

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن
باديس مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire de fin d'études

Présenté par

KECIR Abdelhakim

&

MUSTAPHA Mohamed Kamel

Pour l'obtention du diplôme de

Master en biologie

Spécialité: Microbiologie Appliquée

Thème

**Etude de l'effet antibactérien de l'huile de lentisque pistachier
(*Pistacia lentiscus L.*)**

DEVANT LE JURY

Président : DJIBAOUI.R	Grade : Pr	(Université de Mostaganem)
Examineur : ARABI. A	Grade : MCB	(Université de Mostaganem)
Encadreur : CHIALI. F. Z	Grade : MCA	(Université de Mostaganem)

Année universitaire : 2021-2022

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions Dieu, le tout puissant, pour nous avoir donné la force, le courage, la patience, et la volonté pour terminer ce travail.

Nous remercions nos parents pour nous avoir encouragés et permis d'entreprendre cette formation.

Je tiens à exprimer mes remerciements et ma gratitude particulière à mon encadreur Mme Chiali f, professeur à de l'université de Mostaganem pour ses précieux conseils et son orientation ficelée tout au long de notre recherche.

Mes remerciements vont également aux membres de jury pour avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail. M.DJIBAOUI.R et M.ARABI. A)

Un grand merci à la responsable du laboratoire de microbiologie Mme Hafida pour ses conseils.

Aussi nous remercions nos familles pour leurs aides durant nos études et leurs soutiens.

*Mes remerciements vont également à l'endroit de tout le personnel du
Département de Biologie de l'université de Mostaganem.*

*Enfin, nous remercions toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la
Réalisation de cette modeste étude.*

Kecir Abdelhakim

Remerciant

*Nous remercions en premier lieu ALLAH le tout puissant de nous avoir
Illuminé et ouvert les portes de savoir, et de nous avoir donné*

La volonté et le courage d'élaborer ce travail.

*Nous remercions nos parents, pour leur soutien constant et leurs
Encouragements.*

*Nous tenons à remercier profondément et sincèrement tous ceux qui ont
Participés de près ou de loin à la réalisation de ce travail et
Particulièrement à Nos profonds remerciements s'adressent-en
Premier lieu*

*À notre encadreur Mme Chiali Fatima pour avoir accepté de diriger
Ce travail, pour son aide, ses encouragements, ses précieux conseils,
Sa confiance, sa patience, tout au long de la réalisation de ce mémoire.
Pour tout cela, nous tenons à vous exprimez nos sentiments de
Profonde gratitude.*

*Un grand merci à la responsable du laboratoire de microbiologie Mme Hafida
Pour ses conseils.*

*Nous tenons à exprimer notre respect aux membres du jury pour
Avoir acceptés d'apporter leur contribution à notre travail.*

Aussi nous remercions nos familles pour leurs aides durant nos études.

Merci à tous les enseignants artisans de notre formation universitaire..

*On remercie également tous ceux qui nous ont accordés un soutien
Moral, un aide technique ou un conseil, trouvent ici l'expression
de notre profonde reconnaissance.*

Mustapha mohamed kamel

Dédicaces

À mes très chers parents pour leur soutien, leur amour, leur sagesse, leurs sacrifices, leurs conseils et leurs encouragements durant toutes mes études et qu'Allah les bénissent. J'espère que dieu vous protège et vous garde

A ma chère famille du petit au grand

A mes enseignants et professeurs du primaire à l'université

A mes proches amies qui m'ont toujours ouvert les portes de l'espoir

A mes amies de la promotion de master Microbiologie Appliquée

Je dédie ce modeste travail

Kecir Abdelhakim

Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail à mon Père et à ma Mère à qui je dois tout et à
Qui j'adresse tous mes respects et affection en témoignage de leur
Soutien, sacrifice et patience, ainsi que pour leurs précieux conseils
et orientation dans ma vie. Vous avez été pour moi l'exemple du
Courage et de l'optimisme.*

A mes frères et à mes sœurs pour leur soutien et leur affection.

A mes amis de promotion de master.

*A mes camarades de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de
L'université de Mostaganem.*

Et à tous ceux que je porte dans mon cœur.

Mustapha Mohamed Kamel

Le résumé :

La plante de *Pistacia lentiscus L.* est connue depuis l'Antiquité pour ses nombreuses propriétés médicinales, et les substances qui en sont extraites sont largement utilisées en médecine traditionnelle dans le traitement de certaines maladies telles que l'eczéma, les plaies buccales et les calculs rénaux. jaunisse; Douleurs à l'estomac, asthme et problèmes respiratoires.

L'huile de pistachier est largement utilisée en médecine traditionnelle, notamment dans les régions du nord-est de notre pays et en Tunisie, contre les allergies respiratoires et le traitement des brûlures.

Des études microbiologiques ont déjà été réalisées sur l'huile essentielle et les huiles végétales extraites de cette plante par des méthodes de laboratoire, et elles ont montré la présence d'activité de l'huile essentielle contre les bactéries, mais l'inefficacité de l'huile végétale. Elle a été faite sur l'efficacité de l'huile végétale extraite de manière traditionnelle. Notre travail a été mené pour trouver de nouveaux effets plus naturels en présence de résistance bactérienne aux antibiotiques, en utilisant la plante médicinale *Pistacia lentiscus L.*

المخلص :

اشتهر نبات الضرو منذ القدم بخصائصه الطبية المتعددة ، وتستخدم المواد المستخلصة منه على نطاق واسع في الطب التقليدي في علاج بعض الأمراض مثل الأكزيما وتقرحات الفم وحصوات الكلى. اليرقان؛ آلام المعدة والربو ومشاكل الجهاز التنفسي..

يستخدم زيت الضرو على نطاق واسع في الطب التقليدي، وخاصة في المناطق الشمالية الشرقية من بلادنا وفي تونس ، ضد الحساسية التنفسية وعلاج الحروق.

وقد أجريت بالفعل دراسات مكروبيولوجية على الزيوت العطرية والزيوت النباتية المستخرجة من هذا النبات بالطرق المعملية ، وأظهرت وجود نشاط للزيت العطري ضد البكتيريا ، ولكن عدم فعالية "الزيت النباتي". تم استخراجهم بطرق مخبرية . تم تنفيذ عملنا لإيجاد تأثيرات جديدة أكثر طبيعية في وجود المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية، وذلك باستخدام النبات الطبي. *pistacia lentiscus L.*

Abstract :

The (*lentiscus pistacia*) plant has been known since ancient times for its many medicinal properties, and the substances extracted from it are widely used in traditional medicine in the treatment of certain diseases such as eczema, mouth sores and kidney stones. jaundice; Stomach pain, asthma and respiratory problems.

Pistachio oil is widely used in traditional medicine, especially in the northeastern regions of the country and in Tunisia, against respiratory allergies and the treatment of burns.

Microbiological studies have already been carried out on the essential oil and vegetable oils extracted from this plant by laboratory methods, and they have shown the presence of activity of the essential oil against bacteria, but the ineffectiveness of the 'vegetable oil. It was made on the effectiveness of vegetable oil extracted in the traditional way. Our work was carried out to find new, more natural effects in the presence of bacterial resistance to antibiotics, using the medicinal plant *Pistacia lentiscus*.

Liste des abréviations

- : Négatif.

% : Pourcentage.

R% : Rendement

°C : Degré Celsius.

+ : Positif.

≤ : Inférieur ou égale.

≥ : Supérieur ou égale.

ADH : Arginie dehydrolase

AFNOR : Association Française de Normalisati

FRU : Fructose.

g : gramme.

GEL : Gélatine.

GLU : Glucose.

H : heure.

H₂ : gaz d'Hydrogène.

H₂S : sulfure d'hydrogène.

HV : Huile végétal

HEs : Huile essentielle.

LAC : Lactose.

LDC : Lysine décarboxylase.

MAL : Maltose.

MAN : Manitol

MH: Muller Hinton.

MHA: Muller Hinton Agar.

Mm : millimètre.

MI : millilitre.

MLT : Malate.

nd : non déterminer.

∅: Diamètre.

P : Pénicilline G.

PH : potentiel hydrogène.

S : Sensible.

SAC: Saccharose

STAPH : Staphylococcus.

E.coli : Escherichia.coli

TS : Très sensible.

T : Témoin.

µm : micromètre.

UV : Ultra-violet

ATCC : American type culture collection

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

ATB : Antibiotique

DMSO : Sulfoxyde de diméthyle

CMB : Concentration minimale bactéricide

GN : Gélose nutritive

ZI : Zone d'inhibition

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification taxonomique de lentisque	5
Tableau 02 : Activités biologiques et pharmacologiques de <i>Pistacia lentiscus L.</i>	10
Tableau 03 : Les antibiotiques testés.....	31
Tableau 04 : Les dilutions de l'huile végétale dans le DMSO.....	35
Tableau 05 : Résultats d'étude morphologique, de mobilité et des tests biochimiques des bactéries.....	42
Tableau 06 : Résultats de l'antibiogramme de <i>Staphylococcus aureus</i> étudiée	44
Tableau 07 : Résultats de l'antibiogramme d' <i>E.coli</i> étudiée.....	44
Tableau 08 : Caractéristiques organoleptiques.....	46
Tableau 09 : Résultat du pH d'HV de <i>Pistacia lentiscus L.</i>	46
Tableau 10 : les résultats de l'aromatogramme.....	49

Liste des figures

Figure 01 : Photographie des fleurs de pistachier lentisque	6
Figure 02 : Photographie des feuilles de pistachier lentisque.....	7
Figure 03 : Photographie des fruits de pistachier lentisque à différents stades de maturation.....	7
Figure 04 : Photographie de la résine de pistachier lentisque	8
Figure 05 : Répartition géographique de <i>Pistacia lentiscus</i> . Noir= <i>Pistacia lentiscus</i> subsp. <i>emarginata</i> . Vert= <i>Pistacia lentiscus</i> subsp. <i>lentiscus</i>	9
Figure 06 : Produits commercialisés à base de <i>Pistacia lentiscus</i> . A. Huiles essentielles, B. Huiles végétales, C. Compléments alimentaire, D. Parfum.....	13
Figure 07 : Malaxage de la pâte.....	17
Figure 08 : Pate mise sur des courtins	18
Figure 09 : Appareil de soxhlet à gauche, et appareil de Lickens-Nickerson à droite.	20
Figure 10 : Lecture de la densité optique des suspensions bactériennes sur un Spectrophotomètre.....	30
Figure 11 : HV de lentisque pistachier	31
Figure 12 : Détermination du pH d’HV de <i>Pistacia lentiscus</i>	32
Figure 13 : le coulage des boites avec la gélose MH.....	33
Figure 14 : les étapes de la standardisation de la suspension bactérienne à 0.5 Mc Ferland et leur étalement sur les boites gélosées de MH.....	37
Figure 15 : la dilution de HV	37
Figure 16 : les étapes de la dilution des huiles végétales de lentisque pistachier et Leur dépôt sur les disques en papier.....	38
Figure 17 : Aspect macroscopique de <i>Staphylococcus aureus</i> sur gélose.....	40

Figure 18 : Aspect macroscopique d' <i>Escherichia coli</i> sur gélose...	40
Figure 19 : Coloration de Gram des différentes bactéries isolées (grossissement X100) ..	41
Figure 20 : Test de la catalase	42
Figure 21 : Résultats de l'antibiogramme d' <i>E. Coli</i>	43
Figure 22 : Résultats de l'antibiogramme d' <i>Staphylococcus aureus</i>	43
Figure 23 : Représentation graphique des résultats de l'antibiogramme de Staphylococcus aureus.....	44
Figure 24 : Représentation graphique des résultats de l'antibiogramme de <i>E.coli</i>	45
Figure 25 : Résultats de l'aromatogramme de <i>Staphylococcus aureus</i>	48
Figure 26 : Résultats de l'aromatogramme d' <i>E. Coli</i>	49
Figure 27 : Représentation graphique des résultats de l'aromatogramme de l'HV Pistacia lentiscus	50

Sommaire :

Remerciements.....	I
Dédicaces	II
Résumé.....	III
Liste des abréviations.....	IV
Liste des tableaux.....	V
Liste des figures	VI
Introduction	VII
Mise au point bibliographique.....	4
I. Présentation de l'espèce.....	5
1. Généralités	5
2. Description botanique.....	6
i. Les fleurs	6
ii. Les feuilles.....	7
iii. Grains.....	7
iv. Mastic	8
3. Répartition géographique.....	8
4. Activités biologiques et pharmacologiques.....	9
5. Utilisations et vertus traditionnelles.....	11
6. Applications industrielles.....	12
II. Généralités sur les huiles végétales	14
1. Historique	14
2. Définition.....	14
3. Classification des HV	15
4. Composition	16
5. Méthodes d'extraction HV	16

i.	Procédé classique ou traditionnel	16
ii.	Procédé discontinu ou système à super presse	17
iii.	Procédé continu	18
a)	Système d'extraction par centrifugation à trois phases.....	18
b)	Système d'extraction par centrifugation à deux phases	19
iv.	Extraction de solvant	19
6.	Caractéristiques physico-chimiques.....	20
i.	Les caractéristiques chimiques	21
a)	Indice d'acide (I.A).....	21
b)	b. Indice de saponification (I.S)	21
7.	Domaines d'application.....	22
III.	Activités antibactérienne des huiles lentisque (fruits).....	23
1.	Activité antibactérienne des huiles végétales	23
2.	Activité antimicrobien des huiles essentielles.....	23
i.	Activité antimicrobien	24
a)	Activité antibactérienne.....	24

Partie II : Partie Expérimentale

Matériel et méthodes

I.	Matériel et méthodes.....	26
1.	L'objectif.....	27
2.	Protocol expérimental.....	27
i.	Choix et origine des souches bactérienne	27
ii.	Milieu de culture.....	27
iii.	L'identification	28
a.	Etude macroscopique.....	28
b.	Etude microscopique	28
c.	Déterminer les caractères biochimique.....	28
3.	Etude de la sensibilité aux ATB	29
i.	préparation d'inoculum.....	29
ii.	inoculation de gélose.....	29

iii.	dépôt des disques imprégnés ATB.....	30
iv.	lecture des boîtes après incubation.....	30
4.	Etude de l'activité antibactérienne des huiles végétale.....	31
i.	Matériel végétal.....	31
ii.	La conservation de l'huile.....	32
iii.	La mesure de pH.....	32
iv.	Aromatogramme.....	33

Résultats et discussion

I.	Procédés d'études microbiologique.....	39
1.	Identification des souches bactériennes.....	39
i.	Examen macroscopique.....	39
ii.	Examen microscopique.....	40
a.	Etat frais.....	40
b.	Coloration de gram.....	41
iii.	Tests biochimiques.....	41
2.	Antibiogramme.....	43
3.	Effets antibactériens des huiles végétale de <i>pistacia lentiscus</i>	46
i.	Extraction des HV.....	46
ii.	Etude des propriétés organoleptiques.....	46
iii.	Rendement en huile végétale.....	46
iv.	La mesure de pH.....	46
v.	Activité antimicrobienne (Aromatogramme).....	47
	Conclusion.....	53
	References bibliographiques.....	55
	Annexe.....	60

Introduction

Introduction

Introduction :

Il y'a environ 500 000 plantes sur terre, 100 000 d'entre elles, environ, possèdent des propriétés médicinales qui peuvent contribuées par leur principe actif à agir directement sur l'organisme, aussi de nombreux extraits de plantes ont été déclarés posséder des activités antimicrobiennes. (Hacini et Djelloul,2017)

Aujourd'hui encore, diverses maladies sont traitées uniquement par les seules thérapies naturelles qui font appel non seulement aux plantes aromatiques, mais aussi à leurs huiles obtenues.

Les plantes médicinales contiennent un large spectre des substances phytochimiques qui sont des sources d'antioxydants naturels tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins, ces composées possèdent en plus de leurs activités antioxydants d'autres propriétés biologiques : anti-inflammatoires, antimicrobiennes et anti-cancéreuse. (Dhifi et al., 2013).

En effet, en 2002, l'OMS estime que, pour se soigner, 80 % de la population africaine recourt toujours à la médecine traditionnelle pour laquelle la majeure partie des thérapies implique l'exploitation des principes actifs des plantes médicinales. Ces espèces végétales d'aussi grande importance pour la santé, méritent d'être étudiées scientifiquement pour leur meilleure utilisation. (Dhifi et al., 2013).

En Algérie comme dans les autres pays en voie de développement, les maladies infectieuses et parasitaires constituent un problème de santé publique à cause de leur gravité. La situation est plus préoccupante à cause de l'apparition des souches de micro-organismes antibiorésistants et l'émergence des infections non communes qui compromettent les traitements à l'aide des médicaments existants. Face à ces nombreux obstacles que présente l'utilisation des antibactériens disponibles, il est indispensable de rechercher de nouvelles substances antibactériennes efficaces.

Introduction

Pistacia lentiscus est un arbuste ou arbre dioïque qui appartient à la famille des *Anacardiaceae*, pousse dans la région méditerranéenne (Dhifi et al., 2013 ; Hacini et Djelloul, 2017).

Les différentes parties de cette plante ont une longue tradition en médecine populaire datant de l'Antiquité grecque. En effet elle a été utilisée dans le traitement de l'eczéma, la paralysie, la diarrhée, l'infection de la gorge. (Dhifi et al., 2013)

Actuellement, plusieurs questions se sont posées concernant la sécurité et l'efficacité des produits chimiques utilisés en médecine. En effet, durant les 20 dernières années, il a été prouvé que l'efficacité des antibiotiques a fortement diminué. Les bactéries sont devenues de plus en plus résistantes. Par conséquent, notre travail a été conduit à trouver des nouveaux effets antibactériens plus naturels contre cette résistance bactérienne à partir de la plante médicinale *Pistacia lentiscus*. (Kheyret al., 2014)

Ce travail est divisé en deux parties, La première partie comporte une investigation bibliographique dans laquelle une présentation des espèces étudiées par les aspects botanique, biologique, chimique et pharmacologique spécifiques de l'espèce *Pistacia lentiscus* L. Dans un second temps, nous exposerons les connaissances liées aux huiles végétales d'une manière générale seront étalées. Puis les divers modes d'extractions, et les facteurs liés à ce procédé classique d'extraction. Avant de finir par l'activité antibactérienne.

La deuxième partie de ce travail, est une étude expérimentale, concerne l'étude de l'activité antibactérienne des extraits des fruites (les grains), suivie par une discussion qui synthétise l'ensemble des résultats obtenus et nous achevons notre travail par une conclusion générale.

Mise au point bibliographique

I. Présentation de l'espèce de *Pistacia lentiscus L*

I.1. Généralités

Parmi les angiospermes dicotylédones, le lentisque est un arbre aromatique de la famille des Anacardiaceae qui renferme 60 genres et 600 espèces selon Kokwaro, (1986) cité par Djedaia, (2017). (AL-Saghir et Porter, 2012 ;Djedaia, 2017)

D'après Kozhoridze et al.(2015), le genre *Pistacia* comprend 11 autres espèces : *Pistacia weinmannifolia*, *Pistacia chinensis*, *Pistacia terebinthus*, *Pistacia texana*, *Pistacia saportae*, *Pistacia aethiopica*, *Pistacia atlantica*, *Pistacia khinjuk*, *Pistacia mexicana*, *Pistacia palaestina* et le *Pistacia vera*.

Néanmoins, l'Algérie renferme quatre espèces de *Pistacia* : *Pistacia terebinthus*, *Pistacia vera*, *Pistacia lentiscus* et *Pistacia atlantica* (Ghalem et Benhassaini, 2007).

Elle présente des noms vernaculaires qui sont :

- Arabe: Dherou, sarisse.
- Kabyle: Amadagh (la plante), Tidekt (le fruit).
- Français: Lentisque et arbre au mastic.

La position taxonomique de *Pistacia lentiscus L.* est la suivante :

Tableau I : Classification taxonomique de lentisque (Maameri, 2014)

Règne	Plantae
Embranchement	Spermatophytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédone
Sous classe	Dialypétales
Série	Diacifores
Ordre	Sapindale

Famille	Anacardiacées
Genre	<i>Pistacia</i>
Espèce	<i>Pistacia lentiscus L.</i>

I.2. Description botanique

Le lentisque est un arbrisseau ramifié qui peut atteindre 1 à 3 mètres, dioïque dont les pieds mâles et femelles sont distincts, thermophile qui se retrouve dans des milieux chaudes en association avec l'olivier sauvage et dans des zones subhumides et semi-arides généralement en association avec le Pin d'Alep (AL-Saghir et Porter, 2012 ;Bougherara, 2015), cette espèce est caractérisée par :

I.2.i. Les fleurs

Les fleurs sont petites, sous forme de grappes spiciformes, apétales et unisexuelles. Les fleurs mâles ont cinq petits sépales et cinq étamines rougeâtres. Les femelles ont quatre sépales, et un ovaire supérieur avec un style trifide court. Les fleurs de cette plante dégagent une odeur résineuse forte (Aissi et al., 2016 ;Amara et al., 2019) (**Figure 1**).



Figure 1 : Photographie des fleurs de pistachier lentisque (Djedaia, 2017).

I.2.ii. Les feuilles

Les feuilles de cette plante sont persistantes, alternées, trifoliolées ou unifoliées, elliptiques, glabres, coriaces et dont le pétiole est bordé d'une aile verte (AL-Saghir et Porter, 2012) (Figure 2).



Figure 2 : Photographie des feuilles de pistachier lentisque (Djedaia, 2017).

I.2.iii. Graines (fruit)

Le lentisque possède des fruits globuleux de petite taille qui renferment un seul noyau, leur couleur est d'abord rouge puis noire à la maturation, la période de fructification s'étend de juillet à décembre (Aissi et al., 2016 ; Djedaia, 2017) (Figure 3).



Figure 3 : Photographie des fruits de pistachier lentisque à différents stades de maturation

(Djedaia, 2017).

I.2.iv. Mastic

L'excision du tronc de cette espèce, fait écouler un suc résineux nommé mastic (Figure 4) qui, une fois distillé utilisée en parfumeries (Bougherara M, 2015)



Figure 4 : Photographie de la résine de pistachier lentisque (Abdeldjelil, 2016)

I.3. Répartition géographique

Pistacia lentiscus est une espèce sauvage, thermophile, largement distribuée dans les écosystèmes extrêmes de la région méditerranéenne. On la rencontre également en Europe, Asie, et en Afrique (Figure 5). Cette espèce est adaptée au climat semi-aride de la méditerranée et aux sols désertique et salin (Rauf et al. 2017).

En Tunisie, cette espèce a une large répartition géographique et bioclimatique, allant des régions humides jusqu'aux régions arides. On la retrouve aussi en Algérie, Maroc, Turquie, France, Espagne, Italie et Grèce (Tingshuang et al., 2008 ;Trabelsi et al., 2012).

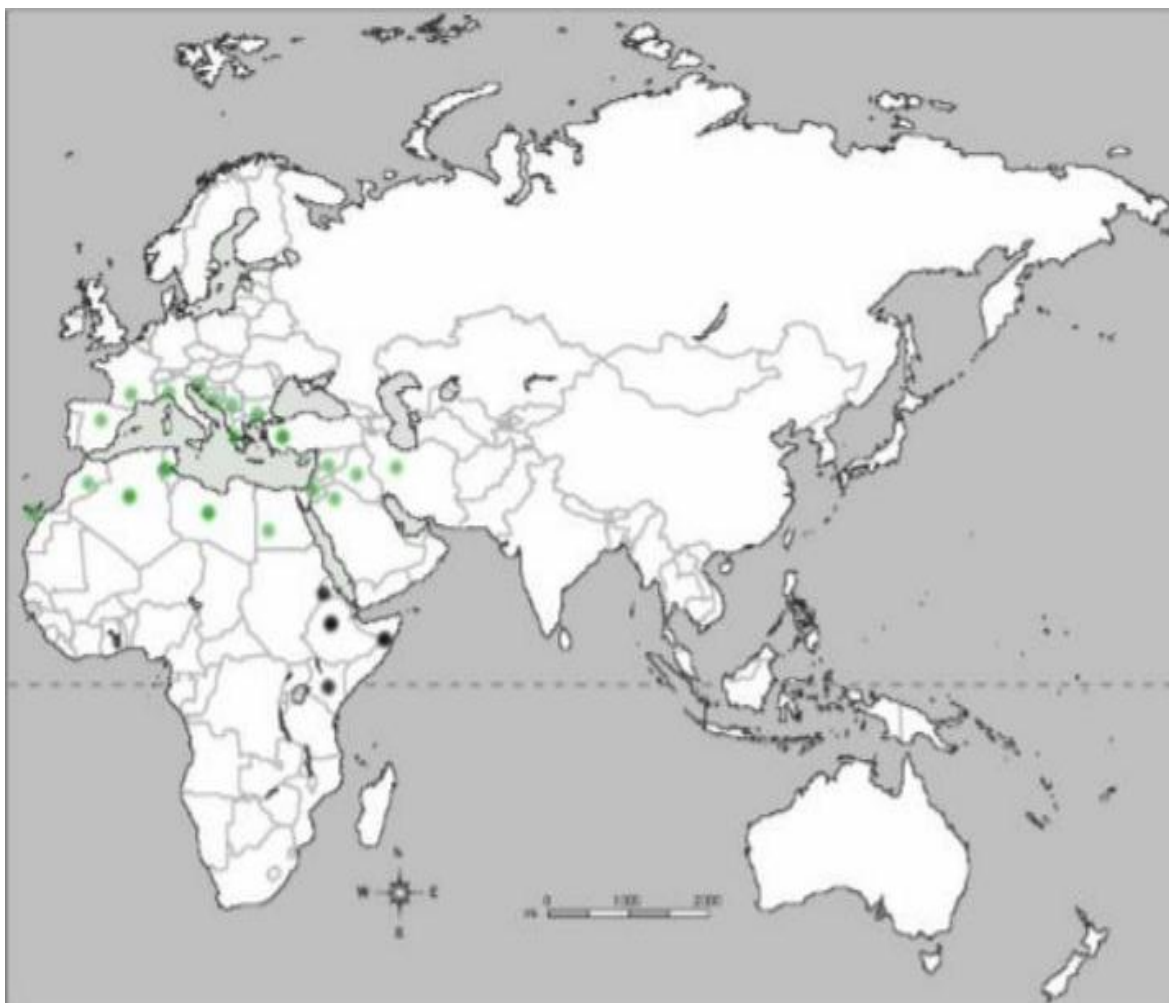


Figure 5 : Répartition géographique de *Pistacia lentiscus*. Noir= *Pistacia lentiscus* subsp. *emarginata*. Vert= *Pistacia lentiscus* subsp. *lentiscus*. (Al-Saghir, 2006)

I.4. Activités biologiques et pharmacologiques

De nombreuses études pharmacologiques ont rapporté que les molécules contenues dans les différentes parties (feuilles, fruits, partie aérienne) de cette plante ont de multiples activités biologiques à savoir : anti-oxydantes, antimicrobienne, antifongique, anti-inflammatoire, anticancéreuse, etc., qui sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 2. Activités biologiques et pharmacologiques de *Pistacia lentiscus*. (Chaabani, 2019)

	Activités biologiques	Partie utilisée	Métabolites/ Extraits	Références
<i>Pistacia lentiscus</i>	anti-oxydante	Fruits	Acide digallique	Bhourri et al., 2010
			Extrait hydro-alcoolique	Remila et al., 2015
		Feuilles	Huile essentielle	Barra et al., 2007
			Fractions aqueuses du chloroforme et d'hexane	Atmani et al., 2009
		Mastic	Extrait aqueux de résine	Sakagami et al., 2009
	Antimicrobienne et antivirale	Feuilles	Huile essentielle	Djenane et al., 2011
			Extrait méthanolique	Chrysaavgi et al., 2008
		Fruits	Huile végétale	Mezni et al., 2015
			Extrait phénolique	Mezni et al., 2015
		Mastic liquide	Extrait aqueux de mastic	Sakagami et al., 2009
	Antifongique	Feuilles	Huile essentielle	Ismail et al., 2013
	Antiinflammatoire	Feuilles	Extraits aqueux, chloroforme, ethyl acetate et méthanol	Dellai et al., 2013
		Fruits	Huile végétale	Ben Khedir et al., 2016
			Extrait hydro-alcoolique Huile végétale	Remila et al., 2015 Al-said et al., 2009
	Antidiabétique	Fruits	Huile végétale	Djerrou et al., 2011
			Extrait éthanolique, fractions aqueuse et organique	Mehenni et al., 2016
		Feuilles	Extrait éthanolique, fractions aqueuse et organique	Mehenni et al., 2016
	Anticancéreuse	Feuilles	Extrait hydro-alcoolique	Remila et al., 2015
	Hépatoprotectrice	Feuilles	Extrait éthanolique, fractions aqueuse et organique	Mehenni et al., 2016
	Anticholinestérasique	Feuilles	Extrait aqueux	Benamar et al., 2010
Insecticide	Feuilles	Huile essentielle	Bachrouh et al., 2010	
Antimutagène	Feuilles	Huile essentielle	Ben Douissa et al., 2005	
		Extrait aqueux	Hayder et al., 2005	
		Extrait enrichi en flavonoïdes	Hayder et al., 2005	
Anti-ulcère	Fruits	Huile végétale	Naouar et al., 2016	

I.5. Utilisations et vertus traditionnelles

Traditionnellement, le Lentisque est essentiellement utilisé pour sa résine, on se sert également de ses feuilles, de son bois et de ses fruits pour des usages alimentaires, domestiques ou médicinaux (De Lanfranchi et al., 1999).

I.5.i. La résine

Elle a été utilisée en Europe, en dentisterie pour l'occlusion des dents cariées; en médecine comme antidiarrhéique, antiscorbutique ou sous forme de cataplasme. Elle a été également utilisée pour faire des fumigations et pour la fabrication de vernis et de colles (Dorvault, 1928). Elle est obtenue par incision du tronc en été.

Dans l'Antiquité cette résine a été employée comme un produit cosmétique. En effet, selon Dioscoride, les femmes grecques s'en servaient de cette résine pour fixer des cils postiche sur leurs paupières. En Afrique du Nord, elle servait de parfum et de dépilatoire. Elle a été également utilisée en Orient, comme masticatoire parfumé, pour rafraîchir l'haleine et protéger les gencives. Elle a été aussi utilisée pour embaumer les cadavres (De Lanfranchi et al, 1999).

I.5.ii. Les feuilles

Les feuilles du Lentisque sont utilisées pour leur propriété antiparasitaire pour lutter contre les charançons, les teignes et les puces. En Afrique du Nord, on utilisait des infusions préparées à partir de ces feuilles pour enlever l'odeur de sueur et la mauvaise haleine.

Grâce à leur richesse en tanins, les feuilles étaient utilisées pour le tannage du cuir en Libye. Dans d'autres pays comme la Macédoine, la Tunisie, le Maroc et l'Anatolie, elles sont utilisées pour teindre la laine des tapis en noir (De Lanfranchi et al, 1999).

I.5.iii. Les fruits

Les fruits sont principalement utilisés pour l'extraction de l'huile fixe. En Méditerranée, cette huile a de nombreuses utilisations. En effet, au Maroc l'huile des fruits de Lentisque est employée sous forme d'onguent pour soulager les douleurs dorsales et soigner les brûlures. En Tunisie, cette huile comestible est utilisée traditionnellement par la population tunisienne dans son alimentation quotidienne en salades et pâtisseries. Elle sert

également de condiment dans les pays maghrébins et elle est utilisée pour le traitement de la gale, des allergies respiratoire, des rhumatismes et dans la fabrication de pilules anti-diarrhéiques (Le Floch et Nabli, 1983 ;Trabelsi et al., 2012).

En orient et en Espagne on l'utilise pour l'éclairage, pour la fabrication des savons ou la préparation d'une sorte de beurre, en la mélangeant avec de la pâte d'amande ou de la farine, connue pour ces propriétés aphrodisiaque (Bonnier et Douin, 1934 ;De Lanfranchi et al., 1999)

Les fruits sont aussi utilisés en confiserie et pour la fabrication d'une liqueur appelée « mastiche ».

I.6. Applications industrielles

De nombreux produit sont formulés à partir d'ingrédients issus de *Pistacia lentiscus* tels que la résine, l'huile essentielle, l'huile végétale ou des extraits enrichis. (Figure 6).

La société Super Smart commercialise un supplément naturel à base de la résine de mastic (*Pistacia lentiscus*) sous le nom de Mastic gum. Ce supplément nutritionnel semble protéger la muqueuse gastrique, possède des effets antimicrobiens et antifongiques et présente un intérêt contre la dyspepsie et les ulcères gastroduodénaux. La boîte de 60 gélules est vendue à 32 euros. (Charlemagne D. 1999)

Mastic Gum est un autre produit à base de la résine de *Pistacia lentiscus*, commercialisé par la société Jarrow formulas pour protéger l'estomac et prévenir les problèmes gastriques. (Charlemagne D. 1999).

L'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* est commercialisée par de nombreuses sociétés comme Vitalba, Huiles & Sens, Florame, etc. Cette huile est connue pour ces propriétés anti-œdémateuse, antalgique cutanée, parasiticide, insectifuge, décongestionnante veineuse et lymphatique, décongestionnante prostatique et décongestionnante des sinus et des bronches. (Si bennasseur.2002)

L'huile végétale des fruits de Lentisque obtenue par pression mécanique est également commercialisée par le laboratoire Nature orient. (Si bennasseur.2002)

Le Lentisque est même utilisé dans plusieurs parfums comme Lilaia (Bulgari), Infusion d'Iris (Prada), French Mastic (Queen B), etc.



Figure 6 : Produits commercialisés à base de Pistacia lentiscus. A. Huiles essentielles, B. Huiles végétales, C. Compléments alimentaire, D. Parfum.

II. Généralités sur les huiles végétales

II.1. Historique

À un moment donné de la préhistoire, on inventera le pressoir à huile. On ne sait pas à quand remonte exactement cette invention, mais on a retrouvé des mentions à ce sujet dans les écrits védiques de l'Inde ancienne, tandis que, dans le bassin méditerranéen, les pressoirs se répandent à partir du 3^e millénaire avant notre ère. L'histoire des huiles végétales et de leurs usages sera directement liée aux avancées technologiques qui ont permis de passer, au fil du temps, du pressoir à main rudimentaire à l'ex peller moderne (ou presse à vis sans fin) en passant par l'ouvrage gigantesque creusé dans le rocher ou bâti en pierre, et alimenté par le courant d'une rivière. (Véronique p.2019).

Les premières huiles seront celles que l'on tire de l'olive, à l'Ouest, et de la graine de sésame, à l'Est. Leur extraction n'exigeait aucune cuisson préalable et ne demandait qu'une force mécanique relativement faible, que pouvait fournir l'être humain ou l'animal de trait. Elles resteront pendant longtemps les seules huiles comestibles. On ne les employait que parcimonieusement, car elles étaient dispendieuses. Puis, s'ajouteront les huiles de fruits secs - noix, noisette, pistache, etc. - des fruits de divers palmiers - cocotier, noix de palme, noix palmiste et, plus récemment, celles des graines de moutarde, colza et coton. Avec l'avènement de l'ère industrielle, on mettra au point des procédés de raffinage permettant d'extraire l'huile de matières réfractaires à la simple pression à froid (soya, maïs, pépins de raisin). Dans certains cas, on les désodorisera pour éliminer les principes amers qui, autrement, en limiteraient la comestibilité. L'huile qui, jusque-là, était essentiellement extraite mécaniquement dans des pressoirs artisanaux, deviendra un produit de consommation courante et, toutes proportions gardées, son prix ne cessera de baisser. (Véronique p.2019).

II.2. Définition

L'huile végétale est un mélange liquide ou semi-liquide à température ambiante, de substances hydrophobes, non volatiles et solubles dans les solvants organiques apolaires ou peu polaires. Elle est constituée d'acides gras insaturés. Selon son origine, elle peut avoir différentes couleurs et différentes odeurs. Elles appartiennent à la classe des lipides.

Ces derniers se retrouvent dans des cellules spéciales localisées principalement dans les graines ou le noyau et se trouvent enfermées dans les cellules oléifères sous forme de petites gouttes. Chez les plantes, elles jouent le rôle de réserves pour la germination et également dans la synthèse du péricarpe de certains fruits. Les huiles végétales sont localisées aussi dans l'enveloppe charnue des fruits. Elles sont présentes dans plusieurs plantes notamment les olives, les arachides, le tournesol, le colza, le lentisque, la nigelle, le romarin, les amandes et le ricin. (Petrović, 2008 ;Salas et al., 2009).

Au-delà du secteur agro-alimentaire, les huiles végétales sont utilisées dans différents domaines de l'industrie tels que les secteurs cosmétiques, pharmaceutiques ou chimiques. On les différencie généralement par leur point de fusion. En effet, les huiles sont des corps gras liquides à la température de 15°C, alors que les graisses sont plus ou moins solides à cette température. Les huiles végétales sont le complément indispensable des huiles essentielles en aromathérapie, en cosmétologie et dans le domaine alimentaire. (Lecerf, 2011).

II.3. Classification des HV

D'après Guichard C. (1967), selon l'utilisation finale des huiles, on distingue :

Huiles officinales

Ce sont des huiles utilisées dans un but thérapeutique ou cosmétique. Elles sont exclusivement obtenues par expression à froid. Il s'agit d'huile vierge de première pression

Huiles alimentaires

Ce sont des huiles destinées à être utilisées par le secteur agro - alimentaire, obtenues par expression des graines oléagineuses, à froid ou à chaud. Elles peuvent subir des traitements de raffinage pour éliminer les pigments, les substances odorantes, à goût insipide et d'autres contaminants

Huiles industrielles

Ce sont des huiles de qualité moindre utilisées par différents secteurs industriels (peintures, lubrifiants, détergents, biocarburants) . Elles sont le plus souvent obtenues par extraction par solvant (hexane) .

II.4.Composition des huiles végétales des baies de lentisque

Une étude a été réalisée sur l'huile extraite à partir des fruits mûrs du de Pistacia lentiscus L. de la Tunisie occidentale nordique et du nord . L'extraction a été faite par deux méthodes méthode traditionnelle pratiqué par des femmes dans des secteurs de forêt et la méthode depression qui a été proposée pour améliorer le rendement et la qualité d'huile La composition en acides gras a été déterminée par (GC / MS) L'acide oléique était l'acide gras principal avec plus de 56 % , suivi de l'acide palmitique avec 27 % , Linoléique 15.82 % , Palmitoléique 1.13 % et l'acide stéarique 1.58 % [56] La composition en acides gras des extraits d'huile grasse des fruits noirs de lentisque récoltés en Algérie sont racide oléique (55.3 %) , l'acide linoléique (21.4 %) , l'acide palmitique (19.5 %) , l'acide palmitoléique (2.1 %) , et l'acide stéarique (1.7 %). (Robinson.2000) .

II.5. Méthodes d'extraction des huiles végétales :

La production des huiles végétales a toujours été le principal objectif de la culture des graines .Les méthodes d'extraction ont évolué mais le processus d'extraction des huiles reste toujours le même. Généralement il existe quatre méthodes qui sont basées soit sur l'expression ou la volatilité.(Alain Rival et Patrice Levang , 2013).

II.5.i. Procédé classique ou traditionnel

Dans les unités d'extraction classique (traditionnelle), le processus d'extraction d'huile consiste aux différentes étapes suivantes :

- Broyage : Il est réalisé par des meules en pierre de granit, qui tournent dans un bac dont le sol est également en pierre. Ce broyage est réalisé manuellement ou par l'intermédiaire d'un animal. Cette étape permet donc d'obtenir une pâte qui contient de la matière solide (débris de noyaux, d'épiderme, de parois cellulaires, etc.) et des fluides (huile et eau de végétation, c'est-à-dire l'eau contenue dans les cellules de la graine). .(Alain Rival et Patrice Levang , 2013).
- Séparation des phases : La pâte produite est mise sur des scourtins (des disques en fibres végétales). Ensuite, une extraction de l'huile est réalisée par une pression. Le pressage génère un sous-produit solide appelée grignons. Ces grignons sont les résidus solides récupérés à la suite de la première pression ou centrifugation. Ils sont constitués par les

résidus de la peau, de la pulpe, et les fragments des noyaux. .(Alain Rival et Patrice Levang , 2013).

· Une séparation par décantation des phases liquides (huile et eau de végétation) est effectuée. Cette séparation se fait à l'air libre dans des bacs en ciment, en faïence ou en argile. Un sous-produit liquide a été généré à la fin de cette étape, appelé les margines. C'est le résidu liquide aqueux brun qui s'est séparé de l'huile par sédimentation après le pressage ou centrifugation. Ce liquide a une odeur agréable mais un goût amer. Cet effluent relativement riche en matières organiques constitue un facteur de pollution qui crée un problème réel à l'industrie oléicole. . (Alain Rival et Patrice Levang , 2013).

II.5.ii. Procédé discontinu ou système à super presse :

Les graines réceptionnées dans les huileries traditionnelles passent directement par les étapes suivantes :

· Broyage : il est réalisé par des meules. Les meules utilisées pour le broyage sont légèrement décentrées par rapport à l'axe de rotation, ce qui accentue la possibilité d'écrasement des graines. (Alain Rival et Patrice Levang , 2013).

· Malaxage : cette étape permet de libérer le maximum d'huile. Des raclettes ramènent en permanence la pâte sous les meules qui jouent alors le rôle de malaxeuses (Figure 7). La pâte est obtenue au bout d'une demi-heure environ. .(Alain Rival et Patrice Levang , 2013).



Figure 7: Malaxage de la pâte (Boutayeb, 2000)

Séparation des phases : la pâte est alors placée en couche de 2 cm d'épaisseur environ sur des disques en fibre de nylon (les scourtins), eux-mêmes empilés les uns sur les autres autour d'un pivot central (appelé aiguille) monté sur un petit chariot. L'ensemble est placé sur un piston de presse hydraulique qui permet de faire subir à la pâte une pression de l'ordre de 100 kg.cm⁻². La phase liquide s'écoule dans un bac. Les grignons restent sur les scourtins. (Figure 8). Cette opération dure environ 45 minutes. Ensuite, chaque scourtin est débarrassé de ses grignons en le tapant comme lors du nettoyage d'un tapis. (Alain Rival et Patrice Levang , 2013).



Figure 8 : Pate mise sur des scourtins (Boutayeb,2000)

Décantation : l'huile, ayant une densité inférieure à celle de l'eau, donc elle remonte à la surface. Il s'agit de la décantation naturelle. Cependant cette méthode n'est presque plus utilisée, en raison de sa lenteur et de la difficulté pour bien séparer l'huile de l'eau au voisinage de l'interface entre les deux fluides. Ce sont des centrifugeuses verticales à assiettes qui permettent aujourd'hui de séparer l'huile des margines. (Alain Rival et Patrice Levang , 2013).

II.5.iii. Procédé continu :

Il existe deux types du procédé d'extraction continu : système par centrifugation à trois phases et système par centrifugation à deux phases. (Alain Rival et Patrice Levang , 2013).

a. Système d'extraction par centrifugation à trois phases :

Les graines, une fois réceptionnées, subissent des traitements préliminaires tels que l'effeuillage, l'épierrage (enlèvement des pierres) et le lavage afin d'avoir de l'huile de bonne qualité. .(Alain Rival et Patrice Levang , 2013).

· Broyage : il est réalisé par des broyeurs mécaniques à disques ou à marteaux. Ces broyeurs peuvent travailler en continu, la pâte étant obtenue presque instantanément. .(Alain Rival et Patrice Levang , 2013).

· Malaxage : la pâte est versée dans un bac en inox modérément fluidifiée avec l'eau tiède, dans lequel tourne une spirale ou une vis sans fin, également en inox. .(Alain Rival et Patrice Levang , 2013).

· Séparation des phases : elle consiste à séparer la partie solide (grignons) de la partie fluide (margines). La pâte malaxée est injectée par une pompe dans une centrifugeuse dont l'axe est horizontal (décanteur horizontal). .(Alain Rival et Patrice Levang , 2013).

· Décantation : on utilise des centrifugeuses verticales à assiettes qui permettent de séparer l'huile des margines. .(Alain Rival et Patrice Levang , 2013).

b. Système d'extraction par centrifugation à deux phases :

Les grains subissent les mêmes étapes d'effeuillage, d'épierrage, de lavage et de broyage, de malaxage et de décantation que celles du système précédent à trois phases. Cependant, ce présent procédé d'extraction des grains fonctionne avec un nouveau décanteur avec centrifugation à deux phases qui ne nécessite pas l'adjonction d'eau pour la séparation des phases huileuses et solides contenant des grignons et les margines.

Ce décanteur à deux phases permet l'obtention de rendements en huile légèrement plus élevés que ceux obtenus par le décanteur conventionnel à trois phases et le système de presse. En outre, il ne procède pas à l'augmentation du volume des margines. (Alain Rival et Patrice Levang , 2013).

II.5.iv. Extraction par solvant:

L'extraction par solvants des huiles et graisse est essentiellement réalisée industriellement en mettant en contact la matière oléagineuse à traiter avec un solvant approprié. On obtient ainsi une solution d'huile dans le solvant ou mélange dont la concentration varie suivant la qualité du solvant et la richesse en huile de l'oléagineux traité. (Alain Rival et Patrice Levang, 2013).

Ce mélange, après filtration et concentration, est soumis à l'action de la chaleur dans un évaporateur puis dans une colonne finisseuse sous vide comportant une injection de vapeur pour l'élimination totale des dernières traces de solvant. Les vapeurs ainsi produites sont condensées dans des appareils classiques et l'huile obtenue est refroidie et stockée en attendant le raffinage. (Alain Rival et Patrice Levang , 2013).

Le solvant condensé est recueilli dans un séparateur où il est débarrassé de l'eau provenant de la vapeur injectée et de l'humidité des produits traités.

Les farines d'extraction retiennent toujours une quantité de solvant assez importante, que l'on récupère dans des appareils sécheurs. Là aussi, les dernières traces de solvant sont chassées à l'aide de vapeur vive ou sous vide plus ou moins poussé. (Alain Rival et Patrice Levang , 2013).

L'extraction est réalisée par un appareil de Soxhlet ou un appareil de Lickens-Nickerson.(Figure 9).

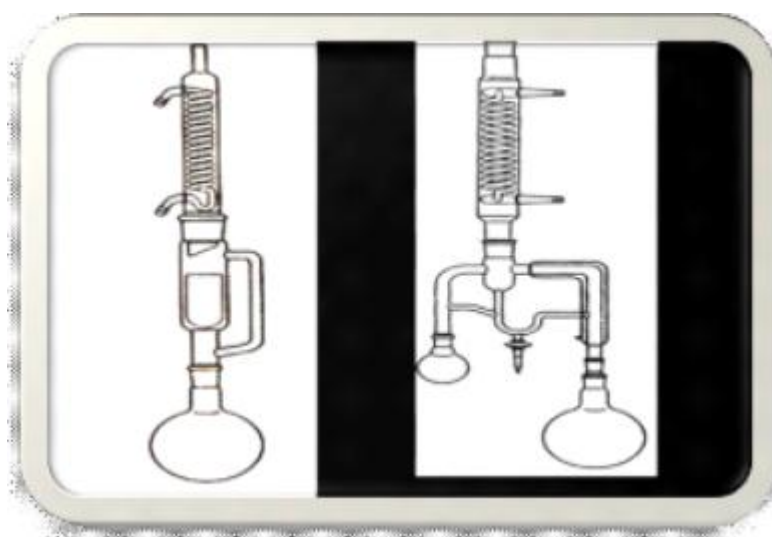


Figure 9 : Appareil de Soxhlet à gauche, et appareil de Lickens-Nickerson à droite (Boutayeb,2000)

II.6. Caractéristiques physico-chimiques :

Après avoir extraites les huiles on va essayer dans cette partie de déterminer quelques indices chimiques qui caractérisent les matières grasses. Ces indices permettent de faire quelques estimations sur les masses moléculaires moyennes des acides gras et des triglycérides déterminés par l'indice de saponification (I.S), sur le nombre des insaturations par la mesure de l'indice d'iode (I.I) et sur la teneur en acides gras libres par la détermination de l'indice d'acide (I.A). On peut également déterminer la teneur de l'huile en matières insaponifiables et quelques caractéristiques physiques tels que l'indice de réfraction et la densité. (Boutayeb, 2000).

II.6.i. Les caractéristiques chimiques :

a. Indice d'acide (I.A)

L'indice d'acide d'un corps gras est la quantité de potasse exprimée en milligramme nécessaire pour neutraliser les acides gras libres contenus dans un gramme de corps gras. (Boutayeb, 2000).

Cet indice apporte un renseignement précieux sur la qualité de la conservation soit des

graines soit de l'huile.

$$I.A = \frac{V.N.56.1}{m}$$

N : normalité de la solution éthanolique de KOH

V : volume de la solution éthanolique de KOH exprimé en ml

m : masse de la prise d'essai d'huile en gramme 56,1 : masse molaire de KOH

b. Indice de saponification (I.S) :

Il correspond au nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaires pour la saponification d'un gramme de corps gras suivant la réaction chimique suivante:



La valeur de l'indice de saponification nous permet d'estimer les longueurs des chaînes de carbone des acides gras constituant l'huile d'une part, et de calculer les masses moléculaires moyennes des acides gras et des triglycérides qui renferment l'huile. (Boutayeb, 2000).

$$I.S = \frac{N.(V_0 - V_1).56.1}{m}$$

II.7. Utilisation et consommation

Les huiles végétales sont utilisées en aromathérapie, en cosmétologie, en kinésithérapie, mais également dans le domaine de l'alimentation. En agriculture, on s'en sert comme carburant. Enfin, l'huile végétale peut aussi servir de combustible. (ooreka.2020).

Si vous souhaitez bénéficier de toutes ses vertus, sachez que vous pouvez utiliser une huile végétale :

- en tant qu'aliment, notamment sur une salade ;
- en massage, efficace et sensuel ;
- en tant que produit de beauté et de soin pour nourrir et embellir corps, visage et cheveux.

III. Activités antibactérienne des huiles lentisque (fruits)

Il n'y a pas beaucoup d'études qui confirment que l'huile végétale extraite par des méthodes traditionnelles a une activité antimicrobienne, mais il y a quelques études qui ont été menées sur l'huile végétale pure, qui ont conclu qu'elle n'a aucune activité contre les microbes, alors que l'huile essentielle a une haute activité contre les microbes.

III.1. Activité antibactérienne des huiles végétales

Un groupe de chercheurs tunisiens s'est organisé pour mener des expériences sur l'huile végétale pure de la plante *Pistacia lentiscus* L'une de ces expériences concerne l'efficacité contre les microbes.

Les diamètres des zones d'inhibition (en mm) ont été mesurés afin d'étudier l'effet bactéricide des différents échantillons d'huile fixe de *Pistacia lentiscus*.

Aucune zone d'inhibition n'a été observée dans le cas d'*Escherichia Coli* et de *Salmonella typhimurium*. Dans le cas de *Clostridium perfringens* seuls les échantillons GP, BA et BP ont un effet bactéricide considéré faible en comparaison avec les zones obtenues en présence du Céfotaxime. Son inhibition de la bactérie Gram+ *Clostridium perfringens*, et l'absence de l'activité bactéricide sur les Gram- (*Escherichia Coli* et *Salmonella typhimurium*) nous mène à déduire une relation entre la présence ou l'absence de l'enveloppe bactérienne et l'effet bactéricide de l'huile fixe de *Pistacia lentiscus*.(Khouja M et al.,2012).

III.2. Activité antibactérienne des huiles essentielles

L'activité biologique d'une HE est liée à sa composition chimique et aux effets synergiques entre ses composants. Sa valeur tient à l'intégralité de ses constituants et non seulement à ses composés majoritaires (Boulechfar, 2014). Ces HEs peuvent être utilisées directement comme agents thérapeutiques, ou comme matières premières pour la synthèse de principes actifs (Bessah et Benyoussef, 2015 ; Boulechfar, 2014).

Dans le domaine médical, le rôle des HEs est devenu indéniable puisqu'elles sont utilisées dans le traitement de diverses pathologies, comme agents antibactériens, antiparasitaires, insecticides, antiviraux, antifongiques et antioxydants. On leur attribue également des pouvoirs antispasmodiques, diurétiques, expectorants, cicatrisants et

sédatives, elles ont également une action antitoxique, antivenimeuse et anticancéreuse (Kouch, 2015).

III.2.i Activité antimicrobien

Les HEs s'avèrent efficaces pour le traitement des affections bactériennes et fongiques de la cavité buccale et du système respiratoire (Boumaza, 2019).

Plusieurs travaux ont montré que les HEs du Thym, d'écorce de Cannelle, et de Menthe poivrée sont très efficace sur les principaux germes pathogènes responsables des infections respiratoires, notamment *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoneae*, *Streptococcus pyogènes* et *Staphylococcus aureus* (Boumaza, 2019).

De façon générale, l'activité antibactérienne de plusieurs HEs testées est plus puissante sur les bactéries à coloration de Gram positif que les bactéries à coloration de Gram négatif (Mehalaine, 2018).

Le processus de l'effet des HEs dépend initialement de la nature chimique et des caractéristiques physico chimiques des substances bioactives, en particulier leur propriété hydrophobe. Cette propriété permet à la molécule de pénétrer à travers la barrière de la membrane plasmique (la bicouche phospholipidique) des cellules microbiennes. Une fois la substance pénètre la membrane, elle peut induire des changements de la conformation structurale, et peut donc perturber l'équilibre chimiosmotique par une fuite d'ions (Benmeddour, 2016).

Partie Expérimentale

Matériel et méthodes

I.1. L'objectif :

La résistance aux antibiotiques est devenue une véritable préoccupation à cause de ceci beaucoup des études ont été réalisées pour la recherche des composés antimicrobiens alternatifs, en particulier à partir des extraits des plantes cela est devenu plus important que jamais grâce aux vertus thérapeutiques dans des journaux spécialisés de microbiologie ou présentées lors de congrès scientifique d'aromathérapie.

Les huiles essentielles ont des activités antibactériennes importantes et peuvent remplacer les antibiotiques qui s'avèrent inefficaces contre les micro-organismes résistants. Cela nous a amené à nous demander si l'huile végétale extraite de la plante *Pistacia lentiscus* (fruits) de façon traditionnelle aurait une activité antibactérienne. Cela nous a poussé à mener une évaluation scientifique de l'activité antimicrobienne pour prouver son efficacité contre les bactéries multirésistantes.

Cadre de l'étude :

La partie expérimentale de cette étude a lieu au laboratoire pédagogique de l'université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem (UMAB) de la période allant du mois d'Avril jusqu'au mois de Juin 2022.

I.2. Matériels et méthodes

I.2.i. Choix et origine des souches bactériennes testées

Les souches microbiennes, misent à notre disposition par le laboratoire pédagogique de microbiologie du l'université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem (UMAB)

Selon la disponibilité du matériel, deux souches ont été testées dont une souche bactérienne à Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), une à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 4158).

I.2.ii. Milieux de culture :

Tous les milieux de culture et d'identification utilisés pour l'isolement et la purification des souches bactériennes pathogènes d'origine clinique sont mentionnés dans l'annexe (2). La gélose nutritive a été utilisée pour le repiquage de l'ensemble des souches

étudiées ainsi que pour la conservation des souches à 4°C et la gélose Mueller-Hinton pour la réalisation des tests d'antibiogramme et d'aromatogramme.

I.2.iii. L'identification :

La confirmation de l'identité des souches bactériennes pathogènes isolées a été faite par des examens macroscopiques, microscopiques et biochimiques.

I.2.iii.a. Etude macroscopique :

Les souches cibles ont été isolées sur des milieux sélectifs pour garantir leur pureté. L'examen macroscopique consiste à étudier l'aspect des colonies obtenues sur milieux solides après 24 heures de culture et à une température de 37°C d'incubation. Il nécessite une observation à l'œil nu, en lumière naturelle ou artificielle, afin de déterminer la taille, la forme, la pigmentation, la viscosité, le contour, la couleur des colonies bactériennes et la consistance parfois caractéristique de chaque espèce.

I.2.iii.b. Etude microscopique :

L'examen microscopique, permet d'étudier la morphologie des cellules bactérienne et leur mode d'association afin de les classer. Il inclut l'observation à l'état frais (examen entre lame et lamelle des bactéries vivantes) et l'observation après coloration, le plus souvent sur frottis sèches et fixes (coloration de gram). (Annexe 1). (Joffin et Leyral, 1996).

La coloration de gram permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne pour distinguer et classer les bactéries à gram positif (+) et les bactéries à gram négatif (-), non seulement d'après leur forme, mais aussi selon leur affinité pour les colorants, liée à la structure de leur paroi (Brelière et al., 2009).

I.2.iii.c. Détermination des caractères biochimiques :

L'identification biochimique permet d'identifier les souches bactériennes en s'appuyant sur leurs caractères biochimiques, ces derniers peuvent révéler des informations vitales nécessaires pour identifier avec précision les genres et les espèces de diverses bactéries dans un échantillon.

Parmi les tests d'identification effectués nous avons le TSI (Triple Sugar Iron), le citrate de Simmons, le nitrate réductase, le mannitol mobilité, la catalase (Annexe 1), en plus des galeries d'identification biochimiques en tubes (macro-galerie) (annexe 3).

Les galeries, inoculées par des suspensions préalablement préparées, sont incubées pendant 24 heures à 37°C puis révélées à l'aide des réactifs spécifiques fournis avec les galeries (Holt et al, 1994).

Enfin, à partir des suspensions précédentes, une gélose nutritive inclinée est ensemencée puis incubée pour permettre la conservation des bactéries identifiées à 4°C.

I.3. Etude de la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques (antibiogramme) :

L'antibiogramme est réalisé selon la méthode de diffusion de disques en milieu gélosé et permet de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique (Burnichon et texier, 2003). Cette étude a pour but de comparer l'effet des antibiotiques avec l'effet de l'huile végétale de *Pistacia lentiscus*

. Les antibiotiques testés sont mentionnés dans le **tableau 03**.

I.3.i. Préparation de l'inoculum :

La suspension est préparée à partir d'une culture jeune sur gélose nutritive de 18 à 24 heures, où quelques colonies des souches cibles ont été prélevées, diluées dans un tube à essai contenant 5 ml de bouillon nutritif stérile, puis bien homogénéisées par la suite à l'aide de vortex.

Après 18 à 24 heures, la suspension bactérienne préparée et bien homogénéisée a été par la suite standardisée à 0.5 McF (McFarland), soit une D.O de 0,08 à 0,10 lue à une longueur d'onde de 625 nm, par utilisation d'un spectrophotomètre UV (JENWAY 670). Le spectrophotomètre permet d'ajuster l'inoculum. L'appareil doit être calibré contre un étalon d'échelle de McFarland.

I.3.ii. Inoculation des géloses :

L'inoculum bactérien doit être idéalement employé dans les 15 min qui suivent sa préparation.

L'ensemencement des boîtes de pétri est réalisé à l'aide d'un écouvillon en coton stérile, un volume de suspension microbienne standardisée a été ensemencé par étalement sur un milieu de culture gélosé approprié (Mueller Hinton), tout en éliminant l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube. Il est important de rejeter l'excès de liquide pour éviter une sur-inoculation des boîtes. L'écouvillonnage doit être effectué sur la totalité de la surface de la gélose dans trois directions. Cette étape est suivie par un séchage qui peut durer entre 10 à 15 min à température ambiante (Denis et al., 2011).

I.3.iii. Dépôt des disques imprégnés d'antibiotiques :

Les disques d'antibiotiques correspondants ont été déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface de la gélose inoculée et séchée sans être déplacés car la diffusion des antibiotiques est très rapide. Il est important que les diamètres des zones d'inhibition soient mesurables. Donc le nombre maximum de disques est de six pour les boîtes de 90 mm de diamètre.

Les boîtes de pétri ont été fermées et incubées idéalement (à température ambiante) dans les 15 min qui suivent le dépôt des disques, sans dépasser 30 min. Elles ont été par la suite portées à incubation à 37°C pendant 18 à 24 h. Les boîtes, si elles sont abandonnées à température ambiante après dépôt des disques, la pré-diffusion des antibiotiques engendrera des zones d'inhibition faussement agrandies.

I.3.iv. Lecture des boîtes après incubation :

La lecture des résultats a été faite par la mesure de la zone d'inhibition représentée par une auréole formée autour de chaque disque où aucune croissance n'est observée.

Les résultats obtenus sont comparés aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondant, ce qui permet de classer la bactérie dans l'une des catégories ; sensible (s), résistante (r) ou intermédiaire (i). Selon la standardisation nationale de l'antibiogramme en médecine humaine et vétérinaire de l'année 2011 et le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (2018). (Ammari et al., 2011 ; Jehl et al., 2015).

. Les antibiotiques testés dans le **tableau 03**.

Famille	Antibiotique	Abréviation	Charge de disque en μg
Quinolones	Ciprofloxacine	CIP	5
Pénicillines	Tétracycline	TE	30
Céphalosporines	Cefotaxime	CTX	30
Aminosides	Gentamycine	CN	120
Phénicolés	Chloramphénicol	C	30
Polymixine	Colistine	COL	10
Pénicillines	Oxacilline	OX	1
Sulfamides	Sulfaméthoxazole	SXT	25
Carboxypénicillines	Ticarcilline	TI	75

I.5. Effets antibactériens des huiles de *Pistacia lentiscus*

I.5.i. Matériel végétal :

L'huile végétale extraite de la plante *Pistacia lentiscus* a été sélectionnée de manière traditionnelle, connue pour ses utilisations en médecine douce, riche en ingrédients naturels, sans additif. (**Figure. 11**).



Figure 11 : HV de lentisque pistachier (photo originale, 2022).

I.5.ii. La conservation de l'huile

Le verre étant le matériau le plus inerte, on le privilégiera, en choisissant, de préférence, du verre teinté. Les huiles gardent ainsi toutes leurs valeurs nutritionnelles pendant 14 à 18 mois

préservée aseptiquement dans un flacon en verre opaque bien scellé de manière à la protéger de la lumière afin éviter toute dégradation des molécules, il faut également éviter le contact avec l'air (pas d'ouverture prolongée de flacon), par la suite il faudra garder le flacon à une température basse entre (4 -5 °C) pour une utilisation ultérieure (Bekhechi et al., 2008).

I.5.iii. La mesure de PH :

Le pH ou « potentiel d'hydrogène » mesure l'activité chimique des ions Hydrogènes (H⁺) en solution. Plus couramment, le pH mesure l'acidité ou la basicité d'une solution. Il s'agit d'un coefficient permettant de savoir si une solution est acide, basique ou neutre : elle est acide si son pH est inférieur à 7, neutre s'il est égal à 7, basique s'il est supérieur à 7. (Hamadou et Touki, 2017). (**Figure. 12**).



Figure 12 : Détermination du pH d'HV de *Pistacia lentiscus* (photo Originale 2022).

Ainsi, les huiles végétales extraites se distinguaient par leur pH. Le pH est mesuré à l'aide de papier pH. Quelques gouttes d'HV extraites sont déposées sur un morceau de papier pH, et le changement de couleur du papier est comparé à un ensemble de couleurs qui varient en fonction du pH. Pour vérifier l'exactitude, nous avons vérifié par pH-mètre.

I.5.iv. Aromatogramme :

L'aromatogramme est un test de laboratoire qui permet aux phytothérapeutes d'analyser *in vitro* l'activité antibactérienne des huiles et de sélectionner plus précisément ceux qui sont capables de supprimer ou de détruire les germes pathogènes (Damian, 1995).

Il existe différents types d'aromatogrammes tout dépend des milieux utilisés : solides ou bien liquides. Alors que, dans la pratique quotidienne, le milieu solide est le plus simple et le plus facilement reproductible (Pibiri, 2005).

L'activité antibactérienne des HV a été déterminée par la méthode de diffusion en gélose. On prépare des boîtes de pétri (90 mm de diamètre) en versant 20 ml de milieu Agar Mueller Hinton (MHA) et on laisse solidifier et sécher pendant 30 minutes. (Hazzit et al., 2009).

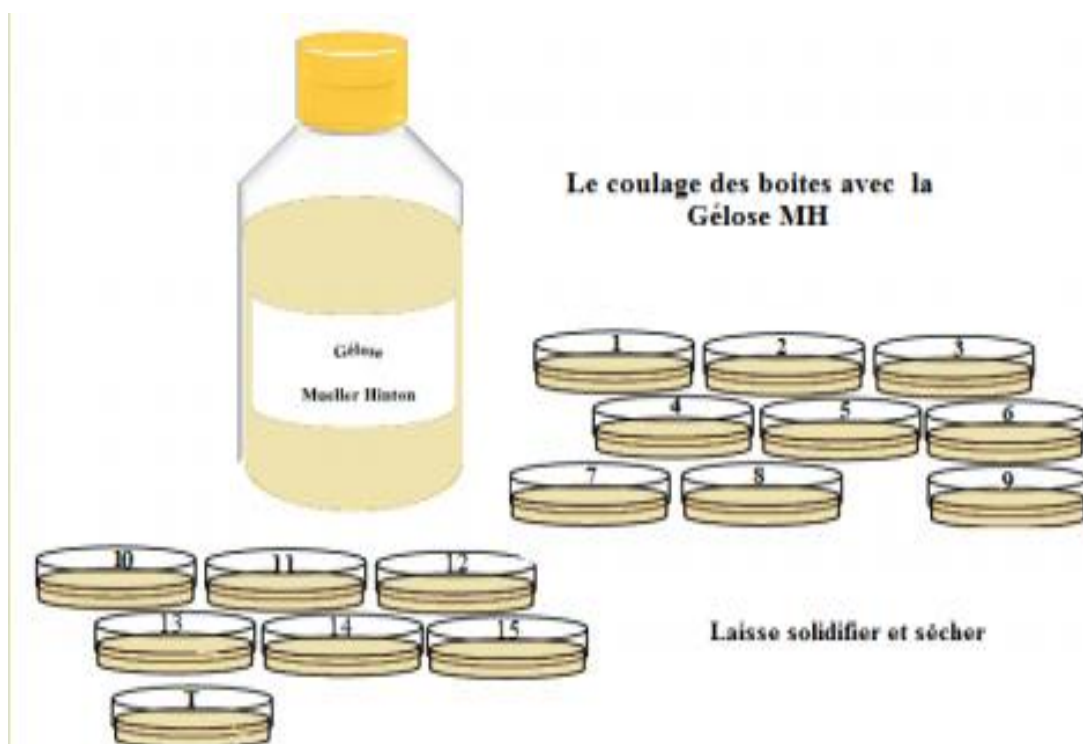
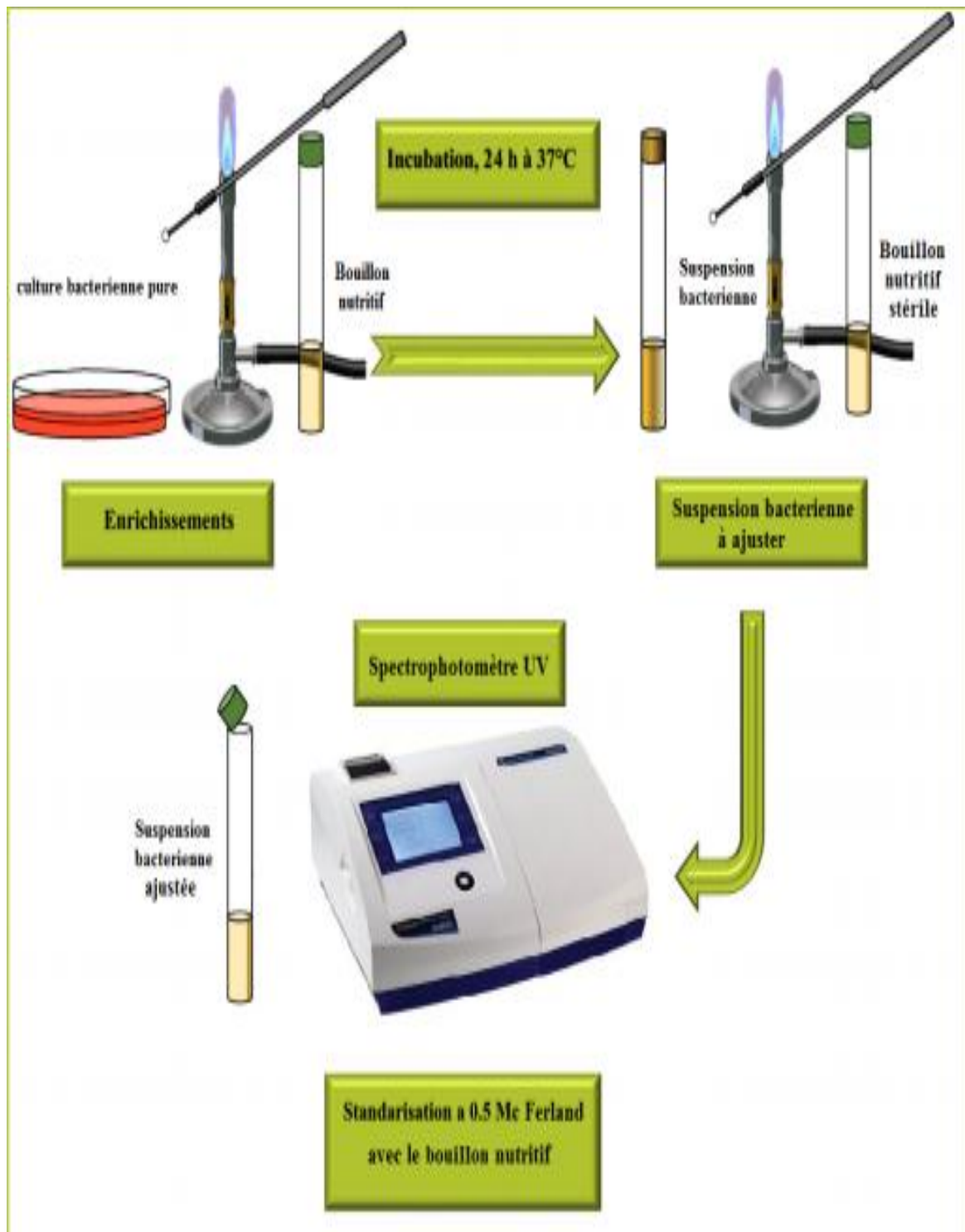


Figure 13 : le coulage des boîtes avec la gélose MH.

Entre-temps, la densité des suspensions bactériennes a été ajustée avec le bouillon nutritif stérile en utilisant un spectrophotomètre UV (Jenway 670) pour atteindre la concentration finale de 10^6 UFC/ml. Un volume de suspension microbienne standardisée a été ensemencé par étalement et étendu uniformément sur la gélose (MH) et laisser sécher pendant 5 min (**figure 13**). (Mohapatra et al, 2011).



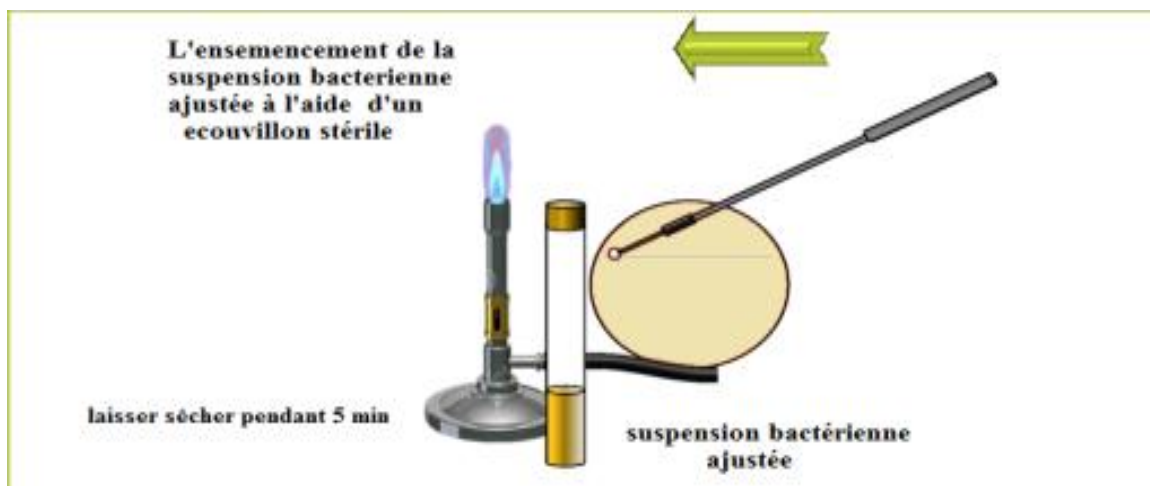


Figure 14 : les étapes de la standardisation de la suspension bactérienne à 0.5 Mc

Ferland et leur étalement sur les boites gélosées de MH.

L'HV est diluée avec le DMSO afin de disperser les composés et d'améliorer leur contact avec les microorganismes testés. Les dilutions préparées sont mentionnées dans le Tableau 04.

Tableau 04 : Les dilutions de l'huile végétale dans le DMSO.

Les concentrations (%)	Quantité de l'HV	Quantité de DMSO	Volume finale
100 %	5 ml	0 ml	5 ml
75 %	3,75 ml	1,25 ml	5 ml
50 %	2,5 ml	2,5 ml	5ml
20 %	1 ml	4 ml	5ml
5 %	0,25 ml	4,75 ml	5 ml
0 %	0 ml	5 ml	5ml

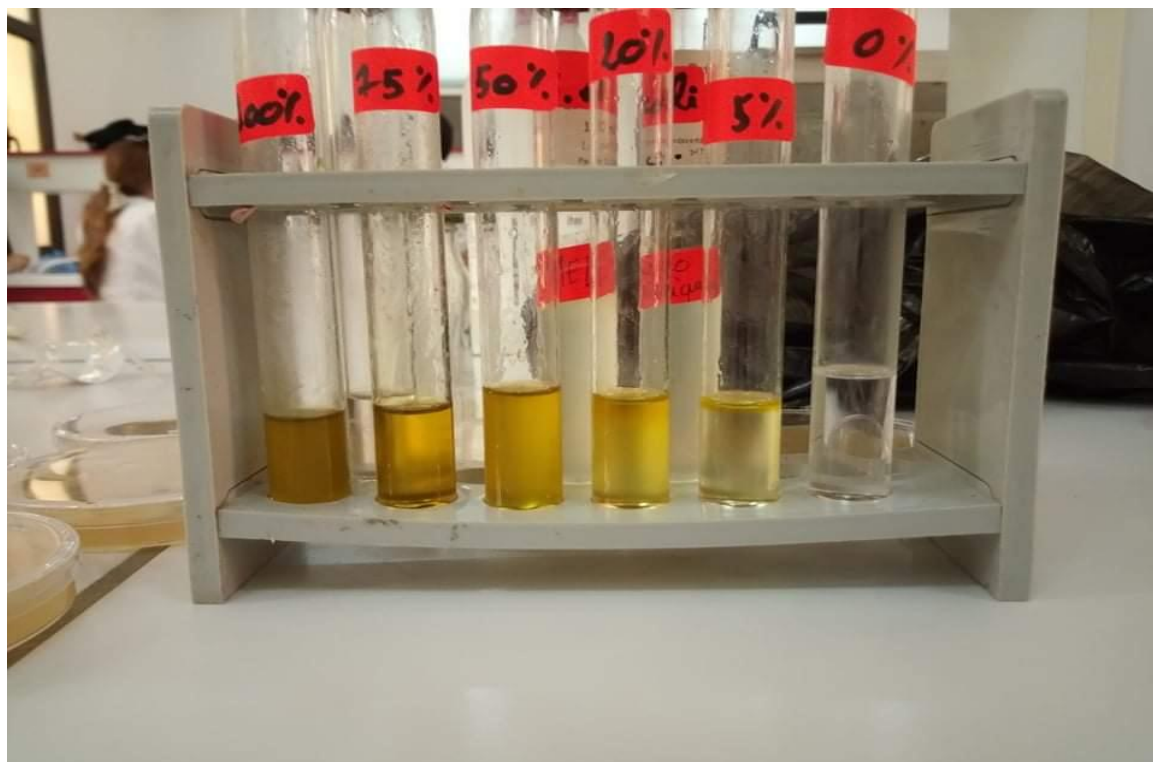


Figure 15 : la dilution (Photo Originale.2022)

Des disques de papier Wattman stériles de 6 mm de diamètre sont déposés sur la surface des boîtes pétri qui sont préalablement coulé et inoculé avec les bactéries testées, ensuite ces disques ont été imprégnés avec 5 μ l d'huile végétale de déférente concentration à l'aide d'une micropipette, sachant que la concentration exprimée avec 0 % est le contrôle négatif qui a été effectué par le dépôt de 5 μ l de DMSO comme boite témoin (Annexe 3). Les boîtes sont ensuite fermées et laissées diffuser pendant 15 min à température ambiante puis incubées à 37 ° C pendant 24 heures. Chaque essai a été réalisé en trois répétitions. Comme il est mentionné à la (Figure 16).

Le diamètre des halos qui apparaissent autour des disques traduisant l'activité antimicrobienne a été mesuré à l'aide d'une règle. La sensibilité des bactéries testées à l'huile végétale est classée selon les diamètres d'inhibition :

- bactéries résistantes ($\text{Ø} < 8$ mm),
- bactéries sensibles ($9 \text{ mm} < \text{Ø} < 14$ mm),
- bactéries très sensibles ($15 \text{ mm} < \text{Ø} < 19$ mm) et bactéries extrêmement sensibles ($\text{Ø} > 20$ mm)

Les diamètres sont mesurés en mm et le résultat étant la moyenne des trois essais. (Dris, 2020).

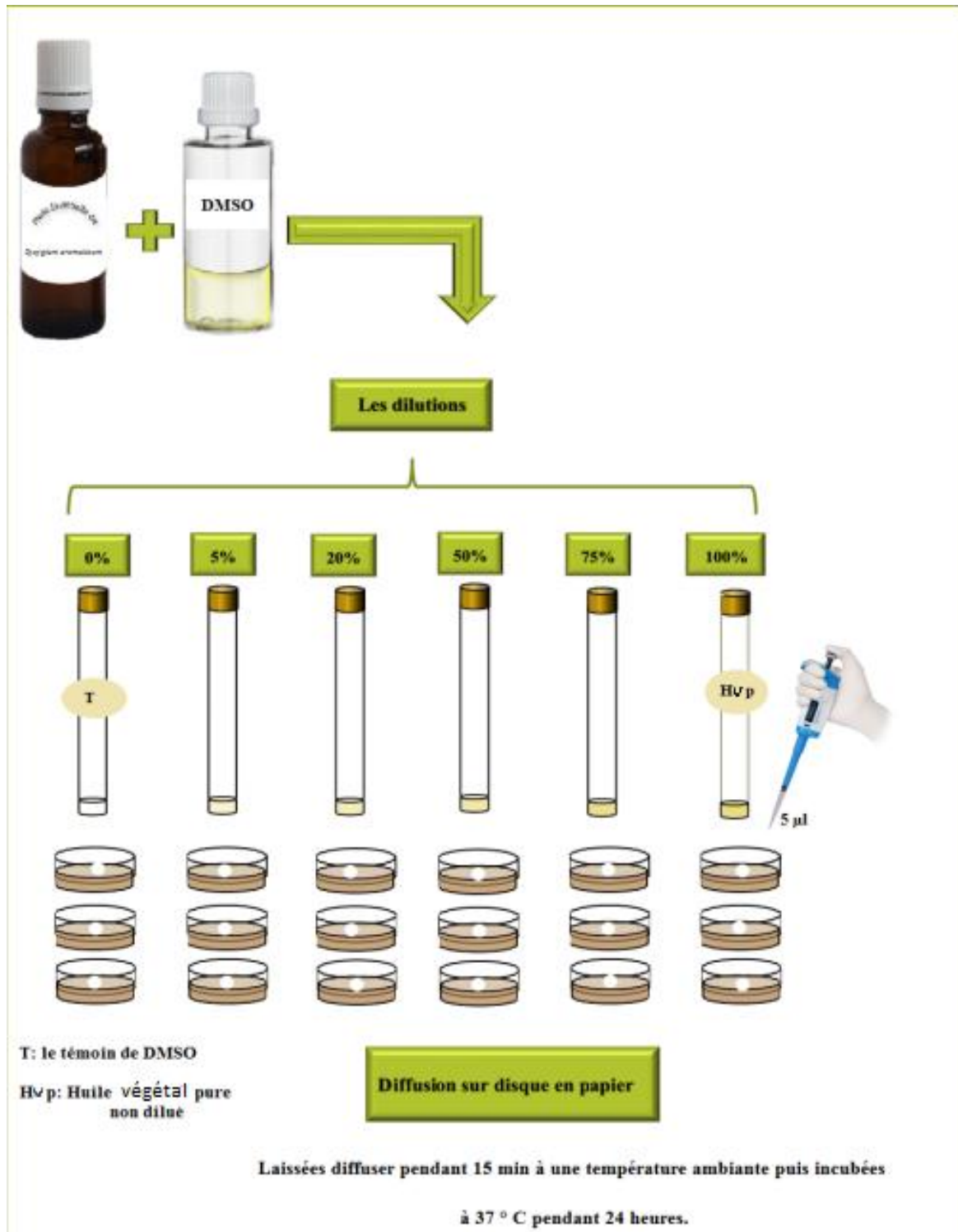


Figure 16 : les étapes de la dilution des huiles végétales de *lentisque pistachier* et leur dépôt sur les disques en papier.

Résultats et discussion

I. Procédés d'études microbiologique

I.1. Identification des souches bactériennes

I.1.i. Examen macroscopique

L'observation macroscopique des colonies permet de l'étude de l'aspect des colonies à l'œil nu, dont la taille, la forme, la couleur, la consistance de chaque espèce.

La culture de *S. aureus* obtenue sur milieu Chapman (**Figure 17**), se caractérise par des colonies (de 1 à 2 mm de diamètre), ayant des formes sphériques, lisses, luisantes et bombées, certaines souches produisent un pigment jaune orangé, mais cette production est irrégulière, car certaines donnent des colonies blanches ; le caractère pigmentaire n'est pas propre à l'espèce (Avril et al., 2000).

Sur milieu BGA, des colonies (de 1 à 2 mm de diamètre) rondes plus ou moins régulières de couleur jaune claire, peu bombées, caractérisent le genre *Escherichia* (**Figure 18**).

Le milieu BCP facilite la différenciation des colonies par le caractère lactose. Il inhibe

L'envahissement de la surface de la boîte par des nappes de *Proteus* car il ne contient pas d'électrolytes. Il contient une base nutritive ordinaire permettant la croissance des bactéries non exigeantes et le lactose comme un critère de différenciation : la fermentation du lactose est révélée par le virage de couleur du milieu.

- Colonies jaunes ; bactéries lactose (+).
- Colonies bleues ; bactéries lactose (-).



Figure 17 : Aspect macroscopique de *Staphylococcus aureus* sur gélose



Figure 18 : Aspect macroscopique d'*Escherichia coli* sur gélose

I.1.ii. Examen microscopique

I.1.ii.a. Etat frais

Les bactéries examinées à l'état frais apparaissent mobiles ou immobile selon l'espèce (tableau 09).

V.1.ii.b. Coloration de gram

Sous microscope optique et à émergence au grossissement X100, la coloration de Gram réalisée à partir des colonies distinctes, montre la présence de bactéries roses donc à coloration de Gram (-) négatif, de forme bacillaire et coccobacille ainsi que d'autres bactéries violettes à coloration de Gram positif, de forme cocci (**Figure 19**).

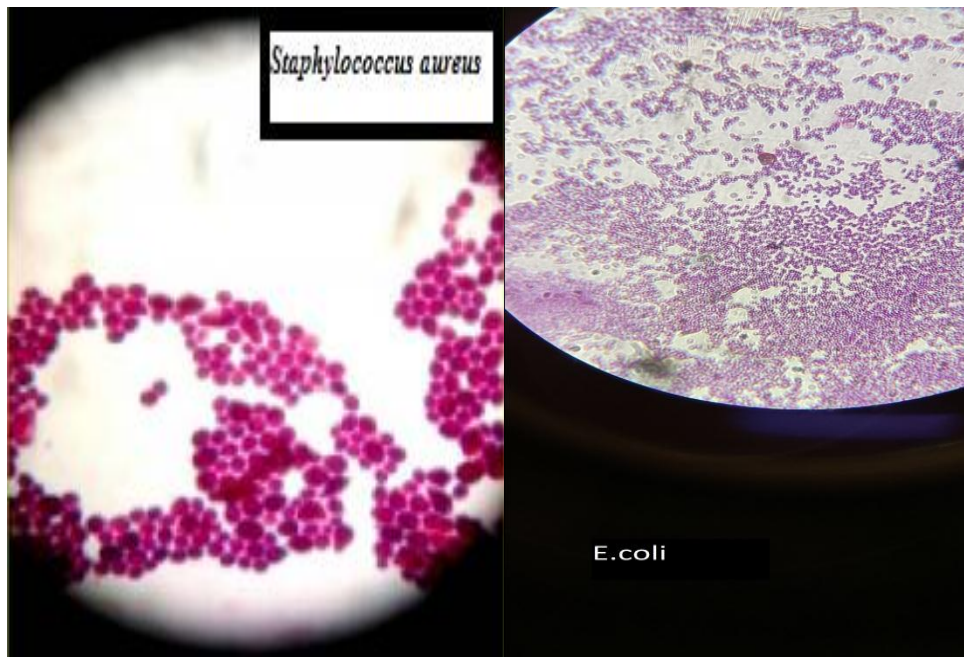


Figure 19 : Coloration de Gram des différentes bactéries isolées (grossissement X100).

I.1.iii. Tests biochimiques :

En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques conduisent à la formation d'eau oxygénée. La présence d'une catalase active (figure 29) chez les bactéries isolées est traduite par un dégagement gazeux abondant sous la forme de mousse ou de bulles d'oxygène, due à la dégradation de l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène comme l'indique la réaction suivante (Holt et al, 1994) :





Figure 20 : Test de la catalase

Les résultats obtenus à partir de l'étude morphologique et les tests biochimiques des souches étudiées sont indiquées dans le tableau 05. Les réactions produites au cours de la période d'incubation se traduisent par des virages de couleurs spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Annexes 2).

Tableau 05 : Résultats d'étude morphologique, de mobilité et des tests biochimiques des bactéries

Milieu \ Souches	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Gram	Négatif (-)	Positif (+)
Forme	Coco bacille	Cocci en amas
TSI	GLU+ LAC+ Gaz (+) H ₂ S (-)	GLU+ LAC+ Gaz (+) H ₂ S (-)
Mannitol et Mobilité	Mannitol (+) Mobile	Mannitol (+) Immobile
Citrate de Simmons	Négatif (-)	Positif (+)
Nitrate Réductase	Positif (+)	Positif (+)
Recherche de Catalase	Positif (+)	Positif (+)
Clark et Lubs	VP (-) RM (+)	VP (+) RM (-)

II. L'antibiogramme :

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques habituellement utilisés dans la thérapie des bactéries isolées à été testée par la méthode des disques et illustrées dans les (figures 21 et 22).

L'observation des boites après incubation à 37°C pendant 24-48 heures nous a donné les résultats indiqués dans les tableaux (06.07).

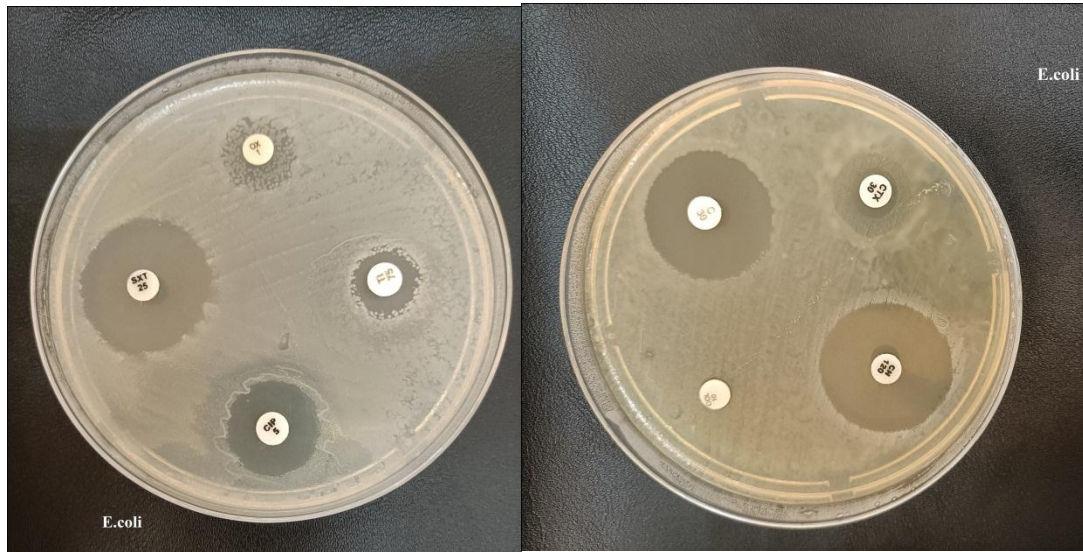


Figure 21 : Résultats de l'antibiogramme d'*E. Coli* (Bouhella et Khadrougui.2022).

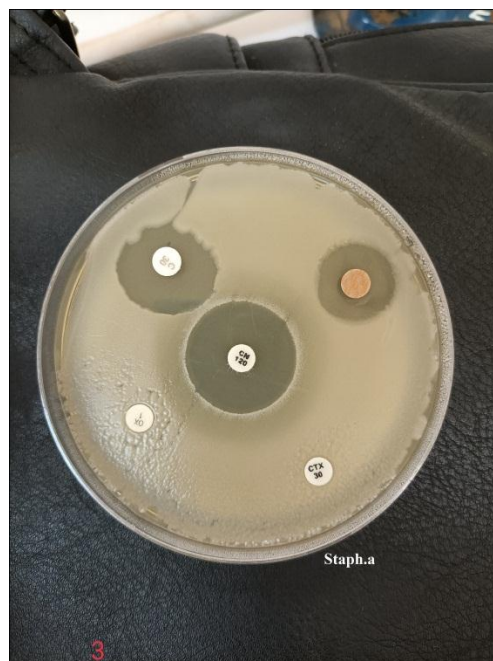


Figure 22 : Résultats de l'antibiogramme d'*Staphylococcus aureus* (Bouhella et Khadrougui.2022).

Tableau 06 : Résultats de l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus* étudiée

Antibiotique	Diametre	Critique	mm	<i>Staphylococcus aureus</i>	Résultats
	R	I	S	Ø (mm)	
CN	< 20		> 20	17.6	R
TE	< 19	20 - 21	> 22	12.2	R
C	< 18		>18	17.8	R
CTX	< 22		>22	0.2	R

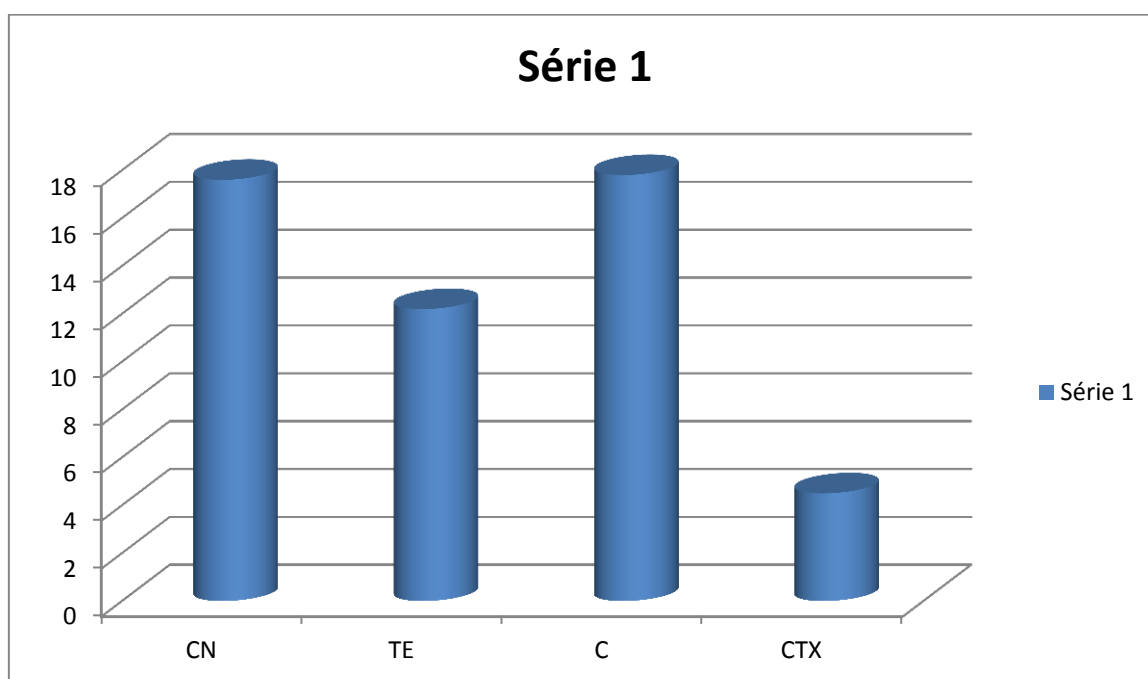


Figure 23 : Représentation graphique des résultats de l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*.

Tableau 07 : Résultats de l'antibiogramme d'*E.coli* étudiée

Antibiotique	Diamètre	critique	mm	<i>E.coli</i>	Résultats
	R	I	S	Ø mm	
SXT	<12	13-16	>17	19.6	S
TI	<20	21-22	>23	7.6	R
CIP	<15	16-20	>21	11.8	R
C				20.2	
CTX	<23	24-25	>26	8.6	R

CN	<16	17	>18	20.6	S
COL	<15	16-17	>18	0.4	R

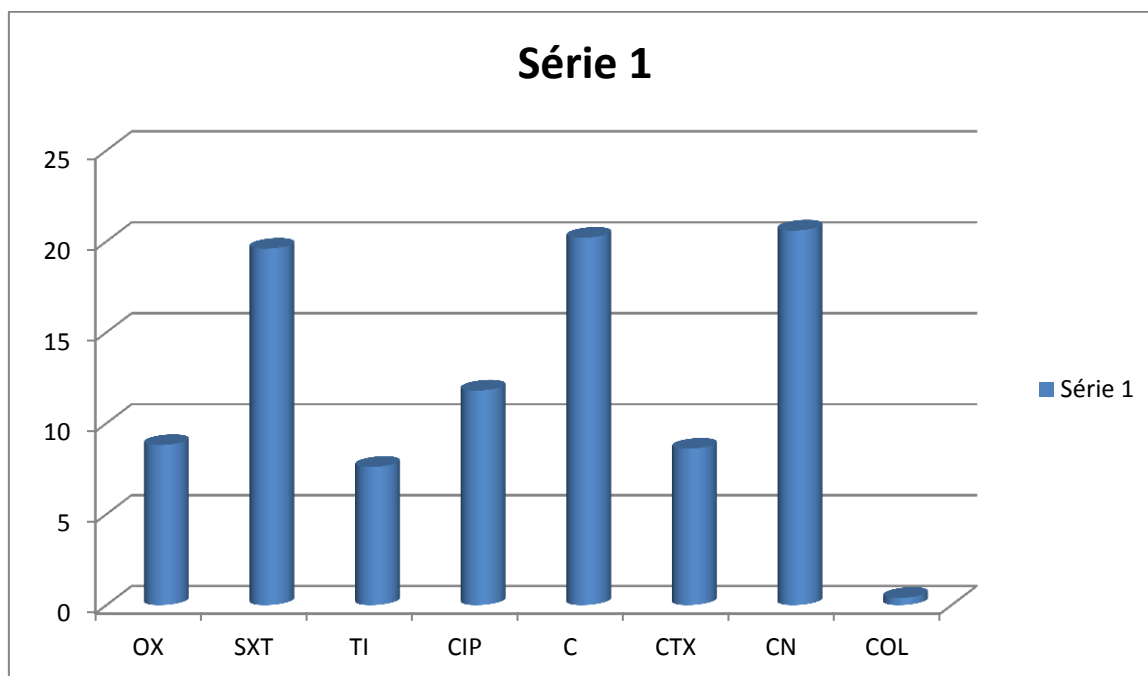


Figure 24 : Représentation graphique des résultats de l'antibiogramme de *E.coli*

Les résultats indiqués dans le (tableau 07) montrent que *E.coli* a présenté une résistance importante, notamment *E. coli* vis-à-vis à la cefotaxime (CTX) , , la Chloramphénicol (C) et Ciprofloxacine (CIP) et Colistine (COL) et Ticarciline (TI) et dont les diamètres d'inhibition sont respectivement de 8.6, 20.2, 11.8 ,0.4 et 7.6 mm , mais il a présenté une certaine sensibilité vis-à-vis la Sulfaméthoxazole (SXT) et la gentamycine (CN).

La bactérie *Staphylococcus aureus* a présenté une résistance vis à vis la Gentamycine (CN) et , la Chloramphénicol (C) et la cefotaxime (CTX). (Tableau 06).

Globalement, les résultats de l'antibiogramme ont exprimé une résistance acquise et multiple des deux bactéries étudiées vis-à-vis des antibiotiques utilisés habituellement dans la thérapie. Cet échec nous a ainsi poussés de chercher une alternative naturelle pour limiter cette résistance croissante.

III. Effets antibactériens des huiles végétales de *Pistacia lentiscus* (fruits)

III.1. Extraction des huiles végétales de *Pistacia lentiscus* (fruits)

III.1.i. Rendement en huile végétale

Afin d'obtenir une masse d'huile végétale suffisante pour effectuer toutes les analyses microbiologiques, nous avons mené une enquête auprès des personnes qui extraient de manière traditionnelle et les avons comparées à d'autres méthodes, et le résultat a été le suivant :

Le rendement en huile végétale par la méthode traditionnelle était de 5% .Au moyen du Soxhlet, le rendement moyen obtenu en pourcentage est de 4%, et cette valeur est inférieure à celle obtenue par la méthode artisanale 20%.

III.1.ii. Etude des propriétés organoleptiques

Les résultats mentionnés dans le tableau 08, montrent une comparaison entre les caractéristiques de notre huile végétale extraite de l'espèce *Pistacia lentiscus* avec les normes d'AFNOR 1992.

Tableau 08: Caractéristiques organoleptiques

Aspect	Couleur	Odeur
Liquide	Vert-jaunâtre	balsamique

III.1.iii. La mesure de pH

Selon le résultat obtenu, le pH de l'huile essentielle est acide (pH= 06) (tableau 16) ; ceci est due à la composition chimique des HV *Pistacia lentiscus*. Tableau 09

Tableau 09 : Résultat du pH d'HV de *Pistacia lentiscus*

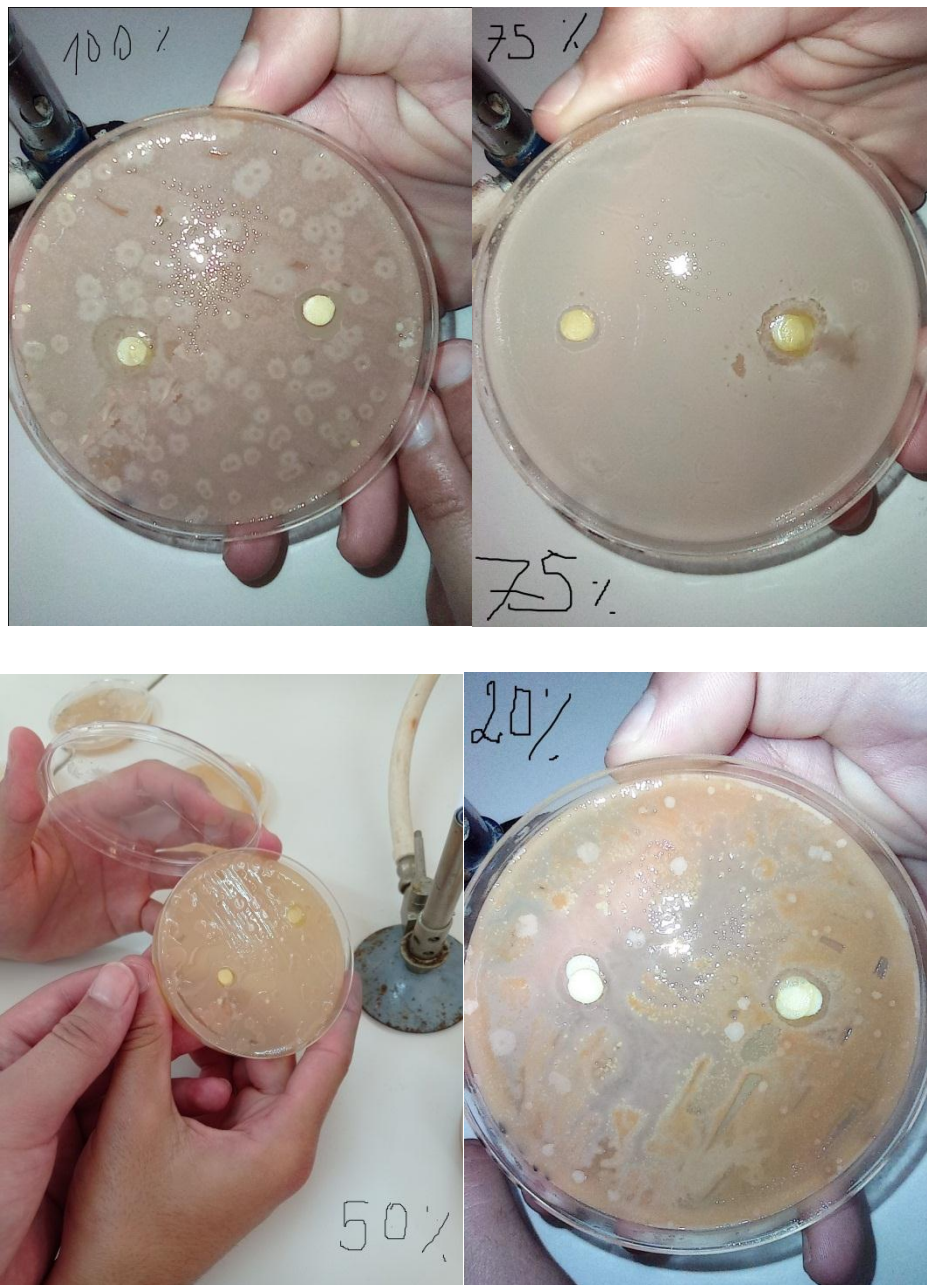
	Huile étudiée	Norme AFNOR	
		Minimale	Maximale
PH	6.2	5.5	7

Résultats et discussion

Dans le but d'estimer le potentiel microbien de notre l'huile végétale (*Pistacia lentiscus*), le choix s'est porté sur plusieurs souches cibles, car chacune d'elle possède des structures cellulaires et un métabolisme particulier.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HV de *Pistacia lentiscus* par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé permet de mesurer la capacité de notre l'huile à inhiber la croissance microbienne in vitro.

Elle est ainsi basée sur la mesure du diamètre des halos d'inhibition obtenus et mesurés avec précision. Les résultats présentés dans le tableau 08 et les **figure 25** et **26** illustrées ci-dessous :



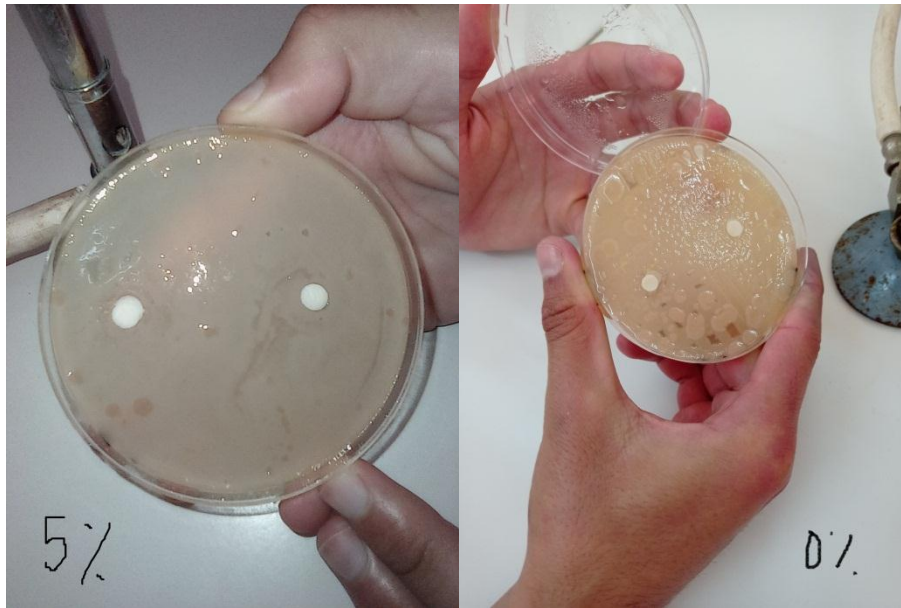


Figure 25 : Résultats de l'aromatogramme de *Staphylococcus aureus*





Figure 26 : Résultats de l'aromatogramme d'E. Coli

Tableau 10 : les résultats de l'aromatogramme

Souche cibles	Les dilutions			Diamètre en (mm)		
	Contrôle Négatif DMSO 0%	05%	20%	50%	75%	HV pure 100%
Staphylococcus aureus	0	0.8	2.2	5.6	10.2	14
Escherichia coli	0	0.4	2.0	4.2	8.0	10.1

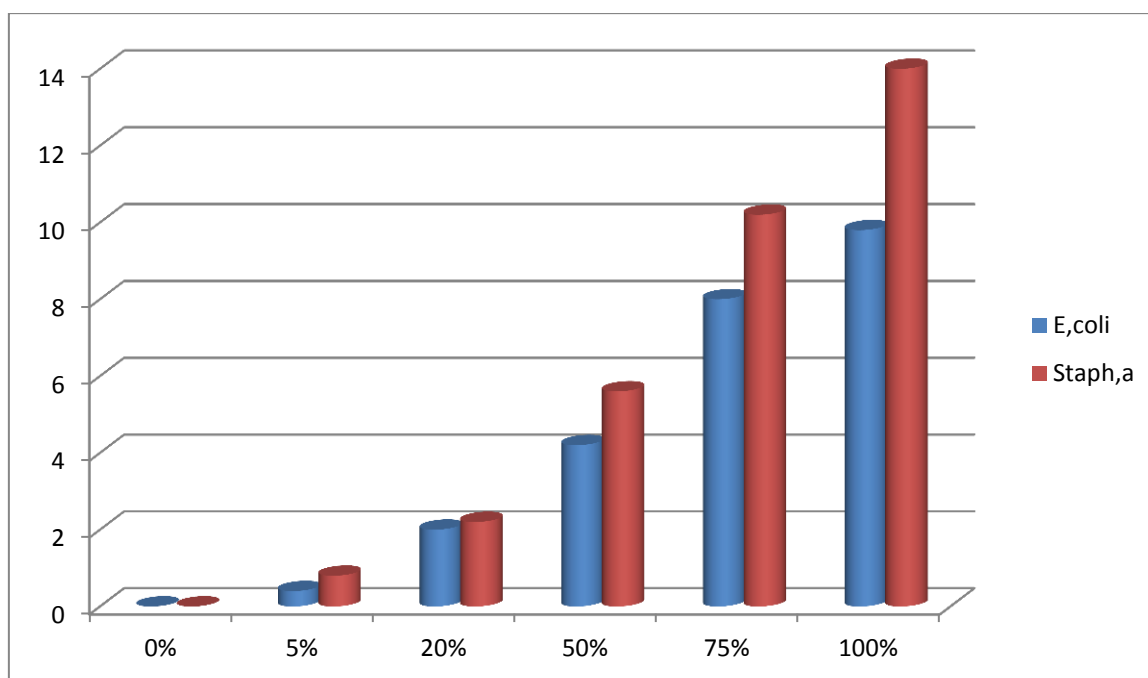


Figure 27 : Représentation graphique des résultats de l'aromatogramme de l'HV *Pistacia lentiscus*

De l'ensemble des résultats obtenus, il ressort que :

La méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile végétale vis-à-vis des bactéries testées. Selon la classification de (Dris, 2020)., toutes les souches sont bactéries sensibles à l'huile végétale de *Pistacia lentiscus* .

L'action de l'antimicrobien sur les microorganismes dépend, d'une part de la structure membranaire de la cellule cible, puisqu'elles possèdent un effet inhibiteur beaucoup plus sur les bactéries à Gram+ que sur les bactéries à Gram-, et d'autre part de la composition de l'huile végétale elles- mêmes qui leur confère un pH acide (pH= 6,40) (Mouas et al., 2017).

Les huiles végétales agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (Guinoiseau, 2010).

Les diamètres des zones d'inhibition nous ont permis de classer les espèces bactériennes en fonction de leur sensibilité à l'huile végétale testée en se référant au spectre

indiqué dans le chapitre II (Dris, 2020). Dans le cas des bactéries à coloration de Gram positif, *Staphylococcus aureus* s'est avéré plus sensible avec un diamètre d'inhibition maximale de 14 mm (**figure 25**). Pour les bactéries à coloration de Gram négatif, les plus grandes zones d'inhibition ont été obtenues chez *Escherichia coli* 10.1 mm, (**figure 26**). On a donc considéré que ces microorganismes étaient sensibles à l'huile. La variabilité des résultats est probablement due à l'influence de plusieurs facteurs tels que la méthodologie, les microorganismes testés et les huiles végétales utilisées (Pattnaik et al., 1997).

En comparant la susceptibilité des différentes souches vis-à-vis de l'huile testée, nous constatons que l'efficacité de cette huile diffère d'une bactérie à une autre. Cependant, *Staphylococcus aureus* est la plus sensible à l'huile testée puis *Escherichia coli*. Ces résultats sont en accord avec la littérature selon lesquelles les bactéries à Gram+ montrent la plus grande sensibilité par rapport aux bactéries à Gram- (Bakkali et al, (2008) ; Burt, (2004) ; Holley et Patel, (2005) ; Russell, (1991) ; Souza et al, 2005).

Le volume des huiles végétale influence l'activité antibactérienne, plus le volume de l'huile végétale augmente plus les diamètres d'inhibitions est important (Emiroğlu et al., 2010). Cela s'applique aux résultats que nous avons obtenus par l'HV de *pistacia lentiscus*

Les diamètres des halos d'inhibition montrent que le pouvoir antimicrobien est proportionnel à la concentration. La différence dans la sensibilité des espèces microbiennes enregistrée suggère la susceptibilité des différents microorganismes aux divers composants de l'huile végétale.

CMI

E.coli..... CMI : 75 %

Staph.a..... CMI : 75 %

Conclusion et perspectives

Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Avec la prévalence des microorganismes pathogènes résistants aux antibiotiques, on note un regain d'intérêt pour les molécules naturelles extraites à partir de ces espèces végétales.

Ce travail a été réalisé afin d'évaluer scientifiquement, l'activité antimicrobienne in vitro de la plante médicinale (*pistacia lentiscus*) et pour prouver leur efficacité contre des bactéries multi- résistantes.

L'extraction de l'huile végétale du lentisque pistachier par méthode traditionnelle a révélé un bon rendement de l'ordre de 5%

Les résultats de l'antibiogramme nous ont permis de constater que *Escherichia coli* était résistante sous l'action de quatre antibiotiques (CTX),(CIP), (TI), (C) et (COL) avec des diamètres des zones d'inhibition (8.6, 11.8, 7.6, 20.2 et 0.4 mm) respectivement, par contre elle était sensible sous l'action de l'antibiotique (CN) et (SXT) avec un diamètre de zone d'inhibition (20.6 et 19.6 mm) respectivement. Enfin *Staphylococcus aureus* a présenté une résistance vis à vis à la (CN) et à la (C) et (CTX) (TE),

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a permis de montrer par la méthode d'aromatogramme, une activité inhibitrice contre les deux souches cliniques testées. Pour les Gram positif, la plus sensible étant *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de 14 mm, alors que chez les Gram négatif, les plus grandes zones d'inhibition ont été obtenues chez *Escherichia coli* 10.1 mm

Le volume des huiles végétale influence l'activité antibactérienne, plus le volume de l'HV augmente plus les diamètres d'inhibitions est important En comparant les résultats de l'aromatogramme avec les résultats de l'antibiogramme, il est clair que l'huile végétale de *pistacia lentiscus* possède un pouvoir antimicrobien supérieur à celui des agents antimicrobiens standards utilisés. En effet, les diamètres des zones d'inhibitions enregistrés sont plus grands. De plus, la croissance de toutes les souches microbiennes a été inhibée par l'HV ; ce qui n'est pas le cas de tous les antibiotiques.

A partir des résultats obtenus au cours de notre étude, on peut conclure et prédire que l'huile de lentisque pistachier pourrait servir comme base de lutte biologique contre les germes responsables des maladies infectieuses et pourrait être de ce fait, une alternative aux antibiotiques.

Perspectives

Dans l'ensemble, cette étude appuie davantage sur la vision selon laquelle *pistacia lentiscus L* est prometteuse comme source naturelle avec une activité antibactérienne et confirme ainsi ses utilisations potentielles en tant qu'un agent antimicrobien pour des applications industrielles telles que la conservation des produits pharmaceutiques, de la parfumerie et alimentaires. On peut dire que l'huile de cette plante peut être utilisée comme alternative aux antibiotiques, et à l'avenir, les plantes pourraient être le pilier de la guerre contre les microbes.

Néanmoins, des tests d'isolement et d'identification de la composition des huiles végétales de *pistacia lentiscus* et des études *in vivo* devraient être menés pour justifier et évaluer leur utilisation potentielle.

Les Références

Les références

Arabi A, (2018). Effet antimicrobien des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L. sur quelques espèces bactériennes multi résistantes de la microflore digestive humaine. Thèse de Doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, Algérie. Pages : 20,21.

A.Bensegueni, 2007. Les onguents traditionnels dans le traitement des plaies et des brûlures. Thèse d'Etat en sciences vétérinaires. Université Mentouri. Constantine. 2007. Pages 21-22.

Abdeldjelil, M.C., 2016. Effets cicatrisants de produits à base d'huile de lentisque (*Pistacia lentiscus* L.) sur les brûlures expérimentales chez le rat (Thèse Doctorale). des Frères Mentouri, Constantine.171.

Abdelilah BOUTAYEB., 2013, Master, Etude bibliographique sur les huiles essentielles et végétales. Université Ibn Tofail -

Alioua M, (2015). Les Staphylocoques : sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire de *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthicilline. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar- Annaba (Algérie). Pages : 20.

Aissi, O., Boussaid, M., Messaoud, C., 2016. Essential oil composition in natural populations of *Pistacia lentiscus* L. from Tunisia: Effect of ecological factors and incidence on antioxidant and antiacetylcholinesterase activities. *Industrial Crops and Products* 91, 56–65.

Amara Nacira, benrima Atika, AnbaChahira, BelkhirHouria, 2019. Activité antimicrobienne de l'huile essentielle des fruits du pistachier lentisque. *Revue Agrobiologia*. 9(2): 1669-1676.

Ammari H, Benslimani A, Rahal K, Tali-Maamar H, Kechih-Bounar S, (2011). Standardisation De L'antibiogramme A L'échelle Nationale (Medecine Humaine Et Veterinaire), 6e édition, OMS.

Baliere C (2016). Les *Escherichia coli* Potentiellement Pathogènes Dans L'environnement Littoral : Cas Des STEC Et Des EPEC. Thèse de Doctorat, université de Bretagne occidentale. Pages : 23.

Barazani, O., Dudai, N., Golan-Goldhirsh, A., 2003. Comparison of Mediterranean *Pistacia lentiscus* genotypes by random amplified polymorphic DNA, chemical, and morphological analyses. *Journal of chemecology* 29, 1939–1952.

Belkacem I (2017). Stratégies de lutte contre les biofilms bactériens responsables d'intoxications alimentaires : polyphénols naturels. Thèse de Doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem (Algérie). Pages : 34.

- Bougherara M, I. 2015. Caractérisation physicochimique et biochimique d'un extrait de *Pistacia Lentiscus* et détermination de ses effets sur certains paramètres biologiques. Thèse Doctorale, Université Badjimokhtar; Annaba ;136
- Benkhiguel O., Zidane L., Fadli M., Elyacoubi H., Rochdi A., Douira A, 2010. Étude Ethnobotanique des Plantes Médicinales dans la Région de Mechraâ Bel Ksiri (Région Du Gharb Du Maroc), *Acta Botanica Barcinonensia* : Vol. 53, 191-216.
- Beloued A. (2005). Plantes médicinales d'Algérie. Office de Publication Universitaire (OPU). Ben-Aknoun, Alger, 286p
- Bitsindou M. and Bouquet A, 2004. Enquêtes sur la Phytothérapie Traditionnelle à Kindamba et Odzala, Betti, JL. An ethnobotanical study of medicinal plants among the Baka pygmies in the Dja Biosphere Reserve, Cameroon. *African Study Monographs* : Vol. 25, No. 1, 1-27, 1996.
- Bonsignore L., Cottiglia F., Loy G, 1998. Antibacterial Activity of *Pistacia Lentiscus* Aerial Parts. *Fitoterapia* : Vol. 69, No. 6, 537-538.
- Blellakhdar, J <<Le Maghreb a travers ses plantes : plantes, productions végétales et traditions au Maghreb>>. Eds. Le fenec. 2003
- Brelière B, Cerrato M, Martinez A et Romoli V (2009). Microbiologie BEP : Les Savoirs En Situation (Broché), Ed. Hachette Technique, pages : 24.
- Brossard H, Leyral G et Terry O (1997). Activités Technologiques En Microbiologie : Classes De Première BGB. Bactériologie Systématique, Vol 2, Collection Biologie technique, Ed. CRDP d'Aquitaine, Bordeaux, pages : 15,75 et 83.
- Couquet, Y., Desmoulière, A., Rigal, M.-L., 2013. Les propriétés antibactériennes et cicatrisantes du miel. *Actualités pharmaceutiques* 52, 22–25.
- Dhifi, W., Jelali, N., Chaabani, E., Beji, M., Fatnassi, S., Omri, S., Mnif, W., 2013. Chemical composition of Lentisk (*Pistacia lentiscus* L.) seed oil. *AJAR* 8, 1395–1400.
- Djedaia, S ,2017. Etude physico-chimique et caractérisation du fruit de la plante lentisque (*Pistacia Lentiscus* L). Thèse Doctorale, Université Badjimokhtar; Annaba,143.
- Djerrou, Z., Djaalab, H., Riachi, F., Serakta, M., Chettou, A., Maameri, Z., Boutobza, B., Hamdi-Pacha, Y., 2013. Irritancy potential and sub acute dermal toxicity study of *Pistacia Lentiscus* fatty oil as a topical traditional remedy. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 10, 480–489.

Les références

Dorman H.J.D. & Deans S.G (2000). Antimicrobial agents from plants antibacterial activity of plant volatile oils. *J of App Microbio* 88(2), 308-316.

Diallo AA (2013). *Escherichia Coli Pathogènes Et Résistantes Aux Antibiotiques Dans Les Effluents D'origine Humaine Et Animale : Prévalence Et Caractérisation Avant Et Après Traitement Epuratoire*. Thèse de Doctorat, Université Paul Sabatier Toulouse III, France. Pages : 13.

Emna Chaabani. ,2019. *Eco-extraction et valorisation des métabolites primaires et secondaires des dif- férentes parties de Pistacia lentiscus*.These de doctorat,Université d'Avignon; Université de Carthage (Tunisie),

Francois De Lanfranchi , Bui Thi Mai, Michel Girard.1999.la fabrication d'huile de lentisque *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*.81-100

George V.Z Dedoussisa, Andriana C Kalioraa, Stellios Psarrasb, Antnia Chioua, Anastasia Mylonaa, Nikolaos G Papadopoulosb, Nicolaos K Andrikopoulos <<Antiatherogenic effect of pistacia lentiscuc L. via GSH restoration and downregulation of CD36 mRNA expression 2004.

Ghalem B.R., Benhassaini H.2007. Etude des phytostérols et des acides gras de *Pistachiaatlantica*. *Afrique Science*. 3(3) 405 – 412.

Hacini, N., Djelloul, R. (2017) Study of the Antibacterial and Antifungal Activities of Oils of *Pistacialentiscus* I. *International Journal of Applied Environmental Sciences*, 12, (1), pp. 133-143.

J.Fleurentin, J.M.Pelt<<les plantes médicinales>>*La Recherche* 21, 1990.pages 811-818.

J. Bellakhdar <<La pharmacopée marocaine traditionnelle, Médecine arabe ancienne et savoirs populaires>>*Ibis Press, Paris, 1997. Pages 764.*

Kozhoridze, N. Orlovsky, L. Orlovsky, Dan G. Blumberg, A. Golan-Goldhirsh, 2015. Geographic distribution and migration pathways of *Pistacia* – present, past and future. *Ecography*, vol. 38: 001–014.

Khouja M. Larbi, Khaldi Abdelhamid, Daly Hamed, Khorchani Ali, Hamrouni Lamia.,2012. *Expérimentation Participative et Adaptive de Modèles de Gestion des*

Les références

Ressources Forestières dans la Chaîne Montagneuse de l'Atlas (Algérie, Maroc, Tunisie), Istitut National de Recherches en Genie Rural, Eaux et Forets.44-56.

Kordali S., Cakir A., Zengin H., Duru ME, 2003. Antifungal Activities of the Leaves of Three Pistacia Species Grown in Turkey. *Fitoterapia* : Vol. 74, No. 1, 164-167.

Mohamed BAMMOU 1, Amine DAOUDI 1, Ikram SLIMANI1, Mariam NAJEM1, El Houssine Bouiamrine1, Jamal IBIJBIJEN 1 et Laila NASSIRI 1., 2014. Valorisation du lentisque «*Pistacia lentiscus* L.»: Étude ethnobotanique, Screening phytochimique et pouvoir antibactérien. Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Moulay Ismail.1-4.

Mohannad G, A.-S., Duncan M, P., 2011. Taxonomic revision of the genus *Pistacia* L.(Anacardiaceae). *American Journal of Plant Sciences* 2012.

Marino M., Bersani C. & Comi G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity oils from Lamiaceae and compositae. *Int. J. Food. Microbiol* 67 (3), p. 187-95.

Nair S. ; 2014. Identification des plantes mellifères et analyses physicochimiques des miels Algérien, Thèse de doctorat, Oran, 235.

Pharmacopée européenne. (2002). 3e édition, Conseil de l'Europe, Strasbourg, p. 681-683.

Shama B., Ghanmi M., Aafi A., Fougrach H. & Bourkhis B. (2006). Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. *Bulletin de la société de pharmacie Bordeaux*, 146: p. 85- 96.

Si Bennasseur RZOZI.,2003. Les Utilisations Alternatives des Huiles Végétales. These de doctorat ,Département d'Agronomie et d'Amélioration des Plantes, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II,237-241.

TOUMI Bakhta & SIAGHI Meriem.,2020, L'étude de L'activité Antimicrobienne de L'huile Essentielle de Clou de Girofle (*Syzygium Aromaticum*) Vis-A-Vis *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* et *Staphylococcus aureus*.Mémoire de Master,A.Ben Badis Mostaganem.,47-60.

Annexe

TECHNIQUE

ANNEXE 1

COLORATION DE GRAM

PRINCIPE

Le principe de cette technique est la fixation des colorants basiques sur les composants cytoplasmiques. Chez les bactéries gram+, la paroi est épaisse, de composition chimique particulière et constitue une barrière à l'alcool-acétone pour la décoloration négative. Le cytoplasme demeure coloré en violet (suite à l'ajout du violet de gentiane), ce qui n'est pas le cas des bactéries gram- dont la paroi plus fine et plus perméable laisse passer l'alcool-acétone qui décolore le cytoplasme. Ce dernier devient rose après être passé sous un autre colorant (la fuschine) (brelière et al., 2009). Les bactéries gram+ sont colorées en violet, tandis que les bactéries gram- sont colorées en rose. La coloration de gram reste une étape essentielle dans l'analyse médicale pour la détermination des bactéries pathogènes (gram -).

MODE D'EMPLOI

Réaliser un frottis ou un étalement.

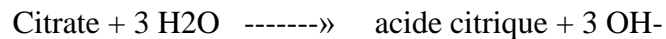
1. Fixer la préparation à la flamme sans dépasser 50 - 60° (brièvement supportable à la main), ce qui les sèche puis laisser refroidir la lame.
2. Immerger (ou inonder) les lames dans la solution de cristal violet pendant 1mm.
3. Lavage à l'eau en transvasant les lames ou sous le robinet.
4. Immerger (ou inonder) les lames dans du lugol pendant 1 mn en les agitant.
5. Laver à nouveau à l'eau.
6. Décolorer jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée ou en immergeant les lames pendant une dizaine de secondes dans le décolorant.
7. Laver à l'eau.
8. Contre colorer avec la solution de safranine diluée ou de fuchsine diluée pendant 20 à 30 secondes.

9. Laver à l'eau et sécher à l'air ou en chauffant vers 50°. Les lames doivent être parfaitement sèches.
10. Observer à l'objectif x 100, en immersion avec de l'huile à immersion.

UTILISATION DE CITRATE DE SIMMONS

PRINCIPE

Le milieu de citrate de simmons est utilisé pour la recherche de l'utilisation de citrate de sodium comme seule source de carbone et d'énergie (Brossard et al., 1997). Sachant que le citrate est utilisé selon la réaction :



L'utilisation du citrate s'accompagnera d'une alcalinisation mise en évidence par le bleu de bromothymol.

LECTURE

Si le citrate est positif, cela se traduit par le bleuissement du milieu en donnant souvent une culture abondante.

RECHERCHE DE LA NITRATE REDUCTASE

PRINCIPE

En l'absence d'oxygène, certaines bactéries peuvent obtenir leur énergie par respiration anaérobie. Cette respiration anaérobie est liée à l'activité d'enzymes localisées dans la membrane plasmique bactérienne (le minor et richard, 1993). Au cours de ce test, on détecte si une bactérie peut utiliser le nitrate comme accepteur d'électrons. La réduction des nitrates par la nitrate réductase se traduit par la production de nitrites. Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction jusqu'à une dénitrification.



LECTURE

- Si le milieu devient rouge : présence de nitrites, donc la bactérie possède une nitrate réductase. Résultat nr+
- Si le milieu reste inchangé : on ajoute de la poudre de zinc qui joue le même rôle que la nitrate réductase vis-à-vis des nitrites.

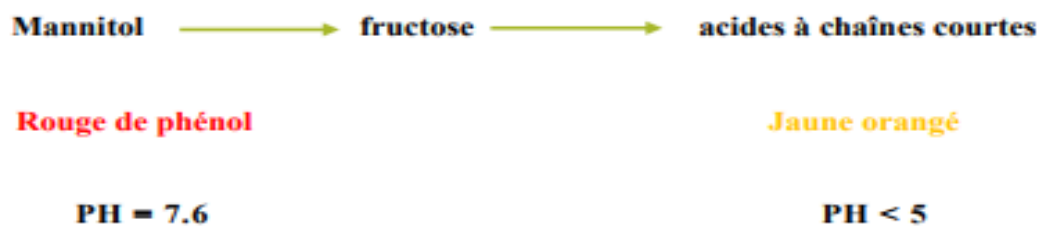
Coloration rouge : on a donc transformation des nitrates en nitrites par le zinc. La bactérie ne possède pas cette enzyme résultat NR-.

Pas de coloration : Les nitrates ont été transformés par la bactérie au-delà des nitrites. La bactérie possède cette enzyme. Résultat NR+.

UTILISATION DU MANNITOL MOBILITE

PRINCIPE

Ce milieu contient du mannitol, des nitrates et du rouge de phénol (indicateur de pH) qui permet de déceler l'attaque du mannitol et la mobilité du germe (Guiraud, 1998). La dégradation en anaérobiose du mannitol conduit à la formation de fructose dont l'attaque conduit elle-même à la formation d'acides à chaînes courtes (acide méthanoïque, acide éthanoïque...).



L'acidification produite par les bactéries aérobies strictes est en général insuffisante pour permettre le virage du rouge de phénol du fait de l'importance du pouvoir tampon du milieu. Ce milieu convient donc plus particulièrement à l'étude des bacilles Gram négatif fermentatifs.

La présence de nitrates permet la recherche de nitrate réductase en ajoutant les réactifs de Griess (à la surface du milieu). Par contre, si l'addition de zinc est nécessaire, la lecture peut être un peu plus délicate. Les nitrates inhibent l'hydrogène lyase, enzyme

catalysant la production de CO₂ et H₂ à partir de l'acide méthanoïque (HCOOH). Dans le cas de bactéries mannitol +, le seul gaz produit est donc le CO₂. Pour celles qui sont mannitol -, l'utilisation des peptones ne produit pas de gaz : le CO₂ est alors sous forme d'hydrogénocarbonate, le milieu restant alcalin. L'apparition de bulles pour une bactérie mannitol - ne peut donc être due qu'à la respiration des nitrates et le gaz est alors de l'azote (N₂). Une bactérie aérobie

stricte pourra, si elle possède une nitrate réductase, se développer dans toute la masse du milieu (Joffin et Leyral, 2001).

LECTURE

Si le mannitol est fermenté (mannitol +), le milieu vire au jaune (teinte du rouge de phénols en milieu acide). Les bactéries mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement en créant un trouble du milieu (gélose molle), les bactéries immobiles se développent uniquement le long de la strie d'ensemencement.

TEST DES TROIS SUCRES (T.S.I)

PRINCIPE

La gélose TSI est utilisée pour l'identification présomptive des entérobactéries basée sur la fermentation du glucose, du lactose, du saccharose et sur la production de gaz et d'H₂S (gaz qui est produit à partir d'un acide aminé : la cystéine) (Guiraud, 1998). La fermentation de ces glucides provoque une production d'acide, qui est détectée par l'indicateur au rouge de phénol. Des changements de couleurs en résultent, et le milieu vire au jaune en cas de production d'acide, ou au rouge en cas d'alcalinisation. En cas de pH neutre ou alcalin, l'acide sulfhydrique (produit à partir du thiosulfate de sodium) réagit avec le sel d'ammonium ferreux et entraîne la formation de sulfure de fer noir.

LECTURE

- Virage du culot au jaune : culture glucose positive et bactérie aéro-anaérobie.
- Virage du culot au rouge : culture glucose négative ou bactérie aérobie stricte
- Pente virant au jaune : culture lactose et/ou saccharose positive.
- Pente virant au rouge : culture lactose et saccharose négative

- Présence d'un précipité noir : culture H₂S positive.
- Bulle dans la masse du milieu : production du gaz.

MISE EN EVIDENCE DE LA CATALASE

PRINCIPE

Dans les conditions d'aérobiose, certaines bactéries produisent le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée). La catalase peut décomposer le peroxyde d'hydrogène en H₂O₂ avec dégagement d'oxygène (Singleton, 2005).

La catalase est habituellement présente chez les bactéries Gram + sauf les genres *Streptococcus* et *Lactobacillus*.

LECTURE

Le dégagement de gaz (O₂) indique un résultat positif.

TEST DE CLARK ET LUBS (RM-VP)

PRINCIPE

Le milieu de Clark et Lubs permet l'étude de la voie de fermentation du glucose : différenciation entre les fermentations « acides mixtes » et « butylène glycolique ».

Le test RM (rouge de méthyle) permet la mise en évidence, grâce au rouge de méthyle, de la fermentation "acides mixtes" par acidification d'un milieu glucosé après fermentation du glucose.

Les bactéries dites Voges-Proskauer positives possèdent une voie métabolique particulière dans la fermentation des hexoses. A partir de l'acide pyruvique (produit d'oxydation du glucose), elles peuvent former de l'acétyl-méthyl-carbinol ou de l'acétoïne et du butane-diol-2-3. En milieu alcalin, ces produits sont oxydés en diacétyl qui réagit avec des peptones pour produire un complexe de couleur rose rouge en présence de l' α -naphthol qui accélère la réaction. D'une façon générale, les bactéries qui possèdent cette

voie métabolique présentent une réaction peu acide (virage au jaune du rouge de méthyle ou RM-) (Larpent et al., 1997).

Le test VP est beaucoup plus spécifique que le test RM qui ne donne qu'une idée globale du métabolisme. Le test VP est particulièrement intéressant pour caractériser le groupe *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* des entérobactéries. Cette distinction des deux voies peut justifier une règle parfois contestable mais fréquemment vérifiée : les bactéries VP+ sont toujours RM-, les bactéries RM+ sont VP-. Les bactéries oxydatives ne sont pas concernées (Joffin et Leyral, 2001).

LECTURE

Une coloration rouge franche indique une réaction de RM+. Le milieu reste incolore indique une réaction de RM-. Si la réaction est une RM positif c a d le VP est négatif.

MILIEUX DE CULTURE

ANNEXE 2

Milieu d'enrichissement utilisé : selon (Guiraud, 1998).

1. Bouillon Nutritif (BN) :

- Peptone : 10g.
- Extrait de viande : 5g.
- Chlorure de sodium (facultatif selon la formule) : 5g.

PH 7,2 Autoclave 20minutes à 120C°.

Milieus de culture utilises : selon (Guiraud, 1998).

2. Milieu Chapman (= Gélose Mannitol) :

- Extrait de viande : 1g.
- Peptones : 10g.
- Chlorure de sodium : 75g.
- Mannitol : 10g.
- Rouge de phénol : 0,025g.
- Agar... 15g.

PH 7,4. Autoclaver 15 minutes à 120C°.

3. TSI (=Gelose Glucose-Lactose-Saccharose- H2s)

- Peptone 20g.
- Extrait de viande 3g.
- Extrait de levure 3g.
- Chlorure de sodium 5g.
- Glucose 1g.
- Lactose 10g.
- Saccharose 10g.
- Citrate de fer 0,5g.
- Hyposulfite de sodium 0,5g.
- Rouge de phénol 0,025g.
- Agar..... 12g.

PH 7,4 répartir en tubes à essais (7 à 9ml). Autoclaver 15mn à 195C° solidifier en position semi inclinée.

4. Mannitol- Mobilité (MM)

- Peptone :20g.
- Nitrate de potassium : 1g.
- Mannitol : 2g.
- Rouge de phénol : 0,0004g.
- Agar : 4g.

PH 8,1 répartir en tubes à essais (8 à 10ml) Autoclaver 15mn à 120C°. solidifier en culot.

5. Clark Et Lubs (Milieu De Culture)

- Peptone : 10g.
- Phosphate dipotassique : 2g.
- Glucose : 5g.

PH 7, répartir en tubes à essais (5ml). Autoclaver 20mn à 120C°.

6. Mueller Hinton (Gelose Pour Antibiogramme)

- Extrait de viande : 2g.
- Hydrolysate acide de caséine : 17,5g.
- Amidon : 1,5g.
- Agar : 10g.

PH 7,4. Autoclaver 15mn à 120C°.