

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة جيلالي بونعامة خميس مليانة
Université Djilali Bounaama Khemis Miliana
Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre
Département de: Biologie



Mémoire de fin d'étude
En vue de l'obtention du diplôme de **Master** en
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Biologie
Spécialité: Analyses Biologiques et Biochimiques

Etude de l'activité Antibactérienne des extraits de Pistacia lentiscus

Présenté par :

- ❖ M^{me} BENROKIA Hayat
- ❖ M^{me} AOUAR Khedidja

Soutenu le 02 juillet 2015, Devant le jury :

Présidente :	GHOMARI F.N.	M.A.A	U.K.M
Promotrice :	DAOUDI A.	M.A.A	U.K.M
Examineur :	AOUNE O.	M.A.A	U.K.M
Examineur :	AIT OUAZZOU A.	M.A.A	U.K.M

Année universitaire : 2014/2015

Remerciements

Louange et Gloire à Dieu, Le Tout Puissant, qui nous a permis de mener à bien ce modeste travail.

Nombreux sont qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail. Nos remerciements vont en particulier à :

Mme Daoudi A. notre promotrice, Maitre assistante A à l'Université Djilali Bounaama Khemis Miliana, que nous la remercions vivement pour son soutien, ses conseils précieux et ses critiques qui nous ont aidés au sein du laboratoire.

Mme Ghomari. F.N. Maitre assistante A à l'Université Djilali Bounaama Khemis Miliana, que nous remercions pour nous avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Mr Aoune O. Maitre assistant A à l'Université Djilali Bounaama Khemis Miliana, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mr Ait Ouazzou A. Maitre assistant A à l'Université Djilali Bounaama Khemis Miliana, qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous adressons encore nos remerciements à :

L'ensemble des membres du département de biologie ;

L'ensemble des membres des laboratoires du département de biologie qui ont contribué par leur bonne humeur à créer un cadre de travail agréable.

Que tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce modeste travail, trouvent ici nos sentiments de profonde gratitude et de reconnaissance infinie. Très cordialement.

DÉDICACE

Avec l'aide de dieu, j'ai pu faire se modeste travail que je dédie :

A mes très chers parents, ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.

Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

A mon très cher Mari : Mr Faouzi, reçois à travers ce travail tout mon respect ma gratitude et ma profonde reconnaissance.

Mes frères et sœurs et mes amies oublie qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

Sans oublier tous les professeurs que ce soit de primaire, du moyen, du secondaire, ou de l'enseignement supérieure.

Rhedidja
Rhedidja

DEDICACE

Je dédie ce mémoire :

A mes très chers parents pour leurs amours, leurs sacrifices et leurs Encouragements. Que ce travail soit, pour eux, un faible témoignage de ma profonde affection et tendresse.

A mes frères : Amine et sa femme ABIR

A mes sœurs : Anissa, Alia, Merieme, NESRINE

A mon marie Elhadi et sa famille Aoues et Khatmi

Surtout à mes enfants : Abid EL Madjid, HOUSSEME Eddine et RAOUENE

A tous mes amis et camarades au laboratoire d'université de khemis Miliana.

*Hayet
Hayet*

PAM : Plante aromatique et médicinale

°T : Température

C° : Degré selcus

EEP : Extrait d'éther de pétrole

EDCM : Extrait de dichlorométhane

EMeOH : Extrait methanolique

EAQ : Extrait aqueux

HT : Huile totale

ATCC : American type culture collection

CMI : concentration minimal d'inhibition

MH : Muller Hinton

Liste des tableaux

<u>Tableau 01</u> : classification botanique de <i>P.lentiscus</i> . (Emberger, 1989).....	5
<u>Tableau 02</u> : les composants actifs des PAM: (Iserin, 2001).....	09
<u>Tableau 03</u> : aspect physiologique des extraits étudiés.....	30
<u>Tableau 04</u> : les composants des extraits.....	31
<u>Tableau 05</u> : les observations microscopiques.....	32
<u>Tableau0 6</u> : Diamètre des zones d'inhibition de la croissance bactérienne par les différents extraits bruts étudiés en (mm)	38
<u>Tableau0 7</u> : les résultats des CMI de <i>Pistacia lentiscus</i>	43

Liste des figures

Figure 1 : arbuste de <i>Pistacia lentiscus</i> (Belfadel, 2009).....	5
Figure 2 : feuilles avec fruit. (Belfadel, 2009).....	6
Figure 3 : fruit (détail) (Belfadel, 2009)	6
Figure 4 : mastic de <i>P. lentiscus</i> (Belfadel, 2009).....	7
Figure 5 : Distribution des 11 espèces de <i>Pistacia</i> (Thingshuang <i>et al.</i> , 2008)	7
Figure6 : Aire de répartition de <i>P lentiscus</i> .autour du bassin méditerranéen (Seigue., 1985)	8
Figure 7 : fruits et feuilles secs	19
Figure 8 : Agitation et filtration.....	20
Figure 9 : extraction de l'huile totale.....	21
Figure 10 : cinq extraits de <i>p lentiscus</i>	22
Figure 11 : technique d'aromatogramme.....	25
Figure12 : teste d'antibiogramme.....	27
Figure 13 : Préparation des dilutions.....	27
Figure 14 : Technique de CMI.....	28
Figure 15 : Taux d'humidité.....	28
Figure16 : le rendement des extraits de <i>Pistacia lentiscus</i>	30
Figure 17 : les observations microscopiques des souches utilisées	32
Figure 18 : L'effet extrait méthanolique sur <i>S. blanc</i>	33
Figure 19 : L'effet de l'EMeOH sur les bactéries étudiées.....	34
Figure 20 : L'effet extrait AQ sur <i>P.aeruginosa</i>	35
Figure 21 : L'effet de l'EQ sur les bactéries étudiées.....	35
Figure22 : L'effet extrait EP sur <i>S. aureus</i>	36
Fugure23 : L'effet de l'EEP sur les bactéries étudiées.....	36

<u>Figure24</u> : L'effet extrait EDCM sur <i>S. blanc</i>	37
<u>Figure25</u> : L'effet de l'EDCM sur les bactéries étudiées.....	38
<u>Figure 26</u> : L'effet extrait d'huile totale sur <i>P.aeruginosa</i>	38
<u>Figure 27</u> : L'effet de HT sur les bactéries étudiés.....	39
<u>Figure 28</u> : l'antibiogramme.....	41
<u>Figure 29</u> : La zone d'inhibition des ATB sur les souches étudiées.....	42
<u>Figure 30</u> : Résultat de CMI.....	44
<u>Figure 31</u> : Résultats après quelques jours d'incubation	46

Sommaire

Introduction.....	1
Partie 1 : Etude bibliographique	
Chapitre I: LES PLANTES AROMATIQUES ET MEDICINALES	2
I-1-GENERALITE SUR LES PLANTES AROMATIQUES ET MEDICINALES.....	2
I-1-1-Définition.....	2
I-1-2-Historique.....	2
I-1-3-Technique culturales	3
1-2-ETUDES CARACTERISTIQUES DE <i>Pistacia lentiscus</i>	4
I-2-1-Classification taxonomique :.....	4
1-2-2- Description botanique.....	5
I-2-3-Répartition géographique.....	7
I-2-4-composants actifs des PAM.....	8
Chapitre II : VERTUS THERAPEUTIQUE DES PAM	10
II-1-Phytothérapie des PAM.....	10
II-1-1- La phytothérapie.....	10
II-1-2- Préparation médicinales.....	10
II-1-3- Les activités biologiques des extraits.....	11
II-1-4-Les actifs antibactériens.....	13
II-1-5- La nature de l'activité antibactérienne.....	13
II-1-6-Mode d'action contre les bactéries.....	14
II-2- Effet thérapeutiques de <i>Pistacia lentiscus</i>	14
II-2-1-1 Résine.....	14
II-2-1-2- les Parties aérienne.....	14
II-2-2-3 Racine.....	15
Partie 2 : Etude expérimental	
CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES	17
Partie 1 : Préparation des extrait.....	17
III-1-Matériels.....	17
III-2-Méthodes	18
III-2-1-Séchage de la plante	18
III-2-2- Détermination de la matière sèche et de l'humidité.....	18
III-2-3- Préparation des extraits.....	19
III-1-4-Détermination du rendement	21
Partie02: activité antibactérienne.....	22

III-2-1-1- Matériel biologique.....	22
III-2-2-1-Caractérisation microscopique des souches étudiées.....	23
III-2-2-2-Conservation des souches.....	23
III-2-2-3-Préparation des suspensions bactériennes.....	23
III-2-2-4-Méthodes d'étude de l'activité antibactérienne des extraits végétaux.....	23
CHAPITRE VI : RESULTATS ET DISCUSSIONS	29
1 ^{ère} partie : préparation des extraits.....	29
VI-1-1-Détermination de la teneur en eau.....	29
VI-1-2-caractérisation des extraits.....	29
IV-1-3- Le rendement.....	30
2 ^{ème} partie : activité antibactérienne.....	32
VI-2-1-Caractérisation microscopique des souches étudiées.....	32
VI-2-2-1-Aromatogramme.....	33
VI-2-2-2-Comparaison aux antibiotiques.....	41
VI -2-3-Détermination des CMI.....	43
VI-2-4-Qualification de l'action antibactérienne des extraits étudiés	46
Conclusion et perspectives.....	48
Références bibliographies.....	51
Annexe	

INTRODUCTION

Les plantes médicinales et aromatiques ont été utilisées pendant des siècles pour traiter les maladies humaines. Des extraits de plantes étaient déjà connus et utilisés par différentes civilisations (égyptiens, grecs, chinois etc.) en médecine traditionnelle.

La médecine actuelle remet de plus en plus en honneur les simples plantes médicinales, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques décroît, et l'émergence de microorganismes pathogènes multi-résistants, due à l'usage abusif et inapproprié des antibiotiques, pose actuellement un problème de santé publique particulièrement préoccupant.

La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels, est bien acceptée par l'organisme et souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en accident, spécialement dans les traitements des maladies chroniques, comme l'asthme ou l'arthrite. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se trouvent vers des soins moins agressifs pour l'organisme.

Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme l'activité antibactérienne, demeure une tâche très utile et l'une des plus intéressantes pistes à explorer, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou non connues dans la médecine et les traditions médicinales folkloriques.

C'est dans cette perspective que nous sommes intéressés à étudier une plante poussant à l'état spontané dans notre pays, et qui n'est pas fréquemment employée par la population, dans le but de trouver de nouvelles activités antibactériennes.

Dans ce contexte, notre étude vise deux objectifs :

- ✓ Préparation des extraits végétaux (huiles totales, extraits aqueux et alcooliques) à partir de *Pistacia lentiscus* (feuilles et fruits).
- ✓ Évaluation qualitative et quantitative des propriétés antibactériennes des extraits préparés.

Chapitre I : LES PLANTES AROMATIQUES ET MEDICINALES**I-1- GENERALITE SUR LES PLANTES AROMATIQUES ET MEDICINALES****I-1-1- Définition****I-1-1-1-Plantes médicinales**

Selon la pharmacopée française (1965), une plante médicinale est utilisée entière ou sous forme d'une partie de plante et qui possède des propriétés médicamenteuses. Ces plantes peuvent aussi avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques.

I-1-1-2-Plantes aromatiques

Les plantes aromatiques appartiennent à la fois au domaine des plantes médicinales et des matières premières industrielles d'origine végétale, et constituent des sources de substances naturelles complexes, destinées à apporter des caractères organoleptiques particulier aux aliments (Antonet *al.*, 2005).

I-1-2-Historique

L'histoire des plantes médicinales est très ancienne, elle est liée à celle de l'homme (Baba Aissa, 1999). Depuis la plus haute antiquité, les hommes se sont soignés avec les plantes qu'ils avaient à leur disposition (Iserin, 2001), ce qui leurs a permis d'enrichir ses connaissances des plantes, et même de se spécialiser dans le traitement par les herbes (Baba Aissa, 1999).

Moins de 400 ans avant J-C : Hippocrate, le très célèbre médecin grec considéré comme le père de la médecine occidental actuelle, laisse une somme considérable de données dans le *Corpus Hippocratum* qui traite environ 250 « simple ».

Au cours du 1 siècle : Dioscoride référença 609 drogues végétales dans son ouvrage « *De materia medica* » (Fleurenta, 2007), qui est devenu depuis quelques années « *Pharmacognosie* » (Bruneton, 1999).

Plus tard, en 1635, Louis XIII crée à Paris le célèbre jardin royal des plantes médicinales riches de plus de 2300 espèces végétales (Delaveau, 1983).

C'est au 18^{ème} siècle que les plantes acquièrent leurs identités telles qu'on les connaît aujourd'hui, à savoir un double nom indiquant le genre et l'espèce (Alben, 1996).

Depuis quelques décennies, l'ère du bien-être, la recherche d'une vie saine, le retour aux choses essentielles, à la nature, fait renaitre un enthousiasme certain pour les plantes (Iserin, 2001).

Le travail des chimistes du XIX^{ème} siècle va permettre une identification plus précise des agents actifs des plantes et une meilleure définition de leurs vertus (Kothe, 2007).

I-1-3-Technique culturales

I-1-3-1-Mise en place d'une culture

Un certain nombre de paramètres jouent un rôle capital dans la production des PAM :

- La lumière : chaque plante a ses exigences en matière de qualité de la lumière et de photopériodisme, le plus souvent les PAM préfèrent un ensoleillement direct d'au moins six à huit heures / J (Girre, 1979).
- La température : la T° optimale est décisive pour chaque plante (Anton, 2005) ;
- La fertilisation : d'une manière générale la fertilisation de la culture doit être limitée voire même absente pour les plantes de garrigues sèches (thym, romarin, sarriette) ;
- Le sol : la plupart des herbes aromatiques requièrent un sol riche, meuble, bien drainé et de PH neutre ou légèrement alcalin (Debuigue, 1984).

I-1-3-2-Cueillette

Il convient de respecter certaines règles lors de la cueillette sinon tous les efforts mis en œuvre pourraient être à néant. De plus, certaines parties de la plante doivent être cueillies à des moments précis de l'année (Iserin, 2001).

Les racines sont récoltées de préférence au moment du repos végétatif car à ce moment les substances utiles sont stockées.

Les parties aériennes au moment de la floraison dont la teneur en constituants aromatiques est maximale (Lavergne, 2005), les feuilles sont récoltées juste avant la floraison tandis que les fleurs à leur plein épanouissement ou en bouton (Fleurentin, 2007).

Les graines doivent en général être récoltées lorsqu'elles sont à maturité (Kothe, 2007).

Il est préférable de récolter par temps sec pour faciliter le séchage (Longuefosse, 2006 ; Debuingue, 1984).

I-1-3-3 -Séchage

De nombreuses plantes médicinales ne sont pas destinées à être utilisées immédiatement donc on souhaite les conserver. Le stockage n'est possible que lorsque l'on effectue au préalable certaines procédures sur les plantes cueillies. L'un des procédés les plus fréquents est le séchage des plantes (Kothe, 2007).

Les PAM peuvent être séchées naturellement ou artificiellement, à condition que des mesures adéquates soient prises afin d'éviter la contamination ou l'altération des matières premières au cours du processus. (Lavergne, 1990 ; Bernard, 1983).

I-1-3-4-Conservation

Le stockage doit débuter dès que le séchage est achevé. Il doit se dérouler à l'abri de la lumière, de l'humidité et des variations de température (Christine, 1983), dans des récipients en verre ou en plastique, dans des sachets en papier ou dans des pochons en tissu (Bernard, 1983).

I-2- ETUDES CARACTERISTIQUES DE *Pistacia lentiscus*

I-2-1- Classification taxonomique

Le genre *Pistacia* comporte 11 espèces d'arbre ou d'arbustes de la région méditerranéenne. Les espèces les plus importantes sont : *Pistacia atlantica*, *Pistacia chinensis*, *Pistacia lentiscus*, *Pistacia terebinthus*, *Pistacia vera*, *Pistacia integerrima*, *Pistacia palestina*, *Pistacia khinjuk*.

Nom scientifique : *Pistacia lentiscus*

Noms communs : Tidikth (non Berbère)

Mastik (nom Latin)

Chois Mastic Tree (nom Anglais)

Mastic Baum (nom Allemand)

Appellation local : Darou

La classification botanique de la plante est donnée par le tableau 1

Tableau 1 : Classification botanique de *P.lentiscus*

Règne	Plantae
embranchement	tracheobionta
classe	magnoliopsida
ordre	Sapindales
famille	anacardiaceae
genre	Pistacia L
espèce	Pistacialentiscus

Source : Emberger, (1989).

I-2-2- Description botanique

C'est un arbrisseau de 1 à 3 mètres de hauteur (figure1), courant en sites arides de la région méditerranéenne (de l'Asie, l'Europe, l'Afrique, jusqu'aux Canaries) (Belakhdar, 2003).



Figure1: Arbusto de *Pistacia lentiscus* (Belfadel, 2009).

Les feuilles sont persistantes, paripennées, avec 4 à 10 folioles elliptiques, coriaces et luisantes et le pétiole est nettement ailé (figure2), (Hans, 2007).



Figure 2 : feuilles avec fruits (Belfadel, 2009).

Les fleurs : brunâtres, constituent des denses grappes spiciformes. Elles sont à l'origine de petites drupes rouges, puis noires à maturité, sub globuleuses (Boullard, 2001).

On différencie les fleurs femelles (vert jaunâtre) des fleurs mâles (rouge foncé) grâce à leur couleur. Les fleurs mâles et femelles poussent sur des arbustes différents. Floraison de Mars à Mai (Belfadel, 2009).

Le Fruit : Est une baie globuleuse (de 2 à 3 mm) de diamètre, monosperme, sa couleur est d'abord rouge, et devient brunâtre à sa maturité, qui est complète à l'automne (figure 3).



Figure 3 : fruit (détail) (Belfadel, 2009).

Le Mastic : Si l'on incise le tronc de ce végétal, il s'en écoule un suc résineux nommé Mastic qui, une fois distillé, fournit une essence employée en parfumerie (figure4) (Belfadel, 2009).



Figure 4 : mastic de *P .lentiscus* (Belfadel, 2009).

I-2-3-Répartition géographique

Le pistachier lentisque est très commun dans le bassin méditerranéen (figure5 et 6), il se trouve à l'état sauvage, dans les maquis et les garrigues dans tout type de sols, bien qu'il préfère les terrains siliceux (Polesse, 2010).



Figure 5: Distribution des 11 espèces de *P lentiscue* (Thingshuang *et al.*, (2008).

a = *P. atlantica*, b = *P. chinensis*, c = *P. integerrima*, d = *P. khinjuk*, e = *P. lentiscus*, f = *P. mexicana*, g = *P. palaestina*, h = *P. terebinthus*, i = *P. texana*, j = *P. vera*, k = *P. weinmannifolia*, l = *P. saportae*.

En Algérie, le lentisque se trouve sur tout le long du tell et dans les zones forestières. (More D. et White J., 2005).



Figure 6 : Aire de répartition de *Pistacia lentiscus* autour du bassin méditerranéen (Seigue., 1985).

I-2-4- Composants actifs des PAM

La plupart des espèces végétales qui poussent dans le mode possèdent des vertus thérapeutiques, donc il est indispensable de connaître leur composition pour comprendre comment elles agissent sur l'organisme (Bruneton, 1999). On classe les plantes et leurs effets en fonction de leur principe actif (tableau2).

Tableau 2 : Les composants actifs des PAM

Principe actifs	Exemples de plante
Huile essentielles	La camomille allemande (<i>Moticariarecutito</i>), l'arbre à thé(<i>Melaleucaalternifolia</i>), Pin sylvester(<i>Pinussylvesteris</i>)...etc
Phénols	La gaulthérie (<i>gaultheria precumbens</i>), le thym (<i>Thymus vulgaris</i>)
Tanins	Le chenepédonculé (<i>Quercus robur</i>), acacia (<i>Acacia catchu</i>)
Flavonoides	Le citron (<i>Citrus limon</i>), sarrasin (<i>Fagopirumesculentum</i>), tréfle rouge (<i>Trifolium pratensel</i>)
Couramines	Le mélilot (<i>Melilotusofficinalis</i>), le celeri(<i>Apiumgraveolens</i>)
Principe amers	L'absinthe(<i>Artemisia absinthium</i>),l'aurone(<i>Artemisia abrotanum</i>)
Alcaloides	Groupe très large : la belladone (<i>Atropa belladona</i>), les jusquiames (<i>Hyoscyamusniger</i> et <i>H.falezlez</i>), pavot (<i>papaver somniferum</i>)...etc
Mucilages	L'orme rouge (<i>Lilmusrubra</i>)
Glucosides	
G cardiotoniques	Digitale poupre(<i>Digitalispurpurea</i>), les muguets (<i>cenvallariamagilis</i>)
G cyanogéniques	Cerisier sauvage (<i>Prunus serotina</i>), l'arbitotier(<i>prununsarmeriaca</i>)
Antraquinones	La rubarbe de chine (<i>Rheumpalmatum</i>), le séné (<i>cassia senna</i>)
Saponines	
Stéroïdes	L'igname sauvage (<i>Discoreavillosa</i>)
Triterpénoides	La réglisse (<i>Glycyrrhizaglabra</i>)

Source: Iserin, (2001)

Chapitre II : VERTUS THERAPEUTIQUE DES PAM**II-1-Phytothérapie des PAM****II-1-1-La phytothérapie**

La phytothérapie, science de l'usage des plantes dans la médecine, est commune à toutes les civilisations (Brunton, 2002 ; Bego, 2003).

L'association européenne de coopération scientifique pour la phytothérapie est chargée de l'élaboration des fiches techniques pour chaque plante afin d'harmoniser l'espèce, la partie à employer, le dosage et la délivrance pour chaque pays de l'Union européenne (Abgrall, 1998 ; Lapaz, 2002).

II-1-2-Préparation médicinales

Il existe des techniques variées pour préparer des remèdes avec les PAM.

a- Infusion

Infusion c'est la méthode la plus simple ; elle consiste à verser de l'eau bouillante sur la plante, couvrir et laisser à infuser pendant 5 à 10 minutes, puis le filtrer (Kothe, 2007)

b- Décoction

La décoction c'est le fait d'extraire les principes actifs des morceaux d'écorces ou de racines ; on fait cuire le morceau de la plante dans l'eau chaude pendant plusieurs minutes (10 à 30 minutes) à feu doux, on laisse infuser puis filtrer (Kothe, 2007).

c- Macération

Cette méthode est utilisée pour préserver le plus possible des principes actifs de certaines plantes qui ne supportent pas la chaleur. Elle consiste à recouvrir la plante destinée avec de l'eau froide et la laisser infuser toute une nuit, le liquide obtenu sera utilisé comme une tisane (Kothe, 2007).

d- Cataplasmes

Ce sont des préparations de plante appliquée sur la peau, les cataplasmes calmant les douleurs musculaires et les névralgies, soulagent les entorses et les fractures et permettent d'extraire le plus des paires infectées, des ulcères et des furoncles (Iserin, 2001).

e- Teinture alcoolique

La préparation des teintures alcooliques nécessite l'extraction des principes actifs des plantes par l'utilisation d'alcool ; les teintures ont fréquemment une action plus forte que celle des infusions ou des macérations qui ne contiennent que les éléments actifs solubles des plantes (Kothe, 2007).

f- Inhalation

Ce type de préparation est préconisé pour le traitement des affections des voies respiratoires. Elle consiste à confectionner une infusion avec de l'eau bouillante dans un saladier, Laisser 15 minutes puis recouvrez la tête et le saladier avec une serviette et inhalez la vapeur pendant une dizaine de minutes (Valnet *et al.*, 1978).

II-1-3-Les activités biologiques des extraits

Le rôle physiologique des extraits pour le règne végétal est encore inconnu. Cependant, la diversité moléculaire des métabolites qu'elles contiennent, leur confère des rôles et des propriétés biologiques très variés.

II-1-3-1-Activités anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire a été décrite pour les plantes de *Protium strumosum*, *Protium lewellyni*, *Protium grandifolium* (Siani *et al.*, 1999), et plus récemment, pour les extraits des racines de *Carlina acanthifolia* (Dordevic *et al.*, 2007).

II-1-3-2-Activité anti-oxydante

Certaines huiles essentielles présentent des activités anti-oxydantes et sont utilisées dans le traitement préventif de certains types de cancers. L'huile essentielle, isolée des graines de *Nigella saliva* L, démontre une activité cytotoxique *in vitro* contre différentes lignées cellulaires tumorales. *In vivo*, elle limite la prolifération de métastases hépatiques et retarde la mort des souris ayant développé la tumeur (MBAREK *et al.*, 2007). L'huile essentielle de *Melissa officinalis* s'est, quant à elle, révélée efficace contre des cellules de ligné es cancéreuses humaines, incluant les cellules leucémiques (DE SOUSA *et al.*, 2004).

II-1-3-3- Activité antimicrobienne

De nombreux auteurs ont rapporté que les extraits d'herbes ont des composés chimiques capables d'avoir une activité antimicrobienne (Bousbia, 2004). Les constituants des extraits sont actifs contre une large gamme de bactéries levures et champignons.

a- Activité antifongique

Le pouvoir antifongique des plantes aromatiques a été mis en évidence par de nombreux auteurs contre les moisissures allergisantes (Billerbeck *et al.*, 2002 ; Koba *et al.*, 2004 ; Oussou *et al.*, 2004) et contre les dermaphytes et les champignons pathogènes et opportunistes tels que *Candida albicans* (levure) (Teixeiraduarte, 2005).

b- Activité antivirale

Les virus sont généralement fortement sensibles aux molécules aromatiques des extraits telles que les monoterpénols. De nombreuses pathologies virales sévères traitées avec des extraits ont montrées des améliorations importantes (Schuhmacher et Reichling, 2003).

c- Activité antibactérienne

Les plantes n'ont pas un système immunitaire proprement dit qui peut identifier une infection spécifique, leur propriété antimicrobiennes sont généralement efficaces contre une large gamme de micro-organisme. Ces propriétés sont utiles pour les infections chez les humains (Remmal, 1993; Chami, 2005; Caillet *et al.*, 2006).

La recherche des molécules naturelles aux propriétés antimicrobiennes est d'une grande importance aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine de l'industrie alimentaire. (Bousbia, 2003; Rayour, 2003; Bouhdid, 2009).

II-1-4- Les actifs antibactériens

Les composants avec des structures polyphénoliques comme les flavonoïdes et les tannins étaient fortement actifs contre les microorganismes testés. Les membres de cette famille sont connus pour être, selon la concentration utilisée, soit bactéricides ou bactériostatiques. Les polyphénols entraînent notamment des lésions irréversibles sur les membranes et sont utiles dans les infections bactériennes, virales et parasitaires, quelle que soit leur localisation (Dugo et *al.*, 1998; Dorman, 2000; Chaumont et *al.*, 2001).

Les alcools monoterpénols, viennent immédiatement après les phénols, sont connus pour avoir une action plus bactéricide que bactériostatique. Molécules à large spectre, elles sont utiles dans de nombreuses infections bactériennes, Il agissait comme des agents dénaturants des protéines ou comme des agents déshydratants (Onawunmi, 1984).

Les aldéhydes sont également quelque peu bactéricides. Les plus couramment utilisées sont le néral et le géranial (des citrals), le citronnellal et le cuminal (Inouye, 2001).

II-1-5- La nature de l'activité antibactérienne

Lorsque l'on parle d'activité antibactérienne, on distingue deux sortes d'effets (Hammer, 1999)

- Une activité létale (bactéricide) : c'est la propriété de tuer les bactéries dans des conditions définies.
- Une inhibition de la croissance (bactériostatique) : inhibition momentanée de la multiplication d'une population.

L'activité biologique d'un extrait végétale est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leur effets synergiques (Dorman, 2000).

II-1-6- Mode d'action contre les bactéries

Les extraits possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches bactériennes, elles sont efficaces contre un large spectre de microorganisme pathogène et non pathogène mais d'une manière générale leur action se déroule en trois phase (Dorman, 2000).

- Attaque de la paroi bactérienne par l'extrait végétal, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

II-2- Effet thérapeutiques de *Pistacia lentiscus*

Pistacia lentiscus est connue pour ses propriétés médicinales depuis l'antiquité (Dupont *et al.*, 2004).

II-2-1- Résine

La résine obtenue de *Pistacia lentiscus* est connue par son effet analgésique, antibactérien, antifongique, antioxydant, antithérogénique, expectorant, stimulant, diurétique et spasmolytique (Prichard, 2004). Par conséquent, cliniquement, le mastic est souvent cité comme un remède efficace contre certaines maladies telles que l'asthme, la diarrhée, les infections bactériennes, l'ulcère gastroduodéal et comme un agent antiseptique du système respiratoire (Mekious *et al.*, 1997).

La résine de *Pistacia lentiscus* a été traditionnellement considérée comme un agent anticancéreux, en particulier contre les tumeurs du sein, du foie, de l'estomac, de la rate, et de l'utérus (Dupont *et al.*, 2004).

II-2-2- les Parties aérienne

La partie aérienne de *Pistacia lentiscus*. Est largement utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement de l'hypertension artérielle grâce à ses propriétés diurétiques (Baba Aissa. 2000).

L'huile végétale de fruits de lentisque est utilisée en Algérie contre la bronchite, l'asthme, la sinusite, l'eczéma et les brûlures.

Les feuilles ont pourvue une action anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique, antipyrétique, astringente, hépato protective, expectorante et stimulante. Elles sont également utilisées dans le traitement d'autres maladies telles que l'eczéma, les infections buccales, les diarrhées, les lithiases rénales, la jaunisse, les maux de tête, les maux d'estomac, les ulcères, l'asthme et les problèmes respiratoires (Mekious.1997).

II-2-3- Racine

La décoction des racines séchées est efficace contre l'inflammation gastro-intestinale et d'estomac ainsi que dans le traitement de l'ulcère (Baba Aissa. 2000).

CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES

L'ensemble de ce travail a été effectué au laboratoire de chimie, zoologie et microbiologie du département de biologie de l'université de khemis Miliana. Pendant une durée de 4 mois (février –mai 2015).

1^{ère} Partie : Préparation des extraits**III-1- Matériels****III-1-1- Matériel végétale**

Les échantillons de *Pistacia lentiscus* (feuilles et fruits) on été récolté durant la période allant de 15 à 20 Décembre 2015, dans la région de Tarik Ibn Ziade.

III-1-2-Produits chimiques

- Méthanol
- Ether de pétrole
- Dichlorométhane
- Hexane

III-1-3-Appareillage

- Etuve
- Autoclave
- Réfrigérateur
- Rotavapeur

III-2- Méthodes

III-2-1- Séchage de la plante

Les feuilles et les fruits de *pistacia lentiscus* fraîchement récoltés, lavés. Et séchés à l'ombre dans un endroit sec et aéré. Une fois séchés, ils sont récupérés dans des sacs en papier.

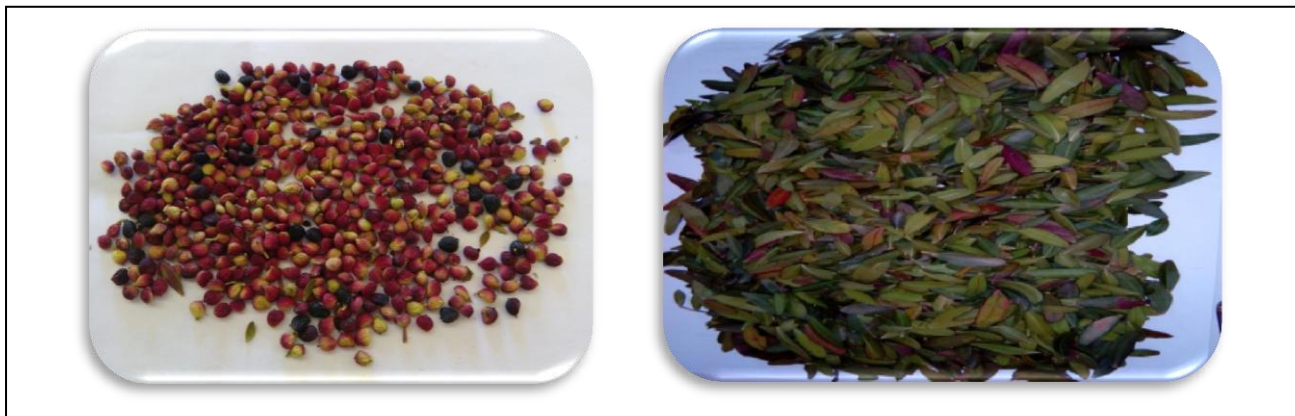


Figure 7 : fruits et feuilles secs.

Notant qu'avant le lavage une certaine quantité de la plante est récupérée pour la mesure du taux d'humidité.

III-2-2- Détermination de la matière sèche et de l'humidité

La matière sèche est déterminée selon la norme NFB51-004 (Bois, 2004) à partir d'une masse E de matière végétale introduite dans un creuset taré, puis séché dans une étuve à 105°C jusqu'à poids constant. Après refroidissement le creuset est pesé. Le taux de matière sèche est :

$$MS(\%) = \frac{S}{E} \times 100$$

S : Masse du creuset taré après dessiccation

E : Masse de la matière végétale

À partir du pourcentage de la matière sèche on peut calculer l'humidité en pourcentages

$$H(\%) = 100\% - MS\%$$

III-2-3- Préparation des extraits

Les feuilles et les fruits séchés de *P. lentiscus* sont broyés à l'aide d'un mixeur jusqu'à leur réduction en poudre. Après broyage du matériel végétal, on a procédé à 3 types d'extraction :

III-2-3-1- Extraction par les solvants organiques à polarité croissante

L'extraction est effectuée par épuisement successive du matériel végétal, en utilisant trois solvants à polarité croissante : éther de pétrole (EP), dichlorométhane (DCM) et méthanol (MeOH), méthode décrite par (Biallo *et al.*, 2004). La quantité de solvant doit être appropriée à la quantité de matière végétale dont nous disposons (dans notre cas, 200 ml de solvant pour 40 g de poudre). L'extraction est effectuée sous agitation continue et à température ambiante durant 24 heures.

Après filtration, le résidu est ensuite concentré par évaporation rotative dans un Rotavapeur puis séché à poids constant (figure8).

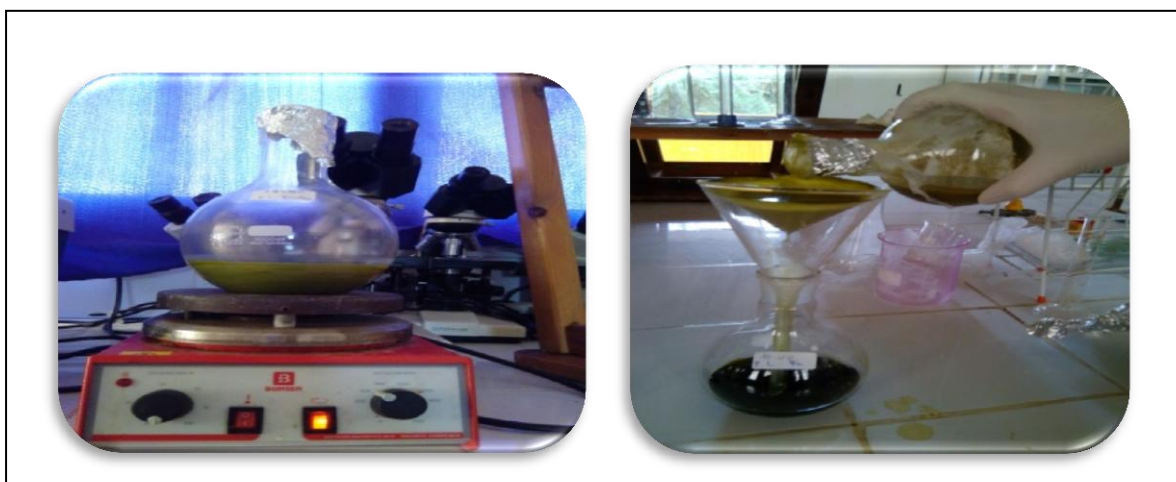


Figure 8 : Agitation et filtration.

III-1-3-2- Extraction aqueuse

La poudre des feuilles et fruits (50g) est mis à macérer à température ambiante dans l'eau distillée (500L) pendant 24 heures. Après décantation du mélange, l'extrait hydrique est récupéré par filtration sur papier Wattman. Ce filtrat obtenu est ensuite séché à 50 C° jusqu'à l'obtention du poids constant (Moroh *et al.*, 2008).

III-1-3-3- Extraction de l'huile totale

L'extrait méthanolique a été mélangé dans une ampoule à décompter avec 50 ml l'hexane. Après agitation deux phases ont été obtenues, une phase aqueuse plus dense qui apparait au-dessous et une phase organique, contenant les lipides (figure 09).



Figure 9 : Extraction de l'huile totale.

La phase organique supérieur a été récupérée, cette étape a été répété 3 fois avec renouvellement du solvant. L'hexane a été par la suite évaporé à 30°C. L'extrait résultant est considéré comme HT de *Pistacia lentiscus*.

La série d'extraction permet d'obtenir cinq extraits pour les feuilles et cinq extraits pour les fruits: un extrait aqueux (AQ), trois extraits organique : extrait éther de pétrole (EP), extrait dichlorométhane (DCM) extrait méthanolique (MeOH) et l'huile totale (HT). Les extraits secs sont stérilisés à l'autoclave à 121C° pendant 15 min puis conservés à 18C° jusqu'à utilisation (figure 10).



Figure 10 : Les cinq extraits de *P. lentiscus*.

III-1-4-Détermination du rendement

Le rendement est la quantité d'extraction obtenue à partir d'une matière végétale, il est exprimé en % par rapport à la matière sèche initialement utilisée (Bssaibis *et al.*, 2009).

$$R (\% \text{ MS}) = \frac{M_1 \times 10^4}{M_0(100 - H\%)}$$

R (% MS) : Rendement en extraits en g/100 de matière sèche

M_1 : Quantité d'extrait récupérée en g

M_0 : Quantité utilisée pour l'extraction exprimée en g

M_s : Matière sèche (MS=100-H%) H : humidité

2^{ème} Partie : Etude de l'activité antibactérienne**III-2-1-Matériel****III-2-1-1- Matériel biologique**

a- Bactéries pathogènes

Les germes qui ont été testés pour déceler l'activité antibactérienne des extraits de *Pistacia lentiscus* sont les suivants :

- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ;
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ;
- ✓ *Staphylococcus bland* ATCC ;
- ✓ *Escherichia coli* ATCC 25922.

Ces souches de collection internationale ATCC (American type culture collection) ont tous été fournis par le laboratoire de microbiologie, université DJILELI BOUNAAMA Khemis Miliana.

b- Les extraits

Nous avons testé l'activité antimicrobienne des extraits (EAQ, EEP, EMOEH, HT, EDCM) qu'on a préparés à partir des feuilles et truites de notre plante.

III-2-1-2- Milieu de culture

- Milieu nutritif (milieu de repiquage)
- Gélose nutritive (milieu de dénombrement)
- Gélose Mueller Hinton (milieu de l'activité antibactérienne)

III-2-1-3- Réactifs chimiques et autres matériel

- Les colorants de coloration de Gram
- Alcool
- Eau physiologique stériles
- Antibiotique (Ampicilline, pénicilline, céfoxaline)

III-2- Méthodes

III-2-1- Caractérisation microscopique des souches étudiées

Après une culture de 24 h à 37 °C sur milieu sélectifs, la pureté des souches est vérifiée par examen microscopique après coloration de Gram.

III-2-2- Conservation des souches

Les souches sont conservées à 5°C dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieu de culture incliné (gélose nutritive).

III-2-3-Préparation des suspensions bactériennes

III-2-3-1- Préparations des prés cultures

Des colonies bien isolées des cultures pures ont été repiquées dans le bouillon nutritif puis incubées à 37 °C pendant 72 h.

III-2-3-2- Préparations des cultures jeunes

A Partir du pré culture, des cultures jeunes de 24 h ont été préparées sur bouillon nutritif puis incubées à 37 °C.

III-2-3-2- Ajustements de la concentration bactérienne

Après la préparation des dilutions décimales ,1ml de chacune des dilutions 10^{-5} , 10^{-7} sont ensemencés en masse dans la gélose nutritive .les boites sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h. Le dénombrement est effectué en utilisation un compteur de colonies (Oussou *et al.*, 2004).

III-2-4- Méthodes d'étude de l'activité antibactérienne des extraits végétaux

Deux méthodes différentes sont employées pour l'évaluation de l'effet antibactérien de différents extraits des feuilles et des fruits de *Pistacia lentiscus* : la méthode de l'aromatogramme a (Essawi et Srour, 2000) qui permet la mise en évidence de l'activité antibactérienne des différents extraits et la méthode des micro dilutions (Billerbeck *et al.*, 2002) qui a pour objectif la détermination des CMI (concentrations minimales inhibitrices) à partir d'une gamme de concentrations de produit dans le milieu de culture .

III-2-4-1- Méthode de diffusion à partir d'un disque solide

La méthode de diffusion à partir d'un disque solide a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antibactérienne de nos extraits et des antibiotiques vis-à-vis des germes pathogènes

A- Aromatogramme

Nous avons utilisé la méthode d'aromatogramme pour mentionner la sensibilité ou la résistance du microorganisme vis-a-vis des extraits testés.

➤ Application

Cette méthode de est préconisée par (carson *et al.*, 1995 et cavallo *et al.*, 2006)

- La gélose M-H, préalablement fondue au bain marie bouillon, a été coulée en boite de pétri à une épaisseur de 4mm.
- Les boite de M-H refroidies sont inoculées (par inondation) de 1ml d'inoculum (10^8 UFC /ml) de façon à recourir toute la surface gélosée.
- Des disques stériles de 6mm de diamètre sont imbibés d'une quantité suffisante (10ml) de chaque extrait (figure11).
- Ces disques imprègnés sont alors déposés sur la gélose et les extraits diffusent radialement des disques dans la gélose en formant un gradient de concentration.
- Les boites sont fermées et incubées à température ambiante pendant 20 min, ensuite dans une étuve à 37 °C /24 h.



Figure 11 : Technique d'aromatogramme.

➤ *Lecture des résultats*

La lecture des résultats se fait par la mesure des \emptyset d'inhibition, qui sont représentés par une auréole claire formée autour de chaque disque. Les résultats sont exprimés selon quatre niveaux d'activité (Pouce *et al.*, 2003)

- (-) souche résistante ($D < 8 \text{ mm}$)
- (+) souche sensible ($9 \text{ mm} \leq D \leq 14 \text{ mm}$)
- (+ +) souche très sensible ($15 \text{ mm} \leq D \leq 19 \text{ mm}$)
- (+ + +) extrêmement sensible ($D > 20 \text{ mm}$)

NB

- ✓ Deux boîtes sont utilisées pour chaque souche.
- ✓ La boîte de contrôle, réalisée pour chaque expérience, est une boîte ensemencée dont le disque déposé au centre de la gélose n'est pas imbibé d'extrait végétal.

B- Test de sensibilité à l'antibiotique

L'étude de l'antibiogramme s'est limitée à tester les antibiotiques les plus utilisés en antibiothérapie tels que : l'Ampicilline, Pénicilline et la Cefoxaline

Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme standard des germes et le comparer avec l'effet de nos extraits bruts. Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est appréciée selon le même protocole qu'avec les disques de papiers imprégnés d'extrait (figure 12).

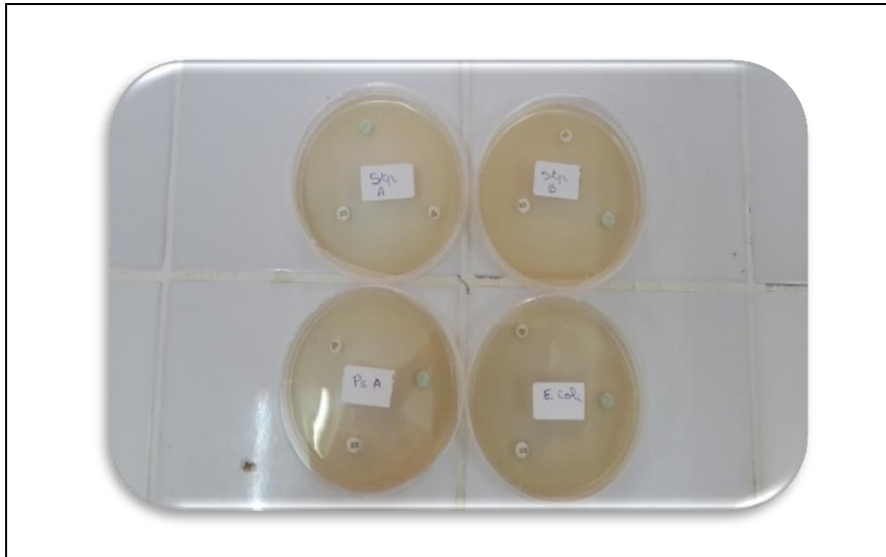


Figure 12 : Test d'antibiogramme

III-2-4-2-Méthode du micro dilutions en milieu solide (détermination des CMI)

Cette méthode permet la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) à partir d'une gamme de concentration d'extrait dans le milieu de culture.

La gamme de concentration des extraits végétaux à été préparé dans tubes à essai par la méthode de dilution de deux en deux ($1/2$, $1/4$, $1/8$, $1/16$, $1/32$) (Ossou *et al.*, 2004), à partir d'une solution mère de concentration initiale de 500 mg /ml. (figure13).



Figure13 : Préparation des dilutions

- 1ml de chaque dilution est alors incorporé à 19 ml de MH maintenu en surfusion ;
- Les mélanges sont immédiatement réparties dans des boîtes de pétri à raison de 20 ml de milieu par boîte. La gamme de concentrations finales ainsi obtenue correspond à 0.25, 0.12, 0.06, 0.03 et 0.015 %
- Après solidification, l'inoculation des géloses contenant l'extrait, est effectuée en surface sous forme de dépôt de 1µl (charge initiale 10^4 UFC /ml) nous avons réalisé les dépôts des quatre bactéries dans une même boîte contenant l'extrait étudié à une concentration donnée.
- Tous les essais sont réalisés deux fois



Figure 14 : Technique de CMI

➤ *Lecture des résultats*

La lecture des résultats s'est faite après incubation à 37°C pendant 24h. La CMI est définie comme la plus petite concentration de produit pour laquelle aucune croissance n'est visible comparativement au témoin sans produit.

La CMI a été déterminée seulement pour les extraits les plus actifs constatés lors de l'étude en milieu solide (dont les diamètres d'inhibition sont $>10\text{mm}$).

CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES

L'ensemble de ce travail a été effectué au laboratoire de chimie, zoologie et microbiologie du département de biologie de l'université de khemis Miliana. Pendant une durée de 4 mois (février –mai 2015).

1^{ère} Partie : Préparation des extraits**III-1- Matériels****III-1-1- Matériel végétale**

Les échantillons de *Pistacia lentiscus* (feuilles et fruits) on été récolté durant la période allant de 15 à 20 Décembre 2015, dans la région de Tarik Ibn Ziade.

III-1-2-Produits chimiques

- Méthanol
- Ether de pétrole
- Dichlorométhane
- Hexane

III-1-3-Appareillage

- Etuve
- Autoclave
- Réfrigérateur
- Rotavapeur

III-2- Méthodes

III-2-1- Séchage de la plante

Les feuilles et les fruits de *pistacia lentiscus* fraîchement récoltés, lavés. Et séchés à l'ombre dans un endroit sec et aéré. Une fois séchés, ils sont récupérés dans des sacs en papier.

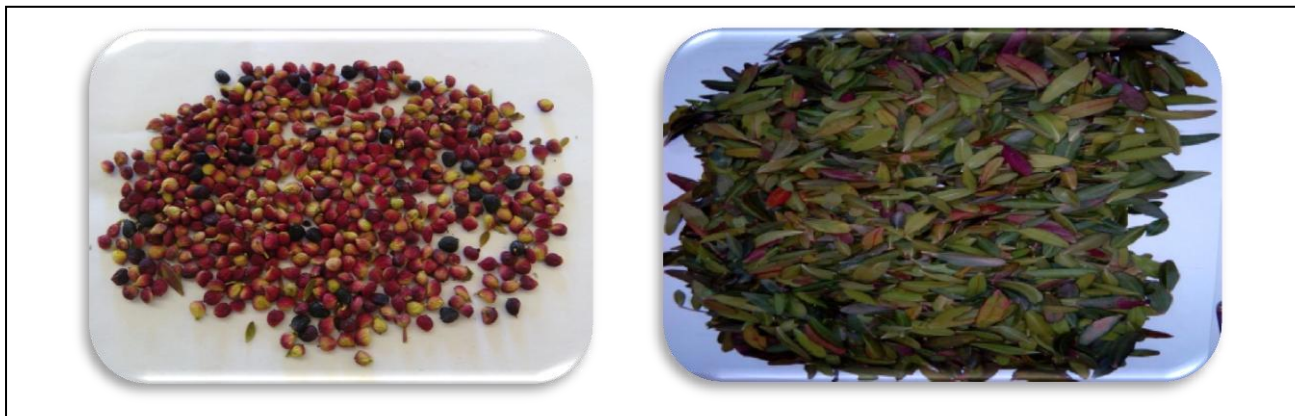


Figure 7 : fruits et feuilles secs.

Notant qu'avant le lavage une certaine quantité de la plante est récupérée pour la mesure du taux d'humidité.

III-2-2- Détermination de la matière sèche et de l'humidité

La matière sèche est déterminée selon la norme NFB51-004 (Bois, 2004) à partir d'une masse E de matière végétale introduite dans un creuset taré, puis séché dans une étuve à 105C° jusqu'à poids constant. Après refroidissement le creuset est pesé. Le taux de matière sèche est :

$$MS(\%) = S/E \times 100$$

S : Masse du creuset taré après dessiccation

E : Masse de la matière végétale

À partir du pourcentage de la matière sèche on peut calculer l'humidité en pourcentages

$$H(\%) = 100\% - MS\%$$

III-2-3- Préparation des extraits

Les feuilles et les fruits séchés de *P. lentiscus* sont broyés à l'aide d'un mixeur jusqu'à leur réduction en poudre. Après broyage du matériel végétal, on a procédé à 3 types d'extraction :

III-2-3-1- Extraction par les solvants organiques à polarité croissante

L'extraction est effectuée par épuisement successive du matériel végétal, en utilisant trois solvants à polarité croissante : éther de pétrole (EP), dichlorométhane (DCM) et méthanol (MeOH), méthode décrite par (Biallo *et al.*, 2004). La quantité de solvant doit être appropriée à la quantité de matière végétale dont nous disposons (dans notre cas, 200 ml de solvant pour 40 g de poudre). L'extraction est effectuée sous agitation continue et à température ambiante durant 24 heures.

Après filtration, le résidu est ensuite concentré par évaporation rotative dans un Rotavapeur puis séché à poids constant (figure8).

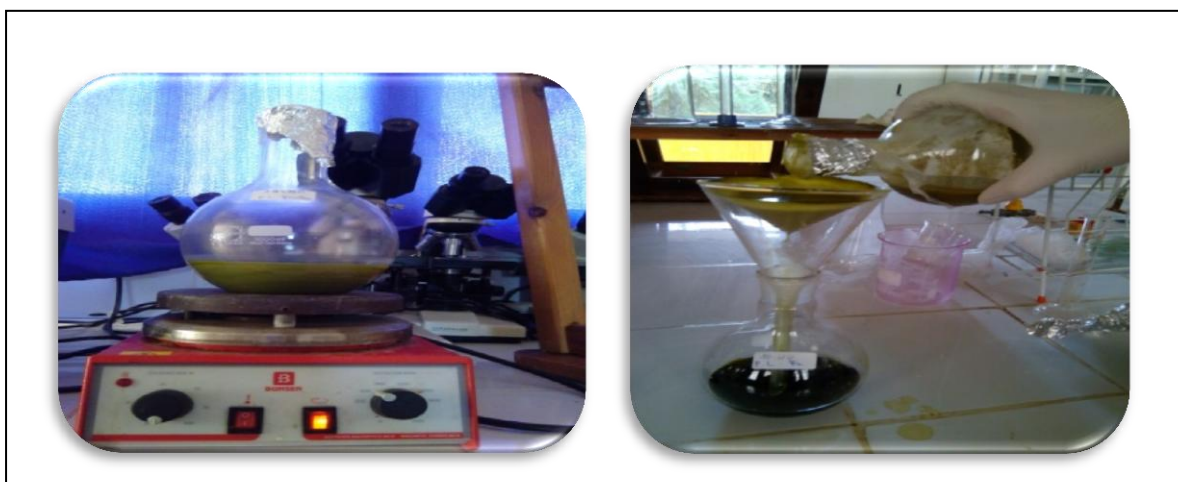


Figure 8 : Agitation et filtration.

III-1-3-2- Extraction aqueuse

La poudre des feuilles et fruits (50g) est mis à macérer à température ambiante dans l'eau distillée (500L) pendant 24 heures. Après décantation du mélange, l'extrait hydrique est récupéré par filtration sur papier Wattman. Ce filtrat obtenu est ensuite séché à 50 C° jusqu'à l'obtention du poids constant (Moroh *et al.*, 2008).

III-1-3-3- Extraction de l'huile totale

L'extrait méthanolique a été mélangé dans une ampoule à décompter avec 50 ml l'hexane. Après agitation deux phases ont été obtenues, une phase aqueuse plus dense qui apparait au-dessous et une phase organique, contenant les lipides (figure 09).



Figure 9 : Extraction de l'huile totale.

La phase organique supérieur a été récupérée, cette étape a été répété 3 fois avec renouvellement du solvant. L'hexane a été par la suite évaporé à 30°C. L'extrait résultant est considéré comme HT de *Pistacia lentiscus*.

La série d'extraction permet d'obtenir cinq extraits pour les feuilles et cinq extraits pour les fruits: un extrait aqueux (AQ), trois extraits organique : extrait éther de pétrole (EP), extrait dichlorométhane (DCM) extrait méthanolique (MeOH) et l'huile totale (HT). Les extraits secs sont stérilisés à l'autoclave à 121C° pendant 15 min puis conservés à 18C° jusqu'à utilisation (figure 10).



Figure 10 : Les cinq extraits de *P. lentiscus*.

III-1-4-Détermination du rendement

Le rendement est la quantité d'extraction obtenue à partir d'une matière végétale, il est exprimé en % par rapport à la matière sèche initialement utilisée (Bssaibis *et al.*, 2009).

$$R (\% \text{ MS}) = \frac{M_1 \times 10^4}{M_0(100 - H\%)}$$

R (% MS) : Rendement en extraits en g/100 de matière sèche

M_1 : Quantité d'extrait récupérée en g

M_0 : Quantité utilisée pour l'extraction exprimée en g

M_s : Matière sèche (MS=100-H%) H : humidité

2^{ème} Partie : Etude de l'activité antibactérienne**III-2-1-Matériel****III-2-1-1- Matériel biologique**

a- Bactéries pathogènes

Les germes qui ont été testés pour déceler l'activité antibactérienne des extraits de *Pistacia lentiscus* sont les suivants :

- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ;
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ;
- ✓ *Staphylococcus bland* ATCC ;
- ✓ *Escherichia coli* ATCC 25922.

Ces souches de collection internationale ATCC (American type culture collection) ont tous été fournis par le laboratoire de microbiologie, université DJILELI BOUNAAMA Khemis Miliana.

b- Les extraits

Nous avons testé l'activité antimicrobienne des extraits (EAQ, EEP, EMOEH, HT, EDCM) qu'on a préparés à partir des feuilles et truites de notre plante.

III-2-1-2- Milieu de culture

- Milieu nutritif (milieu de repiquage)
- Gélose nutritive (milieu de dénombrement)
- Gélose Mueller Hinton (milieu de l'activité antibactérienne)

III-2-1-3- Réactifs chimiques et autres matériel

- Les colorants de coloration de Gram
- Alcool
- Eau physiologique stériles
- Antibiotique (Ampicilline, pénicilline, céfoxaline)

III-2- Méthodes

III-2-1- Caractérisation microscopique des souches étudiées

Après une culture de 24 h à 37 °C sur milieu sélectifs, la pureté des souches est vérifiée par examen microscopique après coloration de Gram.

III-2-2- Conservation des souches

Les souches sont conservées à 5°C dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieu de culture incliné (gélose nutritive).

III-2-3-Préparation des suspensions bactériennes

III-2-3-1- Préparations des prés cultures

Des colonies bien isolées des cultures pures ont été repiquées dans le bouillon nutritif puis incubées à 37 °C pendant 72 h.

III-2-3-2- Préparations des cultures jeunes

A Partir du pré culture, des cultures jeunes de 24 h ont été préparées sur bouillon nutritif puis incubées à 37 °C.

III-2-3-2- Ajustements de la concentration bactérienne

Après la préparation des dilutions décimales ,1ml de chacune des dilutions 10^{-5} , 10^{-7} sont ensemencés en masse dans la gélose nutritive .les boites sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h. Le dénombrement est effectué en utilisation un compteur de colonies (Oussou *et al.*, 2004).

III-2-4- Méthodes d'étude de l'activité antibactérienne des extraits végétaux

Deux méthodes différentes sont employées pour l'évaluation de l'effet antibactérien de différents extraits des feuilles et des fruits de *Pistacia lentiscus* : la méthode de l'aromatogramme a (Essawi et Srour, 2000) qui permet la mise en évidence de l'activité antibactérienne des différents extraits et la méthode des micro dilutions (Billerbeck *et al.*, 2002) qui a pour objectif la détermination des CMI (concentrations minimales inhibitrices) à partir d'une gamme de concentrations de produit dans le milieu de culture .

III-2-4-1- Méthode de diffusion à partir d'un disque solide

La méthode de diffusion à partir d'un disque solide a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antibactérienne de nos extraits et des antibiotiques vis-à-vis des germes pathogènes

A- Aromatogramme

Nous avons utilisé la méthode d'aromatogramme pour mentionner la sensibilité ou la résistance du microorganisme vis-a-vis des extraits testés.

➤ Application

Cette méthode de est préconisée par (carson *et al.*, 1995 et cavallo *et al.*, 2006)

- La gélose M-H, préalablement fondue au bain marie bouillon, a été coulée en boite de pétri à une épaisseur de 4mm.
- Les boite de M-H refroidies sont inoculées (par inondation) de 1ml d'inoculum (10^8 UFC /ml) de façon à recourir toute la surface gélosée.
- Des disques stériles de 6mm de diamètre sont imbibés d'une quantité suffisante (10ml) de chaque extrait (figure11).
- Ces disques imprègnés sont alors déposés sur la gélose et les extraits diffusent radialement des disques dans la gélose en formant un gradient de concentration.
- Les boites sont fermées et incubées à température ambiante pendant 20 min, ensuite dans une étuve à 37 °C /24 h.



Figure 11 : Technique d'aromatogramme.

➤ *Lecture des résultats*

La lecture des résultats se fait par la mesure des \emptyset d'inhibition, qui sont représentés par une auréole claire formée autour de chaque disque. Les résultats sont exprimés selon quatre niveaux d'activité (Pouce *et al.*, 2003)

- (-) souche résistante ($D < 8 \text{ mm}$)
- (+) souche sensible ($9 \text{ mm} \leq D \leq 14 \text{ mm}$)
- (+ +) souche très sensible ($15 \text{ mm} \leq D \leq 19 \text{ mm}$)
- (+ + +) extrêmement sensible ($D > 20 \text{ mm}$)

NB

- ✓ Deux boîtes sont utilisées pour chaque souche.
- ✓ La boîte de contrôle, réalisée pour chaque expérience, est une boîte ensemencée dont le disque déposé au centre de la gélose n'est pas imbibé d'extrait végétal.

B- Test de sensibilité à l'antibiotique

L'étude de l'antibiogramme s'est limitée à tester les antibiotiques les plus utilisés en antibiothérapie tels que : l'Ampicilline, Pénicilline et la Cefoxaline

Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme standard des germes et le comparer avec l'effet de nos extraits bruts. Les disques d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est appréciée selon le même protocole qu'avec les disques de papiers imprégnés d'extrait (figure 12).

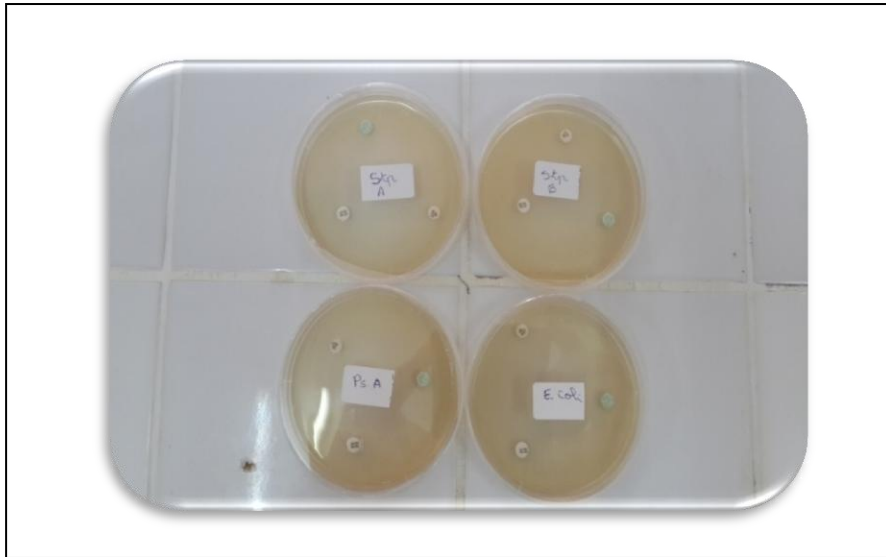


Figure 12 : Test d'antibiogramme

III-2-4-2-Méthode du micro dilutions en milieu solide (détermination des CMI)

Cette méthode permet la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) à partir d'une gamme de concentration d'extrait dans le milieu de culture.

La gamme de concentration des extraits végétaux à été préparé dans tubes à essai par la méthode de dilution de deux en deux ($1/2$, $1/4$, $1/8$, $1/16$, $1/32$) (Ossou *et al.*, 2004), à partir d'une solution mère de concentration initiale de 500 mg /ml. (figure13).



Figure13 : Préparation des dilutions

- 1ml de chaque dilution est alors incorporé à 19 ml de MH maintenu en surfusion ;
- Les mélanges sont immédiatement réparties dans des boîtes de pétri à raison de 20 ml de milieu par boîte. La gamme de concentrations finales ainsi obtenue correspond à 0.25, 0.12, 0.06, 0.03 et 0.015 %
- Après solidification, l'inoculation des géloses contenant l'extrait, est effectuée en surface sous forme de dépôt de 1µl (charge initiale 10^4 UFC /ml) nous avons réalisé les dépôts des quatre bactéries dans une même boîte contenant l'extrait étudié à une concentration donnée.
- Tous les essais sont réalisés deux fois



Figure 14 : Technique de CMI

➤ *Lecture des résultats*

La lecture des résultats s'est faite après incubation à $37C^{\circ}$ pendant 24h. La CMI est définie comme la plus petite concentration de produit pour laquelle aucune croissance n'est visible comparativement au témoin sans produit.

La CMI a été déterminée seulement pour les extraits les plus actifs constatés lors de l'étude en milieu solide (dont les diamètres d'inhibition sont $>10\text{mm}$).

CHAPITRE IV : RESULTATS ET DISCUSSION

1^{ère} partie : Préparation des extraits

IV-1-1- Détermination de la teneur en eau

Les végétaux sont riches en eau, les analyses de nos échantillons ont révélé un taux d'humidité d'environ 54% pour les feuilles et 48% pour les fruits cela signifie que la moitié ou plus de la moitié du poids de la plante fraîche est constituée d'eau.

Nous constatons selon la figure (15) que *Pistacia lentiscus* comprend des proportions approximativement équivalentes en matière sèche et eau.

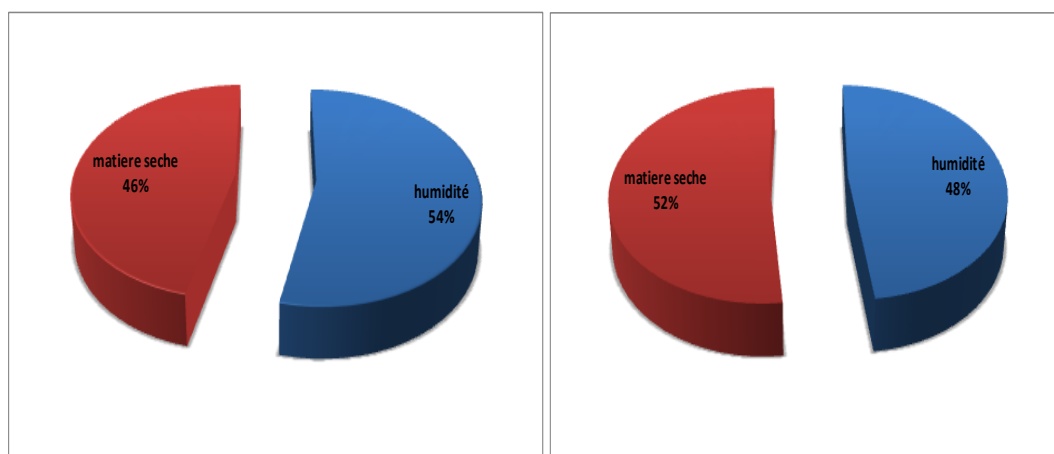


Figure 15 : Taux d'humidité de *Pistacia lentiscus*.

Mohammedi, (2006) a trouver des résultats similaires, ou le taux d'humidité était de 52,03%, 52,5%, 66,2% pour *Citrus ladanifirus*, *Crataegus oxyacantha*, *lavendula stoechas* respectivement.

Selon Kothe, (2007), les plantes aromatiques contiennent des proportions d'eau qui varient entre 43% à 63%, cette variété d'une plante à un autre est premièrement due à l'espèce elle-même puis aux facteurs environnement citant : l'habitat et la saison.

IV-1-2- Caractérisation des extraits

Pour l'obtention des différents extraits de la poudre des feuilles et des fruits de *Pistacia lentiscus*, nous avons réalisé des extractions aqueuses (avec l'eau distillée) et organiques par la méthode de Moroh *et al.*, (2008) (avec des solvants à polarité croissante). Le tableau 3 présente l'aspect physique de nos extraits.

Tableau 3 : Aspect physiologique des extraits étudiés.

	Extrait	aspect
feuille	EP	Pate huileux
	MeOH	pâteux
	DCM	Pate collante
	HT	pâteux
	AQ	poudre
fruit	EP	Pate huileux
	MeOH	pâteux
	DCM	Pate collante
	HT	pâteux
	AQ	poudre

Nos résultats vont dans le même sens que ceux trouvés par Bammou *et al.*, (2015).

IV-1-3- Le rendement

D'après les résultats obtenus (figure 16), l'extrait MeOH de *Pistacia lentiscus* (feuilles et fruits) représente le rendement le plus élevé (12,5%) suivi de l'EAQ des fruits (10,05 %) et des feuilles (9%). l'EEP des feuilles a donné un rendement de (6,7%) et celui des fruits (7,5%), pour l'EDCM, on a enregistré un rendement de (1,25%) pour les feuilles et (2,5%) pour les fruits. L'huile totale a le plus faible rendement avec 1,25 % pour les fruits et 0,5% pour les feuilles.

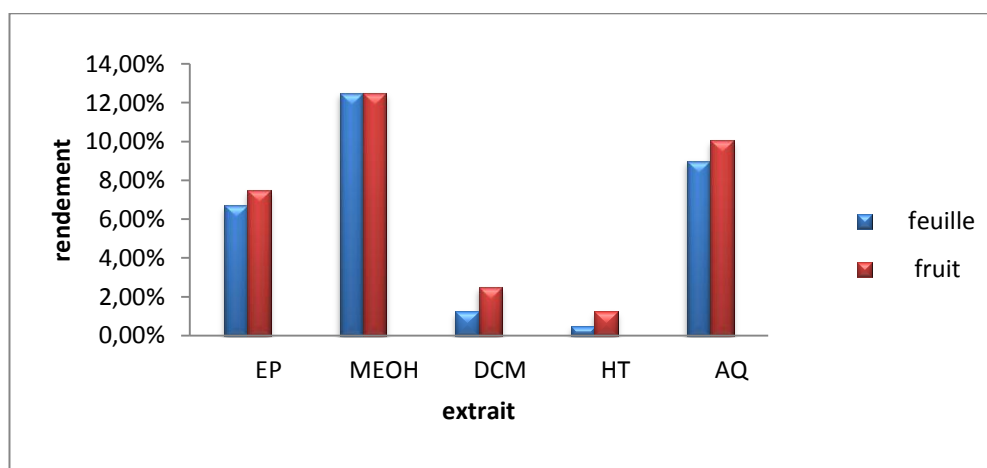


Figure 16 : Le rendement des extraits de *Pistacia lentiscus*

Selon nos résultats on remarque que le rendement des extraits des fruits de *Pistacia lentiscus* est plus élevé par rapport à celui des extraits des feuilles, cela est dû à la richesse des

fruits en composés extractibles. Selon Maha Hafez, (2010) la nature de l'organe utilisé dans l'extraction de l'huile essentielle et les extraits influence son rendement et sa composition chimique.

On constate aussi d'après nos résultats que les extraits polaires (MeOH et AQ) ont donné les proportions les plus élevées en comparaison avec les extraits apolaires (EP et DCM) ; cela peut s'expliquer par le fait que l'EP et le DCM sont des solvants organiques apolaires très volatils et sont juste utilisés pour dégraisser les poudres.

Yekhlef, (2010) a obtenue des résultats similaires avec *Thymus vulgaricus* et *Laurus nobilis* où les proportions des extraits polaires (MeOH et AQ) sont plus élevées par rapport celles des extraits apolaires (EP et DCM). L'extrait MeOH de *Laurus nobilis* représente le rendement le plus élevé (21.94 %) suivi de l'EAQ de *Thymus vulgaris* (20.05 %).

L'utilisation de solvants à polarités différentes permet de séparer les composés de la poudre de feuilles selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction (tableau 04).

Tableau 4 : Les composés que pourraient contenir les différents extraits préparés.

Extraits	Constituants probables
EP	Cires, chlorophylle, lipides, acides gras, stérols, triterpènes, caroténoïdes, huiles essentielles, flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés, coumarines.
DCM	Terpénoïdes, polyphénols aglycones (flavonoïdes, coumarines, tanins, anthracenosides), chlorophylle.
MeOH	Flavonoïdes et coumarines glycosylés, flavonoïdes sulfatés, alcaloïdes, acides aminés, tanins, acides phénoliques, triterpènes et stérols glycosylés.
Aq	Flavonoïdes, aminoacides, terpènes, cires, tanins.

Source : Ciulei, (1981).

IV-2-2- Activité antibactérienne

IV-2-2-1- Aromatogramme

L'activité antibactérienne se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier imprégné d'extrait brut étudié. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. La variation de l'activité antimicrobienne des extraits expliquent les variations de leurs compositions chimiques. Comme cela a été rapporté dans la littérature, nous avons considéré qu'un extrait a une activité antibactérienne si son diamètre d'inhibition est supérieur à 10mm. (Ponce *et al.*, 2003).

Les résultats exprimés dans les figures (18 à 27) montrent que les espèces bactériennes étudiées présentent des degrés de sensibilité différente vis-à-vis des extraits étudiés.

a- L'extrait méthanolique

Selon la figure 18, on remarque que toutes les bactéries sont sensibles à l'EMeOH. La plus grande surface d'inhibition est enregistrée par la souche *P.aeruginosa* (70mm), suivie par *S. aureus* (42mm), *E.coli* (33mm) et *S.blanc* (25mm) avec l'extrait MeOH des feuilles.

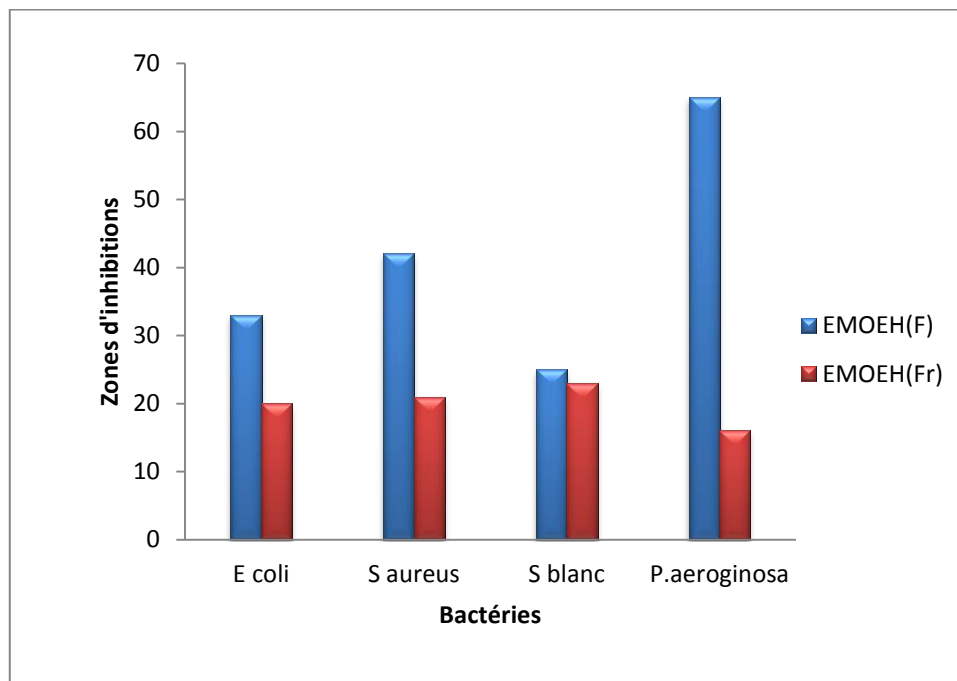


Figure 18 : L'effet de l'EMeOH sur les bactéries étudiées

En revanche, les 4 bactéries sont légèrement moins sensibles à l'extrait MeOH des fruits (figures 18 et 19). Cette activité antibactérienne de l'EMeOH de *Pistacia. Lentiscus* est peut être attribuée principalement à ses constituant majoritaires (flavonoïdes, tanins,...).



Figure 19 : L'effet de l'extrait méthanolique sur *S. blanc*

Meddour *et al.*, (2013) ont indiqués que l'E MeOH de *Capparis spinosa* n'a aucun effet sur les *S. aureus*, *P.aeruginosa* et *E.coli*.

b- L'extrait Aqueux

Les activités les plus élevées de l'E AQ des feuilles ont été remarquées avec *P. aeruginosa* (figure 20) et *S. blanc* dont les valeurs moyennes des auréoles d'inhibition sont respectivement 70 et 29 mm (figure 21).

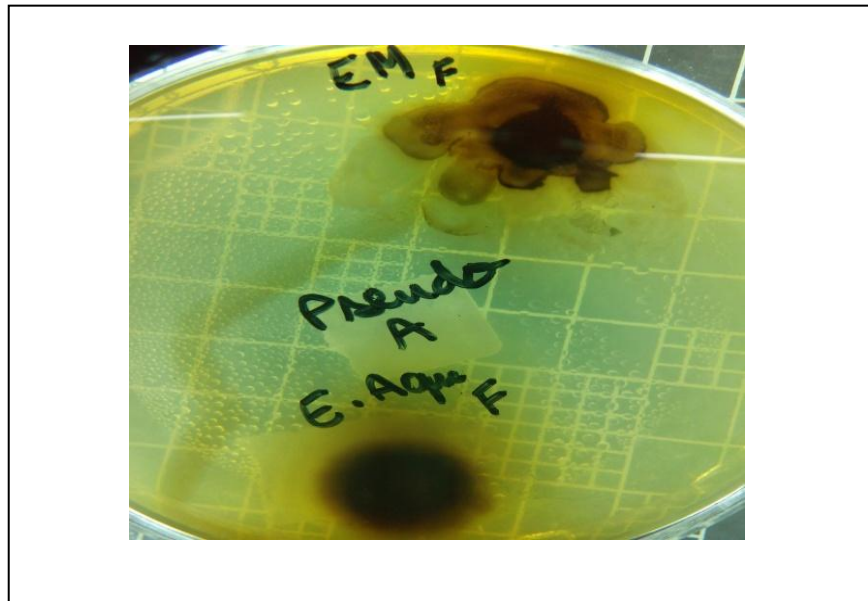


Figure 20 : L'effet de l'extrait Aqueux sur *P. aeruginosa*

Une activité modérée est enregistrée avec les deux autres souches pour l'EAq des feuilles. Les diamètres des zones d'inhibition n'ont pas dépassé les 20mm.

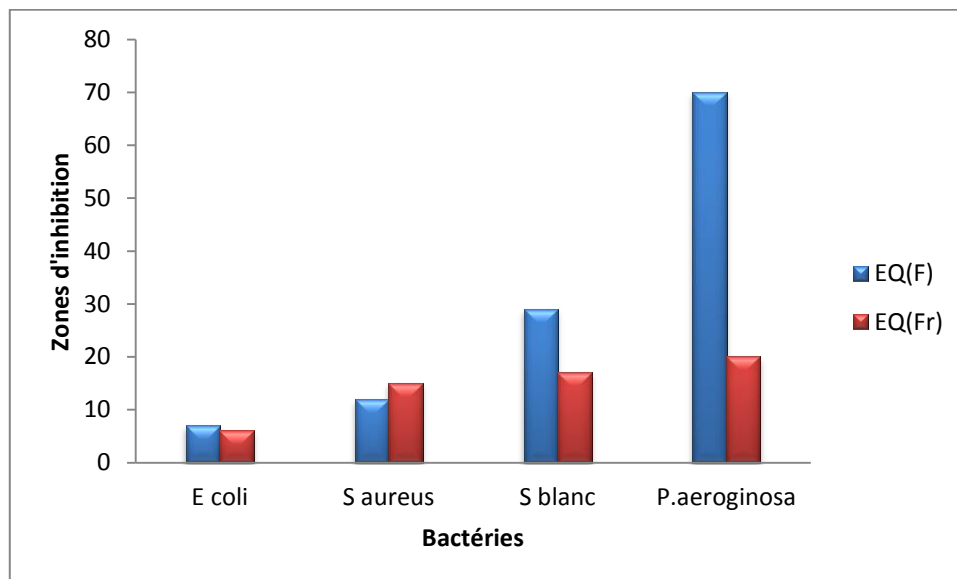


Figure 21 : L'effet de l'EAq sur les bactéries étudiées.

On peut supposer que l'activité inhibitrice de l'EAq de *Pistacia lentiscus* est due à la présence des flavonoïdes, des tanins et des terpènes.

Selon Tahiri, (2008) l'extrait aqueux des feuilles de *P. lentiscus* est actif sur *S. aureus* avec des zones d'inhibition de 35mm.

c- L'extrait d'Ether de pétrole

Le pouvoir antibactérien de l'EEP des feuilles le plus avéré a été observé avec *P.aeruginosa* dont le diamètre de la zone d'inhibition est de 65mm (figure 22). Les autres souches se comportent différemment avec des diamètres compris entre 17mm et 22mm (figure 23). Pour l'extrait EP des fruits a présenté une activité moindre que celle des feuilles dont le diamètre des zones d'inhibition est compris entre 0 et 23mm.

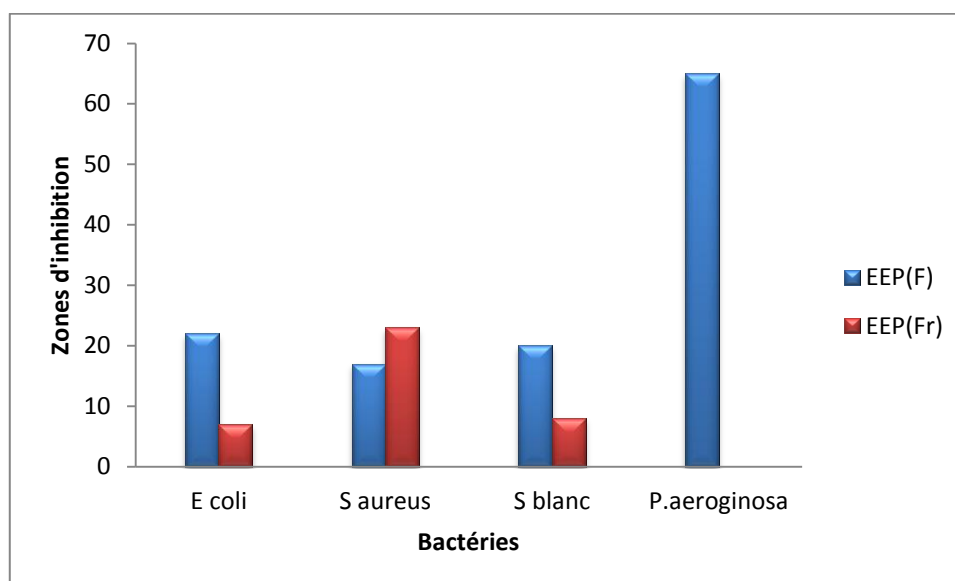


Figure 22 : L'effet de l'EEP sur les bactéries étudiées.

Le pouvoir antibactérien enregistré avec l'EEP de *Pistacia lentiscus* peut être expliqué par la présence des huiles essentielles, les flavonoïdes hautement méthoxylés et les triterpènes.

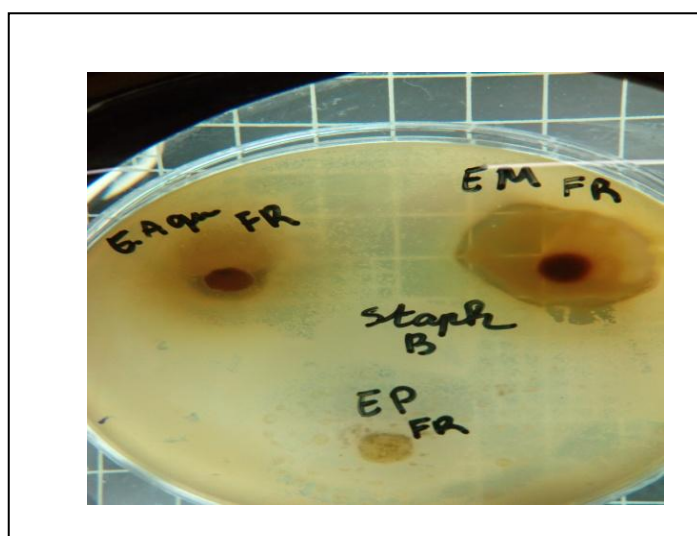


Figure 23 : L'effet de l'extrait EP sur *S. aureus*

Bammou *et al*, (2015) ont étudié le pouvoir antibactérien des extraits de *Pistacia lentiscus* et selon leurs résultats, ils ont enregistré que l'EEP semble le plus inactif sur toutes les souches testées.

Par contre, Yekhlif, (2010) a enregistré que Les extraits EP de *Thymus vulgaricus* et *Laurus nobilis* ont une activité antibactérienne remarquable sur les bactéries étudiées.

d- L'extrait DCM

L'EDCM de *Pistacia lentiscus* a présenté une activité un peu moindre par rapport aux autres extraits. *P.aeruginosa* se révéla la plus sensible avec des diamètres de 60mm pour EDCM de feuilles et de 55mm pour l'EDCM des fruits (figure 24). Une activité faible est enregistrée avec les trois autres souches pour lesquelles les diamètres des zones d'inhibition n'ont pas dépassé les 11mm (figure 25).

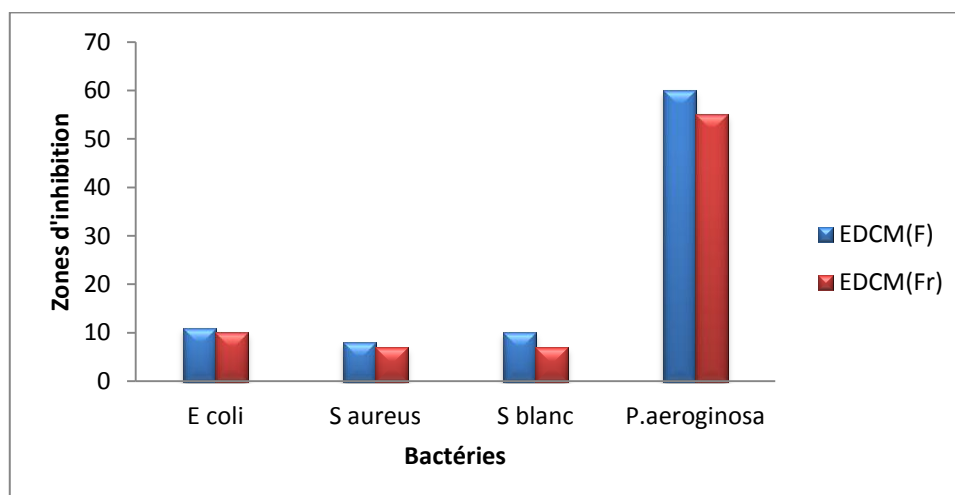


Figure 24: L'effet de l'EDCM sur les bactéries étudiées

La faible activité antibactérienne de l'EDCM peut s'expliquer par leur teneur faible en flavonoïdes.

Nos résultats vont dans le même sens que ceux trouvés par Meddour *et al*, (2013) qui ont montré que l'EDCM de *Capparis spinosa* a une faible activité antibactérienne sur *S. aureus* et *E. coli* avec des diamètres d'inhibition de 11,6mm et 09,5mm respectivement.



Figure 25 : L'effet de l'extrait EDCM sur *S. blanc*

e- L'huile totale

Les activités les plus élevées de l'HT de (fruits et feuilles) de *Pistacia lentiscus* ont été enregistrées avec *P. aeruginosa* (70mm) (figure 26). Les autres souches sont largement moins sensibles à cette HT (figure 27).

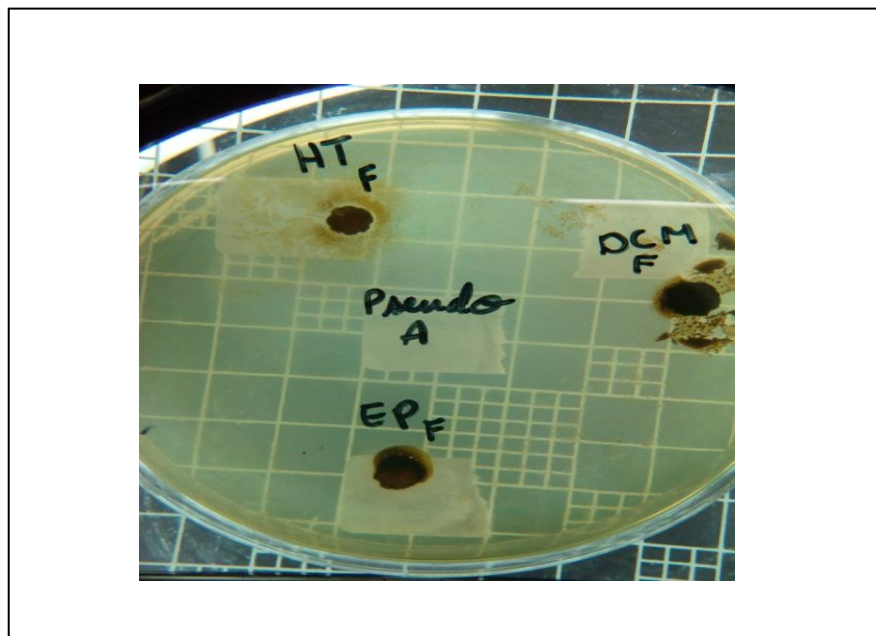


Figure 26 : L'effet de l'huile totale des feuilles sur *P. aeruginosa*.

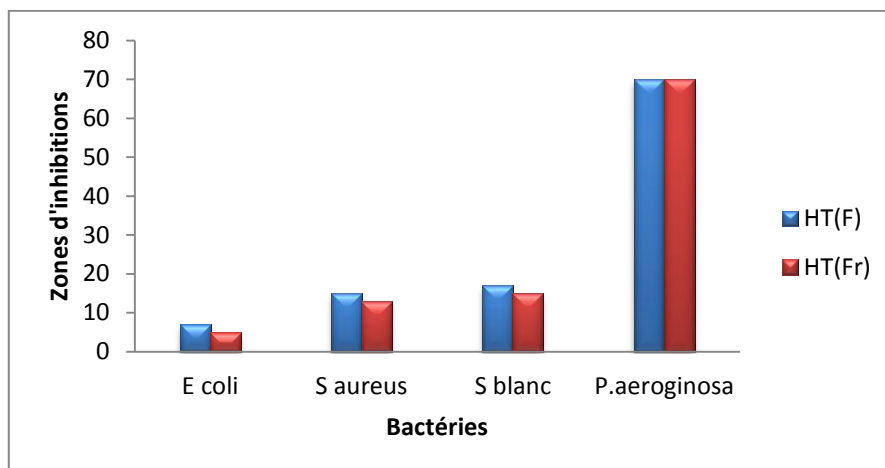


Figure 27 : L'effet de HT sur les bactéries étudiés.

Plusieurs études ont signalé que l'huile essentielle des parties aériennes (feuilles et fruits) de *Pistacia lentiscus* possède des propriétés antifongiques et antibactériennes appréciables (Bonsignore et al. 1998 ; Kordali et al. 2003 Gardeli et al. 2008).

Les résultats du test de sensibilité bactérienne aux extraits (aromatogramme) sont regroupés dans le tableau 4 .

Tableau 4 : Diamètre des zones d'inhibition de la croissance bactérienne par les différents extraits bruts étudiés en (mm).

Partie de la plante	Extrait	<i>E coli</i>	<i>S aureus</i>	<i>S blanc</i>	<i>P.aeruginosa</i>
feuilles	EMeOH	33	42	25	65
	EEP	22	17	20	65
	EDCM	11	08	10	60
	EAQ	07	12	29	70
	HT	07	15	17	70
fruits	EMeOH	20	21	23	16
	EEP	07	23	08	00
	EDCM	10	07	07	55
	EAQ	06	15	17	20
	HT	05	13	15	70

Tous les extraits ont réagit positivement au moins sur une des souches microbiennes testées, ce qui confirme que la plante de *pistacia lentiscus* est douée de propriété antibactérienne très appréciées.

L'activité antibactérienne des extraits de plantes est due aux différents agents chimiques présent dans ces extraits, y compris les huiles essentielles, les flavonoïdes, les tannins et les triterpénoïdes ainsi que d'autres composés de nature phénolique ou groupes hydroxyle libre, qui sont classifiés comme composés antibiotiques très actifs (Rojas *et al.* 1992 ; Marjori, 1999). La variation de la composition chimique explique donc les variations observées dans l'activité antibactérienne des extraits d'une même plante ou de plantes différentes.

L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différents composés de l'origine de cet extrait (Essawi et Srour, 2000). D'après le tableau 4 on remarque que les extraits des feuilles sont plus efficaces que celles des feuilles possèdent une activité anti-bactérienne remarquable en plus d'une activité anti inflammatoire, antifongique et antipyrétique (Villar et al. 1987 ; Magiastis et al. 1999; Janakat et Al meir, 2002 ; Kordali et al 2003 ; Paraschos et al, 2007).

Une étude menée par Bammou *et al.*, (2015) sur l'activité antibactérienne de *Pistacia lentiscus* indique que les extraits des feuilles n'ont aucune effet sur *E.coli* et *Klebsiella pneumoniae*, par contre *S.aureus* et *Proteus mirabilis* laissent voir une certaine sensibilité. L'effet le plus important étant obtenu avec extrait méthanolique sur *S. aureus* (28mm).

Aussi contrairement aux extraits fractionnés et à l'huile essentielle, les extraits bruts de *Pistacia lentiscus* sont les seuls à avoir montré un effet inhibiteur sur *P.mirabilis* (27mm).

Daoudi et Mohamed keriaty, (2009) ont enregistré une activité antibactérienne remarquable avec les EAq et alcoolique de *L.camara*, *L.nobilis* et *M.puligium* avec des zones de 37mm sur *K. pneumoniae*, *S. aureus* (19mm), *Pseudomonas aeruginosa* (27mm) et *E.coli* (39mm).

Les flavonoïdes, les triterpénoïdes et les tanins ainsi que d'autres composés de nature phénolique ou groupes hydroxyle libres, sont classés comme composés antibiotiques très actifs (Rojas *et al.*, 1992 ; Marjorie, 1999).

Les polyphénols notamment les flavonoides et les tanins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes.

IV-2-2-2-Comparaison aux antibiotiques

La comparaison quantitative et qualitative des résultats de l'extrait et des antibiotiques est difficile, car la nature de l'activité et la composition des molécules ne sont pas comparables (biribi, 2002). On peut tous de même risquer à une comparaison globale de l'activité des ATB avec celle des extraits végétaux. Les moyennes des diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques utilisés sur les quatre souches cibles sont représentées dans la figure 28.

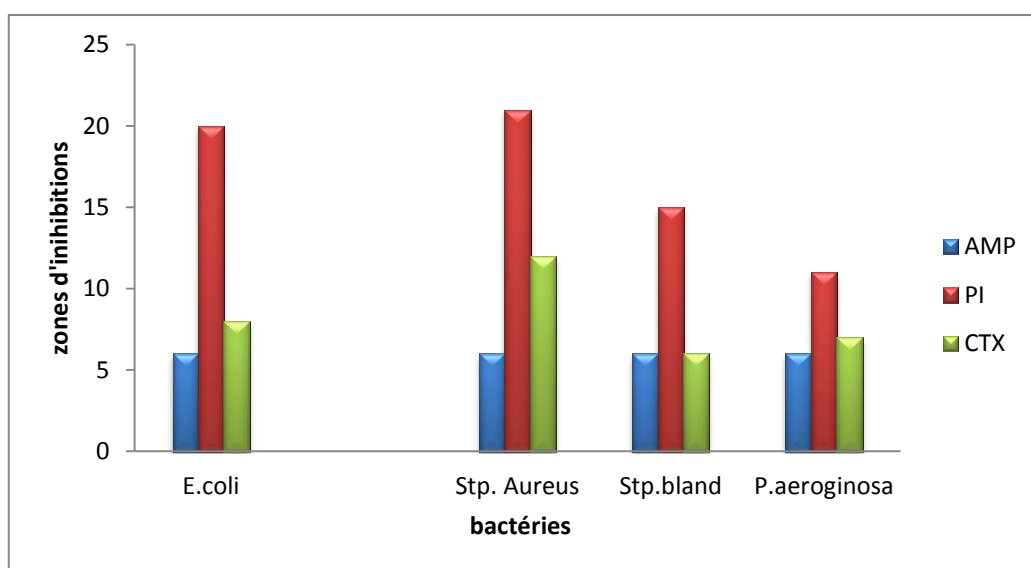


Figure 28 : Les zones d'inhibition des ATB sur les souches étudiées

On observe que les différentes souches de bactéries étudiées réagissent différemment aux antibiotiques testés (figure 29). Parmi les souches étudiées *P. aeruginosa* se révèle multi-résistante.

Pour les extraits des feuilles, l'activité antibactérienne est supérieure à celle des antibiotiques, avec primauté notable concernant la souche *P. aeruginosa*.

Ces extraits sont globalement meilleurs que les ATB testés sauf quelques exceptions : l'EAQ et HT sur *E. coli* et l'EDCM sur *S. aureus*.

Les extraits des fruits de *P. lentiscus* ont une activité majeure par rapport à l'Ampicilline et la Cefoxaline pour l'ensemble des bactéries sauf *E. coli* avec l'EAQ et HT, et *P. aeruginosa* avec l'EEP. De même, ils exercent une activité plus ou moins semblable à celle de la Pénicilline avec une supériorité concernant *P. aeruginosa* et une infériorité pour *E. coli*.

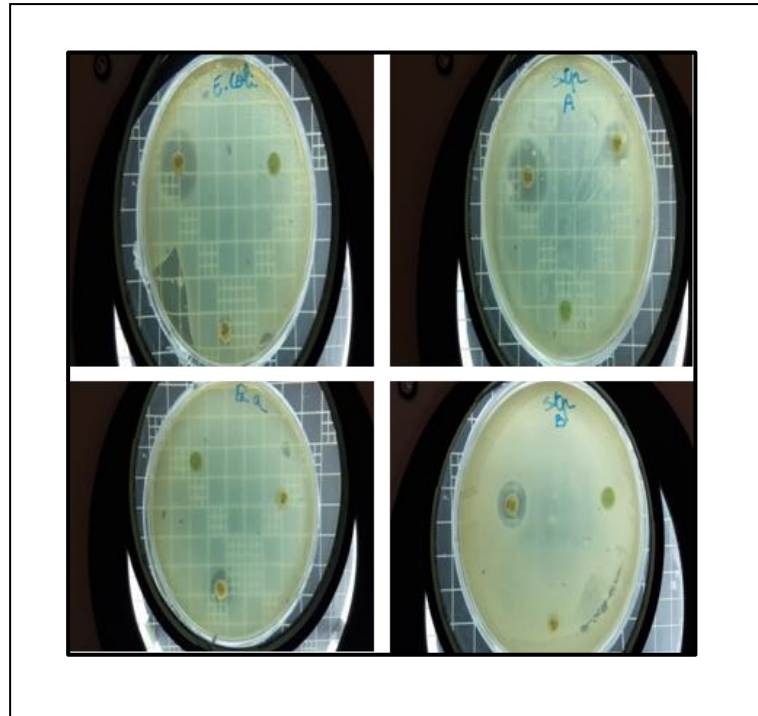


Figure 29 : Les résultats de l'antibiogramme

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par Daoudi et Mohamed keriaty, (2009) qui ont enregistré une bonne activité antibactérienne avec l'huile essentielle de *L.camara*. Cette dernière est globalement meilleure que la pénicilline et l'ampicilline pour *E.coli* (50mm), *S.aureus* (45mm) et *K. pneumoniae* (48mm). Les d'inhibition de la pénicilline et l'ampicilline pour ces trois souches n'ont pas dépassés (30mm).

Mohammdi, (2006) indique que la plupart des souches bactériennes on montre une résistance vis- à-vis les ATB. Les résultats de l'antibiogramme pour *K. pneumoniae*, *S.aureus*, et *E.coli* sont respectivement 12mm, 14mm, et 15mm. Ces zones sont trouvées avec le cortimoxazole.

L'accroissement des infections bactériennes, notamment celles qui sont dues au développement des souches résistantes au médicament utilisé soulignent la nécessité de la découverte de nouveaux agents antibactériens (Gloedani et Kaloustian, 2006).

VI -2-3- Détermination des CMI

Les résultats sur le **tableau 6** indiquent les valeurs des CMI de nos extraits les plus actifs constatés lors de l'étude en milieu solide.

Tableau 6 : les résultats des CMI des extraits de *Pistacia lentiscus*.

Partie de la Plante	extrait	Dilution (mg/ml)	<i>E. coli</i>	<i>Stp. a</i>	<i>Stp .b</i>	<i>Ps .au</i>
Feuilles	MOEH	0,25	-	-	-	-
		0,16	-	-	+	-
		0,06	+	-	+	-
		0,0 3	+	+	+	+
		0,015	+	+	+	+
	EP	0,25	-	-	+	-
		0,16	+	+	+	-
		0,06	+	+	+	-
		0,0 3	+	+	+	+
		0,015	+	+	+	+
	AQ	0,25	/	+	+	-
		0,16		+	+	-
		0,06		+	+	-
		0,0 3		+	+	+
		0,015		+	+	+
Fruits	MOEH	0,25	-	-	-	-
		0,16	+	+	+	-
		0,06	+	+	+	+
		0,0 3	+	+	+	+
		0,015	+	+	+	+
	EP	0,25	/	+	/	/
		0,16		+		
		0,06		+		
		0,0 3		+		
		0,015		+		

Symboles : + : croissance

- : Inhibition de la croissance

Les analyses des résultats montrent que les extraits de *Pistacia lentiscus* présente une activité antibactérienne acceptable. En effet, pour les quatre souches étudiées, la gamme des CMI de nos extraits varie de 0.5 à 0.06 $\mu\text{g/ml}$.

Ainsi, les bactéries n'ont montré aucune croissance en présence des solutions mères des extraits. Cette concentration est donc inhibitrice pour l'ensemble des souches.

Selon le tableau et la figure 30, on remarque que l'extrait MeOH des feuilles de *Pistacia lentiscus* possède une très bonne activité ou *P. aeruginosa* et *S. aureus* semble être les plus sensibles (CMI=0,06mg/ml) suivi de *E. coli* avec une CMI de 0,12mg/ml, l'activité est d'un niveau intermédiaire vis-à-vis de *S. blanc* (CMI=0,25mg/ml).

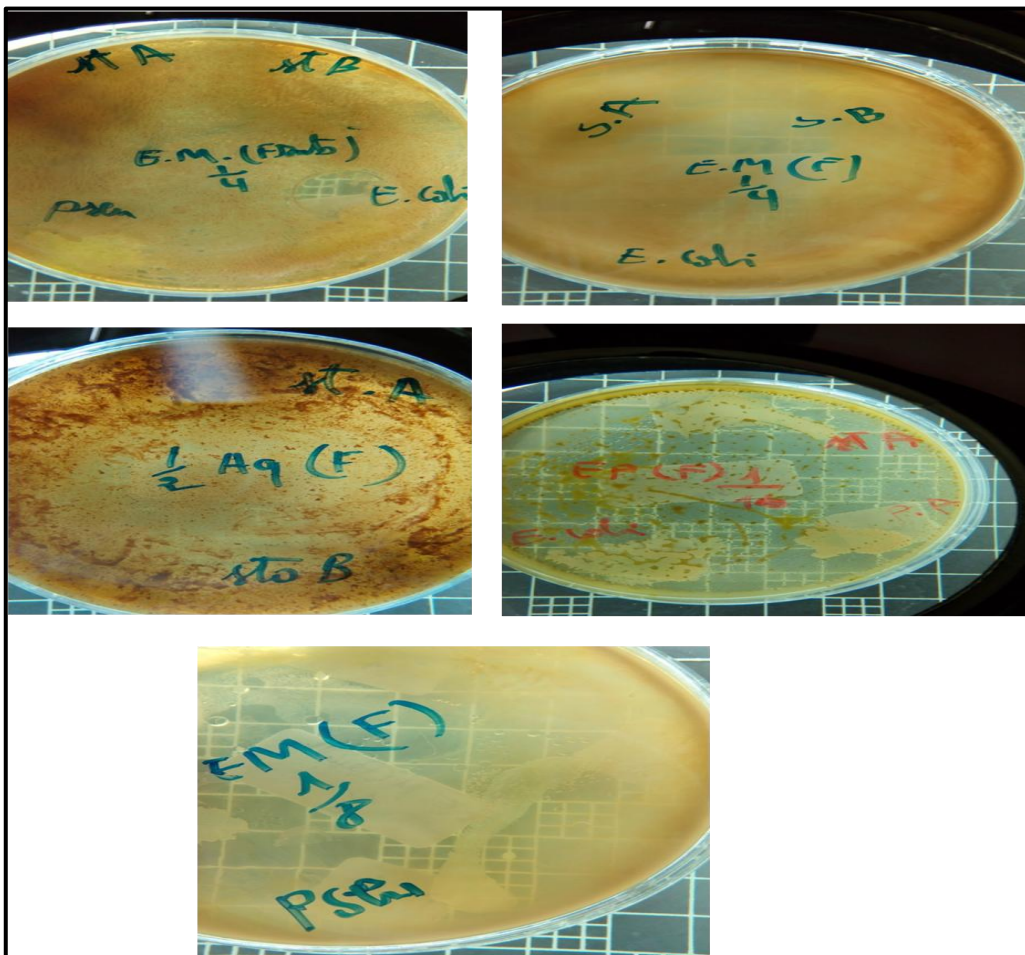


Figure 30 : Résultats des CMI.

Les données des CMI estimées par Yekhlef, (2012) que les souches *S. aureus* et *E.coli* sont inhibées à des concentrations plus élevée d'E.MeOH de *Thymus vulgaris* (0,13µg/ml et 0,25µg/ml) respectivement.

Les résultats que nous avons obtenus avec l'EEP et EAq des feuilles et EMeOH des fruits (tableau et figure) ont montré que ces derniers sont avérée moyennement efficaces.

Une forte activité est enregistrée avec *P.aeruginosa* qui est inhibée à partir de 0,06 mg/ml.

De Billerbek *et al.*, (2002) ont apprécié des valeurs de CMI d'une gamme d'extraits végétaux vis-à-vis d'une souche *E.coli*. Ils ont trouvé que l'effet inhibiteur a commencé à partir de la concentration 0,5% sur les quartes souches, l'EEP des fruits de *P.lentiscus* (figure) possède un faible pouvoir d'inhibiteur puisque l'inhibition de la croissance a été constaté avec une forte concentration (0,5%).

Une étude menée par yekhlef, (2010) montre que l'*E.coli* et *S.typhimirium* sont insensible à l'action de l'extrait EP de *L.nobilis*, et peu sensible à l'action de celui de *Thymus vulgaris* (CMI=2500µg/ml).

Le degré de sensibilité des bactéries testées vis-à-vis d'un même extrait végétal est supposé varie selon le Gram.

Selon nos résultats, *P.aeruginosa* est la souche la plus sensible à la plupart des extraits étudiés.

Zaika (1988), et Ali Shtayeh *et al.*, (1988) ont affirmé que les bactéries à Gram⁺ sont plus résistantes aux extraits végétaux que les bactéries à Gram⁻.

D'autre résultats sont confirmés par de nombreuses expériences (Cosentino et Tuberoso, 1999, De-Billerbeck, 2002) ayant montre que les bactéries à Gram⁻ sont plus résistant aux extraits végétaux que les bactéries à Gram⁺.

Ces affirmation n'ont cependant pas été confirmées par d'autre travaux, la susceptibilité des bactéries est en effet indépendante du Gram (Dorman et Deans, 2000), on dépend des extraits utilisées (Dean et Ritchie, 1987). Nos résultats pour les autre espèces (*E. coli*, *S. aureus* et *S. blanc*) corroborent cette dernière affirmation.

VI-2-4-Qualification de l'action antibactérienne des extraits étudiés

Les résultats présentés dans la figure 31 montrent qu'au sein des boîtes aucune nouvelle colonie n'est développée. Les boîtes restent totalement translucides, même après plusieurs jours d'incubation. Un prélèvement sur la surface de la gélose ne montre aucun développement lorsqu'il est repiqué. Nos en déduisons que la zone est stérile et que l'effet pour ces huiles essentielles est bactéricides.

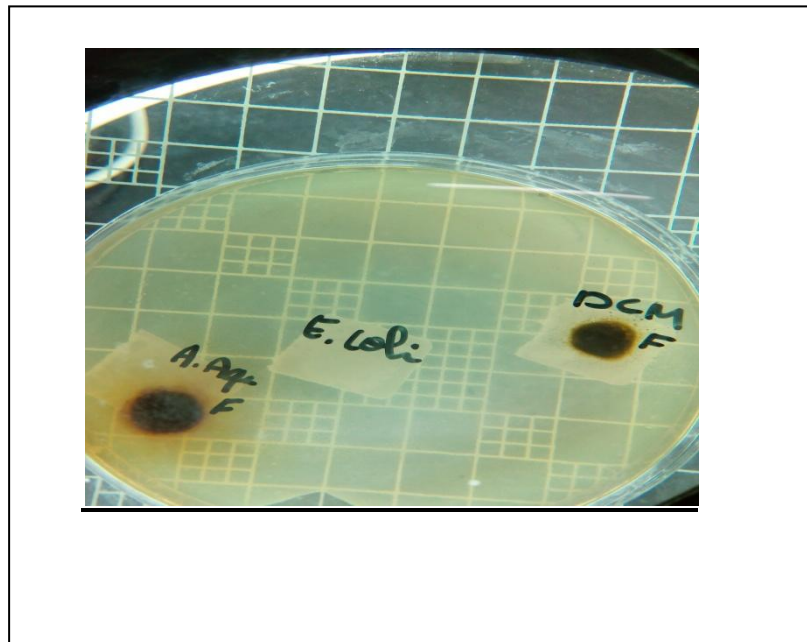


Figure 31 : Résultats après quelques jours d'incubation.

CONCLUSION

Les plantes médicinales constituent une source de nouvelle molécule à activité antibactérienne économique accessibles pour faire face à l'apparition de phénomène de résistance des germes aux antibiotiques. A ce propre. Nous nous sommes intéressés à l'étude des propriétés microbiologique de quelques substance de la flore algérienne.

La préparation des extraits aqueux et alcooliques de *Pistacia lentiscus* est réalisée suivant une décoction et une macération le plus fort rendement a été obtenue avec la fraction polaire (EMeOH et AQ) des feuilles est des fruits avec des pourcentages allant de 9 à 12%, suivi de l'EEP et l'EDCM (7,5%). HT a donnée le plus faible rendement avec (0,5%) pour les feuilles et (1,25 %) pour les fruits.

D'autre part, pour l'étude microbiologique, la méthode de l'aromatogramme donne de très bons résultats et montre que les bactéries testés sont toutes sensibles aux extraits de *Pistacia lentiscus* donnant ainsi des zones d'inhibitions pareilles ou supérieures à celles engendrées par les antibiotiques.

D'une façon générale, la plus part de nos extraits ont une activité antibactérienne qui varie d'une souche a une autre. Cette activité peut être importante ou faible selon la concentration et la quantité de nos échantillons or .chacune de ces bactéries est caractérisée par une CMI d'extrait végétale propre à elle.

Partant des résultats obtenus avec les différentes méthodes employées, l'EMeOH des feuilles présente l'activité la plus puissante quoique celles que montrent les autres extraits ne soient pas négligeables.

Au bout de cette étude, nous retiendrons que les extraits biologiques de notre plant exerce un fort effet bactéricide sur les souches étudiées et pourrait par conséquent être utilisé dans le traitement des maladies infectieuses.

PERSPECTIVE

Comme perspective, nous suggérons des études complémentaires afin :

- D'approfondir l'investigation photochimiques et biologiques sur cette plante afin d'isoler les molécules responsable des activités observées, ce qui permettra d'élargir l'arsenal thérapeutique des médicaments à base de plantes.
- De déterminer d'autres activités biologiques de la plante étudiée (l'activité anti-inflammatoire, antioxydant, antifongique).

ANNEXE

ANNEXE n°01 : MILIEU DE CULTURE

Tableau1 : Les composants de milieu de culture

Milieu de culture	Constituant	Quantité
Bouillon nutritif	Extrait de viande	05g
	Peptone	10g
	Chlorure de sodium	05g
Muller Hinton	Extrait de viandes	03g
	Hydrolisation acide de caseine	17,5g
	Agar	16g
Gélose nutritive	Extrait de viande	05g
	Peptone	10g
	Chlorure de sodium	05g
	Agar	15g

ANNEXE

ANNEXE n°02 : LA TECHNIQUE DE COLORATION DE Gram

Selon (Delarras, 2007)

- Préparer un frottis de la souche testé ;
- Recouvrir le frottis de violet de gentiane, laisse agir 1minute puis rincer à l'eau distillée ;
- Verser du lugol et laisser agir pendant 1minute, rincer à l'eau distillée ;
- Décolorer à l'alcool à 95°pendant 30secondes ; rincer à l'eau distillée ;
- Recolorer avec de la fuchsine pendant 15secondes, rincer l'eau distillé
- Sécher au –dessus de la flamme d'un bec bunsen ;
- Observation au microscope optique à l'objectif x100 à l'immersion



Figure 1 : coloration de Gram

ANNEXE



Figure 3 : Appareillage

ANNEXE

ANNEXE n°3 : RESULTAT EXPERIMENTALE

Tableau 2 : les moyennes des diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques utilisés

Bactérie	ampicilline	pénicilline	cefoxaline
<i>E.coli</i>	06mm	20mm	08mm
<i>Stp. Aureus</i>	06mm	21mm	12mm
<i>Stp.bland</i>	06mm	15mm	06mm
<i>P.aeruginosa</i>	06mm	11mm	07mm

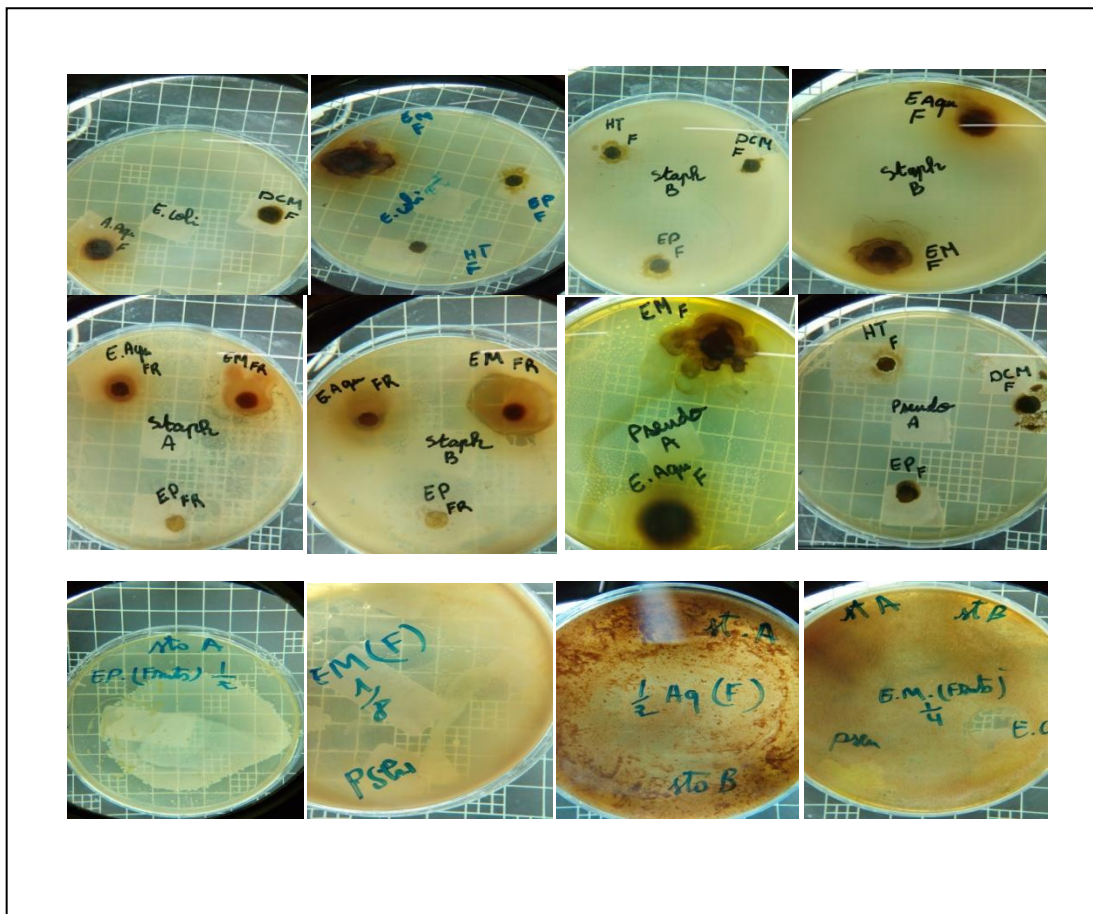


Figure 2 : Résultat d'aromatogramme et CMI

Reference bibliographique

A

- **Ali-Shtayeh MS, Yaghmour R, Faidi, Y, Salem K and Al-Nuri M** (1998). Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the palestinian area. J Ethnopharmacol,60 : 265-271.
- **ANTON R., LOBSTEIN A., TEUSCHER F.**, (2005). Plante aromatiques : épices, aromates, condiment et huile essentielle. Ed : Tec et doc. Paris : 521.

B

- **BAMMOU M., DAOUDI A., SLIMANI I., NAJEM M., BOUIAMRINE E., IBIJBIJEN J. et NASSIRI L.**, (2015). Valorisation du lentisque « Pistacia lentiscus L. » : Etude ethnobotanique, screening phytochimique et pouvoir antibactérien. Journal of applied biosciences. 86 : 7966 – 7975.
- **BEGO PH.**, (2003). Aromathérapie pratique et familial. Ed : MBD. France.
- **BELAKHDAR J.**, (2003). La pharmacopée marocaine traditionnelle : Médecine arabe et savoir population. Ed : Fennec. PP : 764
- **BELFADEL F., Z.**2009. Huile de fruits de Pistacia lentiscus- Caractéristiques physicochimiques et effets biologiques. Mémoire présentée pour obtenir le diplôme de Magistère en chimie organique, Université Constantine 1, 2009, p 139.
- **BERNARD WEIL and FREDRIC BATTEUX.** (2003). Immunopathologie et reaction inflammatoires. Ed: DE Boeck superieur. P:23
- **BIALLO D., SANOGO R., YASAMBOU H. et autre.** (2004) : Étude des constituants des feuilles de Ziziphus mauritiana Lam. (Rhamnaceae). C. R. Chimie. 7 P : 1073-1080.
- **BILLERBECK G.**, (2002). Les contaminations biologiques des biens culturels : Essai d'utilisation d'huile essentielle en traitement de l'aire. Ed : Elsevier. 357-365
- **BOIS.**, (2004). Détermination de l'humidité. ED : AFNOR. 3p
- **BOUHDID S.**, (2009). Activité antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles : Application biotechnologique pour l'amélioration de la qualité des boyaux naturels. Thèse de doctorat. Université Abdelmalek. Tétouan
- **BOULLARD B.**, (2001). Dictionnaire des plantes médicinales du monde: Ed: Estem, p : 414, 415.24.
- **BOUSBIA N.**, (2003) Extraction et identification de quelque huile essentielle (Nigelle, Coriandre, Origan, Thym, Romarin). Etude de leurs activités antimicrobiennes. Thèse de magister. I. N. A. Alger. P : 38-115.
- **BRUNETON J.**, (1999). Pharmacognosie phytochimie plante médicinales .Tec et Doc. Paris. P : 125-130
- **BSSAIBIS F., GMIRA N. et MEZIANE M.**, (2009). Activité antibactérienne de Dittrichia viscosa W. Greuter . Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. Vol 3, N° 1. PP 44-45.

C

- **CARSON C.F., HAMMER K.A. et RILEY T.V.**, (1995). Broth microdilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Microbios*, 82: 181
- **CHAMI F.**, (2005). Oregano and clove essential oils induce surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytother. Res.* 19 (5), 405-8
- **CHAUMONT J.P., MANDIN D., SANDA K., KOBAYASHI T. et DE SOUSA C.**, (2001). Activité antimicrobienne de cinq huiles essentielles de lamiacées togolaises vis-à-vis de germes représentatifs de la microflore cutanée. *Acta Bot. Gall.*, 148, 93-101.
- **COSENTINO S. et TUBEROSO C. I. G.**, (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Let Appl Microbiol*, 29(2): 130- 135.
- **CVALLO J. D., CHARDON H., CHIDIAC., CHOUTET P., COURVALIN P., DABERNAT H., DRUGEON H., DUBREUIL L., GOLDSTEIN F., JARVALIER V., NICOLAS-CHANOINE., PNILIPON A., QUENTIN C., ROUVEIX B., SIROT J., et SOUSSY C.J.**, (2006). Communiqué de la comité francaise de l'antibiogramme. Société Francaise de Microbiologie. Ed : de janvier.

D

- **DAOUDI N. et MOHAMED KERIATI Z.**, (2009). Etude de l'activité antibactérienne de molécule d'origines végétales. Mémoire de fin d'etude. UHB.chlef
- **DE Billerbeck V. G., ROQUES C., VANIERE P. et MARQUIER P.**, (2002). Activity antibactérienne et antifongique de produit à base d'huile essentielles. Hygiènes volume X N  3
- **DEANS S. G. et RITCHIE G.**, (1987). Antimicrobial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5: 162-180.
- **DELAVEAU P.**, (1983). Histoire et renouveau des plantes médicinales. Ed : Albin Michel. Paris : 300-303
- **DIAS P.C., FOGLIO M.A., POSSENTI A. et DE CARVALHO J.E.**, (2000). Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L., *J. Ethnopharmacol.* Vol. 69, pp : 57 – 62.
- **DORMAN H.J.D.**, (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oil. *Journal of Applied Microbiology*. 88-308-316.
- **DUGO G., MONDELLO L., PREVLTI., BEGUM J., YUSUF M. et CHOWDHURY J.U.**, (1998). Studies on the essential oil bearing plants of Bangladesh. Composition of the leaf oils of three cymbopogon species. *Essent. Oil Res.* 10.301.306.
- **DUPONT F., GUIGNARD J-L.**, (2004). Botanique: systématique moléculaire, Ed : Masson. Paris. P : 226-228

E

- **ESSAWI T., SROUR M.**, (2000) Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharm.* 70: 343-349.

F

- **FLEURENTIN JE. ,** (2007). Les plantes qui nous soignent – Tradition et thérapeutique. Ouest-France.

G

- **GIRRE.,** (1979). Nouveau guide des vieux remèdes naturels. Ed : Rennes. France. 314 p ISBN 2-85882-860-1
- **GROSJEAN N.,** (2007) L'aromathérapie. Ed. Eyrolles, Amazon France, 2007, 334p.

H

- **HAFSE M.,** (2010). Valorisation de deux plantes médicinales et aromatiques du Nord du Maroc : Pistacia lentiscus et Coriaria myrtifolia. Thèse de magister
- **HAMMER K. A.,** (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology. 86-985-990.
- **HANS W., KOTH.,** (2007). 1000 plantes aromatiques et médicinales. Ed: Terre: 242

I

- **INOUYE S.,** (2001). Screening of the antibacterial effect of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. J. Infect. Chemother. 7 (4): 251-4.
- **IRBON O. N. et DARAMOLA S. O.,** (1994). Antifungal activities of crude extracts of mitracapyus villosus (Rubiaceae). J. Ethnopharmacol., 40 :137-140 .
- **ISERIN P.,** (2001). Larousse encyclopédie des plantes médicinales. Ed : Larousse Bordas, Milan. PP 9-15 et pp 292-297.

K

- **KOTHE H.,** (2007). 1000 plantes aromatiques et médicinales. Ed : Terre édition. P 7- 13

L

- **LAVERGNE R.,** (1999). Tisaneurs et plantes médicinales indigènes de l'île la réunion orphie. P : 20.
- **LAVERGNE R.,** (2005). Tisaneurs et plantes médicinales réunionnaises d'aujourd'hui. Ed : Orphie. P : 50
- **LONGUESFOSSE J-L.,** (2006). Le guide de phytothérapie créole. Ed : Orphie

M

- **MEKIOUS Sch. et HOUMANI Z.,** (1997). Plante dans la médecine traditionnelle et la cuisine algérienne. Ed : RVBIA. P : 51

O

- **ONAWUNMI G.O.,** (1984). Antibacterial constituents in the essential oil of Cymbopogon citrate. Ethnopharmacol. 12(3): P: 279-86.

P

- **POLESSE., J-M.,** (2010). Arbres & Arbustes de Méditerranée. Ed: Edisud, p. 85
- **PONCE A. G., FRITZ R., DEL VALLE C. et ROURA S.I.,** (2003). Antimicrobial activity of oils on the native microflora of organic Swiss chard. Society of Food Science and Technology (Elsevier). 36: 679-684.

R

- **RAYOUR L.**, (2003). Mechanism of bactericidal action of clove oils and of their phenolic major components in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *The journal of essential oil research*.
- **REMMAL A., BOUCHKHI T., RHAYOUK., ETTAYBI M et TANTOUI-ELRAKI.**, (1993). Improved method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *J.ESS.Oil Res.*5 (2). 179-184.

S

- **SEIGUE A.**, (1985). *Le foret circumméditerranéenne et ses problèmes*. Ed : Maisonneuve and larose Paris ,502p

T

- **THINGUECHUANG YI., JUN WAN. AVIGOLEN-GOLDHRISH., DANE PARFITT.**, (2008). Phylogenetics and reticulate evolution in *Pistacia* (anacardiaceae). *American Journal of Botany*, 95(2):241-251.

V

- **VALNET J., DURAFFOURD C et LAPRAZ J C.**, (1978). *Une médecine nouvelle phytothérapie et aromathérapie*. Ed : Presses de la renaissance. ISBN 2-85616-121-9.p :20

Y

- **YEKHLEF GHANIA.**, (2011). *L'étude des activités biologiques des extraits des feuilles de *Laurus nobilis*, *Thymus vulgaris**. Thèse de magistère. PP : 170.

Z

- **ZAIKA L.**, (1988). *Spices and Herbs : Their Antimicrobial Activité and Its Determination*. *Journal of Food Saftey*, 9(2): 97-118.

RÉSUMÉ

Ce travail s'inscrit dans la perspective d'une évaluation qualitative et quantitative de l'activité antibactérienne *in vitro* des 'extraits de *Pistacia lentiscus* vis-à-vis des souches bactériennes associées à plusieurs pathologies humaines.

On a commencé notre travail par l'extraction des extraits de *Pistacia lentiscus*

(EMeOH, EE, EDCM, HT) les rendements obtenus intéressant pour l'exploitation industrielle

Les testes antibactériens des différents extraits biologique été opérés sur les souches pathogènes suivant deux méthodes, les résultats montrent que nos extraits ont témoigné d'une forte action antibactérienne vis-à-vis des souches étudiées.

Les plantes médicinales constituent une source de nouvelles molécules à activité antibactérienne économiquement accessibles pour faire à l'apparition de phénomène de résistance de germes aux antibiotiques.

Mot clés : extraits végétaux, *Pistacia ,lentiscus*, bactérie, pathogène, activité antibactérienne.

SUMMARY

This work joins with the prospect of a qualitative and quantitative evaluation of the *in vitro* antibacterial activity of the ' extracts of *Pistacia lentiscus* towards bacterial strains associated with several human pathologies.

We began our work with the extraction of the extracts of *Pistacia lentiscus* (EMeOH, EEP, EDCM, HT) the obtained yields (efficiencies) interesting for the industrial undertaking concern

Test them antibacterial deferential extracted biological operated on the pathogenic origins (stumps) following two methods, the results (profits) show that our extracts testified of one Strong antibacterial action (share) towards the studied origins (stumps).

Healing plants establish (constitute) a source (spring) of new molecules with antibacterial activity economically accessible (approachable) to make for the appearance of phenomenon of Resistance of germs against in antibiotics.

Keywords: extracts vegetables, *Pistacia, lentiscus*, bacterium, pathogenic, antibacterial activity

المخلص

هذا العمل هو جزء من التقييم النوعي والكمي مستخلصات الضرو واستعمالها كمضاد حيوية للسلاطات البكتيرية المرتبطة مع العديد من الأمراض التي تصيب الإنسان *Pistacialentiscus*..

بدأنا عملنا من خلال استخراج المستخلصات الضرو (*Pistacialentiscus*) الحصول على مردودية ذات فائدة في المجال الصناعي (EMeoh, TH, EDCM, EEP).

النتائج تبين أن كل سلاطات البكتيرية المدروسة كانت حساسة لهذه المستخلصات وتبين أيضا أن حساسيتها متعلقة بتركيز هذه الأخيرة.

ومن هذه التجارب البيولوجية نستنتج أن الأعشاب الطبية تشكل لنا منبع جديد في المضاد الحيوية.

الكلمات المفتاحية : الجراثيم المسببة للإمراض. النشاط المضاد للبكتيريا . المستخلصات النباتية، *Pistacialentiscus*.

INTRODUCTION

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

