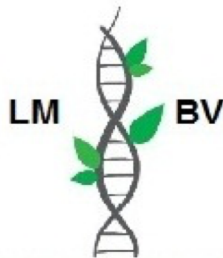


Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem

Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Laboratoire de Microbiologie  
et Biologie Végétale



UNIVERSITE  
Abdelhamid Ibn Badis  
MOSTAGANEM

Filière : Sciences Biologique

Option : Microbiologie

**THÈSE**  
**PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DOCTORAT**  
**EN SCIENCES**

Par  
**M<sup>r</sup> ARABI Abed**

**Thème**

**Effet antimicrobien des huiles essentielles de  
*Pistacia lentiscus* L. sur quelques espèces bactériennes  
multirésistantes de la microflore digestive humaine**

Soutenue publiquement le **Dimanche 11/03/2018** devant le jury de soutenance suivant :

Président	MEKHALDI Abdelkader	Pr	Université de Mostaganem
Directeur de thèse	DJIBAOUI Rachid	Pr	Université de Mostaganem
Examineur	BEKADA Ahmed Med Ali	Pr	Centre Universitaire de Tissemsilet
Examineur	BELAHCENE Miloud	Pr	Centre Universitaire de Ain-Timouchent

Année universitaire : 2017-2018

# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail à :*

*A mes très chers parents pour leurs soutiens  
au long de mes études, je ne les remercierai jamais  
assez, pour tout ce qu'ils m'ont fait.*

*A ma petite famille (Asma & Maya)*

*A mes chères sœurs et mes frères.*

*A toute ma grande famille.*

*A la famille ARABI, YEFRAH, SISBANE  
et GHRAÏR.*

*A mes très chers amis*

*A tous ceux que j'aime.*

*ARABI Abcd*



## REMERCIEMENTS

Avant tout, je remercie « **ALLAH** » tout puissant de m'avoir donné la force, la volonté et le courage pendant toutes ces années d'études pour concrétiser ce travail.

Je tiens à remercier en deuxième lieu mon pays et l'Université Algérienne.

Sans oublier d'exprimer mes plus vifs remerciements à :

- **Mr. MIKHALDI Abdelkader** ; Professeur à l'Université de Mostaganem qui m'a fait l'honneur de présider le jury de thèse.
- **Mr. DJIBAOUI Rachid** ; Directeur de thèse et Professeur à l'Université de Mostaganem, qu'il soit assuré de ma plus profonde reconnaissance et de mes chaleureux remerciements pour son soutien et sa disponibilité tout au long de cette étude.
- **Mr. BELAHCENE Miloud** ; Professeur au Centre Universitaire de Ain-Timouchent, qui m'a fait l'honneur de participer au Jury de soutenance ; je le remercie profondément.
- **Mr. BEKADA Ahmed Mohamed Ali** ; Professeur au Centre Universitaire de Tissemsilet, d'avoir accepté d'être examinateur de mon travail.
- **M<sup>me</sup>. MALIHAC Caterine** et **Mr. OTMANE Mohamed** ; Maîtres de Conférences A au niveau de l'université du Havre, France, pour l'encadrement pendant mon stage pratique.
- **M<sup>me</sup>. OUAR KORICHI Mounira** ; Professeur et chef de service et aussi **M<sup>me</sup>. TALAB Farida** ; Laborantine et tout le personnel du service d'Entérobactériologie au niveau de l'Institut Pasteur d'Algérie (Alger), qui ont préparé l'environnement idéal pour réaliser une grande partie de ce travail de recherche.
- **Mr. DAHLOUM Lahouari** ; Maîtres de Conférences B à l'Université de Mostaganem, pour son encouragement sur tous les plans et tout au long de cette thèse.
- **Dr ITTALHI. M, NEKKA. H, REZIGA. C, MORALENT. B, AMRANE. H** et tout le personnel du Laboratoire de l'Hopital de Ain-Tedeles.
- ✓ **Mr. BENALIWA, BENYAMINA. M, WAHIOUN. L, RAHOU. N** et tout le personnel du Laboratoire d'hygiène de Mostaganem, pour leur soutien au cours de ces études.
- ✓ **M<sup>elle</sup>. LAZRAGUE. H, M<sup>me</sup>. AMIR. F et M<sup>me</sup>. HAMED. D, M<sup>elle</sup>. TEHLAITI. A** ; laborantins de l'Université de Mostaganem, pour leurs rôles importants dans l'achèvement de cette expérimentation.
- ✓ **M<sup>elle</sup>. HAMANI. F** ; pour sa présence durant la période de la récolte de la plante.
- ✓ **Mes parents**, mes frères et sœurs, mes remerciements les plus chaleureux, pour leurs soutiens, leurs amours, gentillesse et encouragement tout au long de mes études.
- ✓ Je tiens à exprimer mes remerciements les plus chaleureux à ma femme **M<sup>me</sup>. ARABI-SISBANE. I** ; pour son soutien et sa présence continue au cours de la réalisation de ce travail.
- ✓ **M<sup>me</sup>. MAZOUZ. OK, Mr. BELHALHALI. K, Mr. Azeddine, Mr. Moussa, Mr. Youcef et Mr. Samir**, je leurs expriment ici toute ma reconnaissance pour m'avoir donné la possibilité de réaliser mon stage au Havre.
- ✓ Je voudrais également remercier l'ensemble de mes collègues ; **HAMOUM. H, DAHAH. H, IDER. A, AREZKI. M, OUAINI. A, LATTAB. A, BECHELAGHEM. N, ABDELI. W, CHIBANI. H, KACEM. I, ZERGOUG. A, BENCHOUK. A, BENGUENEB. A et BENSLIMANE. S**, avec lesquels j'ai vécu de bons moments.
- ✓ **Mr. Le Doyen** de la Faculté des sciences mathématiques et informatiques, ainsi les agents de sécurité du site II, pour le respect tout au long de ce travail.
- ✓ **Mr. Ahcen, Mr. Abdelkader, Mr. Kamel, Mr. Mofdi, Mr. Mounir, Mr. Bilal, M<sup>me</sup>. Boubchiche** ; Chercheurs aux centres de recherches : CSC, CNRDPA et l'école ENSSMAL, pour la réalisation de mon stage pratique à Alger.

Mes remerciements vont également à l'adresse de mes amis **BOUAGUADA. D, BENOTMANE. K, BOUTEBAL. A, ELKETROUSSI MA et BENSSEKRANE. M** et de toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

*ARABI Abed*

# Sommaire

Résumé

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

**Introduction** ..... 1

## **Partie Bibliographique**

### **Chapitre I. Microflore digestive humaine et antibiorésistance**

<b>I.1. Microflore digestive humaine</b> .....	<b>3</b>
<b>I.1.1. Généralités</b> .....	<b>3</b>
<b>I.1.2. Flore bactérienne normale du tube digestif</b> .....	<b>3</b>
<b>I.1.3. Répartition topographique de la flore digestive</b> .....	<b>4</b>
<b>I.1.4. Composition de la flore intestinale humaine</b> .....	<b>6</b>
<b>I.1.5. Rôles de la flore intestinale humaine</b> .....	<b>7</b>
<b>I.1.5.1. Effets digestifs</b> .....	<b>7</b>
<b>I.1.5.2. Effets nutritionnels</b> .....	<b>8</b>
<b>I.1.5.3. Protection contre l'infection</b> .....	<b>8</b>
<b>I.1.5.4. Effets défavorables pour l'hôte</b> .....	<b>9</b>
<b>I.1.6. Stabilité apparente de la flore</b> .....	<b>9</b>
<b>I.1.7. Facteurs d'agression de la flore intestinale</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1.7.1. Carence en fibres alimentaires</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1.7.2. L'utilisation des traitements anti-acide</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1.7.3. Gastroentérite aiguë</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1.7.4. L'antibiothérapie</b> .....	<b>10</b>
<b>I.2. Antibiorésistance</b> .....	<b>11</b>
<b>I.2.1. Les antibiotiques</b> .....	<b>11</b>
<b>I.2.1.1. Les antibiotiques naturels et synthétiques</b> .....	<b>11</b>
<b>I.2.1.2. Les cibles bactériennes des antibiotiques</b> .....	<b>13</b>
<b>I.2.2. Résistance aux antibiotiques</b> .....	<b>16</b>
<b>I.2.2.1. Résistance naturelle</b> .....	<b>16</b>
<b>I.2.2.2. Résistance acquise</b> .....	<b>16</b>
<b>I.2.3. Mécanismes de résistance pour lutter contre l'action des antibiotiques</b> .....	<b>18</b>
<b>I.2.3.1. Modification de la perméabilité membranaire</b> .....	<b>19</b>
<b>I.2.3.2. Systèmes d'efflux bactériens</b> .....	<b>19</b>
<b>I.2.3.3. Dégradation et modification enzymatique des antibiotiques</b> .....	<b>19</b>
<b>I.2.3.4. Altération des cibles cellulaires des antibiotiques</b> .....	<b>20</b>

## Chapitre II : Les huiles essentielles, source naturelle d'antimicrobiens

II.1. Généralités .....	21
II.2. Définition .....	21
II.3. Répartition systématique des huiles essentielles .....	21
II.4. Localisation des huiles essentielles dans les tissus .....	22
II.5. Méthodes d'extraction .....	22
II.5.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau .....	22
II.5.2. Extraction par hydrodistillation .....	23
II.5.3. L'hydrodistillation assistée par micro-ondes .....	24
II.5.4. Hydrodiffusion .....	25
II.5.5. L'expression à froid .....	26
II.5.6. Extraction par solvant organique .....	27
II.5.7. Extraction par du CO <sub>2</sub> à l'état supercritique .....	28
II.6. Méthodes d'identification des huiles essentielles .....	29
II.7. Composition chimique des huiles essentielles .....	31
II.8. Propriétés d'utilisation des huiles essentielles .....	32
II.9. Mode d'action des huiles essentielles .....	33
II.10. Toxicité des huiles essentielles .....	34

## Chapitre III : *Pistacia lentiscus* L. et l'aromathérapie

III.1. Classification systématique et description botanique .....	35
III.1.1. Classification taxonomique .....	35
III.1.2. Description botanique .....	36
III.2. Produits et dérivés à base de <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....	37
III.3. Etude chimique de l'espèce <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....	38
III.3.1. Le mastic de <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....	38
III.3.2. Le fruit de <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....	39
III.3.3. Les feuilles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....	39
III.3.4. Les huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....	39
III.3.5. Aspects pharmacologiques et effets thérapeutiques de <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....	42
III.3.6. Données toxicologiques de <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....	43

## Partie Expérimentale

### Chapitre IV : Matériel et méthodes

IV.1. Objectif du travail .....	44
IV.2. Isolement et identification des bactéries de la microflore digestive humaine .....	44
IV.2.1. Choix et origines des bactéries testées .....	44
IV.2.2. Isolement .....	44
IV.2.3. Identification .....	50
IV.2.3.1. Examen macroscopique .....	50
IV.2.3.2. Examen microscopique .....	50
IV.2.3.3. Tests biochimiques .....	50
IV.2.3.4. Calcul du profil numérique .....	50

<b>IV.3. Antibiogramme</b> .....	<b>51</b>
<b>IV.4. Activité Antimicrobienne des HEs de <i>Pistacia lentiscus</i> L.</b> .....	<b>54</b>
<b>IV.4.1. Extraction, caractérisation et identification des HEs de <i>Pistacia lentiscus</i> L.</b> .....	<b>54</b>
<b>IV.4.1.1. Matériel végétal</b> .....	<b>54</b>
<b>IV.4.1.2. Extraction par des HEs de <i>Pistacia lentiscus</i> L. hydrodistillation</b> .....	<b>55</b>
<b>IV.4.1.3. Caractérisation et identification chimique des HEs de <i>Pistacia lentiscus</i> L.</b> .....	<b>56</b>
<b>IV.4.2. Activité antibactérienne de l'HE de <i>Pistacia lentiscus</i> L.</b> .....	<b>57</b>
<b>IV.4.2.1. Aromatogramme</b> .....	<b>57</b>
<b>IV.4.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice</b> .....	<b>58</b>

## **Chapitre V : Résultats et discussion**

<b>V.1. Isolement et identification des bactéries de la microflore digestive humaine</b> .....	<b>62</b>
<b>V.1.1. Examen macroscopique</b> .....	<b>62</b>
<b>V.1.2. Examen microscopique</b> .....	<b>68</b>
<b>V.1.2.1. Etat frais</b> .....	<b>68</b>
<b>V.1.2.2. Coloration de gram</b> .....	<b>68</b>
<b>V.1.3. Tests biochimiques</b> .....	<b>70</b>
<b>V.2. Antibiogramme</b> .....	<b>78</b>
<b>V.3. Effets antibactériens des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus</i> L.</b> .....	<b>86</b>
<b>V.3.1. Extraction des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus</i> L.</b> .....	<b>86</b>
<b>V.3.2. Activité antimicrobienne des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. vis-à-vis les bactéries testées</b> .....	<b>93</b>
<b>V.3.2.1. Activité antimicrobienne (Aromatogramme)</b> .....	<b>93</b>
<b>V.3.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice</b> .....	<b>97</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>101</b>
Références bibliographiques .....	<b>102</b>
Annexes .....	<b>114</b>
Travaux scientifiques .....	<b>150</b>

## الملخص

قد يدل كثرة انتشار البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية على نقص في فعالية هذه العلاجات سواء عند الإنسان أو عند الحيوان. وبناءا عليه فقد قمنا في هذه الدراسة بالبحث عن بدائل علاجية أخرى حيث بدأنا بانتقاء مجموعة من البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية، أخذت من الجهاز الهضمي لعشرين مريض بمستشفى عين تادلست مستغانم. وقد بينت الدراسات المرفولوجية والفيزيولوجية التي أجريت لتحديد هذه العزلات أنها تابعة للأنواع: *E.coli* و *Morganella morganii* و *Enterobacter cancerogenus* و *Serratia fonticola* و *Staphylococcus aureus* و *Enterococcus faecalis*. أما النوع *Helicobacter pylori* فقد قمنا بتحديدته بعد عزله من خزعة قرحة معدية في مخبر البكتيريا المعوية و البكتيريا ذات الصلة، بمعهد باستور بالجزائر العاصمة (الجزائر).

من جانب آخر فقد قمنا في هذه الدراسة باستخلاص الزيت الأساسي لأحد أنواع نبات البطم (الظرو) (*Pistacia lentiscus* L.) المأخوذ من المناطق المحيطة بمدينة مستغانم. تمت عملية الاستخلاص بطريقة التقطير المائي بجهاز *Clevenger*. وتم تحليله بالكروماتوغرافيا الغازية و الطيف الكتلي (*GC-MS*) وذلك باستخدام جهاز *Shimadzu GC-2010* متصل بمطياف الكتلة *MS-QP2010 SE* في وحدة البحث للكيمياء العضوية و الجزيئات الكبيرة (*URCOM*) بجامعة لوهافر (فرنسا)، و تم تحديد و تأكيد المكونات الكيميائية بواسطة *National Institute of (NIST) Standards and Technology*

أظهرت نتائج تحليل الزيت الأساسي لـ *Pistacia lentiscus* L. أنه يحتوي على 50 مكون (تمثل 99.9% من تكوين الزيت) ومنها الهيدروكربونات مونوتربان (72.43%) و  $\alpha$  بينان (42.13%) و الصبينان (6.46%) و  $\gamma$  تربينان (6.21%) و  $\alpha$  تربينولان (2.18%) وهي تشكل المكونات الرئيسية. أظهر النشاط المضاد للبكتيريا أن الزيت الأساسي المدروس أعطى ضد البكتيريا متعددة المقاومة مناطق تثبيط بأقطار مقنعة (40.00، 24.71، 24.60، 16.07، 14.58، 23.54، و 12.86 مم) وقيم التركيز المثبط الأدنى (1/1000، 1/500، 1/500، 1/250، 1/250، 1/500 و 1/250) للبكتيريا سالبة الغرام: *Helicobacter pylori*، *Escherichia coli*، *Morganella morganii*، *Enterobacter cancerogenus* و *Serratia fonticola* و موجبة صبغة غرام: *Staphylococcus aureus* و *Enterococcus faecalis* على التوالي .

الكلمات الرئيسية: البكتيريا متعددة المقاومة، *Pistacia lentiscus* L.، الزيت الأساسي، التركيب الكيميائي، النشاط المضاد للميكروبات.

## Résumé

L'émergence et la diffusion croissante des bactéries résistantes aux antibiotiques, remettent en question l'efficacité de ces traitements tant chez l'homme que chez l'animal, en conséquence, nous avons essayé de trouver dans cette étude d'autres alternatives thérapeutiques.

Nous avons commencé à sélectionner un groupe de bactéries multirésistantes provenant du système digestif de vingt patients de l'hôpital de Aïn-Tedles, Mostaganem. Les études morphologiques et physiologiques de ces isolats a conduit à l'identification des espèces : *E.coli*, *Morganella morganii*, *Enterobacter cancerogenus*, *Serratia fonticola*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*. L'espèce *Helicobacter pylori*, a été identifiée après son isolement d'une biopsie d'un ulcère gastrique au niveau du laboratoire des Entérobactéries et autres bactéries apparentées de l'Institut Pasteur d'Algérie (Alger).

D'un autre coté, nous avons effectué l'extraction de l'huile essentielle de l'espèce *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae) récoltée de la région de Mostaganem (Nord-ouest de l'Algérie). L'extraction de l'huile est réalisée en utilisant la méthode d'hydrodistillation (type Clevenger) et ensuite analysée par la **chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)**, à l'aide d'un chromatographe Shimadzu GC-2010 connecté à un spectromètre de masse MS-QP2010 SE au niveau de l'Unité de Recherche de Chimie Organique et Macromoléculaire (URCOM), Université du Havre (France). Les composants chimiques ont été identifiés et confirmés par ; **National Institute of Standards and Technology**, (NIST).

Les résultats de l'analyse de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. ont montré qu'il contient 50 composants (représentant 99.9% de la composition de l'huile) dont les hydrocarbures monoterpéniques (72.43%) ; l' $\alpha$ -pinène (42.13%), le sabinène (6.46%), le  $\gamma$ -terpinène (6.21%) et l' $\alpha$ -terpinolène (2.18%) étant les principaux composants.

L'activité antimicrobienne *in vitro* contre ces agents pathogènes cliniques montre que l'huile essentielle étudiée, a donné contre les bactéries utilisées des valeurs de diamètre de zones d'inhibition satisfaisantes (40.00, 24.71, 24.60, 16.07, 14.58, 23.54, et 12.86 mm) et des valeurs de CMI (1/1000, 1/500, 1/500, 1/250, 1/250, 1/500 et 1/250) pour les bactéries à coloration de Gram-négative: *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Enterobacter cancerogenus* et *Serratia fonticola* et les bactéries à coloration de Gram-positive: *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*, respectivement.

**Mots clés :** Multirésistance, *Pistacia lentiscus* L., huile essentielle, composition chimique, activité antimicrobienne.

## **Abstract:**

The emergence and increasing spread of antibiotic-resistant bacteria is challenging the efficacy of these treatments in both humans and animals, consequently we have tried to find other therapeutic alternatives in this study. We started selecting a group of multiresistant bacteria from the digestive system of twenty patients from Ain-Tedles Mostaganem Hospital. The morphological and physiological study of these isolates led to their identification to the species: *E. coli*, *Morganella morganii*, *Enterobacter cancerogenus*, *Serratia fonticola*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. The *Helicobacter pylori* species was identified after its isolation from a biopsy of a gastric ulcer in the laboratory of Enterobacteria and other related bacteria in Pasteur Institute of Algeria (Algiers).

On the other hand, we extracted the essential oil of the species *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae) harvested from the region of Mostaganem (Northwestern Algeria). The extraction of the oil is carried out using the hydrodistillation method (Clevenger type) and then analyzed by **gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS)**, using a shimadzu chromatograph GC-2010 connected to an MS-QP2010 SE mass spectrometer, at the Organic and Macromolecular Chemistry Research Unit (URCOM), University of Le Havre (France).

Chemical components have been identified and confirmed by the **National Institute of Standards and Technology, (NIST)**.

The results of analysis of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. showed that it contains 50 components (representing 99.9% of the oil composition) of which the monoterpene hydrocarbons (72.43%);  $\alpha$ -pinene (42.13%), sabinene (6.46%),  $\gamma$ -terpinene (6.21%) and  $\alpha$ -terpinolene (2.18%) being the main components.

The *in vitro* antimicrobial activity against the clinical pathogens used shows that the studied essential oil gives a satisfactory inhibition zones against the used bacteria (40.00, 24.71, 24.60, 16.07, 14.58, 23.54, et 12.86 mm) and MIC values (1/1000, 1/500, 1/500, 1/250, 1/250, 1/500 et 1/250) for Gram-positive staining bacteria : *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Enterobacterer cancerogenus* and *Serratia fonticola* and Gram-negative staining bacteria: *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*, respectively.

**Key words:** Multiresistance, *Pistacia lentiscus* L., essential oil, chemical composition, antimicrobial activity.

## Liste des abréviations

- : Négatif  
%: Pourcentage  
°C : Degré Celsius  
+ : Positif  
++ : Fortement positif  
≤ : Inférieur ou égale  
≥ : Supérieur ou égale  
<sup>13</sup>C : Carbone marqué  
<sup>1</sup>H : Hydrogène  
3D : Trois dimension  
ACE : Acétate  
ADH : Arginine dehydrolase  
ADI : Adipate  
ADN : acide désoxyribonucléique  
MHA : Muller Hinton Agar  
AK : Amikacine  
AM : Ampicilline  
AMD : Amidon  
AML : Amoxicilline  
AMY : Amygdaline  
Api : Application Programming  
ARA : Arabinose  
ArgA : Arginine arylamidase  
ARN : Acide ribonucléique  
ASAP : AES *Salmonella* Agar Plate  
AspA : Aspartate arylamidase  
BCP : Pourpre de Bromocrésol  
BHIB : Brain Heart Infusion broth  
BLSE : Bêta-lactamases à spectre élargi  
C : Chloramphenicol  
*CAMPY* : *Campylobacter*  
CAP : Caprate  
CAZ : Ceftazidime  
CCM : Chromatographie à couche mince  
CD : Clindamycine  
CFZ : Cefazoline  
CIP : Ciprofloxacine  
CIT : Citrate  
CLHP : Chromatographie en phase liquide à haute performance  
CLR : Clarithromycine  
CMI : Concentration minimale inhibitrice  
CN : Control négatif (Témoin)  
CN Gentamycine  
CO<sub>2</sub> : Di-oxyde de Carbone  
COL : Colistine  
CPG : Chromatographie en phase gazeuse  
CTX : Cefotaxime  
D.O : Densité optique  
DAD : Détecteur Autonome Déclencheur

DHF : Dihydrofolate  
DHP : Dihydroptéroate  
DMSO : Diméthylsulfoxyde  
DO : Doxycycline  
dTMP : désoxythymidine monophosphate  
dUMP : déoxyuridine monophosphate  
E : Erythromycine  
ESC : Esculine  
EST : Estérase  
eV : electron-Volt  
ExS : Extra sensible  
FA : Acide fusidique  
FF : Fosfomycine  
Fig : Figure  
FOX : Cefoxitine  
FRU : Fructose  
g : gramme  
GEA : Gastroentérite aiguë  
GEL : Gélatine  
GENbag : Generator bag  
GGT : Gamma glutamyl transférase  
GLU : Glucose  
GLYG : Glycogène  
GNT : Gluconate  
GTP : Guanosine Tri-Phosphate  
h : heure  
H<sub>2</sub> : gaz d'Hydrogène  
H<sub>2</sub>S : sulfure d'hydrogène  
HE : Huile essentielle  
HIP : Hippurate  
*Hp* : *Helicobacter pylori*  
I : Intermédiaire  
IND : Indol  
INO : Inositol  
INU : Inulin  
IR : Indice de rétention  
Ir : Infra-rouge  
IRTF : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier  
j : jour  
K : Kanamycine  
Kg : Kilogramme  
Km : Kilomètre  
L. : Linné  
LAC : Lactose  
LAP : Leucine naphyl-2-amide  
LDC : Lysine decarboxylase  
LPS : Lipopolysaccharide  
MAL : Maltose  
MAN : Manitol  
McF : McFarland  
MDG : Méthyl-D-glucoside  
MEL : Mélibiose  
MH : Muller Hinton  
min : minute

ml : millilitre  
 MLS : Macrolides, lincosamides, streptogramines  
 MLT : Malate  
 Mm : millimètre  
 MNE : Mannose  
 MRD : Multi-résistance aux drogues  
 MSA2 : Mannitol Salt Agar 2  
 MTR : Metronidazole  
 N<sub>2</sub> : Gaz d'Azote (Nitrogène)  
 NA : Acide nalidixique  
 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : Sulfate de sodium anhydre  
 NAG : N-acétyl-glucosamine  
 NAL : Nalidixique  
 NAM : N-acétylmuramique  
 nd : non déterminer  
 NEO : Neomycine  
 NIST : National Institute of Standards and Technology  
 NIT : Nitrate  
 NO<sub>3</sub> : Nitrate  
 Ø : Diamètre  
 O<sub>2</sub> : Gaz d'Oxygène  
 ODC : Ornithine decarboxylase  
 OFX : Ofloxacin  
 ONPG : Ortho-nitro-phenyl-galactoside  
 OX : Oxaciline  
 PAC : Phenyl-acétate  
 PAL : Phosphatase alcaline  
 PDA : Photodiode array detector  
 pH : potentiel hydrogène  
 PI : Acide pipedimique  
 PNPG : P-nitrophényl- β -D-galactopyranoside  
 PROP : Propionate  
 PYRA : Pyrrolidone naphthyl amide  
 PyrA : Pyrrolidonyl arylamidase  
 R : Résistante  
 RA : Rifampicine  
 RAF : Raffinose  
 RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA : Deoxyribonucleic acid  
 RHA : Rhamnose  
 RIB : Ribose  
 RMN : Résonance magnétique nucléaire  
 RP : Pristinamycine  
 S : Sensible  
 SAC : Saccharose  
 SARM : *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline  
 SARV : vancomycine  
 SM : Spectrométrie de masse  
 SOR : Sorbitol  
 sp : specis  
 SP : Spiramycine  
 STAPH : *Staphylococcus*  
 STREP : *Streptococcus*  
 SUT : Succinate  
 SXT : Sulfaméthoxazole-Trimethoprime  
 T : Témoin  
 TDA : Tryptophane désaminase  
 TE : Tetracycline  
 THF : Tétrahydrofolate  
 TI : Ticarcylone  
 TLC : Thin layer chromatography  
 TMN : Tobramycine  
 TMP : Trimethoprime  
 TIAC : Toxi-Infections Alimentaire Collectives  
 tr : trace  
 TR : Temps de rétention  
 TRE : Trehalose  
 TRP : Tryptophane  
 TS : Très sensible  
 TSI : Triple Sugar Iron  
 TTC : Triphényl tétrazolium du chlorure  
 UFC : Unité Formant Colonie  
 URCOM : Unité de Recherche de Chimie Organique et Macromoléculaire  
 URE : Urée  
 UVVIS : Ultra-violet visible  
 v : volume  
 VA : Vancomycine  
 VP : Voges-Proskauer  
 X : fois  
 XLT : Xylitol  
 XYL : Xylose  
 y : yield  
 αGAL : α-Glactopyranoside  
 βGAL : β- Glactopyranoside  
 βGUR : β-Glucuronate  
 μm : micromètre

## Liste des tableaux

<b>Tableau. 1.</b>	Mode d'action des principales classes d'antibiotiques .....	15
<b>Tableau. 2.</b>	La variation saisonnière de la composition chimique des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....	40
<b>Tableau. 3.</b>	Les antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme .....	53
<b>Tableau. 4.</b>	Concentrations finales des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....	59
<b>Tableau. 5.</b>	Résultats des tests biochimiques (catalase, oxydase, uréase et coagulase) et de la mobilité des bactéries étudiées .....	71
<b>Tableau. 6.</b>	Résultats des tests biochimiques (API 20 E) des entérobactéries .....	75
<b>Tableau. 7.</b>	Résultats des tests biochimiques (API 20 NE) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> et (API 20 STREP) de <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Streptococcus agalactie</i> .....	76
<b>Tableau. 8.</b>	Résultats des tests biochimiques (API STAPH) de <i>Staphylococcus aureus</i> et (API CAMPY) de <i>Helicobacter pylori</i> .....	77
<b>Tableau. 9.</b>	Profils numériques des bactéries identifiées .....	78
<b>Tableau. 10.</b>	Résultats de l'antibiogramme de <i>Helicobacter pylori</i> .....	82
<b>Tableau. 11.</b>	Résultats de l'antibiogramme des entérobactéries étudiées .....	83
<b>Tableau. 12.</b>	Résultats de l'antibiogramme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Alcaligenes faecalis</i> .....	83
<b>Tableau. 13.</b>	Résultats de l'antibiogramme de <i>Enterococcus faecalis</i> et <i>Streptococcus agalactie</i> .....	84
<b>Tableau. 14.</b>	Résultats de l'antibiogramme de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	84
<b>Tableau. 15.</b>	Quantités d'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> L. extraite par hydro-distillation .....	86
<b>Tableau. 16.</b>	Composition chimique de d'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> L. extraite par hydro-distillation .....	91
<b>Tableau. 17.</b>	Valeurs des diamètres d'inhibition (en mm) de l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> L. vis-à-vis les sept bactéries testées .....	93
<b>Tableau. 18.</b>	Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> L. vis-à-vis les sept bactéries testées .....	98

## Liste des figures

<b>Figure. 1.</b>	Schéma du développement de la microflore à partir du premier inoculum en tant que nourrisson grâce à un changement continu, modifié par l'alimentation, la génétique et l'environnement, tout au long de la vie.....	4
<b>Figure. 2.</b>	Composition et concentration (UFC/g) des espèces bactériennes du microbiote du tractus digestif .....	6
<b>Figure. 3.</b>	Découverte et premières utilisations cliniques des principaux antibiotiques d'origine naturelle et synthétique.....	12
<b>Figure. 4.</b>	Mode d'action des antibiotiques .....	14
<b>Figure. 5.</b>	Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries .....	17
<b>Figure. 6.</b>	L'efflux, la destruction et la modification des antibiotiques comme modes de résistance .....	18
<b>Figure. 7.</b>	Principe schématisé de l'appareillage d'extraction par entraînement à la vapeur de l'eau .....	23
<b>Figure. 8.</b>	Principe schématisé de l'appareillage d'hydrodistillation .....	24
<b>Figure. 9.</b>	L'appareillage du système de l'hydrodistillation sous micro-ondes .....	25
<b>Figure. 10.</b>	Schéma du procédé d'hydrodiffusion .....	26
<b>Figure. 11.</b>	Schéma du procédé de récupération de l'huile essentielle de citron et autres agrumes .....	27
<b>Figure. 12.</b>	Schéma d'une batterie d'extraction par solvant pour végétaux bruts .....	28
<b>Figure. 13.</b>	Schéma du système d'extraction du CO <sub>2</sub> à l'état supercritique .....	29
<b>Figure. 14.</b>	Les principales voies d'analyse d'un mélange complexe naturel .....	31
<b>Figure. 15.</b>	Action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne .....	33
<b>Figure. 16.</b>	Description botanique de <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....	36
<b>Figure. 17.</b>	Aire de répartition de <i>Pistacia lentiscus</i> L. autour du bassin Méditerranéen .....	37
<b>Figure. 18.</b>	Chromatogramme des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....	41
<b>Figure. 19.</b>	Formules structurales des énantiomères $\alpha$ -pinène et $\beta$ -pinène. ....	42
<b>Figure. 20.</b>	Schéma d'isolement de <i>Helicobacter pylori</i> en primoculture et subculture.....	46
<b>Figure. 21.</b>	Schéma d'isolement des bactéries de la microflore digestive à partir des selles(Coproculture).....	49
<b>Figure 22.</b>	Ajustement de la turbidité de la suspension bactérienne de <i>Hp</i> à 3 McF à l'aide d'un densimètre.....	51
<b>Figure. 23.</b>	<i>Pistacia lentiscus</i> L. de Mostaganem, Algérie.....	54
<b>Figure. 24.</b>	Schéma du montage d'hydrodistillation (Clevenger).....	55

<b>Figure. 25.</b>	Chromatographe shimadzu GC-2010 connecté à un spectromètre de masse MS-QP2010 SE .....	<b>57</b>
<b>Figure. 26.</b>	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....	<b>60</b>
<b>Figure. 26.</b>	<b>(Suite)</b> Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. ....	<b>61</b>
<b>Figure. 27.</b>	Aspect macroscopique de <i>Helicobacter pylori</i> sur milieu Columbia additionnée de 10% de sang de cheval.....	<b>64</b>
<b>Figure. 28.</b>	Aspect macroscopique de <i>E. coli</i> sur milieu BCP.....	<b>64</b>
<b>Figure. 29.</b>	Aspect macroscopique de <i>Klebsiella oxytoca</i> sur milieu BCP.....	<b>65</b>
<b>Figure. 30.</b>	Aspect macroscopique de <i>Morganella morganii</i> sur milieu BCP.....	<b>65</b>
<b>Figure. 31.</b>	Aspect macroscopique de <i>Enterobacter cancerogenus</i> sur gélose BCP.....	<b>66</b>
<b>Figure. 32.</b>	Aspect macroscopique de <i>Serratia fonticola</i> sur gélose BCP.....	<b>66</b>
<b>Figure. 33.</b>	Aspect macroscopique de <i>Proteus mirabilis</i> sur gélose Hektoen.....	<b>67</b>
<b>Figure. 34.</b>	Aspect macroscopique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur le milieu Hektoen.....	<b>67</b>
<b>Figure. 35.</b>	Aspect macroscopique de <i>Staphylococcus aureus</i> sur gélose Chapman.....	<b>68</b>
<b>Figure. 36.</b>	Coloration de Gram des différentes bactéries isolées (Grossissement X100).....	<b>69</b>
<b>Figure. 37.</b>	Fermentation des sucres et production du gaz chez les entérobactéries ( <i>E. coli</i> , <i>Serratia fonticola</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> et <i>Morganella morganii</i> ) en milieu TSI.....	<b>70</b>
<b>Figure. 38.</b>	Test de la catalase.....	<b>73</b>
<b>Figure. 39.</b>	Test de l'oxydase.....	<b>73</b>
<b>Figure. 40.</b>	Test de l'uréase.....	<b>73</b>
<b>Figure. 41.</b>	Test de la coagulase.....	<b>73</b>
<b>Figure. 42.</b>	Résultats des tests biochimiques des galeries : API 20E, API 20NE et API 20 STREP.....	<b>74</b>
<b>Figure. 43.</b>	Résultats de l'antibiogramme de <i>Morganella morganii</i> .....	<b>79</b>
<b>Figure. 44.</b>	Résultats de l'antibiogramme de <i>Klebsiella oxytoca</i> .....	<b>80</b>
<b>Figure. 45.</b>	Résultats de l'antibiogramme de <i>Proteus mirabilis</i> .....	<b>81</b>
<b>Figure. 46.</b>	Résultats de l'antibiogramme de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	<b>82</b>
<b>Figure. 47.</b>	Procédé d'extraction des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. par hydrodistillation.....	<b>87</b>
<b>Figure. 48.</b>	Chromatogramme de <i>Pistacia lentiscus</i> L. de la région de Mostaganem, Algérie.....	<b>88</b>

<b>Figure. 49.</b>	Proportions de différents groupes chimiques de l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> L. étudiée.....	<b>89</b>
<b>Figure. 50.</b>	Aromatogramme de <i>Helicobacter pylori</i> par l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> L.....	<b>94</b>
<b>Figure. 51.</b>	Aromatogramme de <i>E. coli</i> par l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> L.....	<b>94</b>
<b>Figure. 52.</b>	Aromatogramme de <i>Morganella morganii</i> par l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> L.....	<b>95</b>
<b>Figure. 53.</b>	Aromatogramme de <i>Enterobacter cancerogenus</i> par l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> L.....	<b>95</b>
<b>Figure. 54.</b>	Aromatogramme de <i>Serratia fonticola</i> par l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> L.....	<b>96</b>
<b>Figure. 55.</b>	Aromatogramme de <i>Staphylococcus aureus</i> par l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> L.....	<b>96</b>
<b>Figure. 56.</b>	Aromatogramme de <i>Enterococcus faecalis</i> par l'huile essentielle de <i>Pistacia lentiscus</i> L.....	<b>97</b>
<b>Figure. 57.</b>	Concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles de <i>Pistacia lentiscus</i> L. vis à vis <i>Helicobacter pylori</i> .....	<b>100</b>

A vertical gray bar is positioned on the left side of the page, extending from the top to the bottom. A thin black horizontal line crosses the top of the page, intersecting the vertical bar.

# **Introduction**



## Introduction

L'antibiorésistance est reconnue comme un problème majeur en termes de santé humaine et animale au niveau international. En effet, l'émergence et la diffusion croissante des bactéries résistantes aux antibiotiques remettent en question l'efficacité de ces traitements tant chez l'homme que chez l'animal, nécessitant l'intégration et l'interaction de compétences et connaissances multiples.

Les antibiotiques ne sont pas totalement inoffensifs pour l'organisme et peuvent provoquer, en plus de leurs action antimicrobienne un certain nombre d'effets indésirables, tel que, la modification des caractères physiologiques et métaboliques de la microflore digestive utile (Cummings, 1997).

En effet l'usage des plantes médicinales peut apporter directement des réponses à certains problèmes de santé.

Les plantes médicinales ont été utilisées dans la médecine traditionnelle depuis longtemps. Actuellement, la recherche sur les plantes médicinales a permis de découvrir de nouveaux médicaments contre diverses maladies (Derwich *et al.*, 2010).

Les huiles essentielles, également appelées huiles odoriférantes volatiles, sont des liquides huileux aromatiques extraits de différentes parties de plantes ; les feuilles, les écorces, les fleurs, les bourgeons, les graines, etc. (Tongnuanchan et Benjakul, 2014). Il existe au moins 150 types d'huiles essentielles commercialisées sur le marché international (Kusuma et Mahfud, 2017).

*Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae) est connu par sa longue culture en médecine traditionnelle depuis les anciens grecs. Il est très fréquent dans le bassin méditerranéen, il se trouve à l'état sauvage, dans les broussailles et la garrigue dans tous les types de sol, bien qu'il préfère les sols siliceux (More et White, 2005). L'huile essentielle et la gomme de la plante citée ont été largement utilisées comme additifs alimentaires et boissons dans la région méditerranéenne, sans aucune toxicité rapportée (Loutrari *et al.*, 2006 ; Ghalem et Mohamed, 2009). L'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. est également utilisée en cosmétique, parfumerie et comme agent aromatisant dans les préparations alimentaires (Daferera *et al.*, 2002).

Les résultats scientifiques ont révélé les activités pharmacologiques étendues de diverses parties de lentisque, telles que les activités antioxydantes, antimicrobiennes, antivirales, anticholinestérases, anti-inflammatoires, antinociceptives, antidiabétiques, antitumorales, antihyperlipidémiques, anti-athérosclérotiques et hépatoprotectrices, ainsi que





leurs effets bénéfiques sur les troubles gastro-intestinaux (Remila *et al.*, 2015 ; Bozorgi *et al.*, 2013 ; Dellai *et al.*, 2013). Selon Van den Berg (1998), l'huile essentielle de cette plante a une activité anti-*Helicobacter pylori* et peut être bénéfique dans le traitement de l'ulcère peptique.

La résistance de certaines espèces bactériennes de la microflore digestive aux antibiotiques usuels, notamment *Helicobacter pylori* nous a poussé à exploiter les effets antibactériens des huiles essentielles d'une plante médicinale d'Algérie, *Pistacia lentiscus* L., c'est un arbuste appartenant à la famille des Anacardiaceae, ayant un feuillage dense, d'où seront extraits les huiles essentielles à tester en adjonction avec les rameaux (Baudoux, 2008).

Par conséquent, en raison de l'importance de cette plante, nous avons mené le présent travail pour étudier la composition chimique de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. récoltée dans la région de Mostaganem (Algérie) et d'évaluer son potentiel antibactérien contre de nombreux agents pathogènes.

Pour effectuer ce travail nous avons réalisé les étapes suivantes :

- Isolement et identification de quelques bactéries de la microflore digestive humaine,
- Sélection des bactéries résistantes aux antibiotiques,
- Extraction, caractérisation et identification des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L.,
- Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L. vis-à-vis les bactéries résistantes aux antibiotiques utilisés.





**Partie**  
**Bibliographique**

# Chapitre I

---

## **Microflore digestive humaine et antibiorésistance**



## I.1. Microflore digestive humaine

### I.1.1. Généralité

Le microbiote intestinal de l'homme (ou microflore intestinale) est un ensemble de bactéries hébergées par l'être humain et vivant en commensalisme ou en symbiose avec son hôte. Étroitement associé au tractus intestinal et interagissant avec lui, il ne constitue pas un tissu ni un organe, mais un supra-organisme. La perturbation du dialogue entre les bactéries et les cellules humaines est un facteur de risque, voire la cause de différentes maladies (Bourlioux *et al.*, 2014)

L'évolution des bactéries vers la résistance constitue désormais un risque majeur en santé publique car, chez plusieurs espèces pathogènes, certaines souches ne sont plus sensibles qu'à un très faible nombre d'antibiotiques.

Toutefois, l'augmentation de la résistance s'est récemment accélérée avec l'augmentation de la consommation des antibiotiques et les nouveaux antibiotiques se font rares. Nous sommes donc confrontés à une situation de vulnérabilité d'où peut émerger à tout moment une bactérie pathogène, épidémique et sans solution thérapeutique. Face à cette menace, les interventions que nous pouvons et devons mettre en œuvre s'appuient nécessairement sur nos connaissances concernant la survenue et la dissémination de la résistance (Andremont, 2002).

### I.1.2. Flore bactérienne normale du tube digestif

Chez l'homme la microflore intestinale renferme environ 100.000 milliards de bactéries appartenant à plus de 400 espèces différentes. Il s'agit d'une biomasse considérable dont l'activité se traduit par la production *in vivo* d'enzymes et de métabolites. On ne peut pas séparer l'étude de la microflore intestinale de son contexte environnemental, à savoir l'hôte et les aliments. L'ensemble constitue un écosystème intégré, aux interrelations multiples. Toute modification de l'un ou de l'autre de ses constituants est susceptible de perturber l'équilibre et le fonctionnement de l'ensemble (Mountzouris *et al.*, 2002).

À la naissance, le tube digestif est stérile, les microorganismes entrent avec la première alimentation. Les germes de colonisation initiale varient selon la source de nourriture. Chez les enfants nourris au sein, le *Bifidobacterium* représente 90% de la flore intestinale. Les *Entérocooccus* sont présents, mais peu nombreux, les *Staphylococcus*, les *Lactobacillus* et les

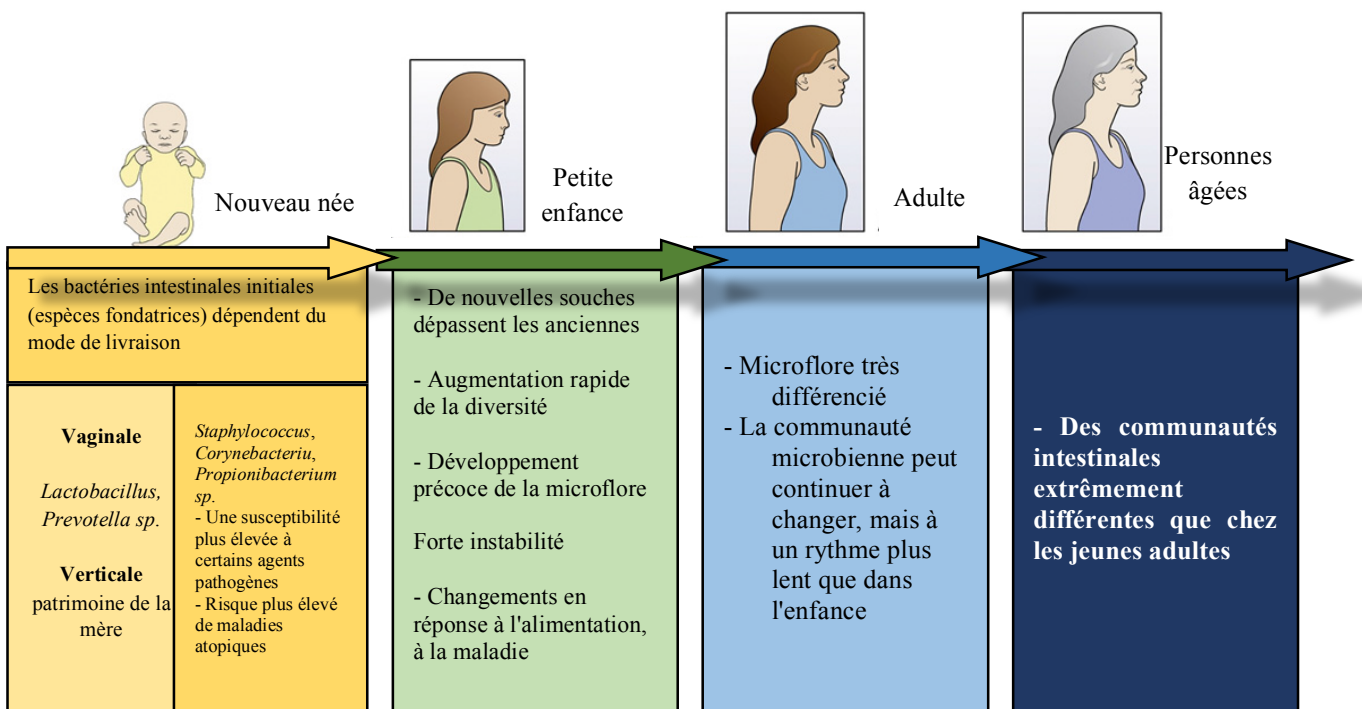




*Clostridium* sont pratiquement absents. Chez les enfants allaités au biberon, le *Bifidobactérium* n'est pas prédominant, il cohabite avec d'autres bactéries comme les *Entérocooccus*, les *Lactobacillus*, et les *Clostridium* (Ducluzeau et Raibaud, 1979).

### I.1.3. Répartition topographique de la flore digestive

La flore bactérienne de l'appareil gastro-intestinal est complexe, elle varie selon les espèces (animale et humaine), l'âge (fig. 1), les régimes alimentaires et l'utilisation des antibiotiques (Cummings, 1997).



**Figure. 1.** Schéma du développement de la microflore à partir du premier inoculum en tant que nourrisson grâce à un changement continu, modifié par l'alimentation, la génétique et l'environnement, tout au long de la vie (Dominguez-bello *et al.*, 2011).

La répartition de la flore varie selon les segments du tube digestif. Elle dépend de la teneur du milieu en oxygène, des sécrétions du tube digestif haut, des nutriments disponibles et de la vitesse du transit ; rapide de la bouche au *caecum*, plus lente ensuite (Backhed *et al.*, 2004). Globalement, il existe un gradient croissant oral-aboral (fig. 2) :

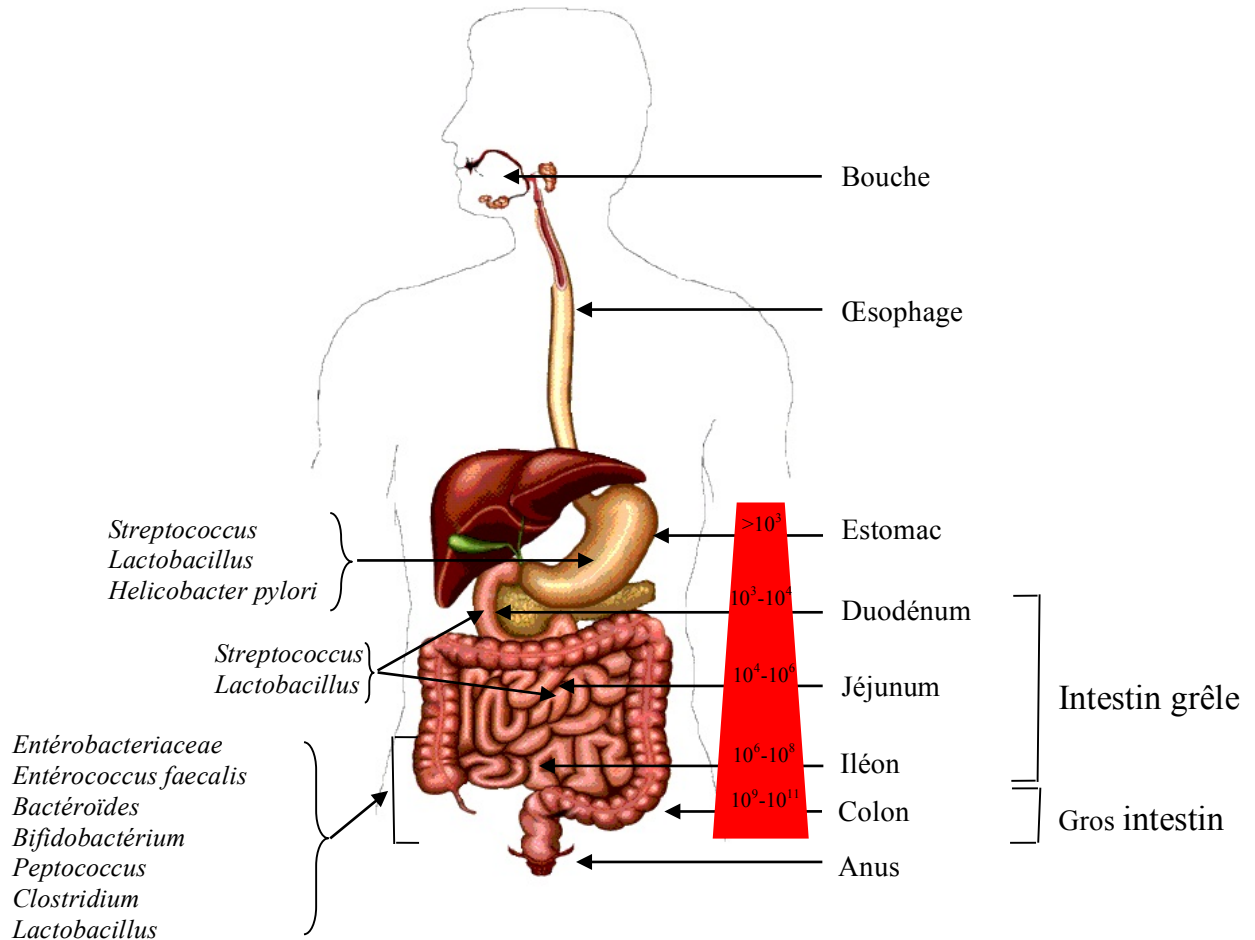




- Dans la bouche et l'œsophage, on retrouve de nombreux germes et en grande quantité. On considère cette flore comme transitoire issue des aliments ingérés même si dans sa partie distale, l'œsophage dispose d'une flore résidente c'est-à-dire qui est toujours la même.
- Dans l'estomac, du fait d'un pH bas, la flore est presque inexistante, on retrouve une flore très pauvre (inférieure à  $10^3$  UFC/g de contenu gastrique) principalement des streptocoques et quelques lactobacilles,
- Dans l'intestin grêle, on observe une variation quantitative (duodénum :  $10^3$ - $10^4$  UFC/g, jéjunum :  $10^4$ - $10^6$  UFC/g, iléon :  $10^6$ - $10^8$  UFC/g) et qualitative : diminution progressive des bactéries aérobies au profit des bactéries anaérobies strictes. Les bactéries habituellement présentes dans l'intestin grêle appartiennent aux genres : *Lactobacillus*, *Streptococcus*, et à quelques espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* à des concentrations faibles jusqu'à l'iléon où elles apparaissent dominées par des espèces anaérobies à coloration de Gram négative appartenant au genre *Bacteroides* (Bourlioux, 1998).
- Dans le côlon, le transit, très fortement ralenti, est à l'origine d'une stase d'où l'augmentation importante de la population bactérienne (de  $10^9$  à  $10^{11}$  UFC/g) (Mackie *et al.*, 1999). C'est une véritable chambre de fermentation, siège de très nombreuses biotransformations des aliments non assimilés au niveau de la grêle. Le côlon est la seule zone colonisée de façon permanente : la flore microbienne essentiellement anaérobie est dense et active, produisant localement de nombreux métabolites (Cebra, 1999).

Les bactéries présentes dans le tube digestif sont des xénobiotiques (toute substance étrangère à l'organisme et reconnue comme telle par celui-ci) qui, n'étant pas reconnues par l'hôte, devraient être rejetées. Or, cette masse bactérienne énorme est tolérée et est même responsable d'une stimulation non spécifique du système immunitaire. La seule stase ne permet pas de l'expliquer ; il est vraisemblable que les souches bactériennes possèdent des capacités d'adhésion soit aux mucines, soit aux cellules coliques par des systèmes spécifiques (adhésines) ou non spécifiques (liaisons ioniques, liaisons hydrogènes) (Eckburg *et al.*, 2005).





**Figure. 2.** Composition et concentration (UFC/g) des espèces bactériennes du microbiote dans tractus digestif (adapté de Sartor, 2008).

#### I.1.4. Composition de la flore intestinale humaine

La flore normale est l'ensemble des espèces présentes dans l'écosystème de façon constante et capables de s'y multiplier dans les conditions environnementales du tube digestif (Mountzouris *et al.*, 2002). Mais il existe de très grandes variations dans les résultats publiés, selon les modes de prélèvement, les méthodes microbiologiques, la présence éventuelle de bactéries d'origine alimentaire, la physiologie intestinale et le contexte environnemental. C'est loin de connaître toutes les espèces et leurs différents types, donc de bien appréhender les variations de la flore induites par les modifications du régime alimentaire, les bactéries exogènes et les substances antibiotiques (Gronlund *et al.*, 1999).





Dans le côlon, on distingue 4 types de flore :

- Flore dominante ( $>10^9$  UFC/g) exclusivement anaérobie : *Bactéroïdes*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Propionibacterium*,
- Flore sous dominante ( $10^6$ - $10^8$  UFC/g) : différentes espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* (notamment ; *Escherichia coli*) et les genres *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Desulfovibrio*, *Methanobrevibacter*,
- Flore résiduelle ( $<10^6$  UFC/g) : bactéries en transit ou réprimées par la flore résidente,
- Flore fécale : facilement accessible pour l'analyse, elle renferme de nombreuses espèces mortes et n'est pas représentative des différentes niches écologiques de l'écosystème microbien digestif. L'analyse de la flore fécale ne donne qu'une vue très limitée de l'écosystème mais permet de retrouver des souches pathogènes ou potentiellement pathogène pour l'hôte (Hopkins *et al.*, 2001).

### I.1.5. Rôles de la flore intestinale humaine

#### I.1.5.1. Effets digestifs

La flore commensale intestinale contribue ensuite à la digestion des aliments au niveau du tube digestif, en ayant une action complémentaire des sucs intestinaux, en produisant des enzymes digestives comme les lactases capables d'hydrolyser le lactose, en favorisant la fermentation des fibres non digérées comme la cellulose, la fermentation des nutriments, l'hydrolyse des lipides non absorbés et la dégradation de protéines et acides aminés (Rofes, 2014).

Des modifications anatomiques et histologiques liées à la présence de la microflore sont mises en évidence en comparant ce qui se passe chez l'animal conventionnel par rapport à l'animal axénique (dépourvu de germes) (Cebra, 1999). C'est ainsi que l'on constate que :

- L'absence de flore entraîne un ralentissement du transit intestinal et une dilatation du caecum (effet sur la motricité),
- La vitesse du renouvellement cellulaire et l'index mitotique sont significativement réduits chez l'animal axénique (effet sur la trophicité) (Jijon *et al.*, 2004).





### I.1.5.2. Effets nutritionnels

La microflore intestinale joue plusieurs rôles nutritionnels :

- Production des acides gras à chaîne courte diminuant la synthèse hépatique du cholestérol ; l'un d'eux, l'acide butyrique, est la principale source d'énergie de la muqueuse colique,
- Dégradation des hydrates de carbone non absorbés (amidon, pectine, glycoprotéines) aboutissant à la production d'acides organiques assimilables par l'hôte (acétate, propionate, butyrate) et de gaz (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>),
- Hydrolyses des lipides alimentaires non absorbés grâce aux lipases bactériennes et à la conjugaison des acides biliaires primaires, indispensables pour une bonne absorption des graisses,
- Dégradation de certaines protéines et de certains acides aminés tel que le tryptophane, permettant la récupération de l'azote,
- Certaines bactéries anaérobies facultatives (*E. coli*, *Enterobacter aerogenes*) sont capables de synthétiser *in vitro* un large éventail de vitamines (biotine, riboflavine, acide pantothénique, pyridoxine et vitamine K). Des bactéries anaérobies strictes (*Clostridium butyricum*, *Veillonellasp.*) sont capables de synthétiser la vitamine B<sub>12</sub>, d'une grande utilité pour la croissance locale bactérienne (Shanahan, 2002).

### I.1.5.3. Protection contre l'infection

La microflore intestinale s'exerce d'abord par l'effet de barrière provoqué par la flore résidente vis-à-vis des bactéries exogènes (résistance à la colonisation), par élimination totale de la souche exogène (effet drastique), ou par maintien de la souche exogène en sous-dominance (effet permissif). Les mécanismes expliquant ces phénomènes, sont étroitement liés aux souches anaérobies strictes dominantes de la flore résidente (Ley *et al.*, 2005).

La flore digestive stimule aussi l'immunité locale, comme l'ont montré les comparaisons du statut immunitaire des animaux conventionnels et axéniques. Ces deux effets peuvent, dans certaines conditions, être augmentés par quelques souches bactériennes probiotiques en transit, comme les bactéries lactiques (Hopkins *et al.*, 2001).





#### I.1.5.4. Effets défavorables pour l'hôte

Dans le Métabolisme des xénobiotiques, l'inactivation de médicaments (inactivation de la digoxine par *Eubacterium lentum*) ou de production de métabolites toxiques (Kelly *et al.*, 2004). Ainsi les myrosinases d'origine bactérienne, capables d'hydrolyser les glucosinates des crucifères (choux, choux de Bruxelles, navets....) peuvent être responsables de diarrhées. De même, après consommation importante et prolongée de choux, les métabolites dérivés de la 5-vinyl-oxazolidine-2-thione (goitrine) sont responsables d'une diminution importante de la captation de l'iode par la thyroïde (Jijon *et al.*, 2004).

#### I.1.6. Stabilité apparente de la flore

Avec les techniques classiques de microbiologie, on constate, chez un même individu, une assez bonne stabilité de la flore. On a encore beaucoup à apprendre sur ce sujet et notamment sur l'influence que peuvent avoir différents types d'agressions comme le jeûne alimentaire, la modification brutale du régime, le ralentissement du transit, les modifications du péristaltisme, l'antibiothérapie (à l'origine d'un dysmicrobisme et de diarrhées), avec comme conséquences des modifications des effets physiologiques, métaboliques et immunitaires de la microflore digestive de l'hôte (Simopoulos *et al.*, 1993).

La microflore intestinale fait partie d'un écosystème complexe dont la connaissance devrait beaucoup progresser grâce aux nouvelles techniques de biologie moléculaire. On peut espérer, grâce à ces nouvelles approches, mieux comprendre les mécanismes qui contrôlent la colonisation du tube digestif, qui régissent les interactions bactériennes, la résistance à la colonisation, la stimulation de l'immunité et qui modulent les propriétés métaboliques des bactéries présentes (Jijon *et al.*, 2004).

Néanmoins, cette flore bien que commensale, une certaine population de germes la composant peuvent acquérir une pathogénicité suite à une antibiothérapie mal adaptée ou un régime alimentaire sévère au cours d'une maladie quelconque, les germes pathogènes d'origine exogène peuvent aussi perturber le bon déroulement de l'écosystème digestif du processus naturel auquel contribuent la flore digestive normale (Mountzouris *et al.*, 2002).





### 1.1.7. Facteurs d'agression de la flore intestinale

Un certain nombre de facteurs thérapeutiques ou diététiques altèrent durablement la flore intestinale.

#### 1.1.7.1. Carence en fibres alimentaires

Une alimentation ne comprenant pas ou si peu de fibres alimentaires ne favorise pas l'implantation et surtout le maintien d'une flore équilibrée avec une proportion suffisante de bifides (Goulet, 2009).

#### 1.1.7.2. L'utilisation de traitements anti-acides

Elle altère également la flore, notamment dans le cadre du reflux gastro-œsophagien avéré ou simplement suspecté devant des douleurs abdominales. L'absence de prokinétiques efficaces conduit à une augmentation majeure de la prescription d'inhibiteurs de la pompe à protons. Malheureusement, l'alcalinisation gastrique supprime l'une des principales barrières à la colonisation par des bactéries de l'environnement, éventuellement pathogènes. Il a été montré que les traitements anti-acides augmentent le risque de diarrhée infectieuse (Goulet *et al.*, 2012).

#### 1.1.7.3. Gastroentérite aiguë

Une banale gastroentérite aiguë (GEA) virale ou, plus rarement, d'origine bactérienne altère la flore intestinale. La plupart des enfants des pays à haut niveau de vie guérissent rapidement d'une GEA. Cependant, certains développent le classique tableau de diarrhée grave prolongée postinfectieuse dont une des composantes est un déséquilibre durable de la flore intestinale avec toutes les conséquences que ses nombreux rôles physiologiques laissent supposer (Goulet, 2009).

#### 1.1.7.4. L'antibiothérapie

L'antibiothérapie, soit administrée par voie orale ou intraveineuse, en particulier aux phases cruciales d'implantation et de développement d'une flore bifide dominante, toute antibiothérapie doit être parfaitement indiquée et adaptée à la situation, tout particulièrement chez le nouveau-né et le nourrisson. Des travaux récents suggèrent un lien entre l'antibiothérapie en période néonatale et l'asthme (Alm *et al.*, 2008). De plus, l'antibiothérapie chez la femme peripartum (surtout pour la prévention du risque d'infection néonatale par le Streptocoque du groupe B) a montré une augmentation des infections néonatales par des bactéries résistantes aux antibiotiques (Stoll *et al.*, 2002).





## I.2. Antibiorésistance

### I.2.1. Les antibiotiques

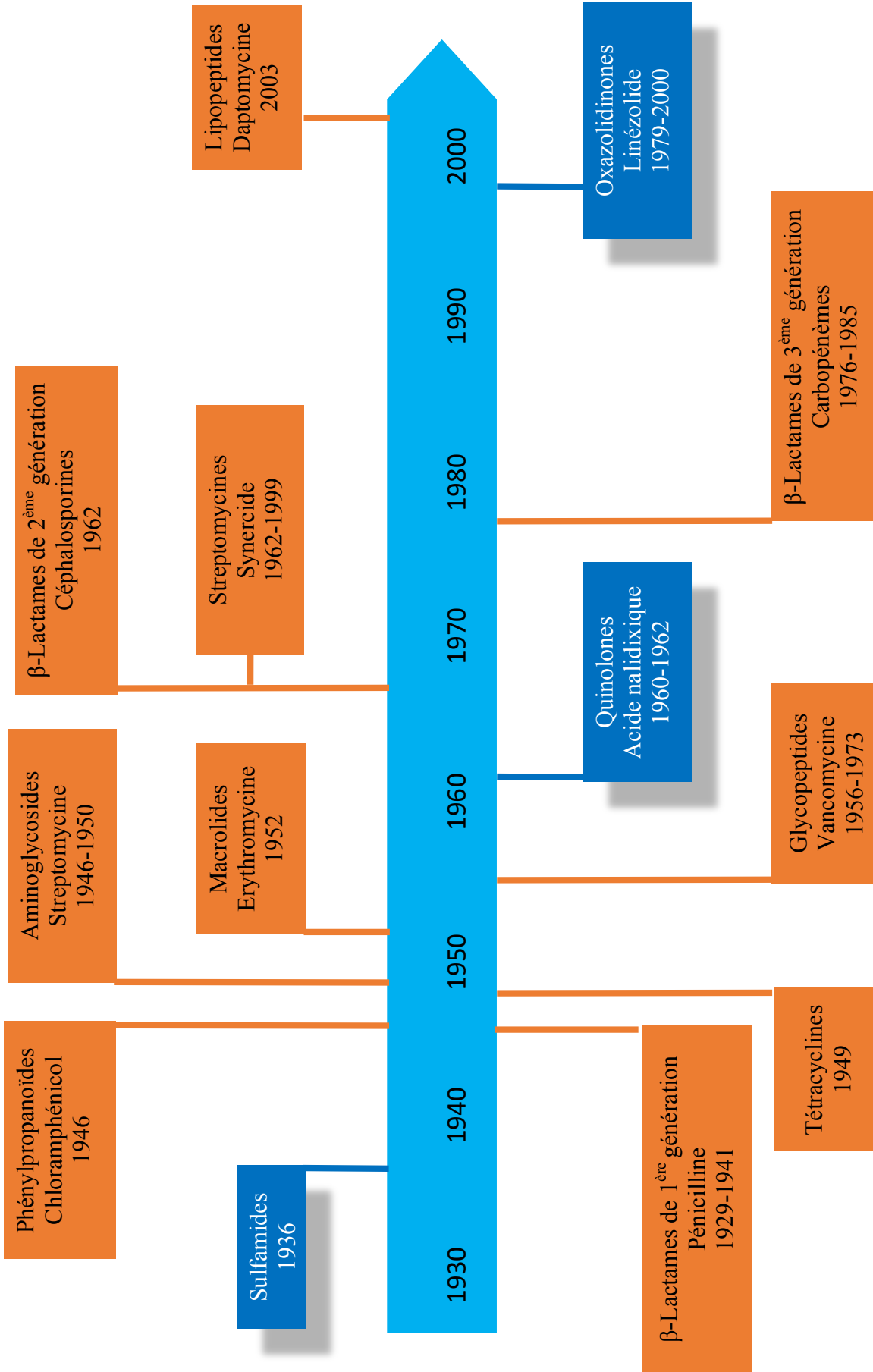
Les antibiotiques sont, par définition, « Des produits microbiens, capables de tuer les micro-organismes sensibles ou d'inhiber leur croissance » (Prescott *et al.*, 1995). Leur action étant spécifique et dirigée contre les micro-organismes, ils ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes.

L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action. Plus un antibiotique agit sur des espèces bactériennes différentes, plus son spectre est large. L'action des antibiotiques peut s'exercer sur des structures ou des mécanismes essentiels à la croissance ou à la survie des bactéries. Ainsi, ceux qui inhibent la croissance bactérienne sont qualifiés de (bactériostatiques) alors que ceux qui tuent les bactéries sont dits (bactéricides). L'administration d'antibiotiques bactériostatiques suffit généralement pour arrêter un processus infectieux, le système immunitaire de l'hôte se chargeant d'éliminer les bactéries restantes. Cependant, chez les sujets immunodéprimés, le recours à un antibiotique bactéricide est recommandé (Guinoiseau, 2010).

#### I.2.1.1. Les antibiotiques naturels et synthétiques

Les antibiotiques sont majoritairement représentés par des molécules d'origine naturelle et leurs dérivés. Ils peuvent aussi être d'origine synthétique ou semi-synthétique (Newman *et al.*, 2003 ; Singh et Barrett, 2006). Les antibiotiques sont groupés par familles ou classes en fonction de leurs propriétés structurales. Pratiquement toutes les classes d'antibiotiques ont été découvertes dans un « âge d'or », qui s'est étendu de 1936 à 1962 (fig. 3).





**Figure 3.** Découverte et premières utilisations cliniques des principaux antibiotiques d'origine naturelle (orange) et d'origine synthétique (bleu) (d'après Singh et Barrett, 2006).

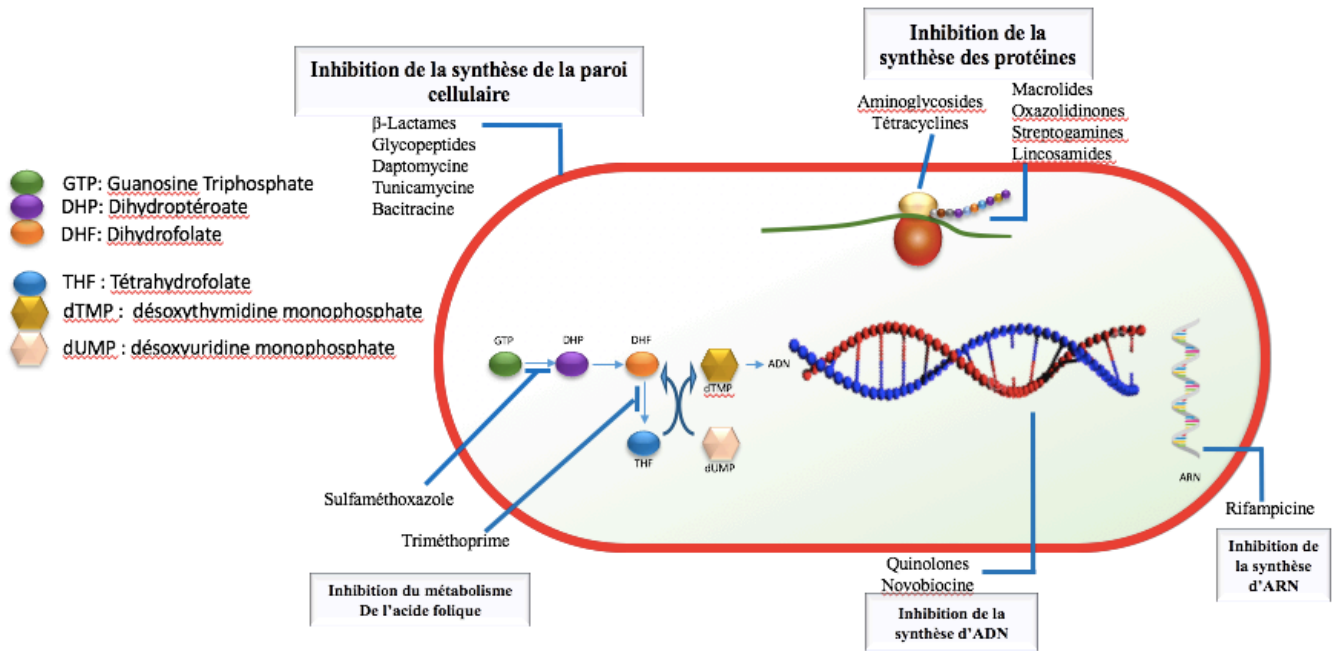


La pénicilline, premier antibiotique à large spectre, isolé des champignons du genre *Penicillium sp*, marque le début de l'ère de substance antibiotique, elle appartient à la classe des  $\beta$ -lactames. Sa découverte a ouvert la voie à l'identification de nombreuses autres classes d'antibiotiques d'origine naturelle, incluant les phénylpropanoïdes, les tétracyclines, les aminoglycosides, les macrolides, les glycopeptides, les streptogramines et les  $\beta$ -lactames de deuxième génération. Une troisième génération de  $\beta$ -lactames a été commercialisée à la fin des années 1970 : les carbapénèmes.

Il existe seulement trois classes d'antibiotiques synthétiques. La première classe est représentée par les sulfamides, qui sont aussi les premiers antibiotiques à avoir été utilisés cliniquement (Laub, 1986). La seconde classe, les quinolones (ou fluoroquinolones), a été découverte lors de la synthèse de la chloroquine, un anti-paludéen, en 1962 (Singh et Barrett, 2006). Les oxazolidinones représentent la troisième classe d'antibiotiques synthétiques., découverte en 1979, celle-ci a conduit au développement et à la commercialisation du linézolide en 1999. Avec les lipopeptides cycliques (daptomycine), les oxazolidinones constituent l'une des rares classes d'antibiotiques mise sur le marché au cours de ces dernières années.

#### **I.2.1.2. Les cibles bactériennes des antibiotiques**

Les cibles des antibiotiques sont impliquées dans les fonctions physiologiques ou métaboliques de la bactérie (fig. 4).



**Figure 4.** Mode d'action des antibiotiques (Singh et Barrett, 2006).

DHP : Dihydroptéroate ; DHF : Dihydrofolate ; THF : Tétrahydrofolate.

Les antibiotiques peuvent inhiber la biosynthèse des acides nucléiques (ADN et ARN), interférer avec les voies métaboliques de synthèse de l'ADN, mais leurs cibles principales sont la paroi cellulaire et les ribosomes bactériens (Tableau 1).



Tableau. 1. Mode d'action des principales classes d'antibiotiques (Singh et Barrett, 2006).

Classe	Origine	Mode d'action	Exemple	Structure chimique
Sulfamides	Synthétique	- Inhibent la synthèse de l'acide folique - Entraînent une diminution de la production	Sulfaméthoxazole	
$\beta$ -Lactames de 1 <sup>ère</sup> génération	<i>Penicillium notatum</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>	Inhibent la synthèse du péptidoglycane par blocage de la transpeptidation	Pénicilline	
$\beta$ -Lactames de 2 <sup>ème</sup> génération	<i>Cephalosporium</i>		Céphalosporine	
Phénylpropanoïdes	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Se fixent sur l'ARN 23S de la sous-unité 50S du ribosome empêchant l'élongation du peptide au cours de la traduction	Chloramphénicol	
Macrolides	<i>Streptomyces erythraeus</i>		Erythromycine	
Tétracyclines	<i>Streptomyces</i>	Bloquent la traduction en se fixant sur la sous-unité 30S du ribosome	Tétracycline	
Aminoglycosides	<i>Streptomyces</i> ou <i>Micromonospora</i>	Se fixent sur la sous-unité 30S du ribosome et bloquent en partie la traduction en engendrant des erreurs de lecture	Streptomycine	
Quinolones et fluoroquinolones	Synthétique	Inhibent la gyrase bactérienne	Ciprofloxacine	



La complexité des motifs structuraux et la grande variabilité des groupements fonctionnels, qui entrent dans la constitution des antibiotiques, leur permettent d'établir des interactions spécifiques avec leurs cibles bactériennes. Cette haute spécificité, associée à l'exceptionnelle capacité d'adaptation des bactéries, participe, avec autres facteurs, à la sélection de bactéries résistantes aux antibiotiques (Guinoiseau, 2010).

## I.2.2. Résistance aux antibiotiques

### I.2.2.1. Résistance naturelle

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. L'expression d'un caractère inné, partagé par l'ensemble de la communauté bactérienne, rend inappropriée l'utilisation de certains antibiotiques. Des particularités structurales de la paroi cellulaire, empêchant les antibiotiques d'accéder à leur cible, ou l'absence de cible sont autant de facteurs, qui conditionnent la résistance naturelle. Les bactéries du genre *Mycoplasma sp.* illustrent ce dernier exemple. Le composant principal de la paroi des bactéries est le peptidoglycane, un réseau tridimensionnel d'acides aminés et de chaînes polysaccharidiques, constituées de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM). Dépourvus de cet élément constitutif, les mycoplasmes présentent une résistance intrinsèque aux  $\beta$ -lactames, dont le mode d'action consiste en une inhibition de la synthèse du peptidoglycane (Normak et Normak, 2002).

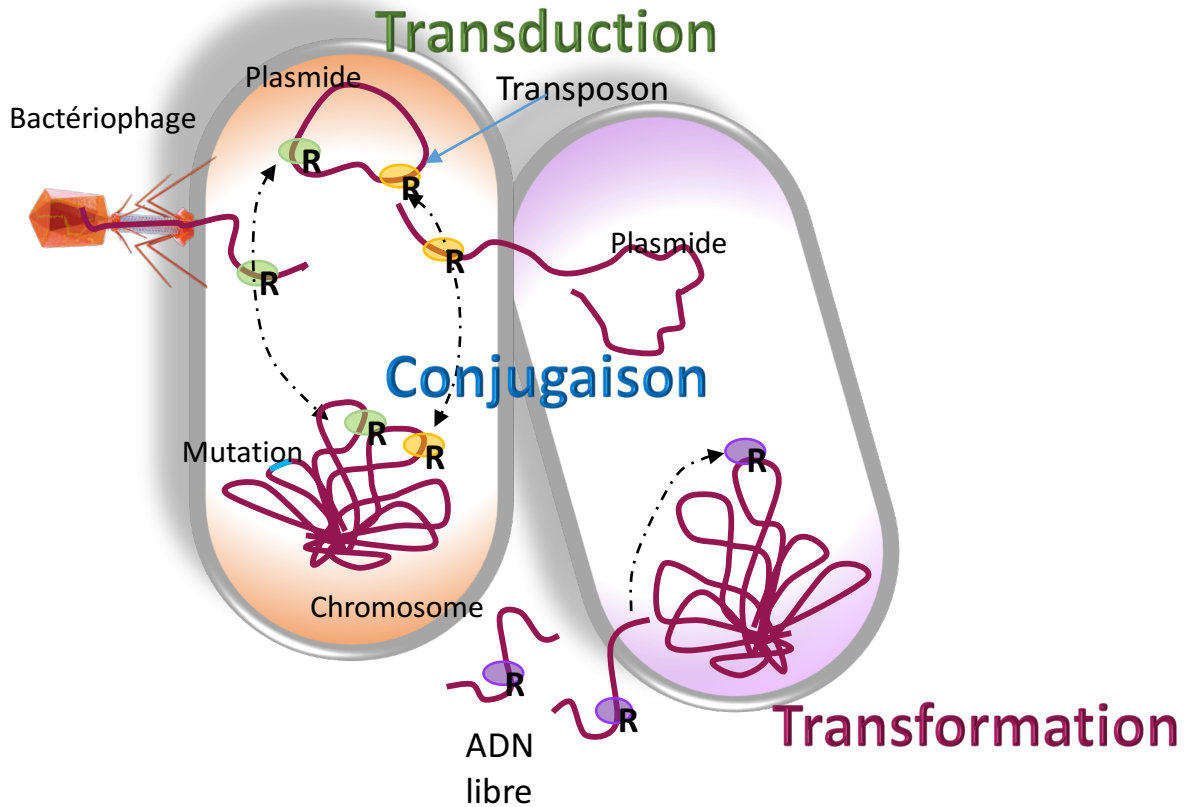
### I.2.2.2. Résistance acquise

La résistance acquise survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes. Cette résistance peut être acquise par mutation ou par transfert de gènes (Muylaert et Mainil, 2012).

La résistance acquise par mutation est aussi qualifiée de résistance chromosomique. Le phénomène de mutation est conditionné par l'utilisation des antibiotiques. Ces derniers ne sont pas des agents mutagènes mais ils contribuent à sélectionner, de manière spontanée, des mutants résistants au sein d'une population bactérienne. En éliminant les bactéries sensibles, les antibiotiques permettent aux mutants résistants de se multiplier plus facilement. La cause principale de l'évolution et de l'extension des résistances aux antibiotiques est leur prescription à grande échelle en thérapeutique humaine (Goossens *et al.*, 2006). Ces prescriptions sont souvent mal ciblées, comme dans les cas d'infections virales, ou incorrectement dosées



(Yagupsky, 2006). La transmission d'éléments génétiques mobiles, comme les plasmides et les transposons, favorisent également l'acquisition des résistances par les bactéries. Elle peut s'effectuer par transduction, conjugaison ou transformation (fig. 5).



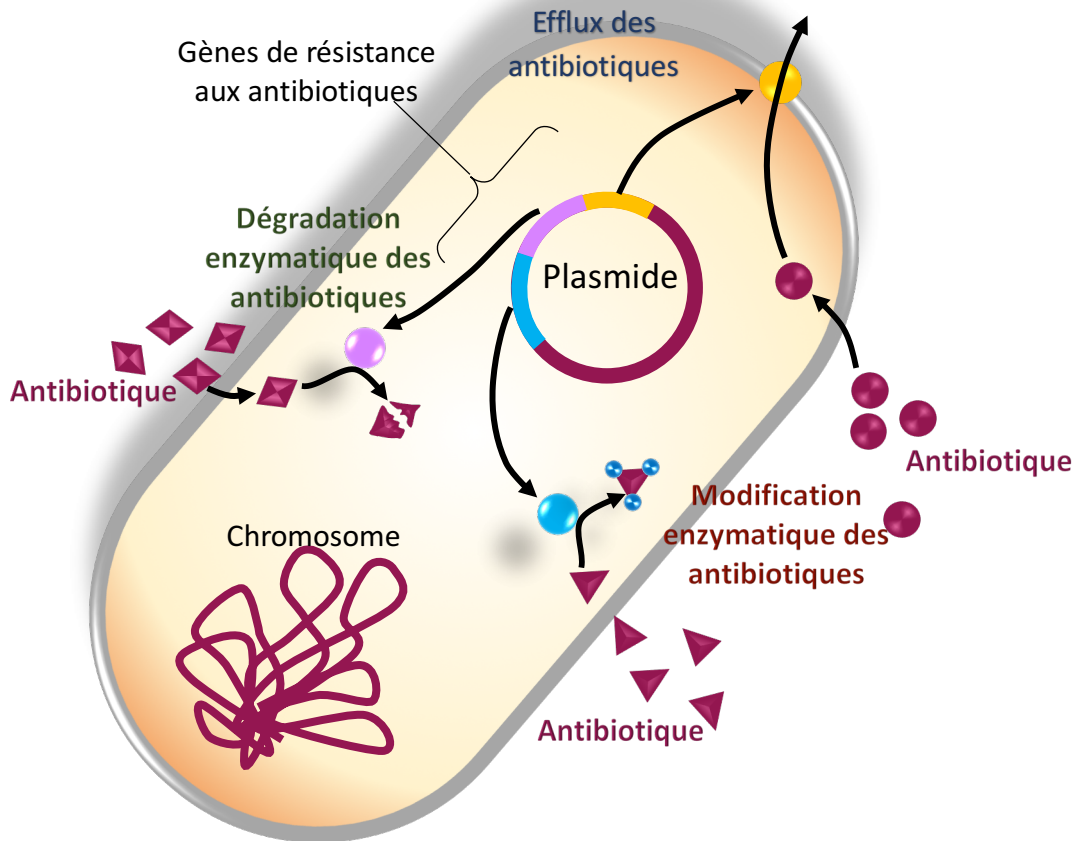
**Figure. 5.** Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries (Levy et Marshall, 2004).

La dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques peut s'effectuer au sein d'une même espèce mais aussi d'une espèce bactérienne à l'autre. Ainsi, les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la vancomycine (SARV) auraient acquis ce caractère suite au transfert plasmidique de l'opéron *vanA*, réalisé par conjugaison avec *Enterococcus faecalis* (Noble *et al.*, 1992 ; Alekshun et Levy, 2007).



### I.2.3. Mécanismes de résistance pour lutter contre l'action des antibiotiques

Certains mécanismes ciblent directement les antibiotiques tandis que d'autres sont dirigés contre les fonctions cellulaires, impliquées dans le transport de ces substances (fig. 6).



**Figure. 6.** L'efflux, la destruction et la modification des antibiotiques comme modes de résistance (Levy et Marshall, 2004).

Aux niveaux physiologique et moléculaire, la résistance bactérienne est la résultante de trois phénomènes : la diminution de la concentration intracellulaire en antibiotique par diminution de la perméabilité membranaire et/ou sur-activation de l'efflux bactérien, l'inactivation des antibiotiques par dégradation ou modification enzymatique et l'altération de leurs cibles cellulaires (Guinoiseau, 2010).



### I.2.3.1. Modification de la perméabilité membranaire

Les lipopolysaccharides (LPS) sont constitués de trois domaines structuraux, comprenant le lipide A, qui assure son ancrage à la membrane externe, un oligosaccharide central et l'antigène O, formé de plusieurs unités oligosaccharidiques. Leurs caractères hydrophiles rendent la membrane externe des bactéries à coloration de Gram négative imperméable à la plupart des macromolécules hydrophobes. Cette particularité structurale est, en partie, responsable de la résistance intrinsèque des entérobactéries et de *Pseudomonas aeruginosa* à certains antibiotiques hydrophobes, comme les macrolides (Normak et Normak, 2002).

### I.2.3.2. Systèmes d'efflux bactériens

Les premiers cas de résistance par efflux ont été mis en évidence pour des agents chimiothérapeutiques, efflués par la glycoprotéine P des cellules cancéreuses de mammifères (Juliano et Ling, 1976). L'efflux des antibiotiques a été observé pour la première fois avec la tétracycline à la fin des années 1970 (Levy et McMurry, 1978).

Les pompes d'efflux sont des transporteurs membranaires, impliqués dans la résistance aux antibiotiques par exportation active des drogues dans le milieu extracellulaire. Cependant, la plupart de ces transporteurs peuvent prendre en charge des composés de structures très différentes et contribuer ainsi, de manière significative, à la multi-résistance (MRD : multi-résistance aux drogues) des bactéries vis-à-vis des antibiotiques (Poole, 2004).

### I.2.3.3. Dégradation et modification enzymatique des antibiotiques

Les bactéries peuvent synthétiser des enzymes capables de détruire ou de modifier les antibiotiques. Les réactions enzymatiques, conduisant à l'inactivation des antibiotiques, peuvent s'effectuer par hydrolyse, transfert de groupements chimiques ou oxydo-réduction (Wright, 2005).

L'inactivation enzymatique de l'antibiotique représente le principal mécanisme de résistance des bêtalactames, des aminoglycosides et des phénicolés. On décrit également ce type de résistance pour le groupe MLS (macrolides, lincosamides, streptogramines), pour les tétracyclines, pour la fosfomycine et plus récemment pour les fluoroquinolones, bien que cette inactivation ne représente pas le mécanisme de résistance qui prévaut pour ces molécules.





L'enzyme en modifiant le noyau actif de l'antibiotique par clivage ou par addition d'un groupement chimique, empêche la fixation de l'antimicrobien sur sa cible et provoque une perte d'activité. Parmi les réactions biochimiques catalysées par ces enzymes bactériennes, on peut citer des hydrolyses, des acétylations, des phosphorylations, des nucléotidylations, des estérifications, des réductions et des réactions d'addition d'un glutathion (Muylaert et Mainil, 2012).

#### **I.2.3.4. Altération des cibles cellulaires des antibiotiques**

La modification de la cible d'un antibiotique est un mécanisme commun de résistance (Lambert, 2005). Elle est la conséquence d'une mutation spontanée au niveau d'un gène bactérien ou de l'acquisition du gène de résistance, par conjugaison, transduction ou transformation. Les changements occasionnés doivent inhiber l'action des antibiotiques tout en maintenant la fonction cellulaire de la cible.

La biosynthèse du peptidoglycane est assurée par une transpeptidase. L'acquisition d'une transpeptidase modifiée confère la résistance à la méthicilline et aux autres  $\beta$ -lactames, à de nombreuses bactéries, incluant les SARMs (Enright *et al.*, 2002).

# Chapitre II

---

**Les huiles  
essentielles, source  
naturelle d'antimicrobiens**



## II.1. Généralités

Les molécules actives, impliquées dans les mécanismes de défense des plantes, sont issues du métabolisme secondaire. Elles ne participent pas directement à la croissance des plantes, mais ont la capacité de leur fournir une protection naturelle contre les attaques de microbes ou d'insectes. Une partie de ces métabolites secondaires se concentre dans les sacs oléifères, qui sont des poches sécrétrices d'huiles essentielles. L'exploration des huiles essentielles pour la recherche de molécules à activité antimicrobienne semble donc être une voie intéressante.

## II.2. Définition

Les huiles essentielles, sont des extraits volatiles et odorants que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau ou incision des végétaux qui les contiennent. Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs, de brindilles, d'herbes, d'écorces, de bois, de racines ou de fruits (Burt, 2004). Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire. Les huiles essentielles sont des composés liquides très complexes. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie ; l'aromathérapie (Cimanga *et al.*, 2002).

Du point de vue chimique, il s'agit de mélanges extrêmement complexes. Les huiles essentielles sont constituées de différents composants terpènes, esters, cétones et d'autres éléments. Elles doivent leur nom à ce qu'elles sont très réfringentes, hydrophobes et hydrophiles. Les huiles essentielles ne sont que très peu solubles ou pas du tout dans l'eau et on les retrouve dans le protoplasme sous forme d'émulsions plus ou moins stables dans les solvants des lipides (acétone, sulfure de carbone, chloroforme, etc.) à l'inverse des glycérides, dans l'alcool (Wang *et al.*, 2006).

## II.3. Répartition systématique des huiles essentielles

Dans le règne végétal, les huiles essentielles se retrouvent généralement chez les végétaux supérieurs. Les genres capables d'élaborer les constituants qui les composent sont repartis dans une cinquantaine de familles dont beaucoup appartiennent aux ordres des Lamiales, des Astérales, des Rutales, des Laurales et des Magnoliales (Samate, 2002).





## II.4. Localisation des huiles essentielles dans les tissus

Les huiles essentielles peuvent s'accumuler dans des cellules isolées qui se distinguent des autres cellules par leur teinte plus jaune et leurs parois épaisses, légèrement lubrifiées. C'est le cas chez les lauracées ; elles peuvent former de fines gouttelettes parsemant le protoplasme de cellules épidermiques comme l'épiderme supérieur des pétales de rose. Mais généralement les épidermes des pétales de fleurs odorantes ne contiennent pas de grosses réserves d'essences. Les essences sont vaporisées de façon continue au cours de leur formation (Wang *et al*, 2006).

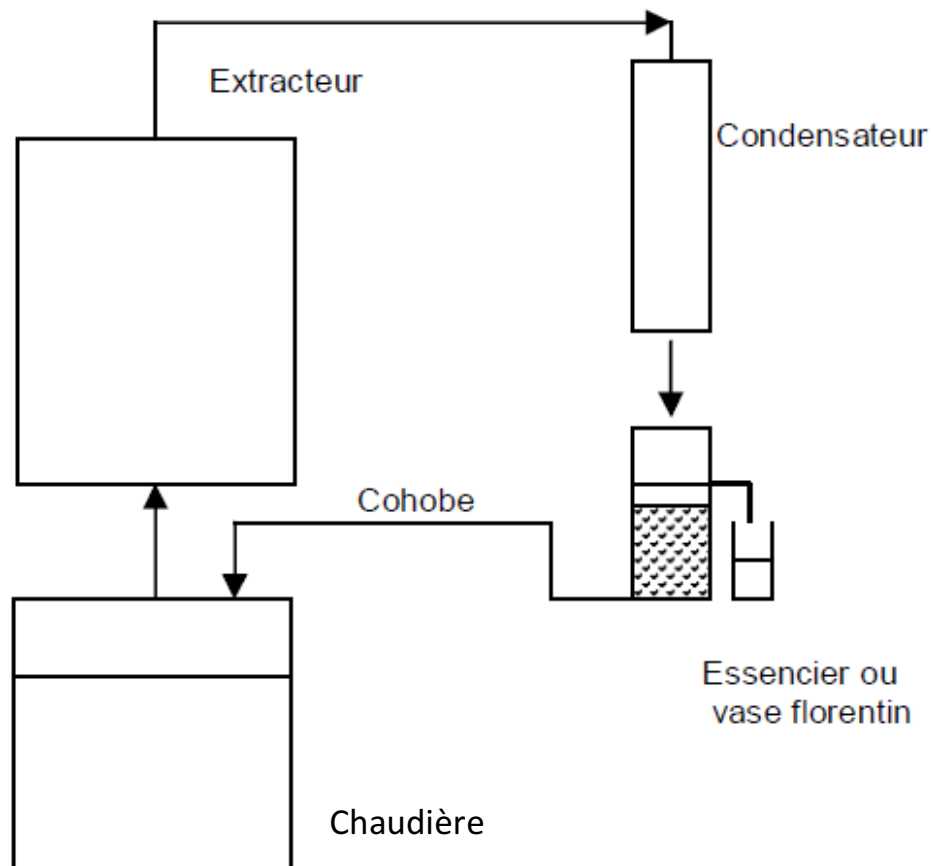
## II.5. Méthodes d'extraction

Les huiles essentielles sont des produits obtenus soit à partir des matières premières naturelles par distillation, soit à partir des fruits de citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques (Stahl-Biskup et Saez, 2002). Les huiles essentielles sont extraites principalement par deux méthodes de distillation (Entraînement à la vapeur d'eau et hydrodistillation) et une méthode d'expression à froid (cas particulier des agrumes). Lesquelles peuvent être mises en œuvre sur les systèmes discontinus ou continus, à la pression ambiante, en surpression ou en dépression (Romdhane et Tizaoui, 2005 ; McDonald *et al.*, 2016). La durée de la distillation peut être ramenée de quelques minutes jusqu'à 30 heures, avantage, suivant les paramètres intervenant au cours du procédé.

### II.5.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

L'entraînement à la vapeur d'eau (fig. 7) est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct de l'eau et la matière végétale à traiter. La vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile (El haib, 2011).

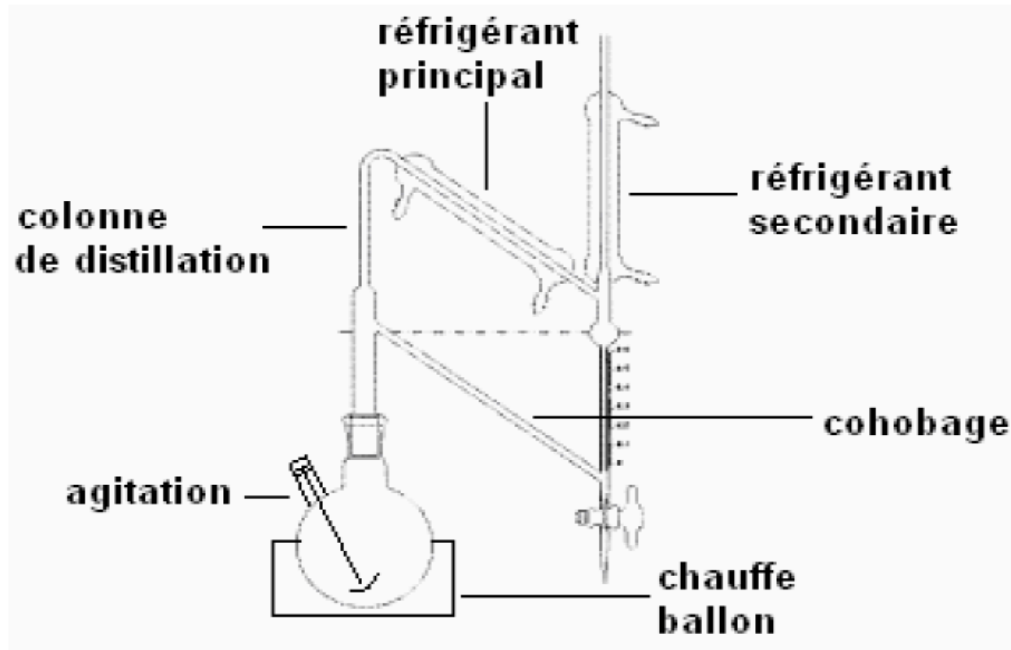




**Figure. 7.** Principe schématisé de l'appareillage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau (Hubert, 1992).

### II.5.2. Extraction par hydrodistillation

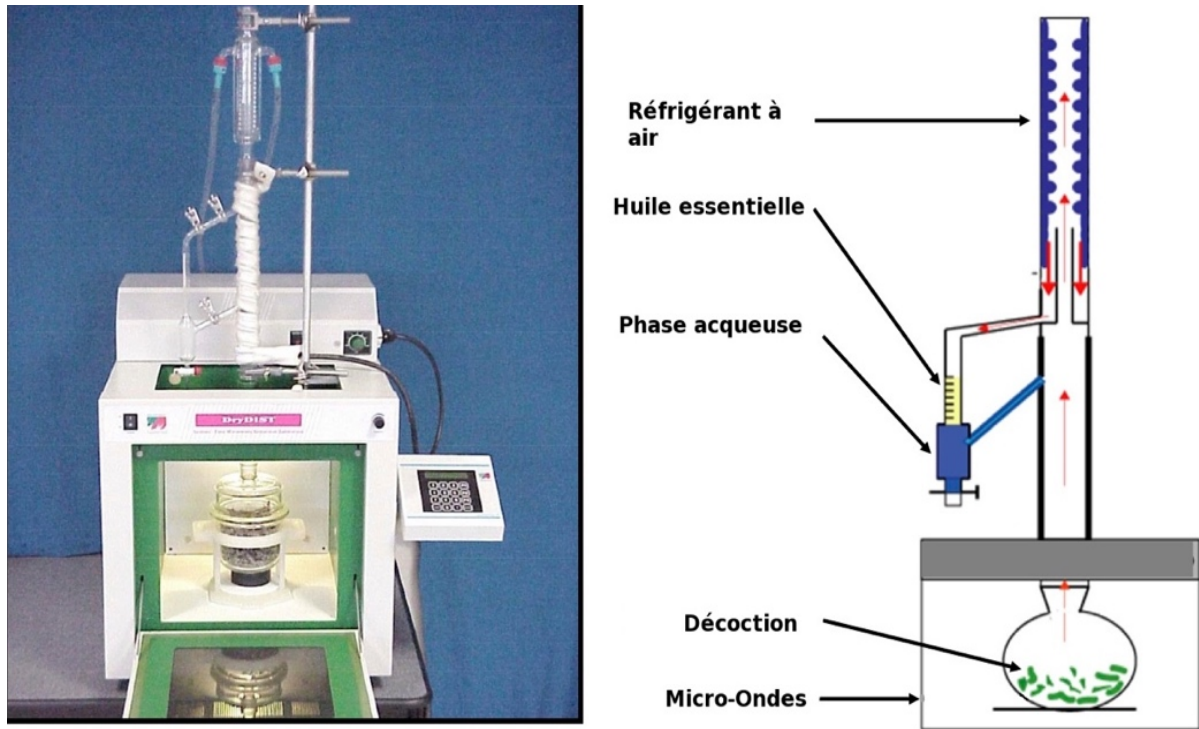
L'hydrodistillation consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition (fig. 8). Elle est généralement conduite à pression atmosphérique. La distillation peut s'effectuer avec ou sans cohobage des eaux aromatiques obtenues lors la décantation (Lucchesi, 2005).



**Figure. 8.** Principe schématisé de l'appareillage d'hydrodistillation (El haib, 2011).

### II.5.3. L'hydrodistillation assistée par micro-ondes

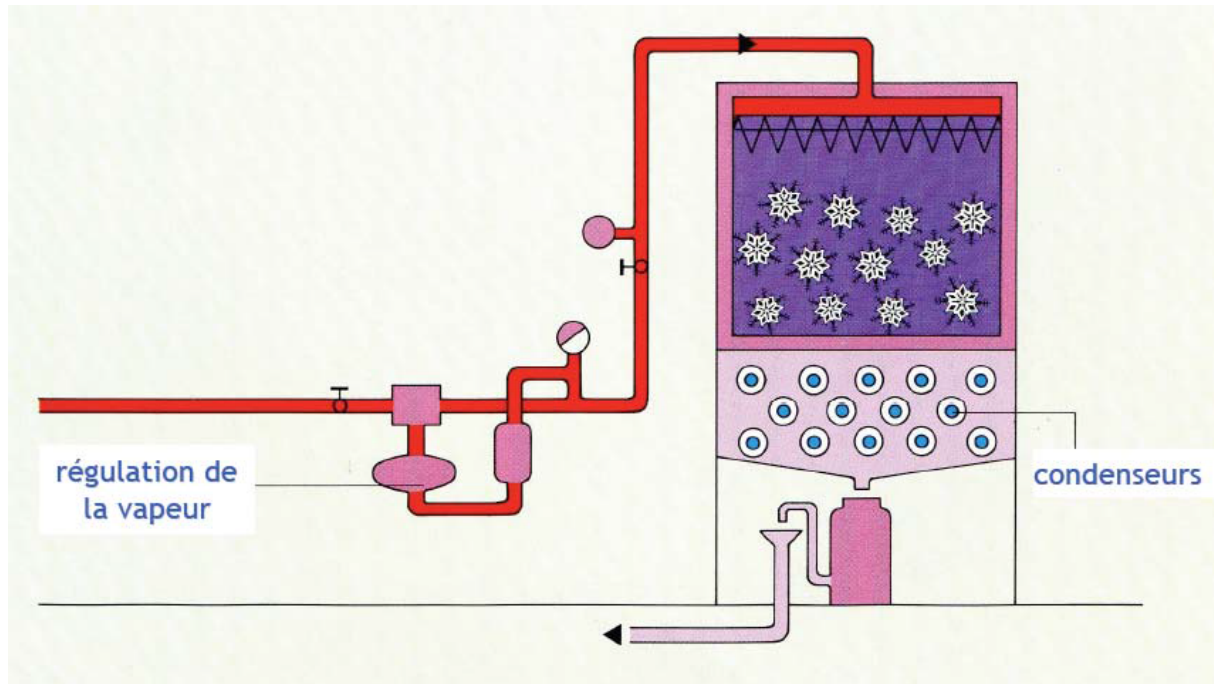
Il existe divers exemples d'applications de cette technique à l'extraction de certains organes végétaux : feuilles de *Pistacia lentiscus* L. par Ben douissa *et al.* (2005), épices de *Cuminum cyminum* L. et *Zanthoxylum bungeanum* L. par Wang *et al.* (2006), fruits de thym par Bahrami *et al.* (2013). L'avantage essentiel de ce procédé (fig. 9) est de réduire considérablement la durée de distillation (ramenée à quelques minutes) et augmente le rendement d'extrait.



**Figure. 9.** L'appareillage du système de l'hydrodistillation sous micro-ondes (Chemat *et al.*, 2012).

#### II.5.4. Hydrodiffusion

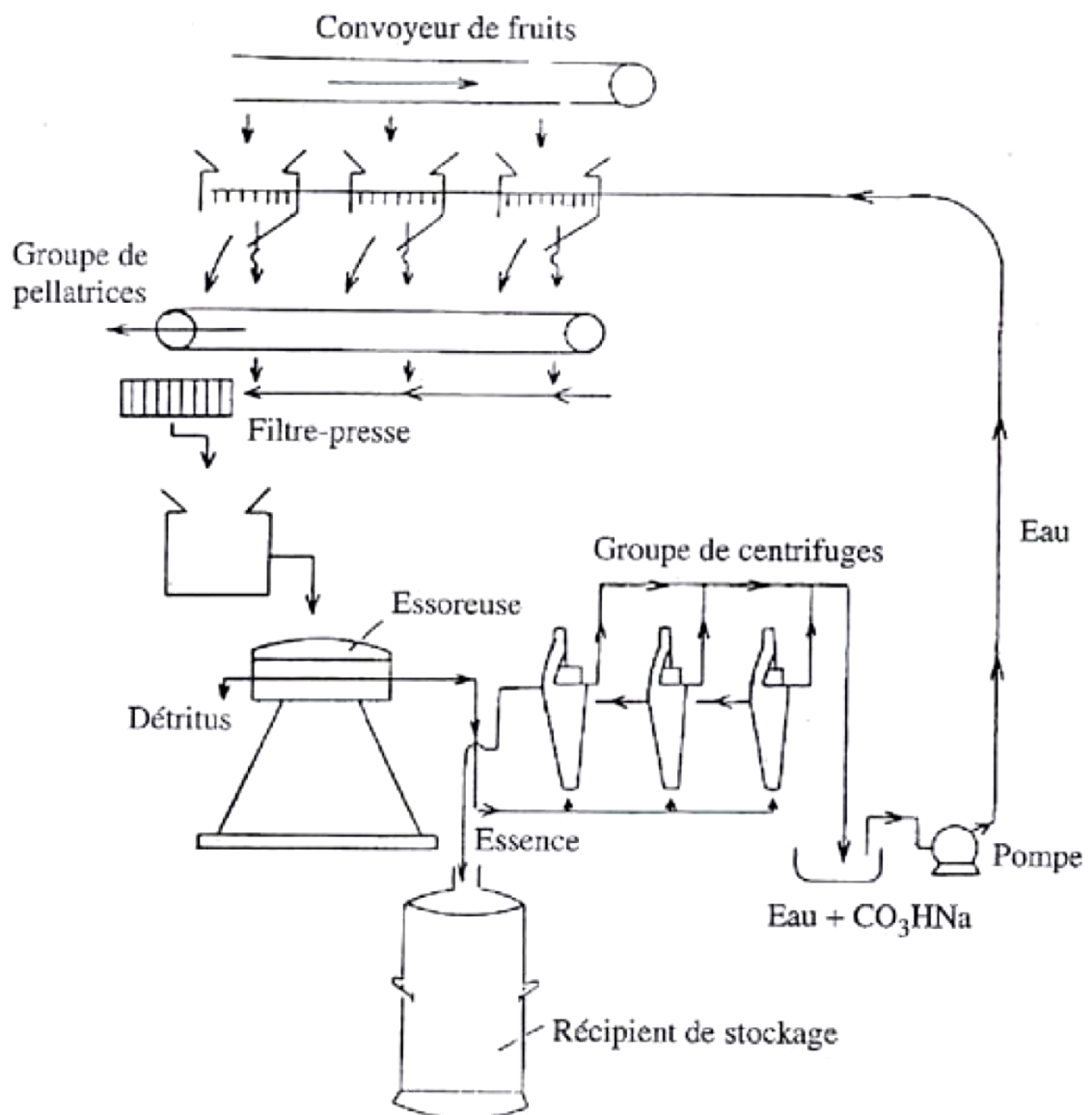
C'est une variante de l'entraînement à la vapeur. Le flux de vapeur n'est pas ascendant mais descendant. Cette technique exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « vapeur d'eau-huile essentielle » dispersé dans la matière végétale. Comme pour l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydrodiffusion (fig. 10) présente l'avantage de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau. De plus, l'hydrodiffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur (Lucchesi, 2005).



**Figure. 10.** Schéma du procédé d'hydrodiffusion (Bousbia, 2011).

### II.5.5. L'expression à froid

L'extraction par expression à froid, est souvent utilisée pour extraire les huiles essentielles des agrumes. Son principe consiste à rompre mécaniquement les poches à essences. L'huile essentielle est séparée par décantation ou centrifugation (fig. 11). D'autres machines rompent les poches par dépression et recueillent directement l'huile essentielle, ce qui évite les dégradations liées à l'action de l'eau (Nzeyumwami, 2004).



**Figure. 11.** Schéma du procédé de récupération de l'huile essentielle de citron et autres agrumes (Martini et Seiller, 1999).

### II.5.6. Extraction par solvant organique

La technique d'extraction par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique (fig. 12). Le produit ainsi obtenu est appelé « concrète ». Cette concrète pourra être par la suite brassée avec de l'alcool absolu, filtrée et glacée pour en extraire les cires végétales. Les rendements sont généralement plus importants par rapport à la distillation.



L'intervention du solvant organique, peut entraîner des risques d'artéfacts et des possibilités de contamination de l'échantillon par des impuretés parfois difficile à éliminer (El Haib, 2011).

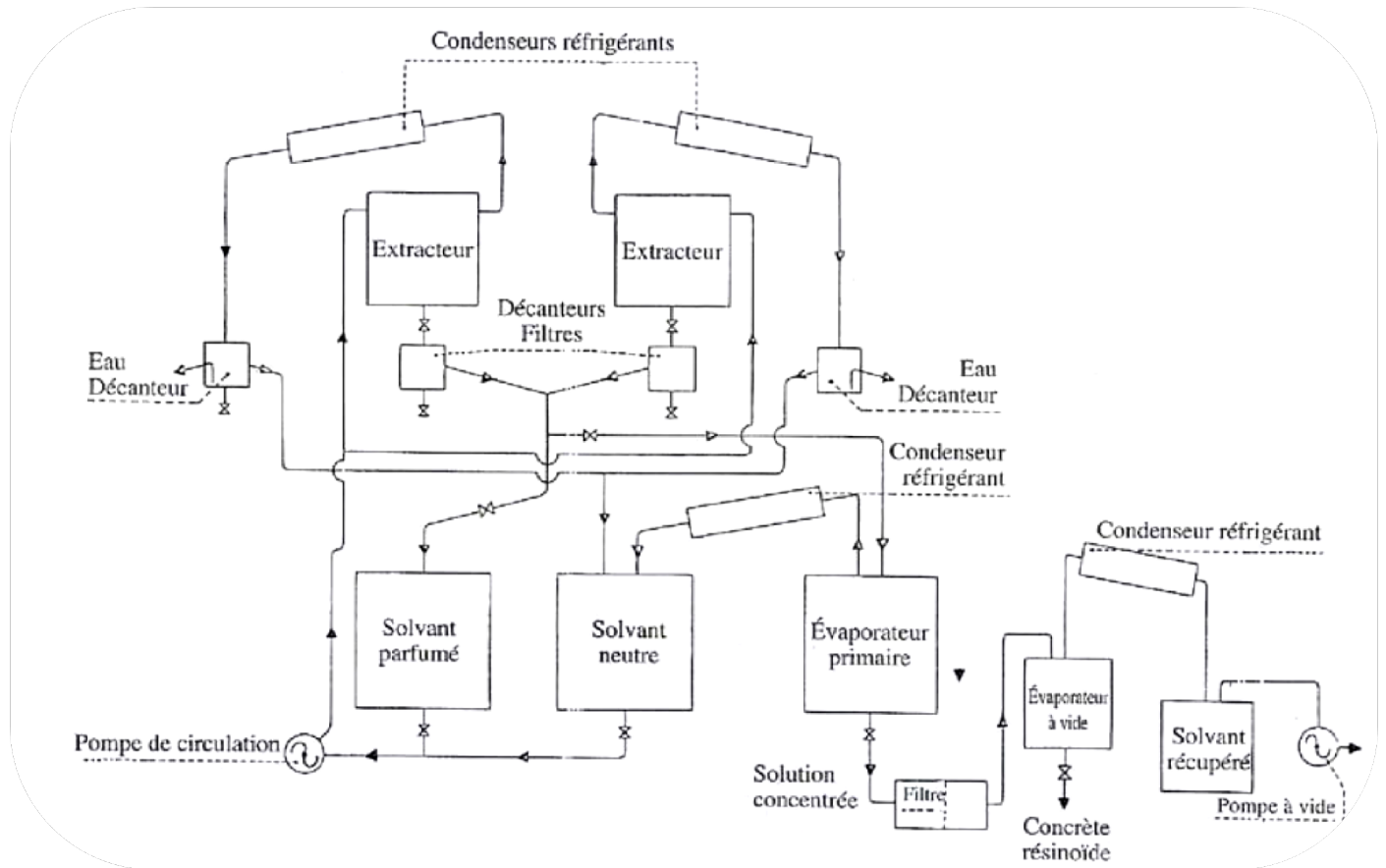


Figure. 12. Schéma d'une batterie d'extraction par solvant pour végétaux bruts (Martini et Seiller, 1999).

### II.5.7. Extraction par du CO<sub>2</sub> à l'état supercritique

L'extraction par gaz liquéfié ou par fluide à l'état supercritique met en œuvre généralement le dioxyde de carbone (Braga *et al.*, 2005). Dans ce système le solvant est utilisé en boucle par interposition d'échangeurs de chaleur, d'un compresseur et d'un détendeur afin de porter le solvant à l'état désiré à chaque stade du processus. La séparation de l'extrait a lieu en phase gazeuse par simple détente.



L'avantage de cette méthode est la possibilité d'éliminer et de recycler le solvant par simple compression détente. De plus les températures d'extraction sont basses dans le cas de dioxyde de carbone et non agressives pour les constituants les plus fragiles. A ces différents avantages s'ajoutent ceux de l'innocuité, d'inertie et d'inflammabilité du CO<sub>2</sub> (fig. 13). En outre, en fonction des conditions de pression et de température, on modifie le pouvoir solvant. Il est donc possible dans certaines limites d'orienter la composition de l'extrait, d'autant qu'il est envisageable d'utiliser un agent de co-extraction pour réguler la polarité. Le frein du développement de cette technologie est le coût élevé des appareillages liés à l'application de pressions de plusieurs centaines de bars (Lagunez rivera, 2006).

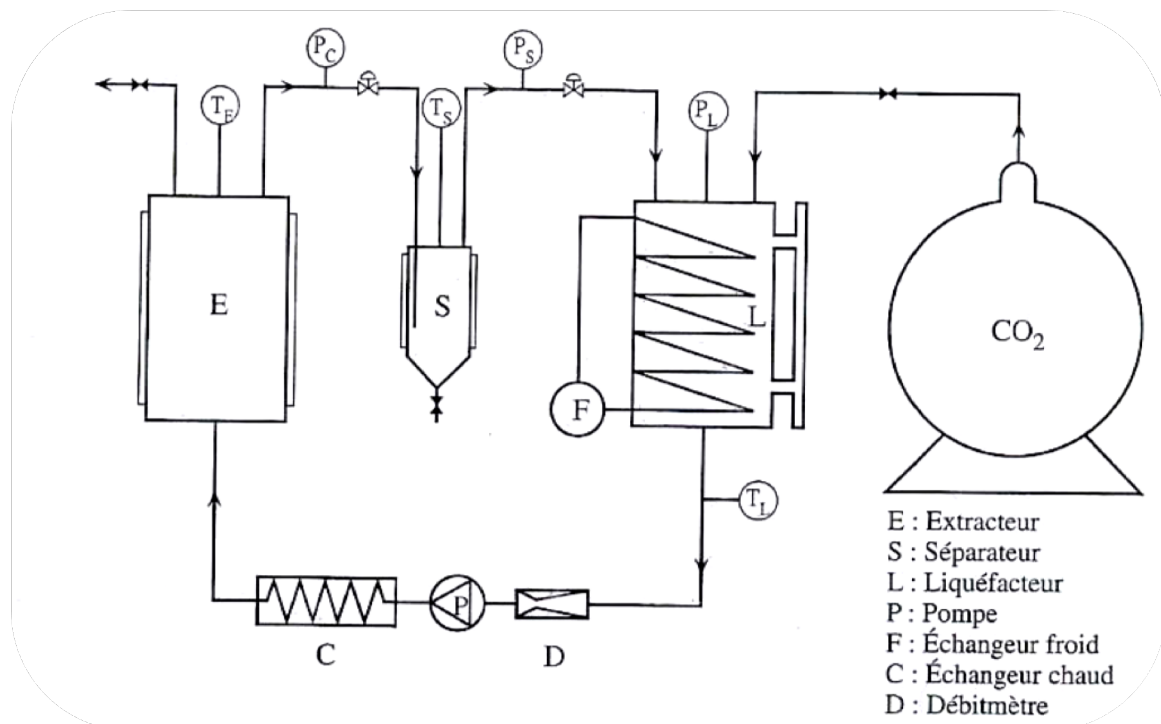


Figure. 13. Schéma du système d'extraction du CO<sub>2</sub> à l'état supercritique (Martini et Seiller, 1999).

## II.6. Méthodes d'identification des huiles essentielles

Les techniques analytiques pouvant être mises en œuvre pour l'identification des constituants d'un mélange complexe sont nombreuses et variées. Toutefois, l'identification et la quantification des constituants d'un mélange naturel restent toujours des opérations délicates qui nécessitent souvent l'utilisation de plusieurs techniques complémentaires (Joulain, 1994 ; Coleman III et Lawrence, 1997).





D'une manière générale, l'identification des constituants d'un mélange complexe naturel s'effectue selon trois voies (fig. 14) :

- La voie A, est spécialement bien adaptée aux analyses de routine telles que les contrôles de qualité d'échantillons (d'huiles essentielles ou d'extraits végétaux par exemple) dont les constituants ont déjà été décrits dans la littérature. Elle fait intervenir le couplage « en ligne » d'une technique chromatographique (CPG, CLHP), qui permet l'individualisation et la quantification des constituants, avec une technique spectroscopique (SM, IRTF, etc.), qui permet leur identification par comparaison de leurs données spectrales avec celles des produits connus.
- La voie B, est préconisée lorsque les constituants d'un mélange présentent des difficultés d'identification (structures d'un nouveau composé et/ou structures très proches). Deux étapes sont nécessaires : après purification/isolement des composés par différentes techniques chromatographiques, une analyse structurale est réalisée en s'appuyant sur la RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$ .
- Enfin la voie C, intermédiaire entre les deux précédentes, met en œuvre la Résonance Magnétique Nucléaire du C (RMN) sans séparation ou fractionnement préalable des composés. Cette voie, initiée par Kubeczka (1982) a été développée, optimisée et informatisée par l'équipe de « Chimie et Biomasse » (UMR CNRS n° 6134-SPE-Université de Corse) depuis une vingtaine d'années pour devenir un véritable outil analytique pour l'identification des constituants d'un mélange naturel (Delphin, 2013).



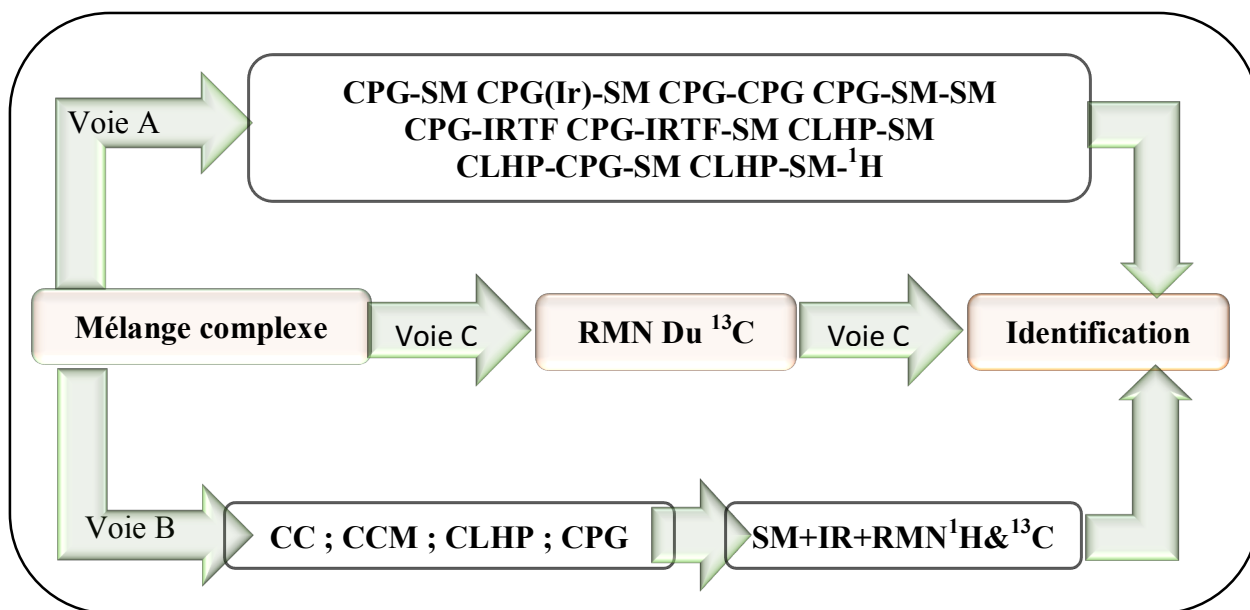


Figure. 14. Les principales voies d'analyse d'un mélange complexe naturel (Delphin, 2013)

## II.7. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes pouvant contenir plus de 300 composés différents (Sell, 2006). Ces composés sont des molécules volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes. Seuls les terpènes les plus volatils, y sont rencontrés soit les monoterpènes (myrcène, pinène, etc.) et les sesquiterpènes (p-caryophyllène, etc.).

Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit des terpènes (mono et sesquiterpènes), prépondérants dans la plupart des essences, et des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (El Haib, 2011).

### ➤ Composés terpéniques

Seuls les monoterpènes en C10 et les sesquiterpènes en C15 peuvent être extraits par distillation, les autres terpènes (diterpènes en C20 et triterpènes en C30) n'étant pas entraînés par la vapeur d'eau. Ils sont classés selon :

- leurs fonctions : alcools (géraniol, linalol), esters (acétate de linalyle), aldéhydes (citral, citronellal), cétones (menthone, camphre, thuyone), éthers-oxydes (cinéole) ;
- leur structure : linéaire (farnésène, farnésol), monocyclique (humulène, zingiberène), bicyclique (cadinène, caryophyllène, chamazulène) ou tricyclique (cubébol, patchoulool, viridiflorol).





### ➤ Composés aromatiques dérivés du phénylpropane

Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane sont beaucoup moins fréquents dans les huiles essentielles que les monoterpènes et sesquiterpènes. Citons l'acide cinnamique et l'aldéhyde cinnamique (HE de cannelle), l'eugénol (HE de girofle), l'anéthole et l'aldéhyde anisique (HE de badiane, d'anis, de fenouil), ainsi que le saffrole (HE de saffras).

Les lactones dérivées des acides cinnamiques, comme les coumarines, sont pour la plupart, entraînaient par la vapeur d'eau et ainsi présentes dans les huiles essentielles de céleri (Bruneton, 1993).

## II.8. Propriétés d'utilisation des huiles essentielles

La connaissance des huiles essentielles remonte à fort longtemps puisque l'homme préhistorique la pratiquait déjà, à sa manière l'extraction des principes odorants des plantes. Il plongeait, dans un même récipient rempli d'eau, des plantes odorantes et des pierres brûlantes (Robert, 2000). Au fil des siècles, l'extraction et l'usage des principes odorants des plantes sont développés, notamment par des civilisations arabe et égyptienne, deviennent alors des remèdes courants en médecine traditionnelle.

En guise d'exemple, à l'époque des grandes épidémies dans la Grèce Antique, les principes odorants de certaines plantes aromatiques étaient répandus par fumigation dans les vus des villes pour combattre la propagation des maladies infectieuses (Buchbauer *et al.*, 1993). Plus tard en France, il a été remarqué que les ouvriers parfumeurs et tanneurs, qui étaient en contact quotidiennement avec des huiles essentielles, résistaient de manière quasi absolue aux épidémies de toutes sortes (Vanier, 1994). De nos jours, le domaine qui utilise les huiles essentielles pour traiter une maladie s'appelle l'aromathérapie. Il est donc important de se renseigner sur les effets thérapeutiques des huiles essentielles car leur usage peut comporter des avantages ou des inconvénients. Outre ces propriétés principales, elles ont toute une vertu ; Antibactérienne, antivirale, antifongique, antiparasitaire et antiseptique. Elles ont aussi des activités insecticides, anti-brûlures et cicatrisantes, analgésiques, antalgique et anesthésique, des propriétés cardiovasculaires et endocrinorégulatrices, des propriétés digestives, des propriétés immunorégulatrices et anti-inflammatoires (Baratta *et al.*, 1998).

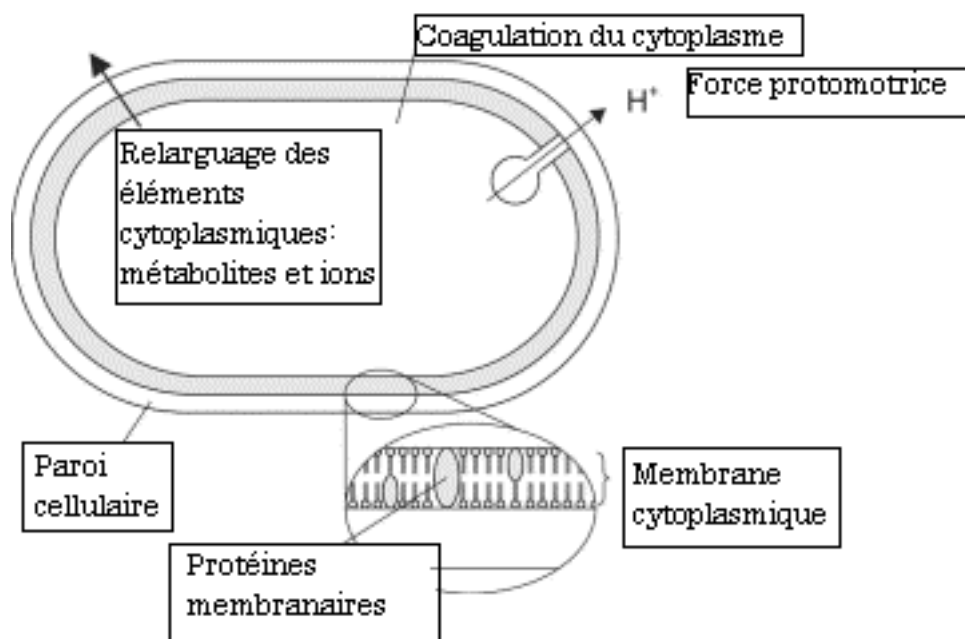




## II.9. Mode d'action des huiles essentielles

L'activité d'une huile essentielle dépend de sa composition en molécules aromatiques. Celles qui agissent sur le système nerveux central sont des huiles à action sédatrice ou à action stimulante. Les huiles essentielles qui agissent sur le système neurovégétatif sont des huiles à action sympathomimétique (stimulent le système sympathique), à action parasympathomimétique (freine le système sympathique), ou sont des huiles essentielles régulatrices du système nerveux périphérique. D'autres agissent sur les systèmes endocriniens. Elles peuvent avoir une action de freinage de la thyroïde, une action de la stimulation de la thyroïde, peuvent stimuler les surrénales ou les inhiber et d'autres ont une action hypoglycémique. Aussi les huiles essentielles peuvent agir sur le système hormonal : huiles essentielles oestrogène-stimulantes, anti-oestrogènes ou stimulantes des hormones mâles. Enfin on constate une action sur le système cardio-vasculaire qui sont des huiles essentielles resserrant la paroi des veines, dilatant la paroi des artères, fluidifiant le sang, augmentant ou diminuant la pression artérielle. Donc les molécules aromatiques agissent à différents niveaux et de manières directes ou indirectes (Balz, 1986).

Le mode d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé (Kalemba et Kunicka, 2003 ; Burt, 2004). Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (fig. 15).



**Figure 15.** Action des huiles essentielles et de leurs constituants sur la cellule bactérienne (Burt, 2004).



## II.10. Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de molécules, dont on peut distinguer 2 groupes : les terpènes et les aromatiques.

Les terpènes et leurs dérivés sont formés d'unités isopréniques (unités pentacarbonnées ramifiées). Pour cette gamme de composés, seules les molécules de poids faible, entre 10 et 20 atomes de carbones, sont présents dans les huiles essentielles. Par conséquent, elles peuvent plus facilement pénétrer la peau humaine et ainsi provoquer des allergies et des inflammations. Cependant, ces effets sont provoqués majoritairement par d'autres composés comme les lactones sesquiterpéniques, l'aldéhyde cinnamique et les phénylpropanoïdes (Marcotte, 2015).

Les huiles essentielles contenant certains composés aromatiques, notamment les phénols et dérivés, comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol, sont à utiliser avec précautions. Ces molécules peuvent provoquer de sévères irritations sur les peaux sensibles ou les muqueuses. De plus, les cellules du foie peuvent se trouver altérées, lorsque les doses prises sont élevées et que la durée de la cure est longue (Rouessac et Rouessac, 2009).

D'autres familles de composés s'avèrent être également toxiques. Ceux sont les cétones, les aldéhydes et quelques esters. Les conséquences sur notre santé vont de la photosensibilisation aux risques d'avortement, dans les cas les plus graves (Marcotte, 2015).

L'utilisation des huiles essentielles n'est pas à prendre à la légère. Les effets toxiques sont très variables d'une huile essentielle à l'autre et dépendent beaucoup de la sensibilité des consommateurs (Bousbia, 2011).

Ainsi, il est nécessaire que les fournisseurs d'huiles essentielles identifient et quantifient les composés potentiellement toxiques, afin d'informer au mieux les utilisateurs. Pour cela, on utilise la chromatographie en phase gazeuse associée à un spectromètre de masse ou à un détecteur à ionisation de flamme (Marcotte, 2015).



# Chapitre III

---

## *Pistacia lentiscus* L. et aromathérapie



Le *Pistacia lentiscus* L. Darou en arabe, Chios mastic tree (Anglais), Mastixbau (Allemand), Arbre au mastic ; Lentisque (Français), Derw (Afrique du nord) et Lentisco (Espagnol) (Seidemann, 2005).

En Algérie, le genre *Pistacia* est représenté par quatre espèces, en l'occurrence *Pistacia lentiscus* L, *Pistacia terebinthus* L, *Pistacia vera* L et *Pistacia atlantica* (More et White, 2005).

### III.1. Classification systématique et description botanique

#### III.1.1. Classification taxonomique

*Pistacia lentiscus* L., est une espèce appartenant à la famille des Anacardiaceae (syn. Pistaciaceae). Les espèces les plus importantes dans le monde du genre *Pistacia* sont :

- *Pistacia atlantica*
- *Pistacia chinensis*
- *Pistacia lentiscus* L.
- *Pistacia terebinthus* L.
- *Pistacia vera* L.
- *Pistacia integerrima*
- *Pistacia palestina*
- *Pistacia khinjuk*

Parmi les espèces du genre *Pistacia*, le *Pistacia lentiscus* L. est un arbrisseau très commun en Algérie (Mitchell, 1986) et sa taxonomie est comme suite :

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Tracheobionta</i>
Super-division	<i>Spermatophyta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Sapindales</i>
Famille	<i>Anacardiaceae</i>
Genre	<i>Pistacia</i>
Espèce	<i>Pistacia lentiscus</i> L.

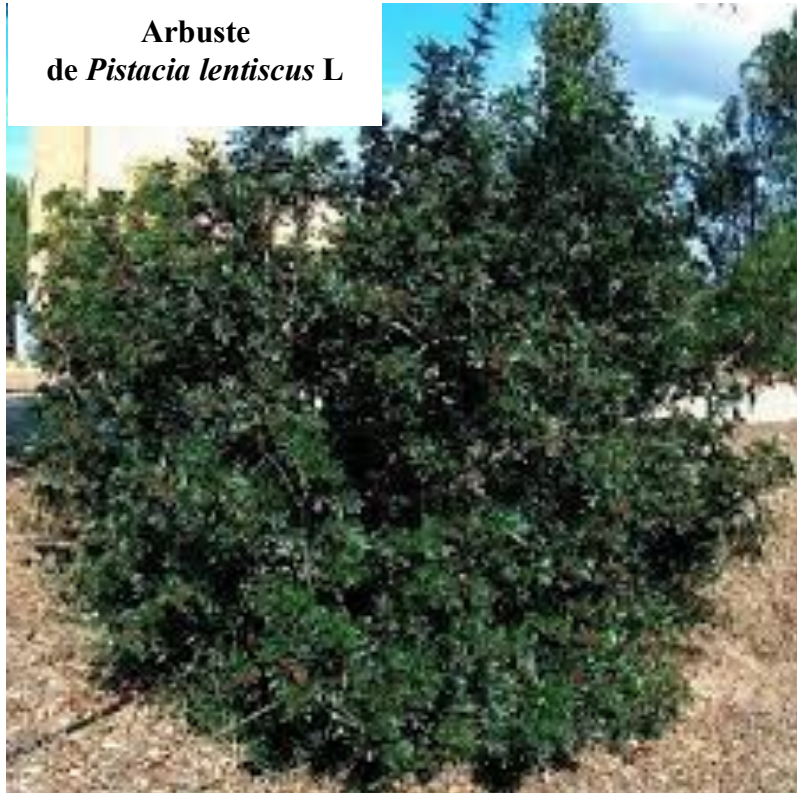




### III.1.2. Description botanique

Le lentisque est un arbrisseau dioïque thermophile de 1 à 3 mètres de hauteur, à odeur résineuse forte et à écorce lisse et grise ; les feuilles persistantes, composées, alternées pourvues d'un pétiole ailé, paripennées de 4 à 10 petites folioles elliptiques-obtuses, coriaces, luisantes en dessus, mates et pâles en dessous. Les fleurs en grappes spiciformes denses, naissant 1 ou 2 à l'aisselle d'une feuille et égalant au plus la longueur d'une foliole. Le fruit petit, subglobuleux, apiculé, rouge, puis noir à la maturité (fig. 16) (Tison et De Foucault, 2014).

Arbuste  
de *Pistacia lentiscus* L



Résine  
(gomme)



Fleurs



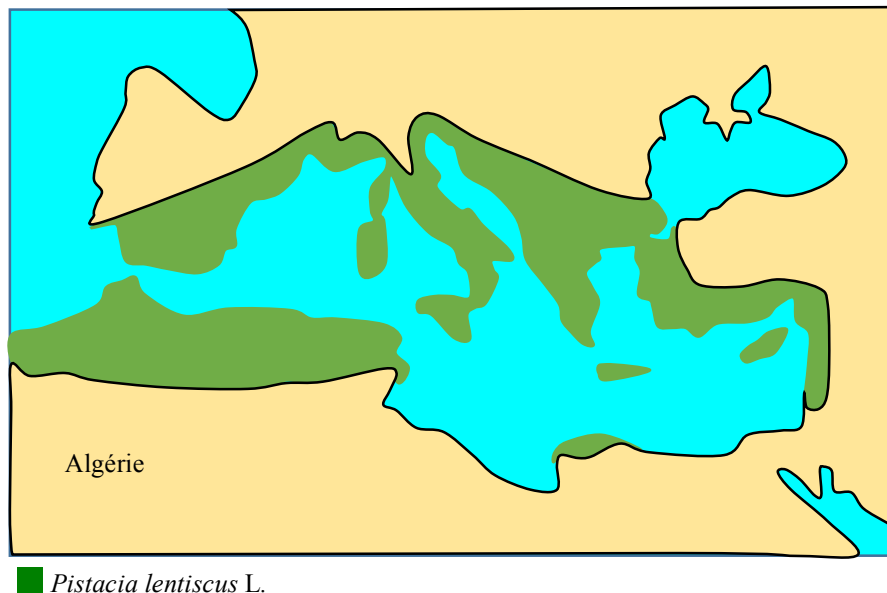
Fruits

**Figure. 16.** Description botanique de *Pistacia lentiscus* L. (More et White, 2005).



Le pistachier lentisque est très commun dans le bassin méditerranéen (fig. 17), il se trouve à l'état sauvage, dans les maquis et les garrigues dans tous types de sols, bien qu'il préfère les terrains siliceux.

En Algérie, le lentisque se trouve dans les zones forestières sur le long du nord algérien (More et White, 2005).



**Figure. 17.** Aire de répartition de *Pistacia lentiscus* L. autour du bassin méditerranéen (Seigue, 1985).

Une étude portant sur la variabilité naturelle de *Pistacia lentiscus* L. du bassin méditerranéen utilisant une analyse par RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), combinée à des examens chimiques et morphologiques, conclue à l'existence d'une grande variabilité génotypique de cette espèce (Barazani *et al.*, 2003).

### III.2. Produits et dérivés à base de *Pistacia lentiscus* L.

D'après Seigue (1985), les principaux produits dérivés du *Pistacia lentiscus* L. et leur utilisation sont décrites :

- **Bois** : pour sa robustesse et la finesse de sa texture, le bois de cette espèce est très apprécié en ébénisterie.
- **Résine** : Les branches et le tronc exsudent naturellement ou par incision une résine jaune claire fortement aromatique, qui durcit au contact de l'air. Elle appelée mastic ou gomme mastic d'où son nom commun d'arbre à mastic, généralement la production est d'environ 4 à 5 kg par





arbuste. Cette résine est produite à grande échelle dans des vastes plantations dans la région d'Emporio et Mesta (Chios-Grèce), qui est d'ailleurs appelée "mastichochoia" qui se traduit par villages à mastic, d'où le nom commercial répandu de « Mastic de Chio ». Ce dernier entrait dans la confection d'eau-de-vie et de liqueurs, aromatisées certaines confitures, confectionner des pâtes ou des gommes à mâcher. Aujourd'hui encore le mastic est employé dans l'industrie agro-alimentaire évidemment comme agent masticatoire, dans l'industrie photographique et dans les soins dentaires (dans les amalgames).

Depuis la plus haute antiquité le mastic de Chio était réputé dans toute la méditerranée orientale pour traiter les affections pulmonaires (Van den Berg *et al.*, 1998).

- **Essence de mastic** : est récupérée après distillation. Cette essence entre dans la confection de parfums, produits cosmétologiques et pharmaceutiques, de vernis de grande qualité recherché par les peintres œuvrant à la peinture à l'huile et aussi dans l'industrie photographique (Romani *et al.*, 2002).

- **Huile de lentisque** : est extraite du fruit comestible, autrefois était couramment utilisée pour l'alimentation, l'éclairage et elle entrait aussi dans la confection de savons (Luigia *et al.*, 2007). L'huile est produite à l'Est de l'Algérie, dans les zones notamment côtière (El Milia, Skikda), où l'espèce abonde. Un procédé traditionnel est utilisé à cet effet. Les baies prennent alors une coloration noire au lieu du rouge. Les baies sont récoltées à la main, macérées dans de l'eau chaude et puis écrasées à l'aide d'une presse. Des baies, s'exultent un liquide épais de couleur jaune verte et l'huile est récupérée par décantation.

- **Essence des feuilles et rameaux** : l'huile essentielle est extraite de ces parties, est utilisée en aromathérapie et phytothérapie pour ses propriétés décongestionnantes, prescrite aussi pour traiter les problèmes veineux dont les hémorroïdes (Romani *et al.*, 2002).

### III.3. Etude chimique de l'espèce *Pistacia lentiscus* L.

#### III.3.1. Le mastic de *Pistacia lentiscus* L.

Des analyses chimiques réalisées sur le mastic de *Pistacia lentiscus* L. ont montré la présence d'un polymère le cis-1,4-poly- $\beta$ -myrcène (Van den Berg *et al.*, 1998). Le mastic contient également une petite fraction (environ 2%) d'huile essentielle, dont certain nombre de constituants de triterpénoïde de gomme mastic ont été identifiés (Papageorgiou *et al.*, 1997).





### III.3.2. Le fruit de *Pistacia lentiscus* L.

Une étude phytochimique réalisée sur les baies de *Pistacia lentiscus* L. a permis d'identifier trois anthocyanes appelés cyanidine 3-O-glucoside, delphinidine 3-O-glucoside et cyanidine 3-O-arabinoside qui ont été déterminées par HPLC–DAD–MS (Charef *et al.*, 2008).

### III.3.3. Les feuilles de *Pistacia lentiscus* L.

La séparation des polyphénols a été effectuée sur les feuilles de *Pistacia lentiscus* L. par l'utilisation des méthodes HPLC semi-préparatives, HPLC avec détecteur photomètre UVVIS à barrette de diodes (PDA) ainsi que par analyse HPLC-SM et RMN (Romani *et al.*, 2002).

Trois grandes classes de métabolites secondaires ont été détectées :

- Acide gallique et dérivés galloyls;
- Anthocyanes, à savoir delphinidine 3-O-glucoside et cyanidine 3-O-glucoside ;
- Glycosides de flavonol comme les glucosides de quercétine et de myricétine.

### III.3.4. Les huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L.

L'étude bibliographique sur *Pistacia lentiscus* L. a montré la richesse en monoterpènes et les sesquiterpènes.

L'étude réalisée par Barazani *et al.* (2003) sur l'extrait T-butyl méthyl éther d'huile de feuilles de *Pistacia lentiscus* L. a montré la présence de 12 monoterpènes, 7 sesquiterpènes et un seul monoterpène linéaire. Les  $\alpha$ -pinène, sabinène, limonène, caryophyllène et germacrène D, ces constituants majoritaires sont identifiés par la méthode GC-MS.

Une étude phytochimique réalisé par Kivçak et Akay (2005) sur l'huile des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. a permis d'identifier quantitativement l' $\alpha$ -tocophérol par l'utilisation de la méthode TLC-DC. Le travail de Castola *et al.* (2000) effectué sur 105 échantillons des huiles essentielles des feuilles de *Pistacia lentiscus* L. de Corse, révèle la présence des constituants majoritaires comme ; myrcène, Limonène, terpinène-4-ol,  $\alpha$ -pinène,  $\alpha$ -phellandrène, ont été détectés par  $^{13}\text{C}$  RMN et GC.

L'étude physico-chimique (GC et GC-MS) réalisée par Duru *et al.* (2003) indique que la présence de  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène, limonène, terpinène-4-ol et  $\alpha$ -terpinéol comme constituants majoritaires des huiles essentielles des feuilles de *Pistacia lentiscus* L., de *Pistacia atherbintus* et de *Pistacia vera* L. Daferara *et al.* (2002) ont identifié les composés  $\alpha$ -pinène et myrcène dans les huiles essentielles de mastic. Derwich *et al.* (2010) ont déterminé la composition



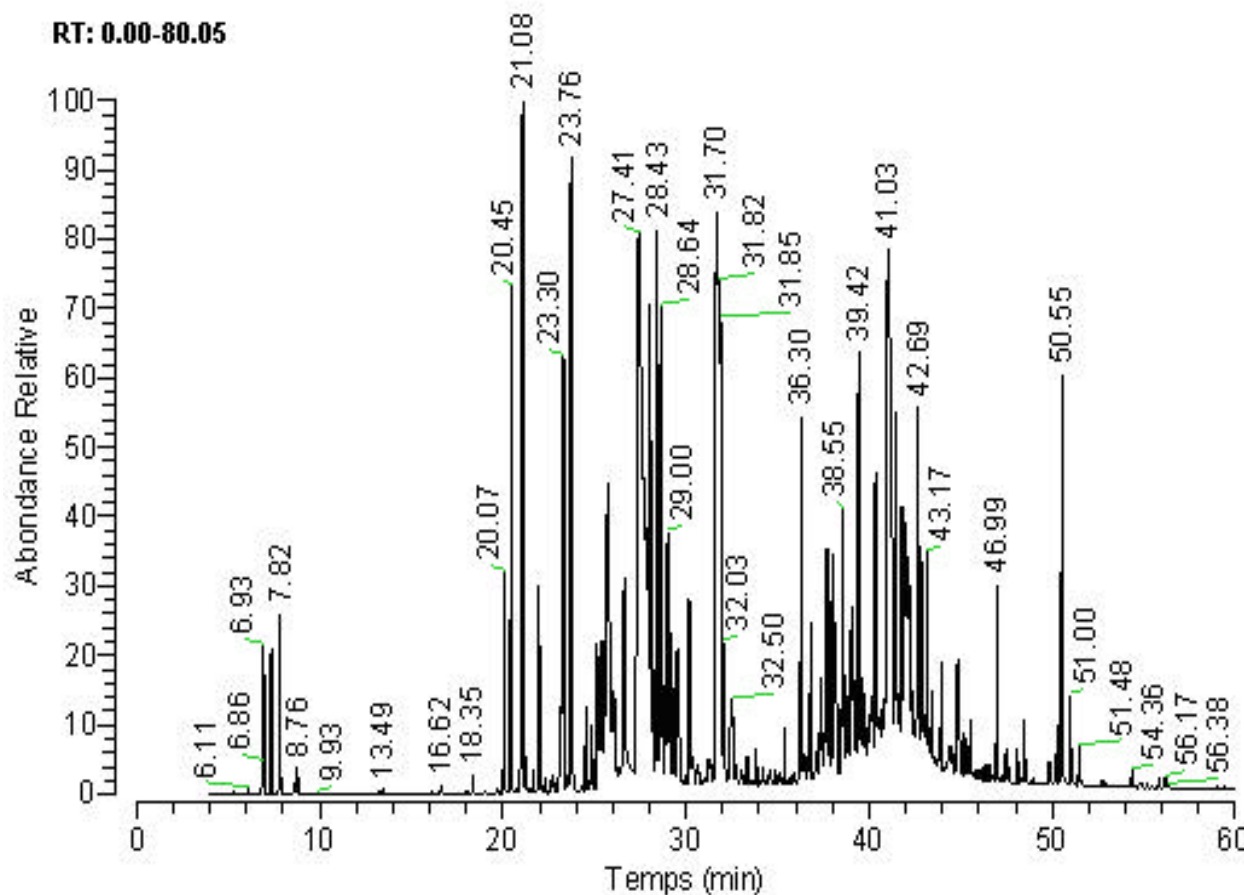


chimique des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L. du Maroc (tableau 2, fig. 18) obtenue par GC-MS.

**Tableau. 2.** Composition chimique des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L. du Maroc obtenue par GC-MS (Derwich *et al.*, 2010).

Pic	Composés	%	TR (min)	IK
1	Isoledène	0.07	6.93	1419
2	3-carene	0.98	7.82	1005
3	Cymène	0.01	8.76	1042
4	$\alpha$ -phellandrène	1.15	20.07	964
5	Verbenol	3.05	20.45	1122
6	$\alpha$ -pinène	24.25	21.08	928
7	Linalool	2.85	23.30	1082
8	$\beta$ -pinène	12.58	23.76	966
9	p-cumen-8-ol	0.08	24.50	1042
10	Terpinolène	0.02	26.45	1052
11	Limonène	7.56	27.41	1018
12	Terpinène-4-ol	6.98	28.43	1137
13	$\beta$ -caryophyllène	3.15	28.64	1494
14	Cis-ocimène	0.35	29.00	976
15	$\beta$ -famésène	0.07	29.25	1458
16	$\alpha$ -terpineol	4.89	31.70	1174
17	$\gamma$ -terpinène	4.45	31.82	998
18	Camphre	0.12	32.03	943
19	Borneol	0.10	32.50	1138
20	Spathulenol	0.05	34.08	1536
21	Camphène	2.32	36.30	949
22	Myrcène	2.09	42.69	948
23	Globulol	0.05	44.11	1530
Total des composés identifiés		77.22		
Rendement %		1.02		
TR : Temps de rétention obtenu par chromatogramme				
IK : Indice de Kovats a été déterminé par GC-FID sur la colonne HP-5MS.				
Les ions moléculaires et les ions du fragment principal ont été déterminés par spectrométrie de masse.				

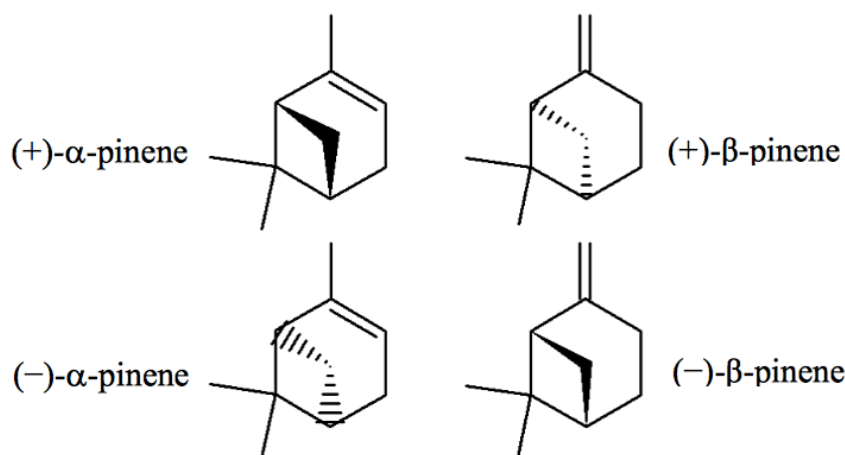




**Figure. 18.** Chromatogramme des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L. du Maroc (Derwich *et al.*, 2010).

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L. du Maroc (Derwich *et al.*, 2010) par GC-MS, montre que les vingt-trois constituants représentent environ 77.22% du total des huiles essentielles. Le  $\alpha$ -pinène (24.25%) et la  $\beta$ -pinène (12.58%), sont les principaux composés (fig. 19), tandis que le limonène (7.56%), le terpinène-4-ol (6,98%), le  $\alpha$ -terpinéol (4.89%), le caryophyllène (3,15%), le verbénol (3,05%), le linalol (2,85%), le camphène (2,32%) et le myrcène (2,09%), sont également présents à des pourcentages relativement élevés.





**Figure. 19.** Formules structurales des énantiomères  $\alpha$ -pinène et  $\beta$ -pinène (Rivas da Silva *et al.*, 2012).

### III.3.5. Aspects pharmacologiques et effets thérapeutiques de *Pistacia lentiscus* L.

La partie aérienne de *Pistacia lentiscus* L. est largement utilisée en médecine traditionnelle dans le traitement de l'hypertension artérielle (Scherrer *et al.*, 2005).

Les feuilles sont pourvues d'action anti-inflammatoire, antibactérienne, antifongique, antipyrétique, astringente, hépatoprotective, expectorante et stimulante (Kordali *et al.*, 2003).

La résine obtenue de *Pistacia lentiscus* L. est connue par son effet analgésique, antibactérien, antifongique, antioxydant, antithrombotique, expectorant, stimulant, diurétique et spasmolytique, par conséquent cliniquement, le mastic est souvent cité comme un remède efficace contre certaines maladies telles que l'asthme, diarrhée, infections bactériennes, ulcères gastro-duodénaux et comme un agent antiseptique du système respiratoire (Marone *et al.*, 2001).

La résine de *Pistacia lentiscus* L. a été traditionnellement considérée comme un agent anticancéreux, en particulier contre les tumeurs du sein, du foie, de l'estomac, de la rate, et de l'utérus (Assimipoulou et Papageorgiou, 2005). Ces croyances traditionnelles sont en accord avec de récentes études montrant que le mastic de Chios induit l'apoptose (Balan *et al.*, 2005) et dispose d'action anti-prolifératrice contre les cellules cancéreuses du côlon (Balan *et al.*, 2007).

L'huile essentielle de lentisque est connue pour ses vertus thérapeutiques en ce qui concerne les problèmes lymphatiques et circulatoires. Des travaux sur les huiles essentielles de



*Pistacia lentiscus* L. révèlent la présence de certaines activités antalgiques, antioxydantes, anti-inflammatoires, et antimicrobiennes (Giner-Larza *et al.*, 2000).

Les études expérimentales effectuées sur cette plante ont mis en évidence différentes activités biologiques et pharmacologiques ; activité anti-ulcéreuse, en médecine traditionnelle, la résine de pistachier lentisque est utilisée afin de combattre les ulcères d'estomac. Son efficacité contre la bactérie *Helicobacter pylori* a en effet été confirmée. Cette méthode consiste à éliminer la bactérie *Helicobacter pylori* par mastication de la résine du pistachier lentisque, comme une gomme à odeur prononcée (Al-Said *et al.*, 1986).

Les huiles essentielles procèdent aussi des effets antibactériens (Iauk *et al.*, 1996), antifongiques (Ali-Shtayeh et Abu Ghdeib, 1999) et hepatoprotecteurs (Janakat et Al-Merie, 2002).

### III.3.6. Données toxicologiques de *Pistacia lentiscus* L.

*Pistacia lentiscus* L., est potentiellement important grâce à ses atouts en termes de biomasse, d'abondance sur le terrain, de richesse en métabolites secondaires (tanins, flavonoïdes, stérols, triterpènes, et saponosides), d'effets antibactériens et de faible toxicité en rapport avec l'absence totale des hétérosides cyanogénétiques, qui diminue fortement les risques toxicologiques liés à l'usage de *Pistacia lentiscus* L. (Bammou *et al.*, 2015).





**Partie**  
**Expérimentale**

# Chapitre IV

---



**Matériel  
et  
méthodes**



## IV.1. Objectif du travail

Le développement de la résistance chez des bactéries responsables des infections communautaires et l'apparition de bactéries multi-résistantes sont un sujet d'inquiétude majeur pour les instances sanitaires. L'écosystème bactérien digestif est le plus exposé à l'antibiothérapie humaine. Pour être innovants et contourner les mécanismes de résistance bactériens, les antibiotiques de demain devront viser de nouvelles « cibles » d'action chez les bactéries. Les pistes de recherche sont nombreuses mais l'exploration des ressources naturelles apparaît comme des plus prometteuses car celles-ci constituent, de par leur biodiversité, la plus grande réserve de substances actives (Guinoiseau, 2010). Donc il convient d'évaluer scientifiquement, l'activité antimicrobienne de *Pistacia lentiscus* L.

## IV.2. Isolement et identification des bactéries de la microflore digestive humaine

### IV.2.1. Choix et origines des bactéries testées

Les tests antibactériens ont été effectués sur des bactéries cliniques relativement résistantes aux antibiotiques, qui ont été isolées d'un produit biologique (les selles de 20 patients hospitalisés) au laboratoire des analyses médicales de l'Hôpital de Ain Tedeles (Mostaganem). Il s'agit de souches suivantes : *E. coli*, *Morganella morganii*, *Enterobacter cancerogenus*, *Serratia fonticola*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis*, *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus*.

*Helicobacter pylori*, a été isolée à partir d'une biopsie gastrique au niveau du laboratoire des Entérobactéries et autres bactéries apparentées de l'Institut Pasteur d'Algérie (Alger).

### IV.2.2. Isolement

La culture de *Helicobacter pylori* (*Hp*), c'est la méthode de diagnostic la plus spécifique, qui reste la référence pour affirmer sa présence (Lamarque *et al*, 2012). Son principal avantage est de tester la sensibilité de *Hp* aux différents antibiotiques à l'aide d'un antibiogramme, notamment en cas de résistance à un traitement d'éradication. Cette technique est coûteuse et peu diffusée, réservée à des équipes spécialisées.

*Hp* est une bactérie exigeante sur le plan métabolique. Les milieux de cultures sont constitués d'une base gélosée (milieu *Brucella*, Cœur-cervelle, Columbia, Wilkins-Chalgren ou Mueller-Hinton, voir annexes) additionnée de 10% de sang de cheval, de mouton ou humain (Denis *et al.*, 2011).

Dans cette étude, la culture a été réalisée en deux phases ; la primoculture et la subculture





(fig. 20). Une biopsie gastrique dilacérée à l'aide d'un disperseur jetable, composé d'un appareil avec un entraînement (non jetable) et un mouvement 3D ou orbital, d'un récipient à échantillon dans lequel est introduit directement le mécanisme de broyage : des billes en verre, en acier ou en zirconium. Le récipient et les billes forment un ensemble conçu comme un produit jetable.

La suspension estensemencée sur gélose Columbia additionnée de 10% de sang de cheval et du mélange de Dent à la cefsulodine (voir annexes) pour inhiber la croissance des contaminants occasionnels (flore buccale surtout). Les boîtes sont incubées en conditions de microaérophilie (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> et 85% N<sub>2</sub>). Cette pression réduite en oxygène, peut être obtenue dans des enceintes closes (Jarres) avec des générateurs de gaz (GENbag microaer) de CO<sub>2</sub> ou de CO<sub>2</sub> et de H<sub>2</sub> (Annexes).

La température optimale de la culture est de 37°C. En primoculture, les boîtes doivent être incubées pendant 12 jours, et examinées quotidiennement à partir du 3<sup>ème</sup> jour. Certaines cultures dégénèrent rapidement, il convient donc de démarrer les subcultures dès que les colonies sont visibles (2 à 4 jours). Dans le cas de cultures pauvres, une subculture peut être tentée sur une petite surface de gélose (culture en Spot). On peut également réétaler les colonies dans une autre zone du même milieu, à condition qu'il ne contienne aucun contaminant (Degnan *et al.*, 2003).



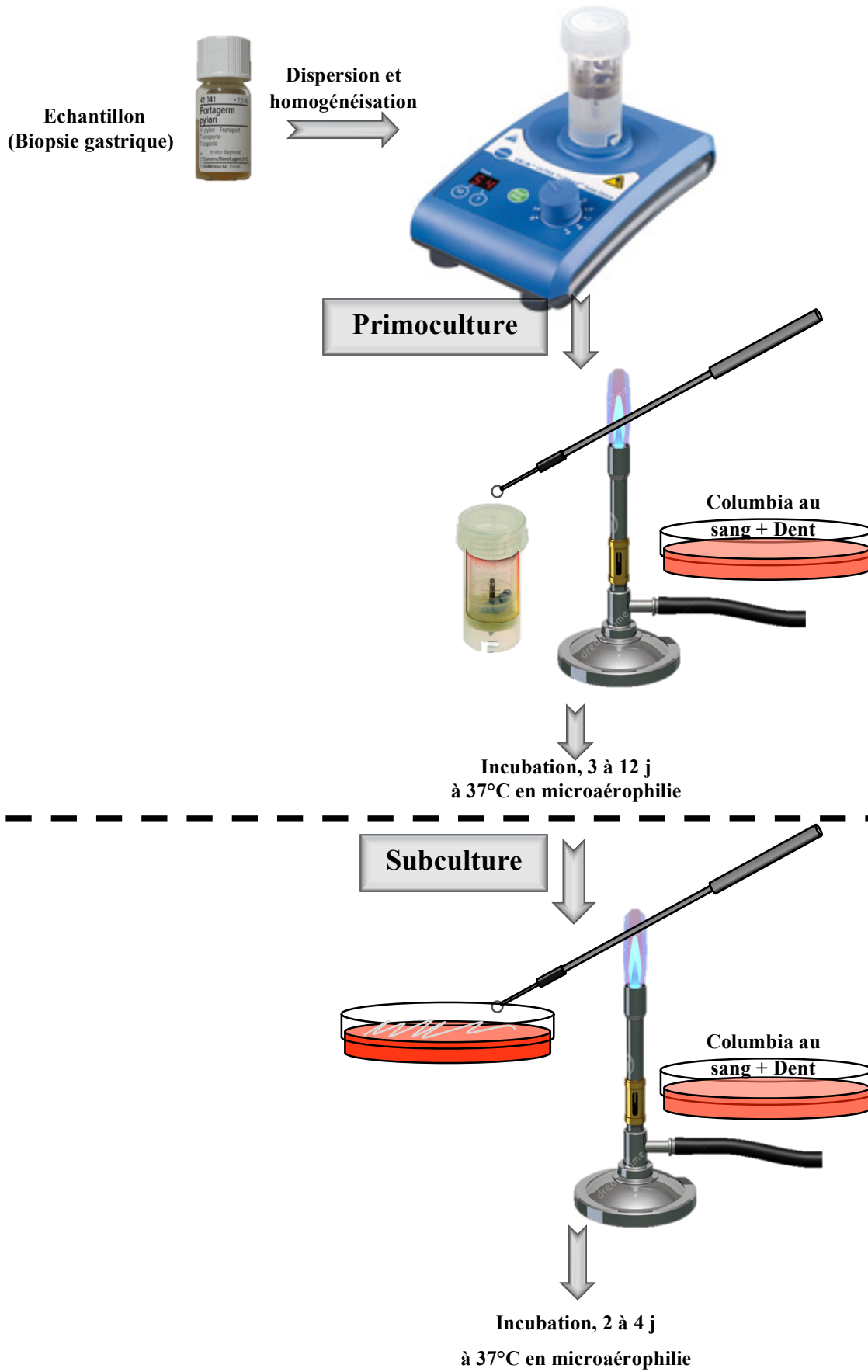


Figure. 20. Schéma d'isolement de *Helicobacter pylori* en primoculture et subculture.



Pour les autres bactéries, les coprocultures sont habituellement réalisées sur selles liquides, molles ou hémorragiques. Les selles doivent êtreensemencées dans les 2 heures suivant leur collection, ou à défaut être conservées à 4 °C pendant 12 heures au maximum. Il est souhaitable de réaliser le prélèvement pour coproculture standard avant le début de toute antibiothérapie, celle-ci pouvant inhiber rapidement la croissance des germes (Rohner *et al.*, 1997). En général, la prescription d'une seule coproculture est suffisante pour le diagnostic des bactéries entéro-pathogènes. En cas de négativité de l'analyse et de persistance des signes cliniques, une deuxième recherche améliore sensiblement le diagnostic pour ces espèces (Liesenfeld *et al.*, 1995 ; Manabe *et al.*, 1995).

Chez les malades hospitalisés dans des services à risques (réanimation ou oncohématologie), on peut être amené à rechercher dans leurs selles des bactéries multi-résistantes telles : Entérocoques résistants à la vancomycine, staphylocoques résistants à la méthicilline (SARM) et entérobactéries productrices de bêta-lactamase (BLSE).

L'ensemencement des milieux de cultures est réalisé afin de déterminer les germes dans les selles. Des milieux de culture sontensemencés par la méthode des quadrants (fig. 21), sous hotte, à partir d'une suspension réalisée avec une noix de selles dans 3 ml d'eau physiologique stérile. La lecture se fait après 24 heures d'incubation en aérobose dans une étuve à 37°C. Pour cela, on utilise plusieurs types de milieux de culture afin d'orienter le diagnostic.

La gélose BCP (Pourpre de Bromocrésol, voir annexes) est un milieu non sélectif et non enrichi. Les bactéries utilisant le lactose comme source d'énergie produisent de l'acide, ce qui entraîne une acidification du milieu, les bactéries sont alors « lactose + ». Par contre, si les bactéries n'utilisent pas le lactose du milieu, il n'y a pas d'acidification de celui-ci, il reste pourpre ; ces bactéries sont donc « lactose - ». Ce critère est important dans l'identification de certaines entérobactéries à l'exemple de *Shigella* et *Salmonella*.

La gélose Hektoen (voir annexes) est un milieu de culture servant à isoler les genres *Shigella*, *Salmonella* et *Yersinia*. Elle inhibe la croissance des bactéries Gram + et des entérobactéries commensales ou saprophytes. Ceci est dû à la forte concentration du milieu en sels biliaires et en vert brillant. La lecture après incubation consiste à repérer les colonies suspectes de couleur bleues-vertes (dues à l'indicateur de pH). Ceux qui n'ont pas utilisé les trois composés du milieu (lactose, glucose et salicine) et donc n'ont pas acidifié le milieu, avec ou sans centre noir (production de sulfure de fer, noir due à la réduction du thiosulfate en sulfure



d'hydrogène, H<sub>2</sub>S). D'autre part, les colonies de couleur saumon avec ou sans centre noir sont non suspectes puisqu'il peut s'agir de bactéries commensales de la flore intestinale comme *Escherichia coli*, ou les genres *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, etc.

De même, on ensemence une gélose MSA2 (Mannitol-Salt-Agar, voir annexes), également appelée Chapman, afin de prévenir des toxi-Infections alimentaires collectives (TIAC) dues, entre autres, à *Staphylococcus aureus*. Ces infections se transmettent par voie inter-humaine directe ou indirecte (eau ou aliments souillés). La gélose Chapman contient une forte concentration en sel, d'où l'isolement des bactéries halophiles telles *Staphylococcus*, et du mannitol qui induit la forte suspicion de *Staphylococcus aureus*. En effet, le changement de la couleur de l'indicateur coloré (rouge de phénol) du rouge au jaune, est due à l'acidification du milieu et donc les colonies jaunes doivent être confirmées comme *Staphylococcus aureus*.

Un bouillon sélénite est ensemencé directement avec une noix de selles. Il est utilisé pour l'enrichissement sélectif des salmonelles. En effet, la teneur en sélénite (ion) provoque l'inhibition des microorganismes autres que les *Salmonelles*. Après 24 heures d'incubation à 37°C, une goutte de ce bouillon est repiquée sur une gélose SS (*Salmonella Shigella*, voir annexes). La lecture se fait 24 heures après incubation à 37°C. Le milieu chromogénique (ASAP) permettant aussi la détection du genre *Salmonella* (colonies roses-violettes) grâce à son activité enzymatique C8-estérase, contrairement au *Citrobacter* (colonies bleues).



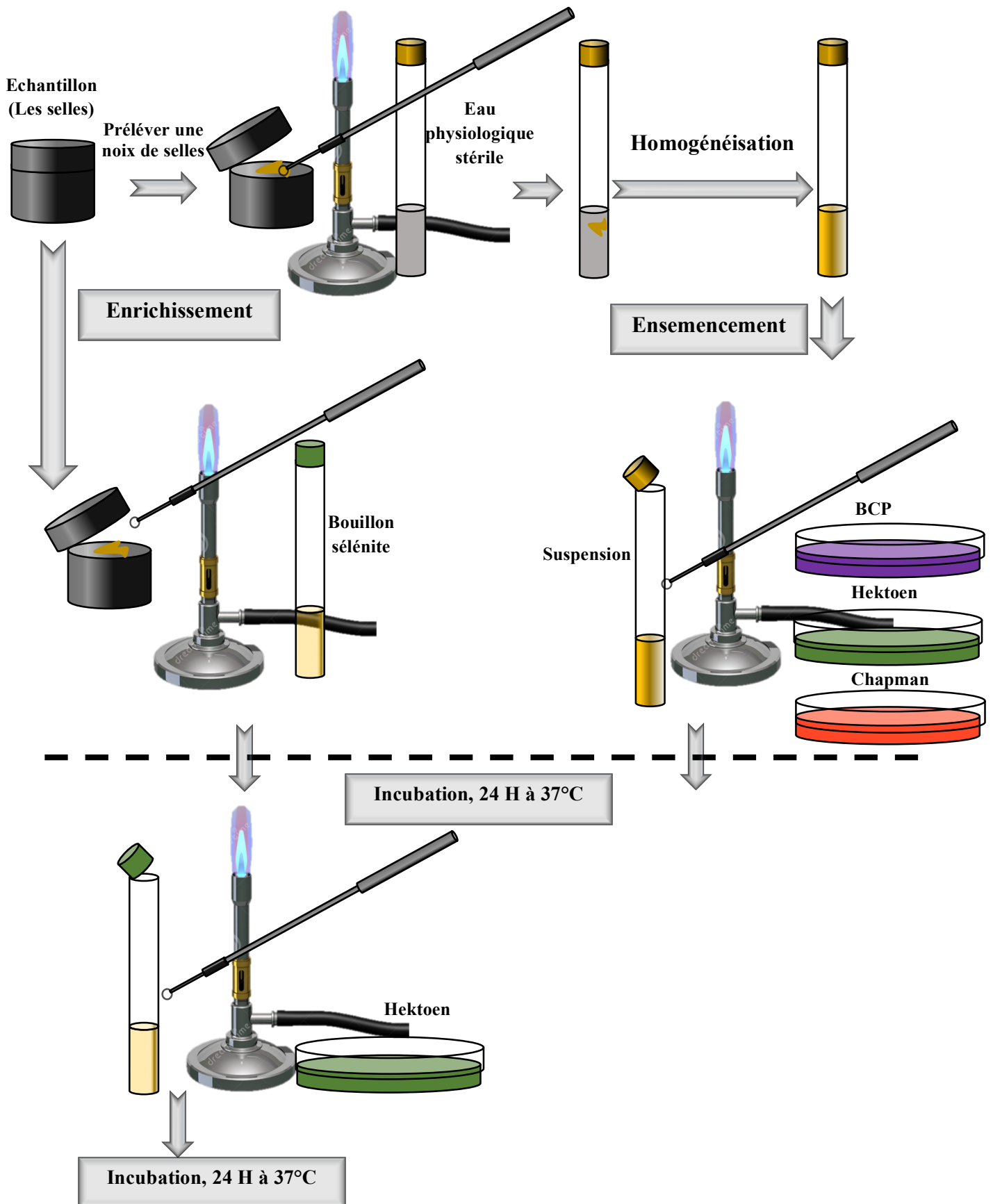


Figure. 21. Schéma d'isolement des bactéries de la microflore digestive à partir des selles (coproculture)



### IV.2.3. Identification

#### IV.2.3.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique consiste à étudier l'aspect des colonies. Une colonie est l'amas, visible à l'œil nu, constitué par des milliards de descendants d'une seule cellule bactérienne et dont la taille, la forme, la couleur, la consistance parfois caractéristiques de chaque espèce.

L'étude de l'aspect des colonies nécessite une observation à l'œil nu, en lumière naturelle ou artificielle.

#### IV.2.3.2. Examen microscopique

L'observation microscopique, permet d'étudier l'aspect morphologique des cellules d'une espèce microbienne. Elle comprend l'examen à l'état frais (examen entre lame et lamelle des bactéries vivantes) et l'examen après coloration, le plus souvent sur frottis séchés et fixés (coloration de Gram, voir annexes).

#### IV.2.3.3. Tests biochimiques

Un milieu de TSI (Triple Sugar Iron), des tests d'uréase, de catalase, d'oxydase, de coagulase (voir annexes) et des galeries d'identification biochimiques de type API (Application Programming Interface) ; API 20E, API 20NE, API 20 STREP, API STAPH et API CAMPY, voir annexes), sont nécessaires pour déterminer le genre et l'espèce.

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

Enfin, à partir de la suspension précédente, une gélose nutritive inclinée estensemencée puis incubée pour permettre la conservation des bactéries identifiées à 4°C à l'exception de *Hp*, qui est conservée en bouillon BHIB (Brain Heart Infusion broth, voir annexes) au glycérol à -80 °C (Megraud, 1996).

#### IV.2.3.4. Calcul du profil numérique

Sur la fiche des résultats, les tests sont séparés par groupe de trois (chaque groupe de trois tests est numéroté 1, 2 et 4 et séparé du groupe voisin par un trait vertical). Chaque test donnant une réaction négative prend la valeur 0 (voir annexes).





Pour chaque groupe de trois, additionner uniquement les chiffres positifs. On obtient un nombre à sept chiffres qui constitue le profil numérique de la souche étudiée (Leyral et Joffin, 1998).

### IV.3. Antibiogramme

L'antibiogramme est réalisé selon la méthode de diffusion en milieu gélosé et permet la détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

A partir d'une culture jeune de 18 à 24 heures, une suspension bactérienne est préparée et bien homogénéisée par la suite. L'opacité doit être équivalente à 0,5 McF (McFarland), soit une D.O de 0,08 à 0,10 lue à une longueur d'onde de 625 nm, et 3 McF pour *Hp*, par utilisation d'un densitomètre (fig. 22).



**Figure 22.** Ajustement de la turbidité de la suspension bactérienne de *Hp* à 3 McF à l'aide d'un densitomètre

L'ensemencement des boîtes de pétri contenant le milieu MH (Mueller Hinton, voir annexes) et le milieu MH au sang (additionné de 10% de sang de cheval) par écouvillonnage puis laisser sécher 10 à 15 min à la température ambiante (Denis *et al.*, 2011).

Il a été Procède ensuite à l'application des disques d'antibiotiques correspondants (tableau 3), 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 (2015) (Ammari *et al.*, 2011 ; Jehl *et al.*, 2015). L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures.

**Lecture :** Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse (XCSOURCE, jauge de précision électronique 100 mm-0,1 mm, 4 pouces-0,01 micromètre MA488, voir annexes). Pour les bactéries testées sur milieu MH, la détermination des diamètres d'inhibition est réalisée sur le fond de la boîte de Pétri fermée. En ce qui concerne les bactéries testées sur MH au sang, les mesures de diamètres des zones d'inhibition sont plutôt déterminées lorsque les boîtes seront ouvertes et bien éclairées (Tepe *et al.*, 2004).

Les résultats obtenus sont comparés aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes, ce qui permet de classer la bactérie dans l'une des catégories ; sensible (S), résistante (R) ou intermédiaire (I).



**Tableau. 3.** Antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme  
(Ammari *et al.*, 2011 ; Jehl *et al.*, 2015)

Famille	Antibiotique	Abréviation	Charge de disque en µg
<b>Pinicillines</b>	Ampicilline	AM	10
	Amoxicilline	AML	25
	Oxaciline	OX	1
	Ticarcylène	TI	75
<b>Cephalosporines</b>	Cefoxitine	FOX	30
	Cefotaxime	CTX	30
	Ceftazidime	CAZ	30
<b>Aminosides</b>	Amikacine	AK	30
	Gentamycine	CN	15
	Kanamycine	K	30
	Neomycine	NEO	30
	Tobramycine	TMN	10
<b>Phénicolés</b>	Chloramphenicol	C	30
<b>Tetracyclines</b>	Doxycycline	DO	30
	Tétracycline	TE	30
<b>Macrolides</b>	Clindamycine	CD	2
	Erythromycine	E	15
	Pristinamycine	RP	15
	Spiramycine	SP	100
	Clarithromycine	CLR	15
<b>Polypeptides</b>	Colistine	COL	10
<b>Sulfamides et associés</b>	Triméthoprime	TMP	5
	Sulfaméthoxazole-Triméthoprime	SXT	25
<b>Quinolones</b>	Ciprofloxacine	CIP	5
	Acide nalidixique	NA	30
	Acide pipédimique	PI	20
	Ofloxacine	OFX	5
<b>DIVERS</b>	Rifampicine	RA	5
	Acide fusidique	FA	10
	Fosfomycine	FF	50
	Vancomycine	VA	30
	Metronidazole	MTR	4



#### IV.4. Activité Antimicrobienne des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L.

##### IV.4.1. Extraction, caractérisation et identification des HEs de *Pistacia lentiscus* L.

###### IV.4.1.1. Matériel végétal

Les échantillons des parties aériennes (feuilles et rameaux) de *Pistacia lentiscus* L. (fig. 23) ont été récoltés en mars 2016 dans la région de Hassi Mameche (Mostaganem) située à 35 ° 55'52 "N, 0 ° 05'21" E, à une altitude de 85 m et avec une superficie de 2269 km<sup>2</sup> (voir annexes). Dans cette région caractérisée par un climat méditerranéen, les populations de *Pistacia* sont relativement abondantes. Les températures annuelles moyennes et les précipitations totales sont de 17,9 ° C et 347 mm (obtenues à partir de [www.fr.climate-data.org](http://www.fr.climate-data.org)).



**Figure. 23.** *Pistacia lentiscus* L. de Mostaganem, Algérie.



#### IV.4.1.2. Extraction des HEs de *Pistacia lentiscus* L. par hydrodistillation

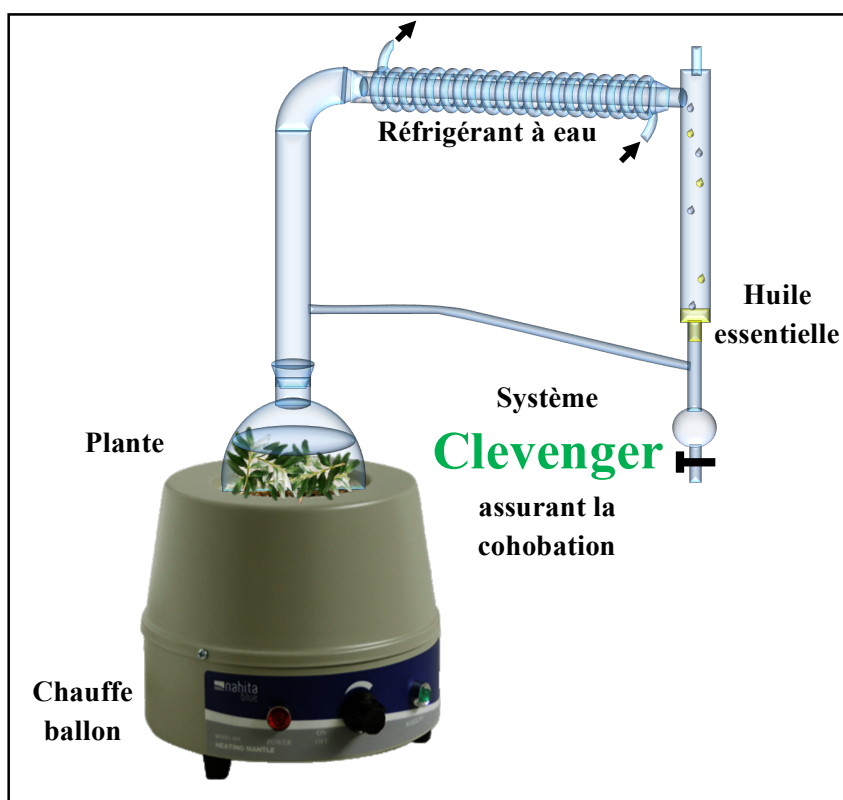
Les feuilles et rameaux ont été nettoyés et débarrassés de tous éléments étrangers, placés dans des sacs et transportés au laboratoire. Un échantillon de 250 g de matières fraîches de *Pistacia lentiscus* L. a été soumis à une hydrodistillation dans un appareil Clevenger (fig. 24) pendant 3 h avec 2000 ml d'eau distillée (Duru *et al.* 2003). L'huile essentielle obtenue a été séchée en utilisant le sulfate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Le rendement de l'huile a été calculé selon l'équation ci-dessous (Kusuma et Mahfud, 2017). L'huile essentielle a ensuite été conservée dans l'obscurité à 4°C (Gardeli *et al.*, 2008).

$$y = \frac{V}{W} \times 100$$

y : Le rendement en huile essentielle (% p/p),

V : Le poids de l'huile extraite (g),

W : Le poids des parties végétales fraîches (g).



**Figure. 24.** Schéma du montage d'hydrodistillation (Clevenger) (Mengal et Mompon, 1994).

Les huiles essentielles ont été utilisées pour réaliser la suite de l'étude (détermination de la composition chimique et l'activité antimicrobienne).



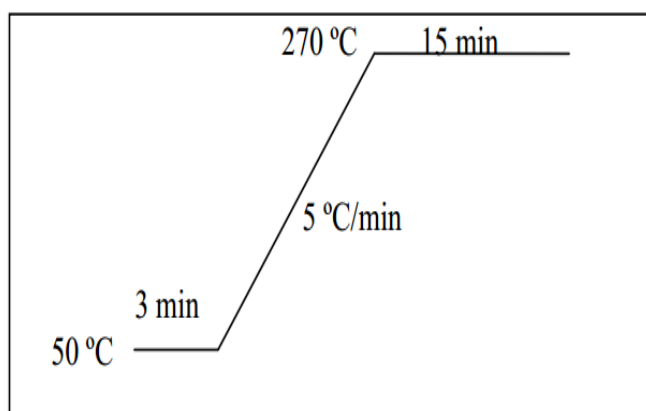
#### IV.4.1.3. Caractérisation et identification chimique des HEs de *Pistacia lentiscus* L.

L'analyse des huiles essentielles a été effectuée à l'aide d'un chromatographe shimadzu GC-2010 connecté à un spectromètre de masse MS-QP2010 SE (fig. 25) au niveau de l'Unité de Recherche de Chimie Organique et Macromoléculaire (URCOM), Université du Havre, France.

L'huile essentielle a d'abord été diluée à 1/100 (v/v) dans l'éthanol à 96°. La séparation des composés a été effectuée sur une colonne capillaire ZB-5MS (5% de phényle, 95% de diméthylsiloxane, 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm d'épaisseur de film). Le Helium (He) a été utilisé comme gaz porteur à un débit de 1 ml/min. Le volume d'injections était de 1 µl d'huile à base d'éthanol, injecté en mode fractionné (rapport de fuite : 1/50). La colonne a été programmée initialement à 50 °C pendant 3 min progressivement à 270°C avec une rampe de chauffage de 5 °C/min et maintenue par la suite pendant 15 min.

Le spectromètre de masse fonctionne en mode d'impact électronique avec une énergie d'ionisation de 70 eV, l'analyseur est effectué dans la plage de balayage de 35-300 m/z.

L'identification des différents constituants des huiles essentielles a été faite sur la base de leurs indices de rétention et de leurs spectres de masse par comparaison avec les données de la littérature et confirmation par l'Institut national des normes et de la technologie (NIST) V.2.0 Bibliothèque GC-MS (Babushok *et al.*, 2011).





**Figure. 25.** Chromatographe shimadzu GC-2010 connecté à un spectromètre de masse MS-QP2010 SE.

#### **IV.4.2. Activité antibactérienne de l'HE de *Pistacia lentiscus* L.**

L'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. a été criblée contre les bactéries relativement résistantes aux antibiotiques habituellement utilisés en thérapie, dont cinq à coloration de Gram-négative (*Helicobacter pylori*, *E. coli*, *Morganella morganii*, *Enterobacter cancerogenus* et *Serratia fonticola*) et deux à coloration de Gram-positive (*Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*).

##### **IV.4.2.1. Aromatogramme**

L'aromatogramme est un test de laboratoire qui permet aux phytothérapeutes d'analyser *in vitro* l'activité antibactérienne des huiles essentielles et de sélectionner plus précisément les huiles essentielles capables de supprimer ou de détruire les germes pathogènes (Damian et Damian, 1995). Différents types d'aromatogrammes sur milieu solides ou liquides, sont exploitables. Cependant, dans la pratique quotidienne, le milieu solide est le plus simple et le plus facilement reproductible (Pibiri, 2005).

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose (Hazzit *et al.*, 2009). On prépare des boîtes de pétri (90 mm) en versant 20 ml de de gélose Mueller Hinton (MH) et on laisse solidifier et sécher pendant 30 minutes. La densité des suspensions bactériennes a été ajustée par l'eau physiologique stérile en utilisant un



densitomètre pour atteindre la concentration finale de  $10^6$  UFC/ml (Mohapatra *et al.*, 2011).

Un volume de 0,1 ml de suspension d'inoculum standardisé ( $0,5 \text{ McF} \sim 10^6 \text{ UFC/ml}$ ) a été versé et étendu uniformément sur la gélose MH et laissé sécher pendant 5 min.

Pour préparer la solution mère d'échantillon (fig. 31), un volume d'huile essentielle pure a été dissous à 10% (v/v) dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma Aldrich-Química, S.A.).

Des disques de papier filtre stériles de 6 mm de diamètre (filtre LAB ANOIA, Barcelone, Espagne) ont ensuite été imprégnés avec 5  $\mu\text{l}$  d'huile essentielle à l'aide d'une micropipette et déposés sur les boîtes ensemencées. Les boîtes ont été laissées pendant 15 min à température ambiante pour permettre la diffusion de l'huile essentielle puis incubées à  $37^\circ\text{C}$  pendant 24 heures. Un contrôle négatif a été effectué par dépôt de 5  $\mu\text{l}$  de DMSO (voir annexes) sur des disques déposés sur un milieu préalablement inoculé de la bactérie testée. Chaque essai a été réalisé en trois répétitions.

Au laboratoire, la croissance de *Helicobacter pylori* est difficile et peut être obtenue en utilisant des milieux complexes contenant du sérum, du sang ou des dérivés sanguins (Olivieri *et al.*, 1993). Pour le test antibactérien contre *Hp*, les boîtes du MH additionnées de 10% de sang de cheval ont été inoculées par une suspension bactérienne préalablement préparée en BHIB dont la densité est ajustée à 3 McF. L'incubation a été effectuée à  $37^\circ\text{C}$  pendant 48 h dans un environnement microaérophile, obtenu avec un sachet en papier Microbox de GENbox (Biomerieux, voir annexes) à l'intérieur d'une jarre d'anaérobiose (concentration en  $\text{O}_2$  : 5%, Concentration en  $\text{CO}_2$  : 10%) (Medouakh, 2010).

Le diamètre de la zone autour du disque traduisant l'activité antimicrobienne, a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse. La sensibilité des bactéries testées à l'huile essentielle est classée selon les diamètres d'inhibition : bactéries résistantes ( $\text{Ø} < 8 \text{ mm}$ ), bactéries sensibles ( $9 \text{ mm} < \text{Ø} < 14 \text{ mm}$ ), bactéries très sensibles ( $15 \text{ mm} < \text{Ø} < 19 \text{ mm}$ ) et bactéries extrêmement sensibles ( $\text{Ø} > 20 \text{ mm}$ ) (Ponce *et al.*, 2003).

#### IV.4.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les tests antibactériens et la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) sont réalisés en milieu solide selon la méthode rapportée par Remmal *et al.* (1993) et Farah *et al.* (2001). L'huile essentielle est émulsionnée à raison de 10% (DMSO) afin de disperser les composés et d'améliorer leur contact avec les microorganismes testés. Les dilutions ont été préparées à 1/10, 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/300, 1/400 et 1/500 dans la solution de DMSO (fig. 26). Un volume de 1,5 ml de chacune des dilutions est versé dans une





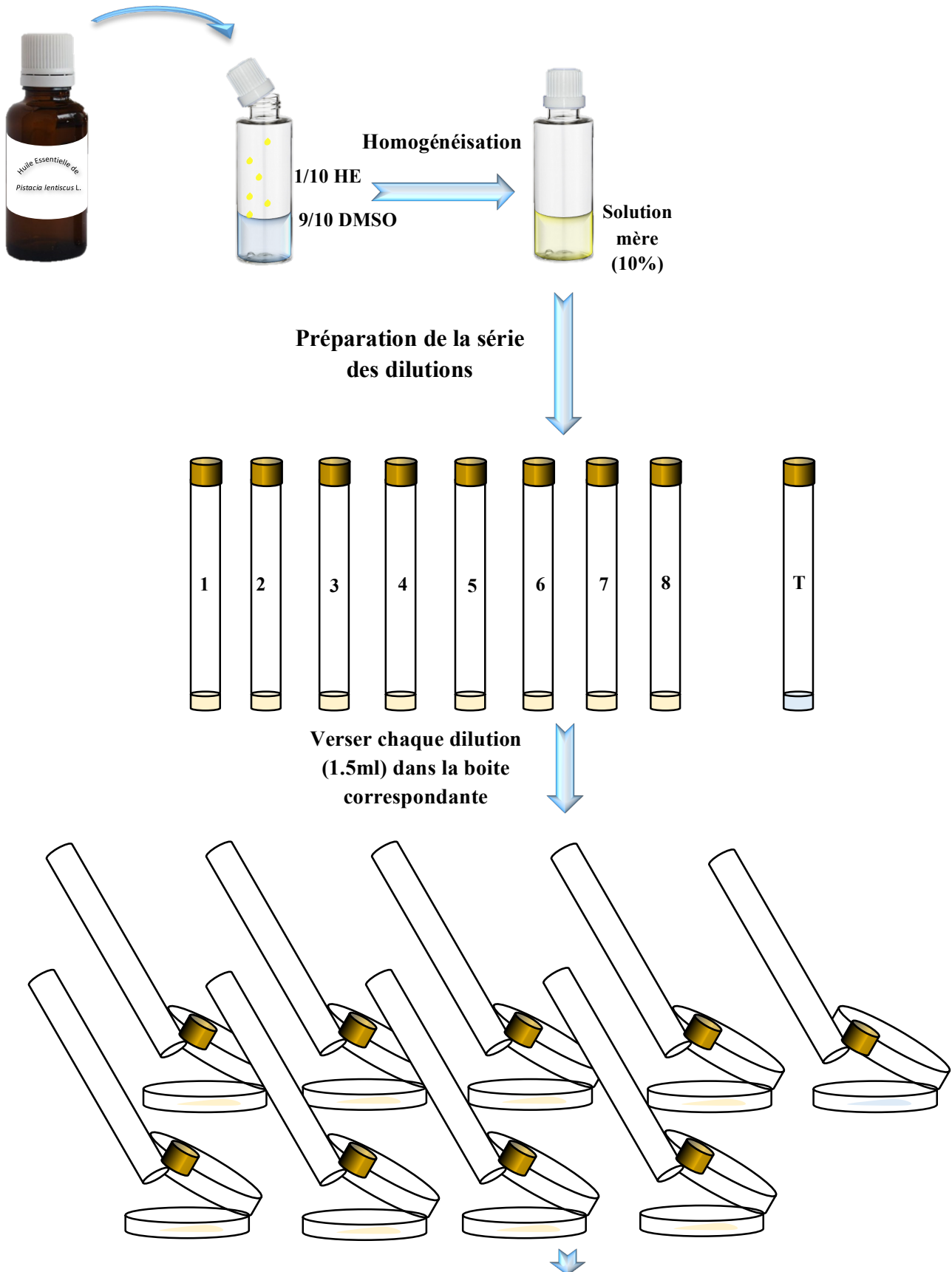
boite de Pétri vide, est ajouté par la suite 13,5 ml du milieu MH (MH au sang pour *Hp*) préalablement stérilisé pendant 20 minutes à 120°C, refroidie à 45 ° C, et on fait tourner les boîtes d'un mouvement circulaire jusqu'à obtention d'un milieu homogène. Les concentrations finales d'huiles essentielles sont de l'ordre de 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/3000, 1/4000 et 1/5000 (v/v) (tableau 4). Des contrôles négatifs (témoins), ne contenant que le milieu de culture et le DMSO ont été également préparés.

Les boîtes préparées font l'objet d'un ensemencement des bactéries testées à l'aide d'une anse calibrée de 1µl (dont la densité des suspensions est ajustée de la même manière).

Après incubation à 37°C pendant 24-48 h (conditions de microaerophilie pour *Hp*). La concentration minimale inhibitrice (CMI) est représentée par les concentrations des boîtes qui ne contiennent pas de culture.

**Tableau. 4.** Concentrations finales des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L.

N°	1	2	3	4	5	6	7	8	T
<b>HE (ml)</b>	0,15	0,06	0,03	0,015	0,0075	0,0050	0,00375	0,003	0
<b>DMSO (ml)</b>	1,35	1,44	1,47	1,485	1,4925	1,495	1,49625	1,497	1,5
<b>Concentrations (V/V)</b>	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625	0,003125	0,00156	0,00078	0
	1/10	1/25	1/50	1/100	1/200	1/300	1/400	1/500	0
<b>Gélose MH /MH au sang (en surfusion)</b>	13,5 ml								
<b>Concentrations finales (V/V)</b>	1/100	1/250	1/500	1/1000	1/2000	1/3000	1/4000	1/5000	0



**Figure. 26.** Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L.



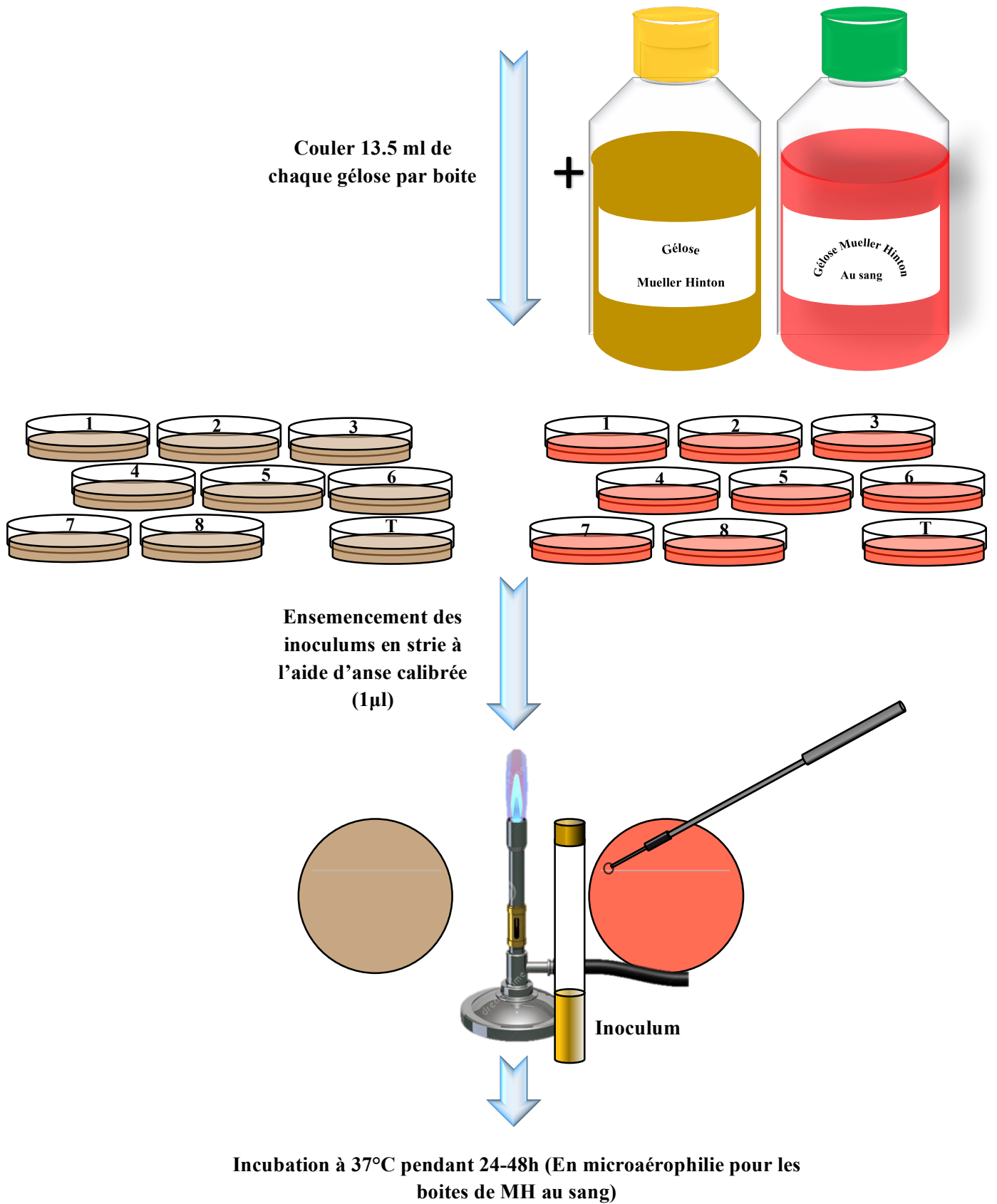


Figure. 26. (Suite) Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L.



# Chapitre V

---

**Résultats  
Et  
discussion**



## V.1. Isolement et identification des bactéries de la microflore digestive humaine

### V.1.1. Examen macroscopique

- Les colonies obtenues après une incubation de 4 jours d'incubation à 37°C dans une atmosphère microaérophile et sur gélose Columbia additionnée de 10% de sang de cheval étaient de 1 mm de diamètre, transparentes, luisantes, discrètement bombées, rondes et à contour régulier (fig. 27). Ces mêmes caractéristiques ont été constatées chez *Helicobacter pylori* par Percival *et al.* (2004).
- 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 révélée par le virage de couleur du milieu.
  - Colonies jaunes ; bactéries lactose +
  - Colonies bleues ; bactéries lactose –

Sur ce milieu, l'observation macroscopique montre des colonies de taille moyenne (1 à 2 mm) rondes plus ou moins régulières de couleur jaune, due à l'acidité du milieu, donc lactose (+) et peu bombées (*E. coli*), très bombées et grasses (*Klebsiella oxytoca*) (fig. 28,29).

La présence d'une  $\beta$ -galactosidase conduit à la dégradation du lactose présent dans le milieu, le pH de celui-ci diminue et est révélé par le virage de l'indicateur coloré, le pourpre de bromocrésol (Vernozy-rozand *et al.*, 1997).

Les colonies de taille moyenne (1 à 2 mm) bleues ; donc lactose (-), rondes plus ou moins régulières, peu bombées, transparentes [*Proteus mirabilis*, *Morganella morganii* (fig. 30), *Enterobacter cancerogenus* (fig. 31) et *Serratia fonticola* (fig. 32)], bien que les colonies de la même taille à contour irrégulier, irisées ou métalliques, odeur de seringat ou de miel sont suspectes d'être du genre *Pseudomonas*.

Les colonies de *Alcaligenes faecalis* sur ce milieu, sont lactose négative, mates, entourées d'une collerette claire.

Ce milieu contient trois types de glucides : la salicine (qui est un hétéroside), le saccharose et le lactose. L'orientation de l'identification des colonies isolées est fondée sur l'attaque de ces trois glucides, les salmonelles et les shigelles n'attaquent aucun de ces glucides.

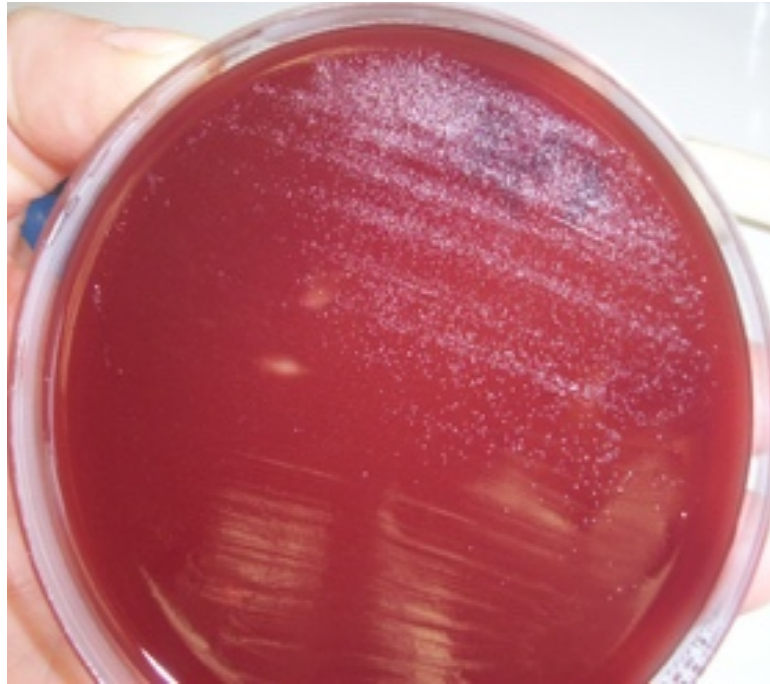
Un autre caractère biochimique que l'on peut suivre sur ce milieu est la production d'H<sub>2</sub>S à partir de thiosulfate. Cette production se traduit par l'obtention de colonies à centre noir, due





à la formation de sulfure de fer. Ce caractère est important car il permet de différencier les *Salmonella* (H<sub>2</sub>S +) des *Shigella* (H<sub>2</sub>S -).

- Le milieu Hektoen utilisé a permis d'isoler le genre *Citrobacter* ; colonies saumon à centre noir, *Proteus mirabilis* ; colonies bleu-vert à centre noir (fig. 33) et *Serratia* ; colonies saumon. Les colonies de *Pseudomonas aeruginosa* (fig. 34) sont transparentes sur cette gélose.
- Sur gélose au sang, la présence de petites colonies du genre *Streptococcus* et *Enterococcus*, se traduit par un halo : c'est le caractère hémolytique (deux types : **alpha** : halo verdâtre parce qu'ils transforment l'hémoglobine en biliverdine et **bêta** : halo clair résultant de la lyse totale des globules rouges).
- Sur milieu Chapman, des colonies (de 1 à 2 mm de diamètre) caractérisent le genre *Staphylococcus*, certaines souches produisent un pigment jaune orangé (fig. 35), 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).



**Figure. 27.** Aspect macroscopique de *Helicobacter pylori* sur gélose Columbia additionnée de 10% de sang de cheval.



**Figure. 28.** Aspect macroscopique de *E. coli* sur gélose BCP.



Figure. 29. Aspect macroscopique de *Klebsiella oxytoca* sur gélose BCP.



Figure. 30. Aspect macroscopique de *Morganella morganii* sur gélose BCP.



Figure. 31. Aspect macroscopique de *Enterobacter cancerogenus* sur gélose BCP.

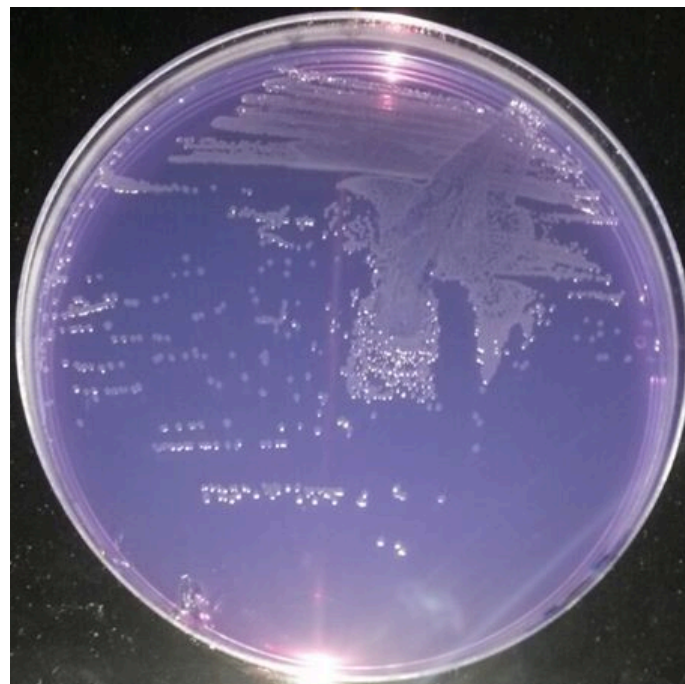


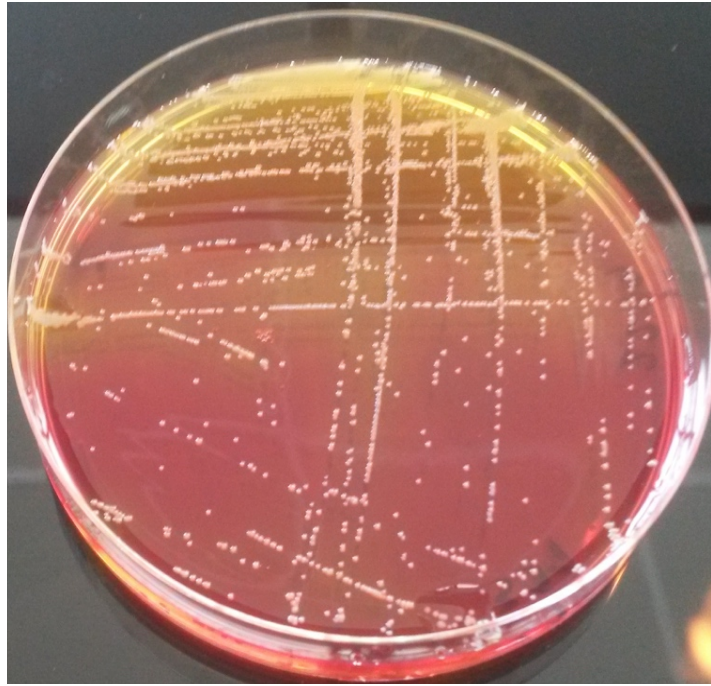
Figure. 32. Aspect macroscopique de *Serratia fonticola* sur gélose BCP.



**Figure. 33.** Aspect macroscopique de *Proteus mirabilis* sur gélose Hektoen.



**Figure. 34.** Aspect macroscopique de *Pseudomonas aeruginosa* sur gélose Hektoen.



**Figure. 35.** Aspect macroscopique de *Staphylococcus aureus* sur gélose Chapman.

## V.1.2. Examen microscopique

### V.1.2.1. Etat frais

Les bactéries examinées à l'état frais apparaissent mobiles ou immobile selon l'espèce (tableau 5).

L'examen à l'état frais est indispensable pour l'identification de *Helicobacter pylori*, elle apparaît très mobile par des mouvements spiralés et de rotation. La combinaison de sa forme incurvée et flagelles unipolaires permet à cette bactérie de se déplacer facilement sur la couche épaisse du mucus de l'estomac humain (Salyers et Whitt, 2002).

### V.1.2.2. 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 9 bactéries roses donc à coloration de Gram-négative et de forme bacillaire, coccobacille ou hélicoïdale et 3 autres bactérie violettes à coloration de Gram-positive, de forme cocci (fig. 36).

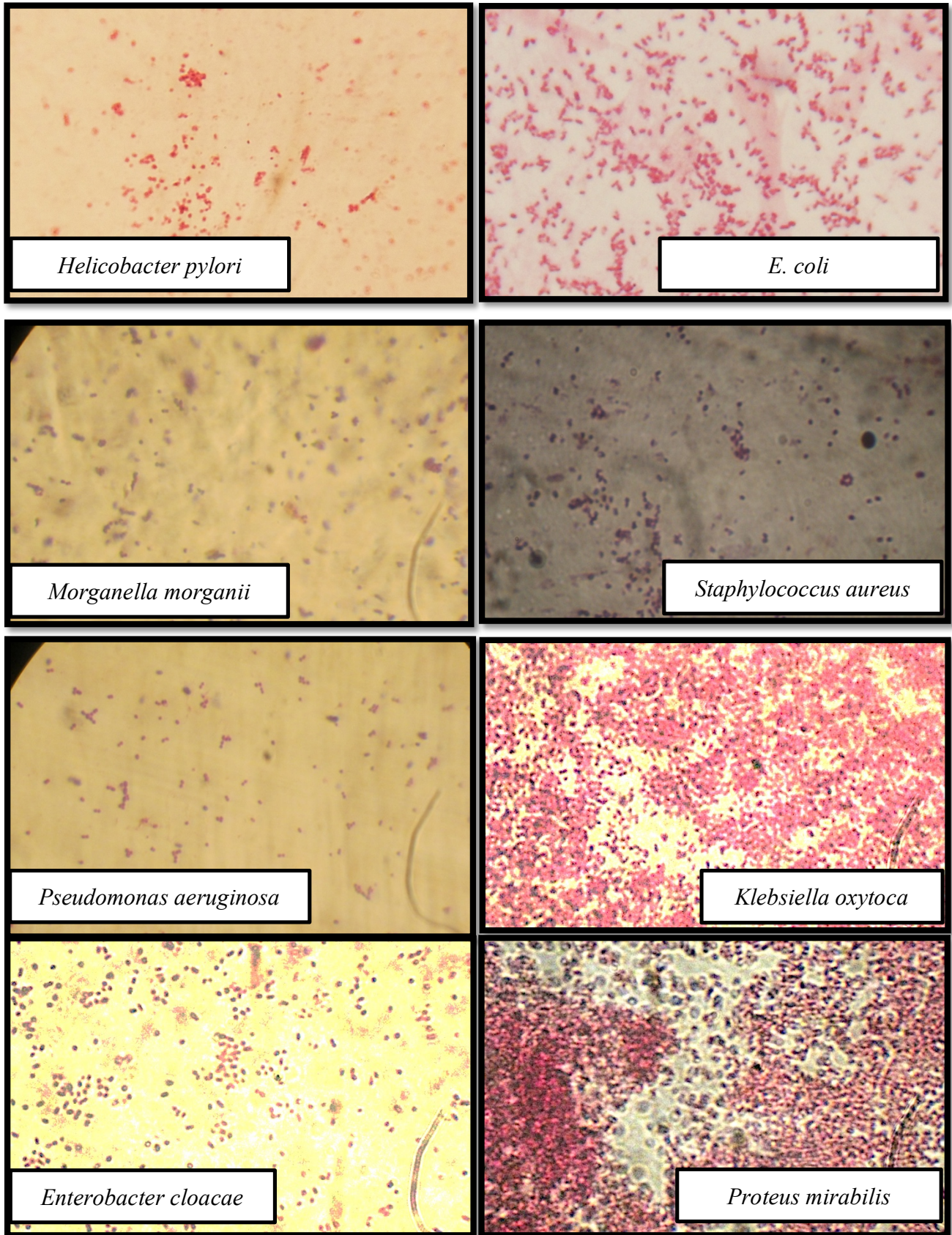


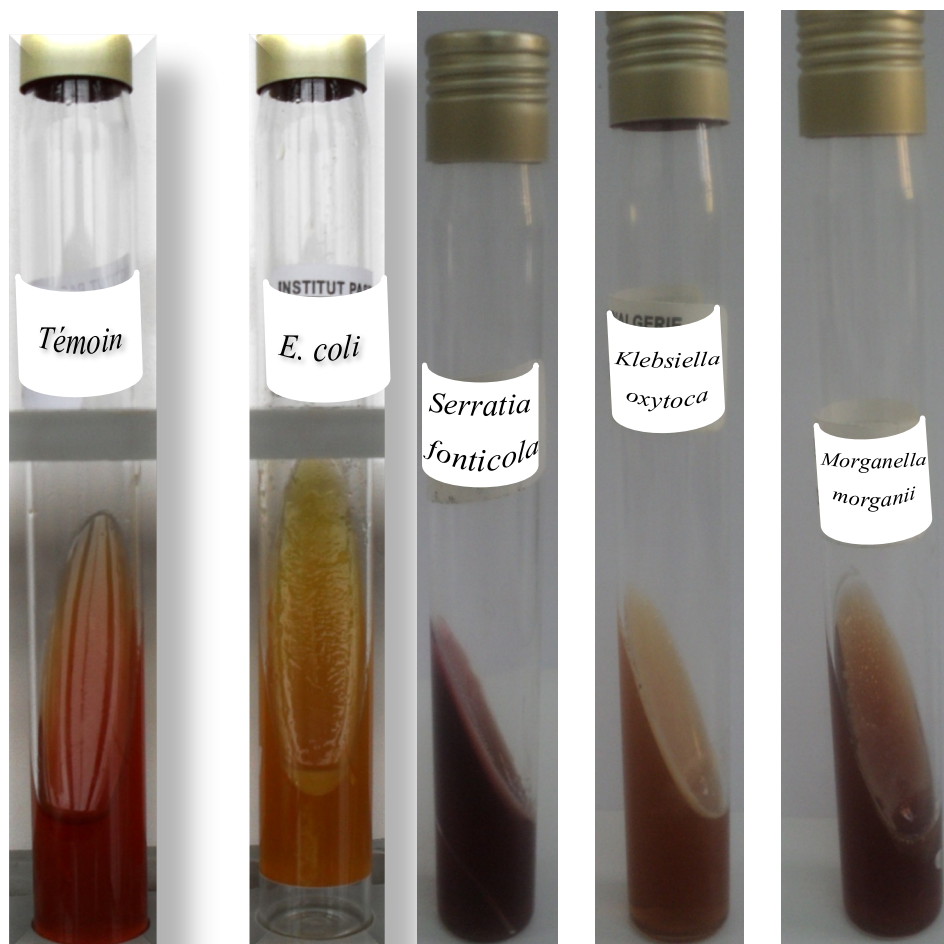
Figure. 36. Coloration de Gram de différentes bactéries isolées (grossissement X100).



### V.1.3. Tests biochimiques

Le TSI en tube est un milieu utilisé pour la différenciation des entérobactéries, qui est basée sur la production de sulfure d'hydrogène et la fermentation du lactose, du saccharose et du glucose.

Après incubation, la production d'acide sur la pente et dans le culot, et les productions de gaz et d' $H_2S$  sont observés (fig. 37). Une pente alcaline et un culot acide (rouge/jaune) indique la fermentation du glucose uniquement. Une pente acide et un culot acide (jaune/jaune) indique la fermentation du glucose, du lactose et/ou du saccharose. Une pente alcaline et un culot alcalin (rouge/rouge) indique que ni le glucose ni le lactose n'ont été fermentés. Des fissures ou des bulles dans le milieu indiquent une production de gaz. Un précipité noir dans le culot montre une production d' $H_2S$ .



**Figure. 37.** Fermentation des sucres et production du gaz chez les entérobactéries (*E. coli*, *Serratia fonticola*, *Klebsiella oxytoca* et *Morganella morganii*) en milieu TSI.



Ces résultats, ont été complétés par d'autres tests biochimiques ; recherche de l'oxydase, la catalase, l'uréase et la coagulase. Les trois premiers tests étaient fortement positifs pour la souche de *Helicobacter pylori* (tableau 5).

**Tableau. 5.** Résultats des tests biochimiques (recherche de la catalase, l'oxydase, l'uréase et de la coagulase) et de la mobilité des bactéries étudiées.

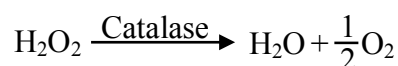
Bactéries	Test biochimique				
	Catalase	Oxydase	Uréase	Coagulase	Mobilité
<i>Helicobacter pylori</i>	+	+	++	-	+
<i>E.coli</i>	+	-	-	-	+
<i>Morganella morganii</i>	+	-	-	-	+
<i>Enterobacter cancerogenuse</i>	+	-	-	-	+
<i>Serratia fonticola</i>	+	-	-	-	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	-	+	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	+	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	-	+
<i>Alcaligenes faecalis</i>	+	+	-	-	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	-	-	-	-
<i>Streptococcus agalactie</i>	+	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	+	-

- : Négatif

+ : Positif

++ : Fortement positif

En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques conduisent à la formation d'eau oxygénée. La présence d'une catalase active (fig. 38) 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) :

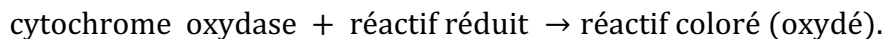


Le test de l'oxydase positif (fig. 39), met en évidence la présence d'une cytochrome-oxydase qui oxyde le cytochrome c réduit. La présence de ce dernier dans les chaînes respiratoires grâce à des réactifs ayant le même potentiel d'oxydo-réduction que le cytochrome



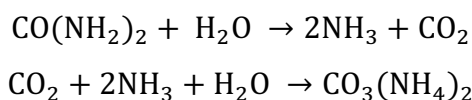


c (N-méthylé du paraphénylène diamine). L'existence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé (Megraud, 1996). La réaction est schématiquement la suivante :



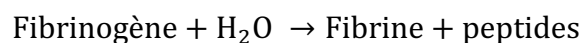
Donc la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore des dérivés N-méthylé du paraphénylène diamine, à sa forme oxydée semi-quinonique rose-violacée.

L'urée contenue dans le milieu urée-indole hydrolysée sous l'action d'une uréase (très active pour *Helicobacter pylori*), conduit à la formation d'ammoniac et de dioxyde de carbone ; ceci se traduit par le virage de la couleur du milieu en coloration rouge violacée ou orange foncée (fig. 40) selon la réaction :



Le produit final de la réaction est le carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu et permet par conséquence à *Helicobacter pylori* de s'adapter au suc gastrique (Fukase, 2008).

Pour *Staphylococcus aureus*, la réaction de la coagulation (fig. 41) est considérée comme positive puisque le coagulum occupe plus de 3/4 du volume initialement mis en jeu.



En principe, la coagulation se manifeste en moins de 3 heures et le plus souvent le caillot adhère aux parois du tube. Parfois la coagulation se produit plus lentement ; dans ce cas la réaction doit être considérée comme positive, si un caillot apparaît en moins de 24 heures.

Les résultats obtenus à partir des galeries API 20 E, API 20 NE, API 20 STREP, API STAPH et API CAMPY, sont indiquées dans les tableaux (6, 7 et 8). Les réactions produites (fig. 42) au cours de la période d'incubation se traduisent par des virages de couleurs spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Annexes).



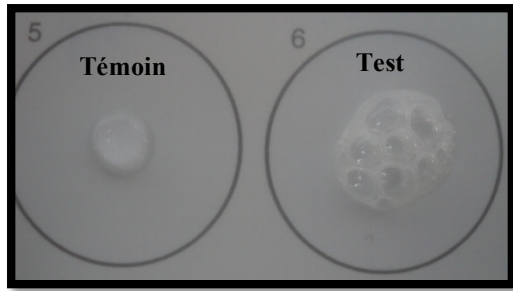


Figure. 38. Test de la catalase.

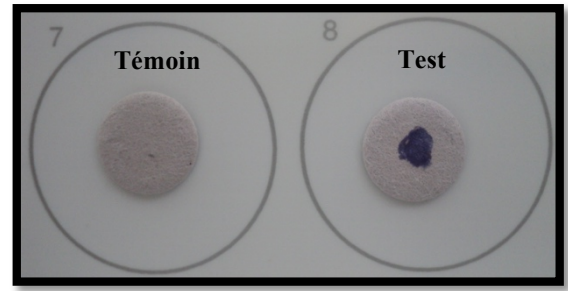


Figure. 39. Test de l'oxydase.

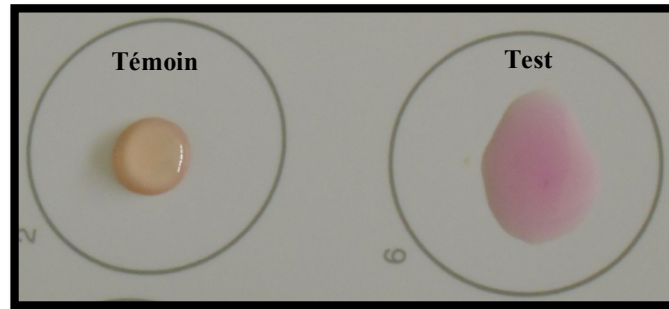


Figure. 40. Test de l'uréase.

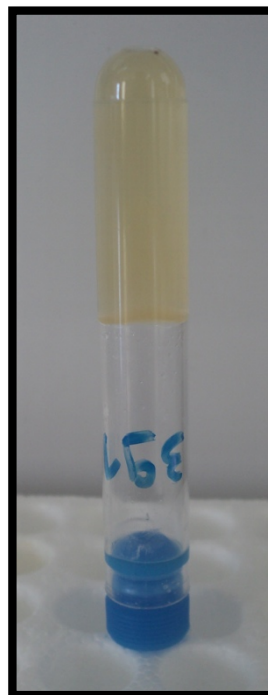
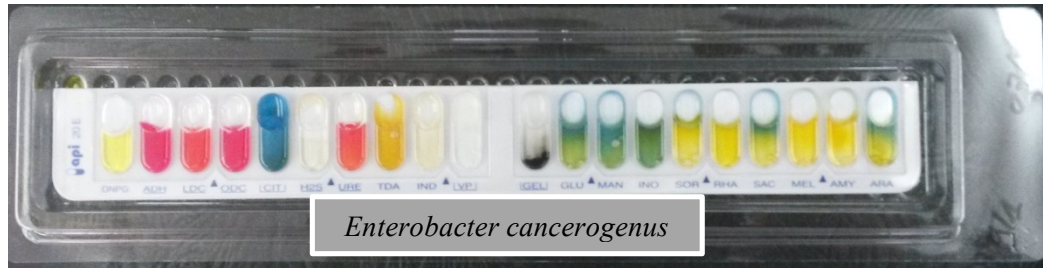


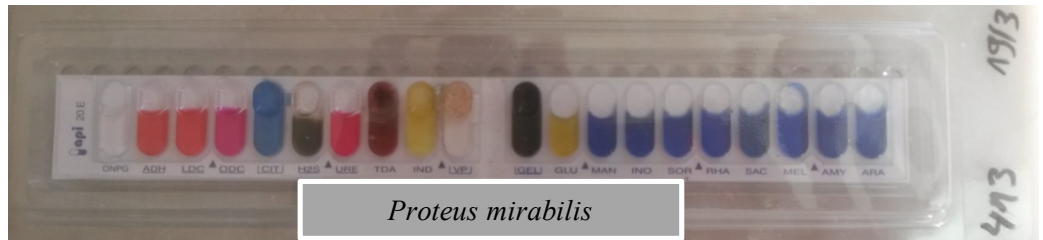
Figure. 41. Test de la coagulase.



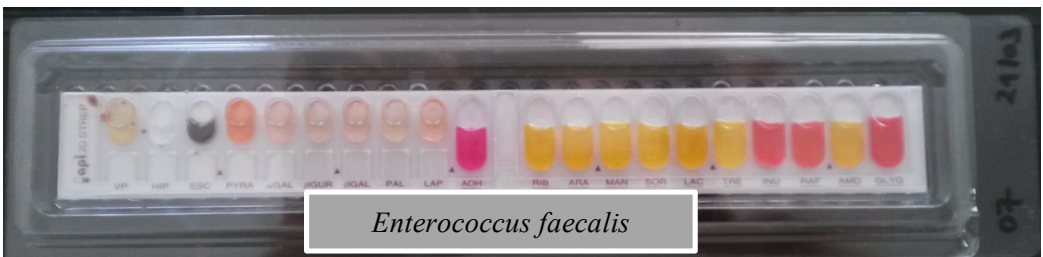
*Enterobacter cancerogenus*



*Pseudomonas aeruginosa*



*Proteus mirabilis*



*Enterococcus faecalis*



*Streptococcus agalactiae*



*Morganella morganii*

Figure. 42. Résultats des tests biochimiques des galeries : API 20 E, API 20 NE et API 20 STREP.



**Tableau. 6.** Résultats des tests biochimiques (API 20 E) des entérobactéries.

Tests	Bactéries					
	<i>E.coli</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	<i>Serratia fonticola</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
ONPG	+	-	+	+	+	+
ADH	+	-	+	-	-	-
LDC	+	+	-	+	+	-
ODC	+	+	+	+	-	+
CIT	-	-	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	+
URE	+	+	-	-	+	+
TDA	-	+	-	-	-	+
IND	+	+	-	-	+	-
VP	-	-	+	-	+	-
GEL	-	-	-	-	-	+
GLU	+	+	+	+	+	+
MAN	+	-	+	+	+	-
INO	-	-	-	+	+	-
SOR	+	-	-	+	+	-
RHA	+	-	+	+	+	-
SAC	+	+	-	+	+	+
MEL	+	-	-	+	+	-
AMY	-	-	+	+	+	-
ARA	+	-	+	+	+	-

- : Négatif

+ : Positif





**Tableau. 7.** Résultats des tests biochimiques (API 20NE) de *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis* et (API 20 STREPT) de *Enterococcus faecalis* et *Streptococcus agalactie*.

Tests	Bactéries		Tests	Bactéries	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus agalactie</i>
NO <sub>3</sub>	+	+	VP	+	+
TRP	-	-	HIP	+	+
GLU	-	-	ESC	+	-
ADH	+	-	PYRA	+	-
URE	+	-	αGAL	-	+
ESC	-	-	βGUR	-	+
GEL	+	+	βGAL	+	-
PNPG	-	-	PAL	+	+
GLU	+	+	LAP	+	+
ARA	+	-	ADH	+	+
MNE	-	-	RIB	+	+
MAN	+	-	ARA	-	-
NAG	+	-	MAN	+	-
MAL	-	-	SOR	+	-
GNT	+	+	LAC	+	+
CAP	+	+	TRE	+	+
ADI	+	+	INU	-	-
MLT	+	+	RAF	-	+
CIT	+	+	AMD	+	+
PAC	-	+	GLYG	+	+

- : Négatif

+ : Positif



**Tableau. 8.** Résultats des tests biochimiques (API STAPH) de *Staphylococcus aureus* et (API CAMPY) de *Helicobacter pylori*.

Tests	Bactéries	Tests	Bactéries
	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Helicobacter pylori</i>
0	-	URE	+
GLU	+	NIT	-
FRU	+	EST	+
MNE	+	HIP	-
MAL	+	GGT	+
LAC	+	TTC	-
TRE	+	PyrA	-
MAN	+	ArgA	+
XLT	-	AspA	-
MEL	-	PAL	+
NIT	+	H <sub>2</sub> S	-
PAL	+	GLU	-
VP	+	SUT	-
RAF	-	NAL	-
XYL	-	CFZ	-
SAC	+	ACE	-
MDG	+	PROP	-
NAG	+	MLT	-
ADH	+	CIT	-
URE	+	ERO	-

- : Négatif

+ : Positif





### Calcul du profil numérique

Les nombres à sept chiffres obtenus à l'aide du système informatique en ligne ApiWeb (annexes), constituent les profils numériques des souches étudiées.

Les profils numériques des bactéries ainsi identifiées, sont les suivants (tableau 9) :

**Tableau. 9.** Profils numériques des bactéries identifiées

Isolat bactérienne	Profil numérique
<i>Helicobacter pylori</i>	5221000
<i>E.coli</i>	7154572 (47)
<i>Morganella morganii</i>	4174020 (57)
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	3305113 (57)
<i>Serratia fonticola</i>	5304773 (57)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5255773 (27)
<i>Proteus mirabilis</i>	1736020 (57)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1355575
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1000477
<i>Enterococcus faecalis</i>	7173713
<i>Streptococcus agalactiae</i>	3663457
<i>Staphylococcus aureus</i>	6736173

### V.2. 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 (43-46).

L'observation des boîtes après incubation à 37°C pendant 24-48 heures nous a donner les résultats indiqués dans les tableaux (10-14).



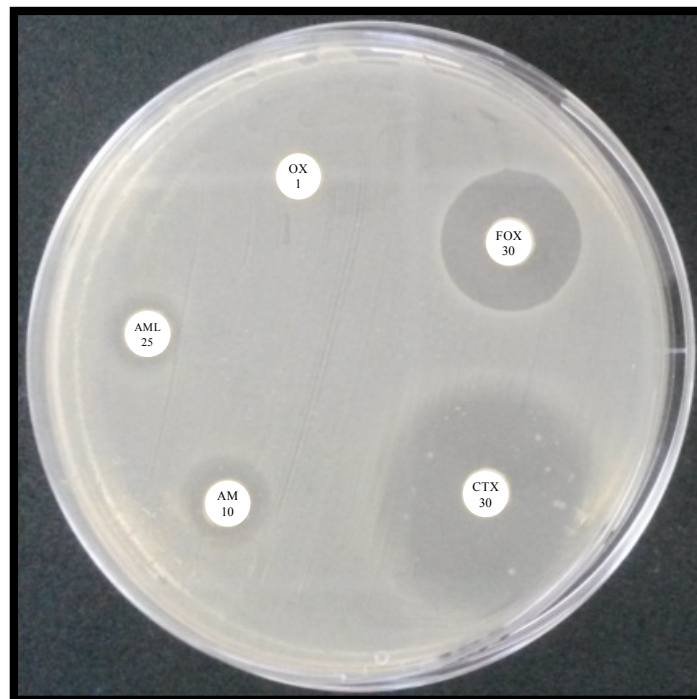
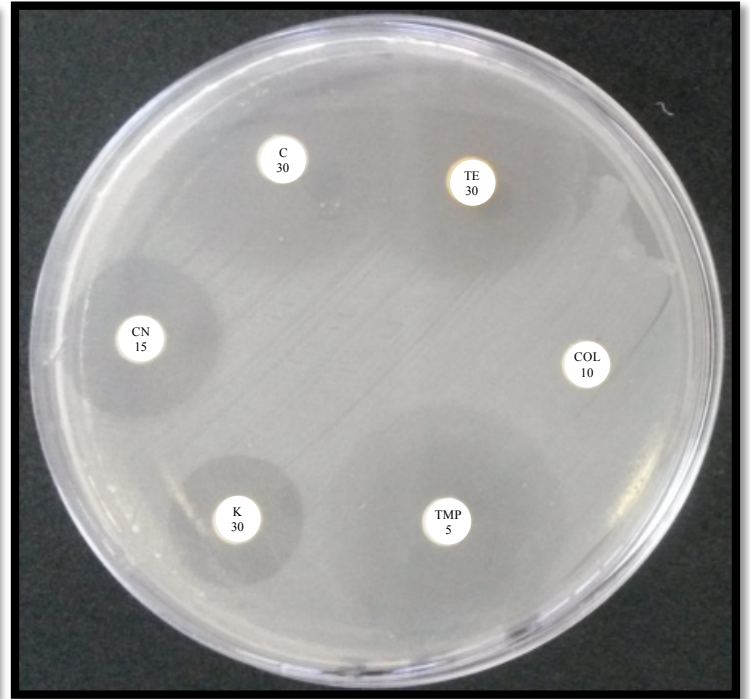
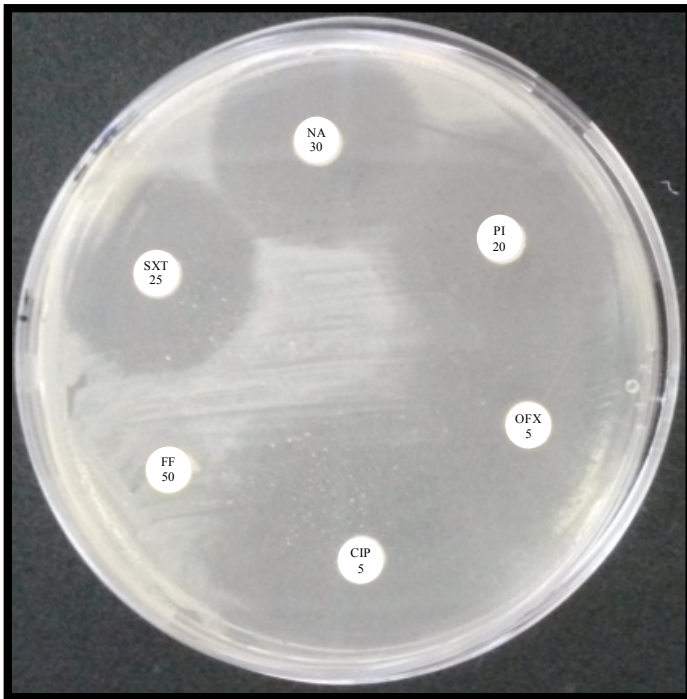


Figure. 43. Résultats de l'antibiogramme de *Morganella morganii*.

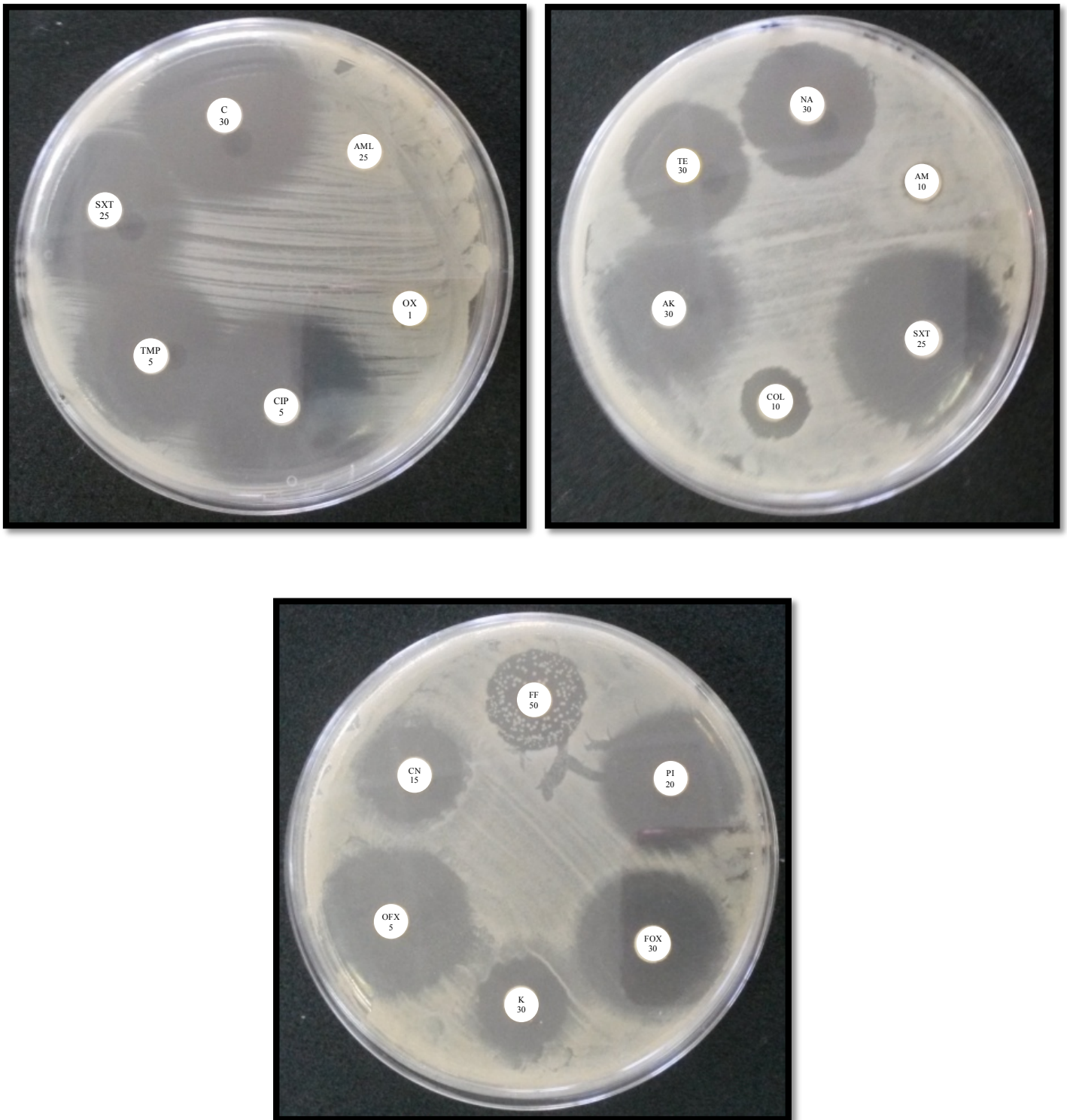


Figure. 44. Résultats de l'antibiogramme de *Klebsiella oxytoca*.

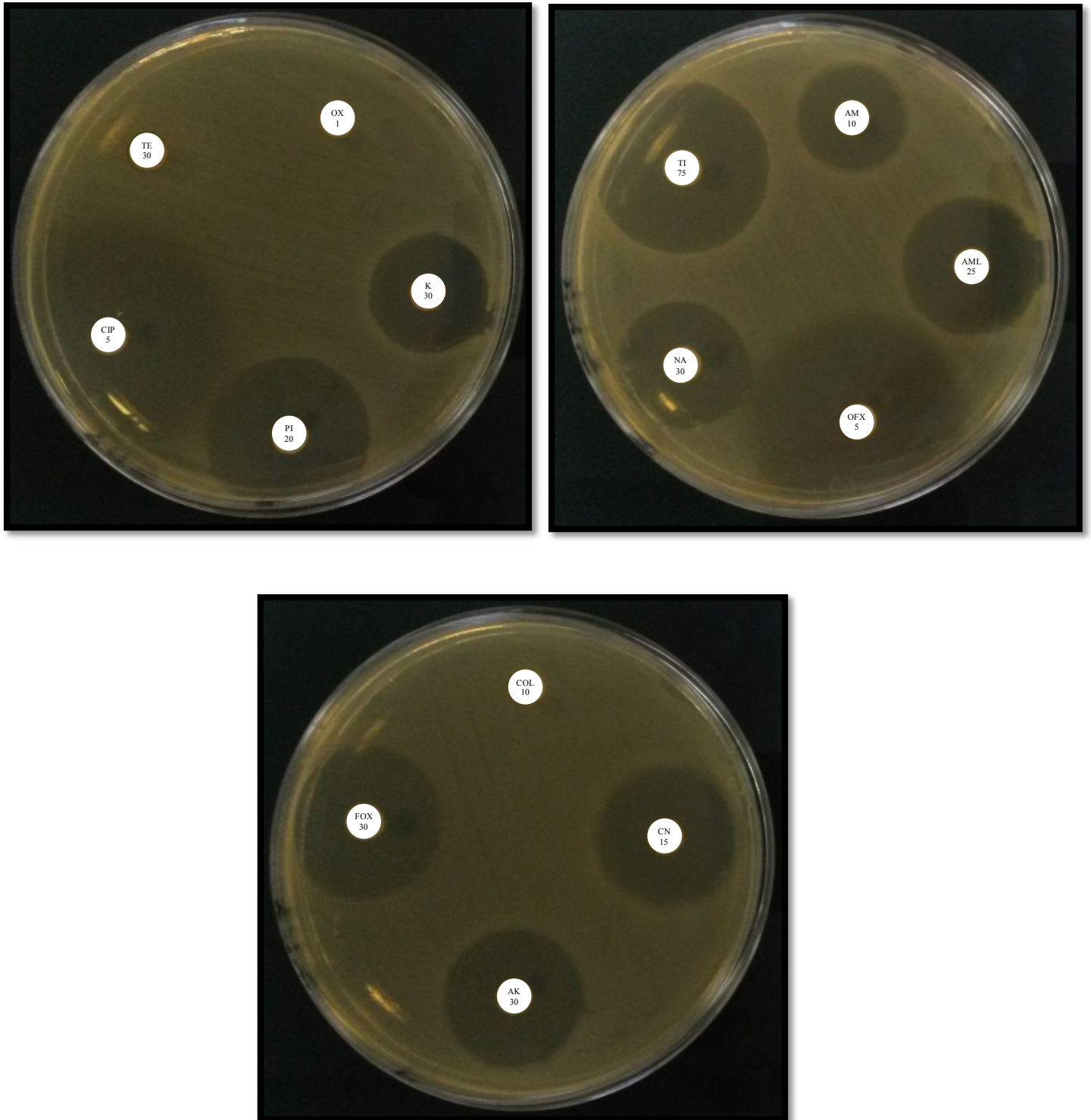


Figure. 45. Résultats de l'antibiogramme de *Proteus mirabilis*.

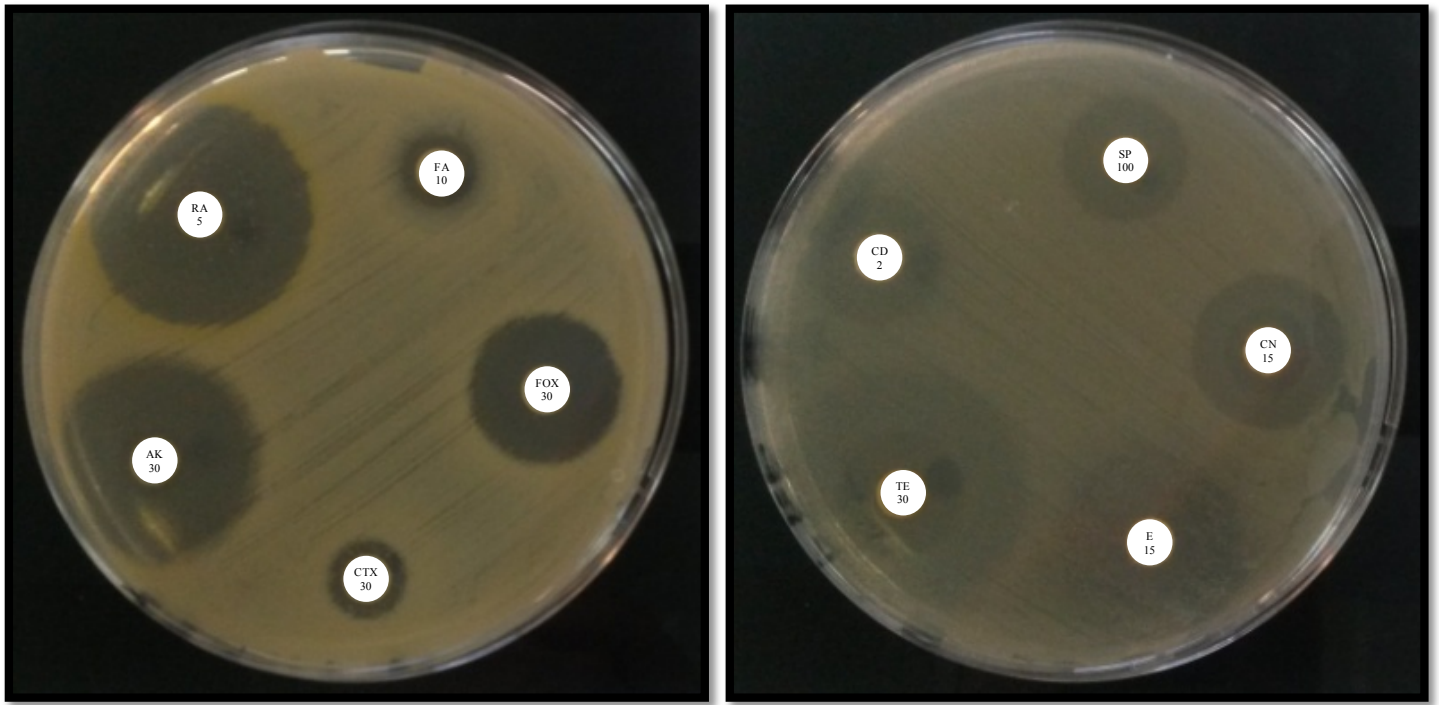


Figure. 46. Résultats de l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*.

Tableau. 10. Résultats de l'antibiogramme de *Helicobacter pylori*.

Antibiotique	Diamètre critique (mm)			Ø (mm)	Résultat
	≤ 17	18	≥ 19		
TE	≤ 17	18	≥ 19	40	S
CLR				18	R
E	≤ 25	26-32	≥ 33	6	R
MTR				17	R
NA	≤ 15	16-18	≥ 19	6	R
CIP	≤ 15	16-20	≥ 21	32	S
AML	≤ 13	14-17	≥ 18	40	S

R : Résistante  
S : Sensible



Tableau. 11. Résultats de l'antibiogramme des entérobactéries étudiées.

ATB	Diamètre critique (mm)			<i>E. coli</i>		<i>Klebsiella oxytoca</i>		<i>Morganella morganii</i>		<i>Proteus mirabilis</i>		<i>Enterobacter cancerogenus</i>		<i>Serratia fonticola</i>	
	R	I	S	Ø (mm)	Résultat	Ø (mm)	Résultat	Ø (mm)	Résultat	Ø (mm)	Résultat	Ø (mm)	Résultat	Ø (mm)	Résultat
AM	≤ 13	14-16	≥ 17	6	RN	8	RN	10,39	R	17,89	S	6	RN	6	RN
AML	≤ 13	14-17	≥ 18	6	RN	6	RN	7,38	R	23,67	S	6	RN	6	RN
TI	< 23		> 23							29,45	S	2123	RN	19,61	R
FOX	≤ 15	16-18	≥ 19	24,98	S	24,35	S	17,87	I	27,12	S	12,33	RN	7,7	R
CTX	≤ 23	24-25	≥ 26	12,38	R	30,81	S	28,44	S	38,03	S	19,20	RN	25,51	I
CAZ	≤ 21	22-25	≥ 26							25,9	S	20,45	RN	17,88	R
AK	≤ 13	14-15	≥ 16	21,55	S	23,57	S			23,84	S	27,71	S	19,66	S
CN	≤ 16	17	≥ 18	10,92	R	19,35	S	18,9	S	23,41	S	21,76	S	16,96	I
K	≤ 15	16	≥ 17	12,45	R	14,65	R	14,96	R	20,58	S			17,87	S
C	< 17		> 17	15,19	R	30,75	S	27,29	S	26,61	S	28,34	S	28,02	S
TE	≤ 17	18	≥ 19	17,33	I	21,30	R	25,58	S	7	RN			20,02	S
COL	< 15		> 15	10,83	R	11,29	RN	6	RN	6	RN	10,13	R	9,68	R
TMP	≤ 15	16-17	≥ 18	R	R	26,72	S	28,78	S						
SXT	≤ 13	14-15	≥ 16	R	R	28,60	S	26,17	S	25,19	S	26,06	S	29,05	S
CIP	≤ 15	16-20	≥ 21	22,31	S	31	S	35	S	37,26	S	29,02	S	29,49	S
NA	≤ 15	16-18	≥ 19	18,18	I	22,73	S	27,47	S	23,19	S	21,21	S	20	S
OFX	≤ 19	20-21	≥ 22	22,34	S	25,53	S	33,03	S	36,44	S	29,3	S	29,6	S
PI	≤ 14	15-18	≥ 19	22,67	S	25,07	S	29,23	S	27,38	S			24,97	S
FF	< 14		> 14	11,58	R	16,87	S	6	RN	27,73	S	13,85	R	13,7	R

R : Résistante

S : Sensible

Tableau. 12. Résultats de l'antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa* et *Alcaligenes faecalis*.

Antibiotique	Diamètre critique (mm)			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Alcaligenes faecalis</i>	
	R	I	S	Ø (mm)	Résultat	Ø (mm)	Résultat
AK	≤ 15	16-17	≥ 18	23,85	S	23,69	S
CN	< 16		> 16	21,34	S	21,58	S
TMN	< 16		> 16	22,33	S	19	S
SXT	≤ 10	11-15	≥ 16	7	RN	19,69	S
CIP	≤ 22	23-24	≥ 25	35,07	S	29,29	S
FF	< 16	-	> 16	6	RN	8	RN

R : Résistante

S : Sensible

Tableau. 13. Résultats de l'antibiogramme de *Enterococcus faecalis* et *Streptococcus agalactie*.

Antibiotique	Diamètre critique (mm)			<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Streptococcus agalactie</i>	
	R	I	S	Ø (mm)	Résultat	Ø (mm)	Résultat
AM	≤ 16	17-18	≥ 19	15,52	R	26,7	S
C	≤ 19	20-22	≥ 23	18,78	R	20,48	I
TE	≤ 17	16-18	≥ 19	15,15	R	30,66	S
CD	< 15		> 15	7,5	RN	12,53	R
E	≤ 14	15-22	≥ 23	6	RN	30,96	S
RP	≤ 19	20-21	≥ 22	8	RN	26,54	S
VA	RN		> 17	25,22	S	19,57	S

Tableau. 14. Résultats de l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*.

Antibiotique	Diamètre critique (mm)			<i>Staphylococcus aureus</i>	
	R	I	S	Ø (mm)	Résultat
FOX	≤ 22	23-24	≥ 25	19,25	R
CN	< 20		> 20	19,7	R
K	≤ 14	15-17	≥ 18	14,7	I
TMN	< 18		> 18	21,64	S
AK	≤ 14	15-16	≥ 17	26,33	S
C	< 18		> 18	21,58	S
TE	≤ 19	20-21	≥ 22	32,88	S
CD	≤ 19	20-21	≥ 22	17,62	R
SP	≤ 19	20-23	≥ 24	22,58	I
RP	≤ 19	20-23	≥ 24	31,66	S
RP	≤ 19	20-21	≥ 22	21,98	I
E	< 18		> 21	22,29	S
TMP	≤ 14	13-16	≥ 17	17,06	S
SXT	≤ 14	15-16	≥ 17	28,83	S
CIP	< 20		> 20	26,24	S
OFX	< 20		> 20	22,66	S
RA	≤ 23	24-25	≥ 26	28,44	S
FA	< 24		> 24	9,36	R
FF	< 14		> 14	26,49	S
VA	RN		> 17	16,24	RN

R : résistant

S : Sensible

I : Intermédiaire

AM : Ampicilline, AML : Amoxicilline, OX : Oxaciline, TI : Ticarcylone, FOX : Cefoxitine, CTX : Cefotaxime, CAZ : Ceftazidime, AK : Amikacine, CN : Gentamycine, K : Kanamycine, NEO : Neomycine, TMN : Tobramycine, C : Chloramphenico, DO : Doxycycline, TE : Tetracycline, CD : Clindamycine, E : Erythromycine, RP : Pristinamycine, SP : Spiramycine, CLR : Clarithromycine, COL : Colistine, TMP : Trimethoprime, SXT : Sulfaméthoxazole + Trimethoprime, CIP : Ciprofloxacine, NA : Acide nalidixique, PI : Acide pipédimique, OFX : Ofloxacine, RA : Rifampicine, FA : Acide fusidique, FF : Fosfomycine, VA : Vancomycine et MTR : Metronidazole.





Les résultats indiqués dans le tableau (10) montrent que *Helicobacter pylori* est résistante à la Clarithromycine, l'Erythromycine, la Métronidazole et l'Acide nalidixique ; dont les diamètres d'inhibition sont respectivement (18, 6, 17 et 6 mm). Cette résistance à plusieurs antibiotiques est peut-être, liée à l'utilisation fréquente de ces derniers notamment par la population algérienne après les études de l'influence de la résistance de *Helicobacter pylori* aux ATB sur l'efficacité thérapeutique, réalisé par un groupe de chercheurs de laboratoires Algériens de recherche sur *Helicobacter* (Touchène *et al.*, 2010).

De même le groupe des entérobactéries a montré une résistance importante notamment *E. coli*, *Morganella morganii*, *Enterobacter cancerogenus* et *Serratia fonticola* par contre *Klebsiella oxytoca* et *Proteus mirabilis*, ont montré une sensibilité aux antibiotiques utilisés.

Toutefois, les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Alcaligenes faecalis*, ont présentés une sensibilité vis à vis l'Amikacine, la Gentamycine, la Tobramycine et la Ciprofloxacine.

Cependant, les diamètres des zones d'inhibition de *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* indique une résistance à la Cefoxitine, la Gentamycine, la Clindamycine et l'acide fusidique, contrairement à *Streptococcus agalactie*.

Les résultats de l'antibiogramme, expriment une résistance acquise et multiple de sept bactéries isolées parmi douze du tube digestif humain vis à vis aux antibiotiques utilisés habituellement dans la thérapie. Cet échec nous a poussé de chercher une alternative naturelle pour limiter cette résistance croissante.



### V.3. Effets antibactériens des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L.

#### V.3.1. Extraction des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L.

Pour chaque essai, après une durée de 3 heures d'hydrodistillation (fig. 47) de 250 g de matière végétale fraîche, on a obtenu des quantités d'huile essentielle illustrés dans le tableau (15) et cela nous a permis de calculer le rendement ( $y$ ) de l'extraction selon la formule suivante (Vagi *et al.*, 2005) :

$$y = \frac{\text{Masse d'huile essentielle (g)}}{\text{Masse du matériel végétal utilisé (g)}} \times 100$$

**Tableau. 15.** Quantités d'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. extraite par hydro-distillation.

Essai N°	Masse du matériel végétal utilisé en g	Volume d'eau distillée utilisé en ml	Masse des huiles essentielles extraites en g
01	250	2000	1,0165
02	250	2000	0,864
03	250	2000	1,021
04	250	2000	1,05
05	250	2000	0,98

$$y_1 = \left[ \frac{1,0165}{250} \times 100 \right] = 0,40\%$$

$$y_2 = \left[ \frac{0,864}{250} \times 100 \right] = 0,34\%$$

$$y_3 = \left[ \frac{1,021}{250} \times 100 \right] = 0,40\%$$

$$y_4 = \left[ \frac{1,05}{250} \times 100 \right] = 0,40\%$$

$$y_5 = \left[ \frac{0,98}{250} \times 100 \right] = 0,39\%$$

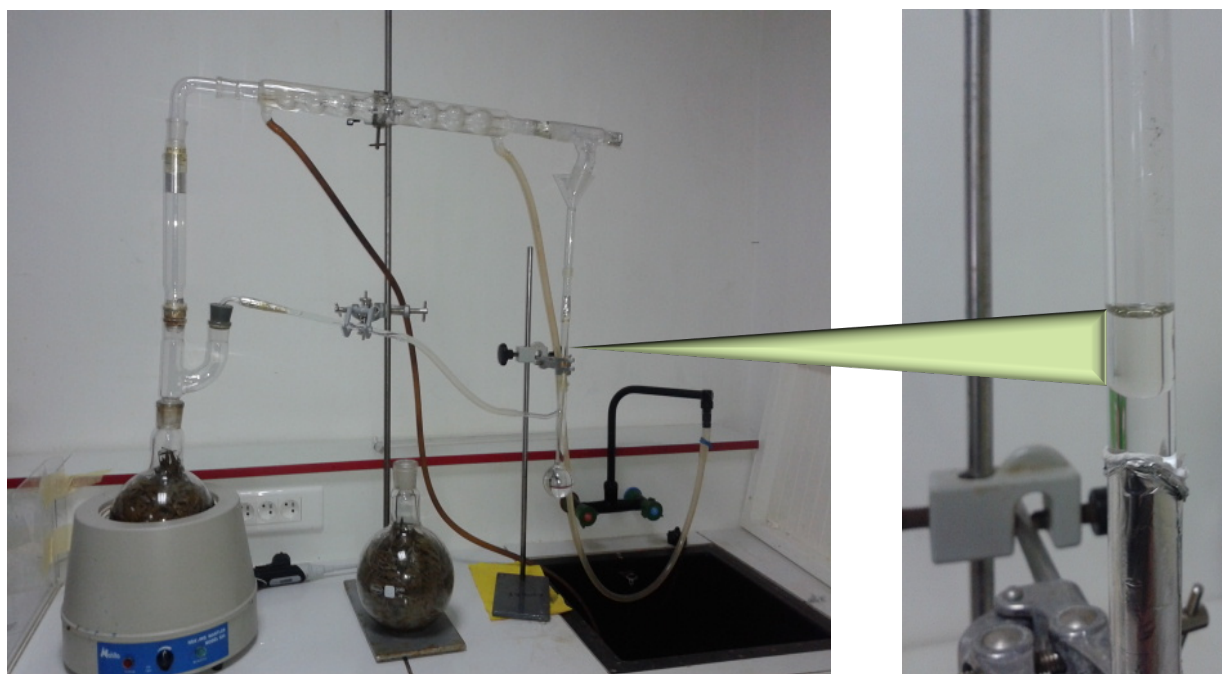
$$y = \frac{y_1 + y_2 + y_3 + y_4 + y_5}{5} = 0,39\%$$

$$y = 0,39\%$$





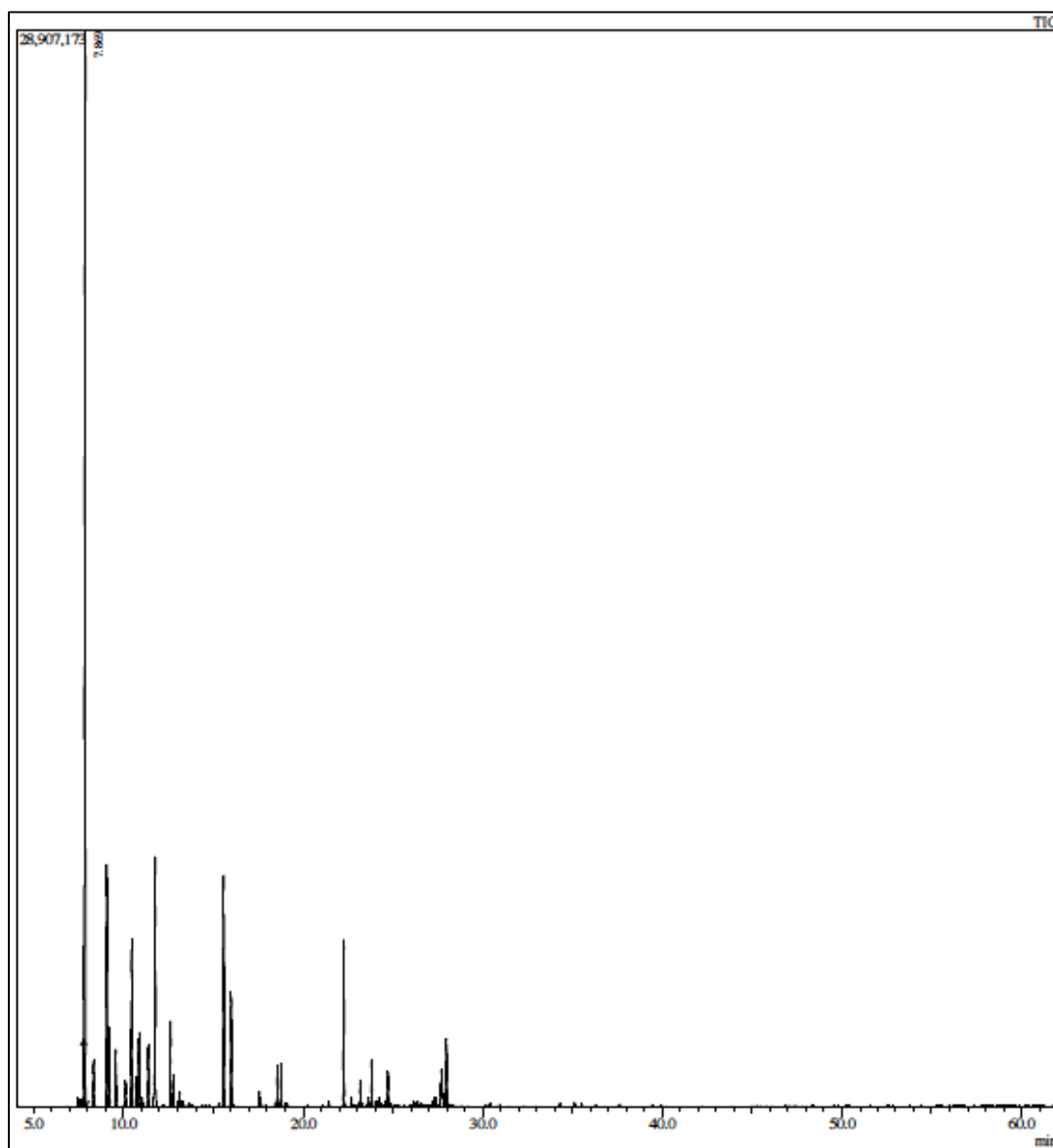
Le rendement moyen de l'huile essentielle extraite des feuilles et des rameaux de *Pistacia lentiscus* L. était de 0,39%. Cette valeur est conforme aux résultats d'Arab *et al.* (2014) dans la région de Boumerdes en Algérie, Zrira *et al.* (2003) au Maroc et Congiu *et al.* (2002) en Sardaigne. Nos valeurs étaient cependant les plus élevées que celles rapportées en Tunisie (Amri *et al.*, 2012) et en Grèce (Tsokou *et al.*, 2007). Le rendement en huile de *Pistacia lentiscus* L. semble dépendre de la nature des parties de plantes utilisées, de la méthode d'extraction et de l'origine géographique. Selon Okoh *et al.* (2007), le rendement de l'huile essentielle a montré un maximum au stade de floraison complète (0,97%) et un minimum au stade de pré-floraison (0,13%).



**Figure. 47.** Procédé d'extraction des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L. par hydrodistillation.

L'analyse GC-MS de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. a permis de détecter 50 composants, représente 99,9% de l'huile essentielle (fig. 48).



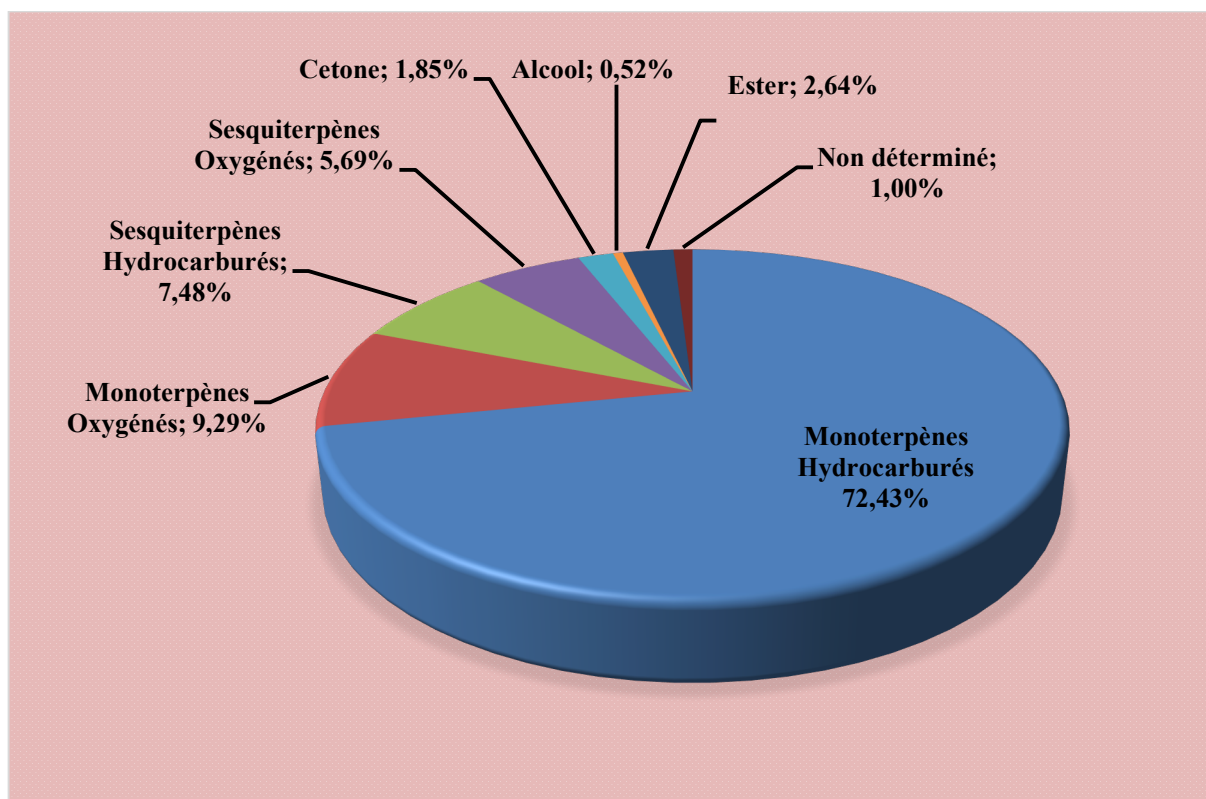


**Figure. 48.** Chromatogramme de *Pistacia lentiscus* L. de la région de Mostaganem, Algérie.

L'huile essentielle a été caractérisée par un pourcentage élevé d'hydrocarbures monoterpéniques (72,43%), suivis par des monoterpènes oxygénés (9,29%) et des hydrocarbures sesquiterpéniques (7,48%), tandis que la fraction sesquiterpénoïde oxygénée était de 5,69% (fig. 49). Des résultats similaires ont été rapportés dans la littérature (Dob *et al.*, 2006). Différents composés ont été observés dans plusieurs études sur la composition chimique



des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L. dans les pays méditerranéens (Castola *et al.*, 2000 ; Ben Douissa *et al.*, 2005 ; Derwich *et al.*, 2010).



**Figure. 49.** Proportions des différents groupes chimiques de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. étudiée.

Dans cette étude, l' $\alpha$ -pinène (42,13%) était le principal composé de l'huile essentielle (tableau 16). Ce composé était également abondant dans les échantillons d'Oran, en Algérie (19,0%) (Dob *et al.*, 2006), en France (31,9%) (Castola *et al.*, 2000), en Espagne (13,0%) (Fernández *et al.*, 2000) et au Maroc (16,1% - 38,5%) (Zrira *et al.*, 2003). Les autres constituants principaux étaient le sabinène (6,46%), le terpinen-4-ol (6,22%), le  $\gamma$ -terpinène (6,21%), le charyophellène (4,43%), l' $\alpha$ -terpinène (4,1%), l' $\alpha$ -terpinéol (2,95%) et l' $\alpha$ -terpinolène (2,18%). En outre, cette majorité est également observée dans la composition chimique de l'huile essentielle de *Pistacia lentisque* L. en Espagne, dont les principaux composés ont été l' $\alpha$ -pinène (24,9%), suivi par le terpinen-4-ol (6,8%), le sabinène (4,6%), la  $\gamma$ -terpinène (3,3%),  $\alpha$ -terpinéol (2,5%),  $\alpha$ -terpinène (2,2%) et trans-caryophyllène (2,0%) (Fernández *et al.*, 2000).



Cependant, les huiles obtenues à partir de feuilles fraîches de *Pistacia lentiscus* L. recueillies en Tunisie (Aissi *et al.*, 2016) ont montré un profil différent de celui détecté dans l'étude en cours puisqu'il s'agissait principalement de germacrène D (11,9%), de  $\alpha$ -pinène (9,9 %), Le limonène (8,5%), le  $\delta$ -cadinène (8,5%), le  $\beta$ -caryophyllène (8,2%) et le terpinène-4-ol (5,1%). De même, en comparant nos résultats avec ceux rapportés par Kivçak *et al* (2004), les principaux composés de Turky étaient le terpinène-4-ol (29,2%), le  $\beta$ -caryophyllène (29,2%) et le p-cymène (7,1%). Selon Tzakou *et al.* (2007), la caractéristique commune pour les échantillons de *Pistacia atlantica* étudiés, ainsi que pour les espèces de *Pistacia* les plus étudiées, est la biosynthèse des monoterpénoïdes comme principale classe de composés dans leurs huiles essentielles, indépendamment de la variabilité observée de la composition de terpène des huiles.

La composition chimique des huiles essentielles peut varier selon les espèces, entre les mêmes espèces et les différentes parties de la plante. Boelens et Jimenez (1991) ont signalé que les principaux constituants de l'huile de gomme étaient : 79% de  $\alpha$ -pinène et 3% de myrcène; de l'huile foliaire: 11% de  $\alpha$ -pinène et 19% de  $\beta$ -myrcène; de l'huile de fruits non mûrs: 22% de  $\alpha$ -pinène et 54% de  $\beta$ -myrcène et de l'huile de fruit mûr: 11% de  $\alpha$ -pinène et 72% de  $\beta$ -myrcène.

D'autres facteurs peuvent affecter la composition chimique de l'huile comme le climat, la qualité du sol, la saison des récoltes, la génétique (Cunha *et al.*, 2013) et les éléments nutritifs (Djenane *et al.*, 2011). Sinon, le rendement et la composition des huiles ont été corrélés avec les paramètres météorologiques (durée du jour, température et humidité) et l'attaque des agents pathogènes fongiques, en particulier dans les mois de précipitations (Hassiotis *et al*, 2010).





**Tableau. 16.** Composition chimique de d'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. extraite par hydro-distillation.

Composés	RT (min)	RI	Surface	%
Tricyclene	7.475	921	601719	0.24
$\alpha$ -Thujene	7.6	925	594140	0.24
$\alpha$ -Pinene	7.87	934	104477800	42.13
Camphen	8.34	949	2910112	1.17
Sabinene	9.07	972	16021996	6.46
$\beta$ -Pinene	9.21	976	4370203	1.76
$\beta$ -Myrcene	9.575	988	3367891	1.36
$\alpha$ -pPhellandrene	10.11	1005	1521771	0.61
$\alpha$ -Terpinene	10.45	1016	10162820	4.1
o-Cymene	10.69	1023	1792977	0.72
Limonene	10.84	1028	4471214	1.8
$\beta$ -Phellandrene	10.89	1030	4329380	1.75
E- $\beta$ -Ocimene	11.05	1035	502755	0.2
Z- $\beta$ -Ocimene	11.385	1045	3715100	1.5
Butyrate iso amyl	11.705	1055	1205552	0.49
$\gamma$ -Terpinene	11.77	1057	15413257	6.21
$\alpha$ -Terpinolene	12.615	1084	5417549	2.18
2-Nonanone	12.77	1089	1987035	0.8
Linalool	13.065	1098	297633	0.12
Nonanol	13.125	1100	1046866	0.42
iso-Amyl isovalerate	13.275	1105	426275	0.17
Terpinen-4-ol	15.575	1180	15434061	6.22
$\alpha$ -Terpineol	16	1194	7313787	2.95
Isopentyl hexanoate	17.565	1248	915591	0.37
Isopamyl hexanoate	17.625	1250	509819	0.21
Bornyl acetate	18.565	1282	2562876	1.03
2-Undecanone	18.77	1289	2615408	1.05
2-Tridecanol	19.05	1299	243635	0.1
$\beta$ -Elemene	21.435	1388	316135	0.13
Charyophelene	22.265	1420	10991141	4.43
Isoamyl benzoate	22.685	1437	655542	0.26
$\alpha$ -Humulene	23.18	1456	1810825	0.73
$\beta$ -Cadinene	23.575	1471	234555	0.09
$\gamma$ -Muurolene	23.645	1474	597657	0.24
Germacrene D	23.82	1481	3357121	1.35
Valencene	24.18	1495	309789	0.12
$\alpha$ -Muurolene	24.23	1497	563572	0.23





$\gamma$ -Cadinene	24.6	1512	391191	0.16
Cubebol	24.715	1517	2397832	0.97
Spathulenol	26.155	1576	423032	0.17
Caryophyllene oxide	26.305	1582	250775	0.1
Globulol	26.38	1585	328341	0.13
Cubenol	27.255	1621	280067	0.11
T-Muurolol	27.345	1625	586024	0.24
Epi-Cadinol	27.705	1639	3847662	1.55
Muurolol	27.77	1642	833174	0.34
$\alpha$ -Cadinol	27.975	1651	4920965	1.98
Bisabolol	28.07	1654	237741	0.1
Benzyl Benzoate	30.42	1751	279968	0.11
Manool oxyde	35.105	1943	255446	0.1
<i>Monoterpènes</i>				
Hydrocarburés				72.43
Oxygénés				9.29
<i>Sesquiterpènes</i>				
Hydrocarburés				7.48
Oxygénés				5.69
Cetone				1.85
Alcool				0.52
Ester				2.64
Non déterminé				0.1
Total identifié				99.9

TR : Temps de rétention obtenu par chromatogramme (Fig. 3).

IR : Indice de Retention.





### V.3.2. Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L. vis-à-vis les bactéries testées

#### V.3.2.1. Activité antimicrobienne (Aromatogramme)

Ces dernières années, il a été ciblé l'intérêt pour les molécules biologiquement actives, isolées des espèces végétales pour éradiquer les microorganismes pathogènes (Essawi et Srour, 2000). L'activité antibactérienne *in vitro* de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. a été évaluée qualitativement et quantitativement par la présence ou l'absence de zones d'inhibition et de la CMI, respectivement.

Suite aux résultats indiquées dans le tableau (17), l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. a montré une activité inhibitrice importante contre les bactéries à coloration de Gram-positive et à coloration de Gram négative testées. Le diamètre moyen de la zone d'inhibition variait de 12,86 à 40,00 mm.

Les diamètres des zones d'inhibition nous ont permis de classer les espèces bactériennes en fonction de leur sensibilité à l'huile essentielle testée selon le spectre indiqué dans le chapitre IV (Ponce *et al.*, 2003). Pour les bactéries à coloration de Gram-négative, les plus grandes zones d'inhibition ont été obtenues chez *Helicobacter pylori*, *E. coli* et *Morganella morganii* (40.00, 24.71 et 24.60 mm, respectivement). On a donc considéré que ces microorganismes étaient plus sensibles à l'huile. En outre, *Enterobacter cancerogenus* a été jugé plus sensible à l'huile que *Serratia fonticola* (16,07 et 14,58 mm, respectivement). Dans le cas des bactéries à coloration de Gram positive, *Staphylococcus aureus* s'est avéré plus sensible que *Enterococcus faecalis* avec des diamètres d'inhibition de 23,54 et 12,86 mm, respectivement (fig. 50-56).

**Tableau. 17.** Valeurs des diamètres d'inhibition (en mm) de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. vis-à-vis les sept bactéries testées.

bactérie	Diamètre	sensibilité
<i>Helicobacter pylori</i>	40.00	ExS
<i>E. coli</i>	24.71	ExS
<i>Morganella morganii</i>	24.60	ExS
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	16.07	TS
<i>Serratia fonticola</i>	14.58	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	23.54	ExS
<i>Enterococcus faecalis</i>	12.86	S

ExS : Extra sensible ; TS : Très sensible ; S : Sensible.



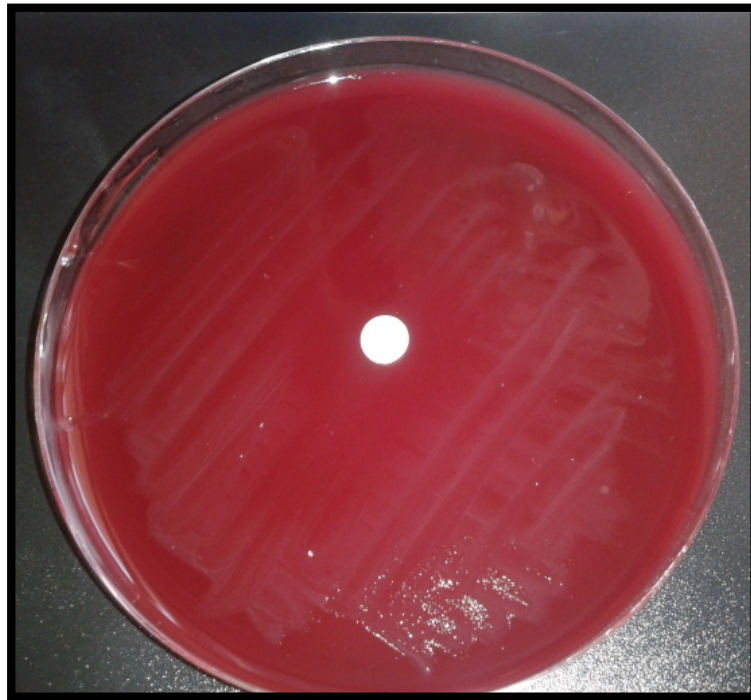


Figure. 50. Aromatogramme de *Helicobacter pylori* par l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L.

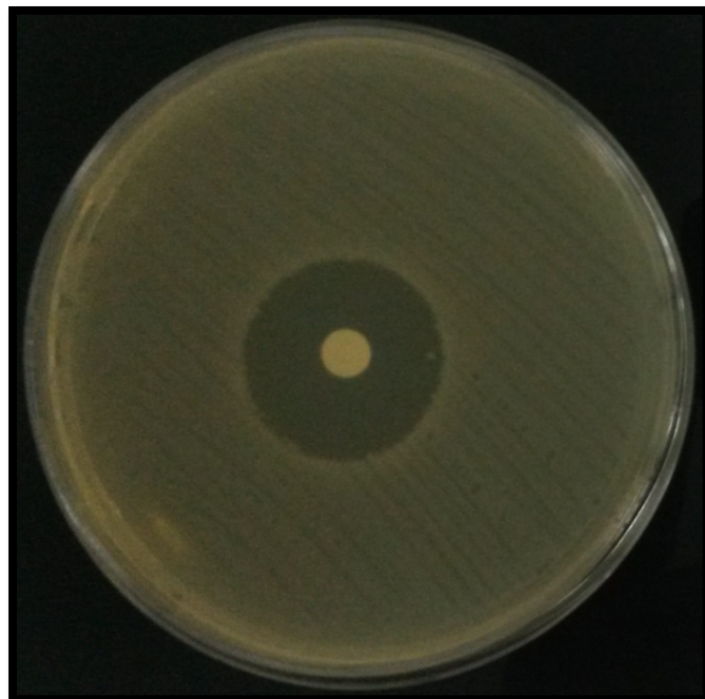


Figure. 51. Aromatogramme de *E. coli* par l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L.

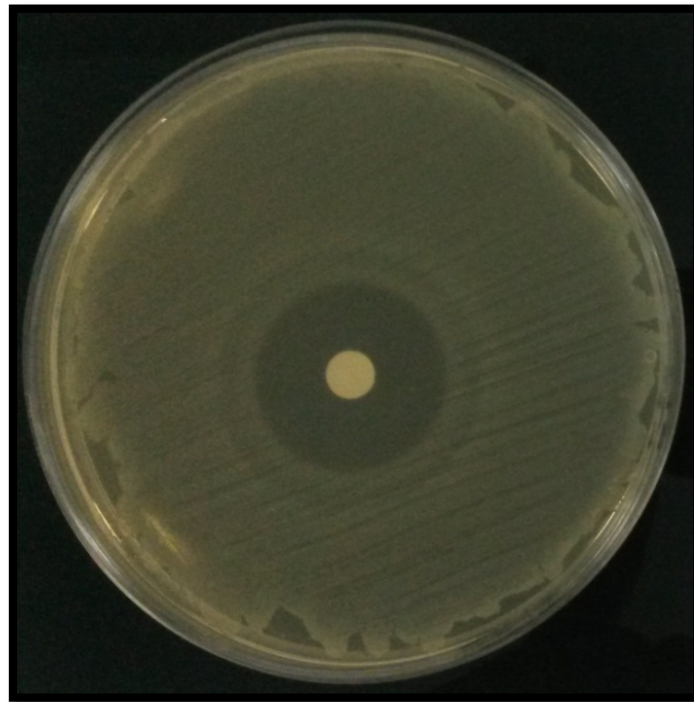


Figure. 52. Aromatogramme de *Morganella morganii* par l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L.

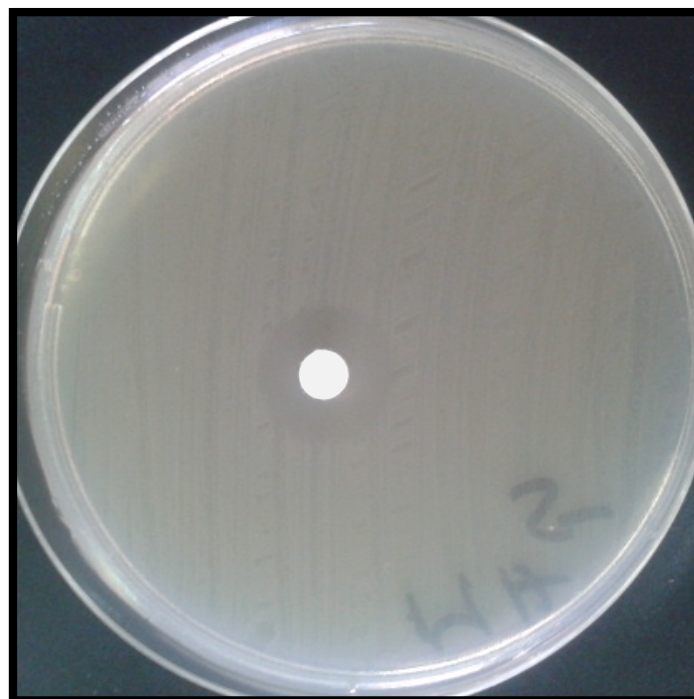


Figure. 53. Aromatogramme de *Enterobacter cancerogenus* par l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L.

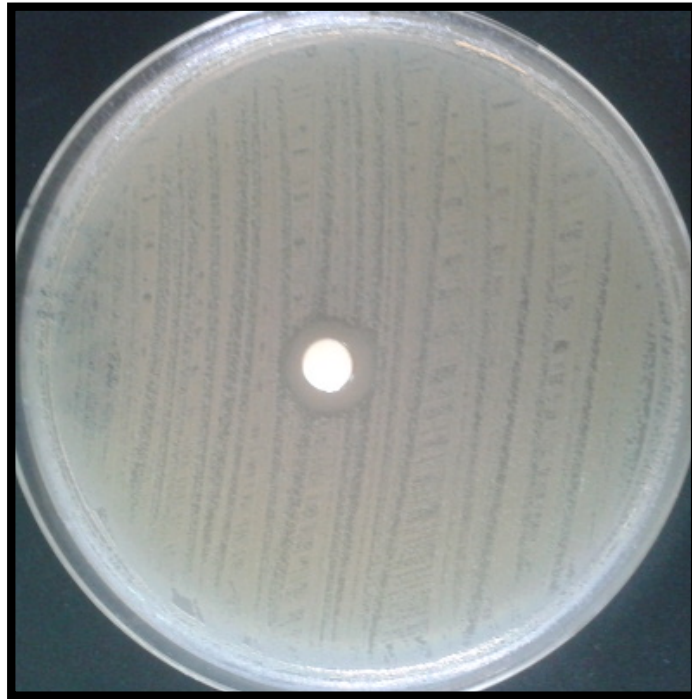


Figure. 54. Aromatogramme de *Serratia fonticola* par l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L.

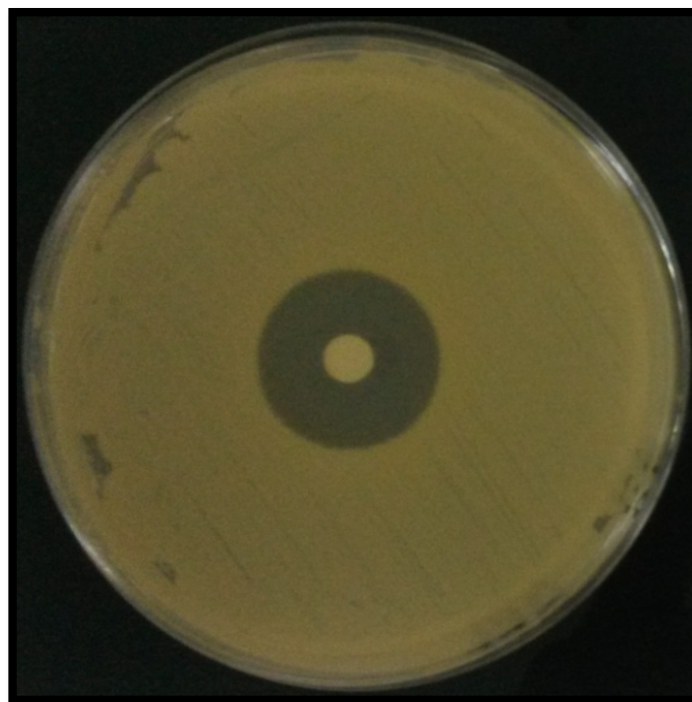
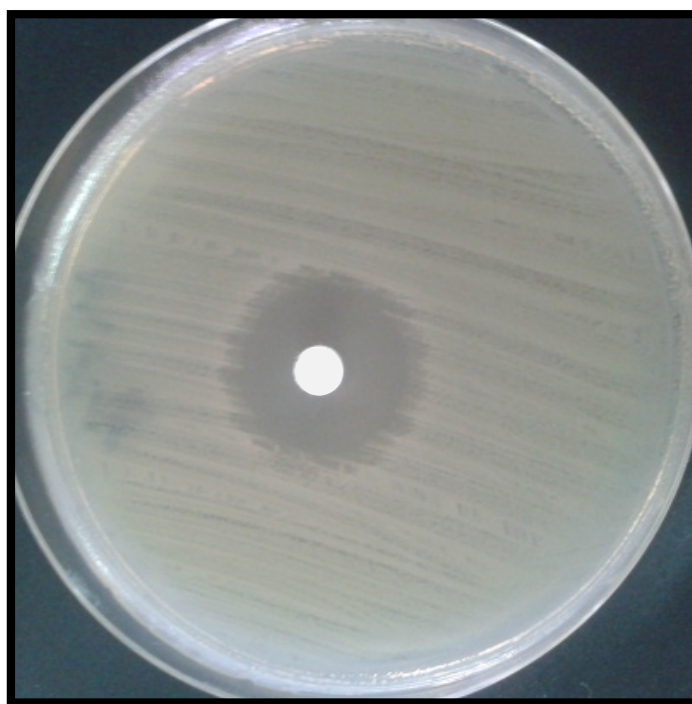


Figure. 55. Aromatogramme de *Staphylococcus aureus* par l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L.



**Figure. 56.** Aromatogramme de *Enterococcus faecalis* par l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L.

### V.3.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été définie comme la plus faible concentration des échantillons testés où l'absence de croissance a été enregistrée (Ponce *et al.*, 2003). La CMI de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. a été testée à des concentrations allant de 1/100 à 1/5000 (v/v). Les valeurs de CMI indiquées dans le tableau (18), montrent que l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. a révélé une forte activité inhibitrice contre tous les germes testés. Bien que les microorganismes étudiés n'expriment pas la même sensibilité. Les données indiquent que *Helicobacter pylori* est inhibé à une concentration de 1/1000 (v/v) (fig. 57), tandis que *Escherichia coli*, *Morganilla morganii* et *Staphylococcus aureus* ont été inhibées à une concentration de 1/500 (v/v). Cependant, une plus grande valeur de CMI de 1/250 (v/v) a été obtenue avec *Enterobacter cancerogenus*, *Serratia fonticola* et *Enterococcus faecalis*.



**Tableau. 18.** Concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. vis-à-vis les sept bactéries testées.

Bactéries	Concentration de l'huile essentielle								
	1/100	1/250	1/500	1/1000	1/2000	1/3000	1/4000	1/5000	CN (T)
<i>Helicobacter pylori</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Morganella morganii</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia fonticola</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+

- : Absence de croissance ; + : Présence de croissance.

Les différences dans les valeurs de CMI, peuvent être liées à la susceptibilité différentielle de la paroi cellulaire bactérienne, qui est la barrière fonctionnelle aux différences mineures présentes dans la membrane externe dans la composition de la paroi cellulaire (Zhao *et al.*, 2001). Les bactéries à coloration de Gram-négative sont entourées par une mince paroi cellulaire peptidoglycane qui est elle-même entourée d'une membrane externe contenant un lipopolysaccharide qui crée une barrière contre les composés hydrophobes tels que ceux trouvés dans les huiles essentielles, tandis que les bactéries à coloration de Gram-positif ne présentent pas une membrane externe mais sont entouré par des couches de peptidoglycane, plus épaisses que ce qui se trouve chez les bactéries à coloration de Gram-négative (Silhavy *et al.*, 2010).

Koutsoudaki *et al.* (2005) et Burt (2004) ont signalé que les extraits végétaux sont plus actifs contre les bactéries à coloration de Gram-positif que les bactéries à coloration de Gram-négative. Cependant, les résultats de cette étude sont soutenus par une hypothèse de Zaika (1988) qui a proposé que les bactéries à coloration de Gram-positif soient plus résistantes que les bactéries à coloration de Gram-négative aux propriétés antibactériennes des huiles essentielles. En effet, plusieurs chercheurs ont signalé qu'il existe une relation entre les composés volatils les plus abondants dans l'huile essentielle testée et l'activité antimicrobienne (Ghalem et Mohamed, 2009 ; Koutsoukadi *et al.*, 2005).

Selon Rios et Recio (2005), les extraits ou les huiles des espèces végétales avec des valeurs de CMI inférieures à 100 µg/ml sont considérés comme prometteurs en tant qu'agents antimicrobiens potentiels. Haloui *et al.* (2015) ont signalé que l'huile essentielle présentait un effet antibactérien plus élevé avec des valeurs de CMI de 0.015, 0.5, 1 et 4% de moins que





l'huile essentielle de brindilles avec des valeurs de CMI de 0,5, 4, 4 et 16% contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, respectivement.

Selon Hafse *et al.* (2017), la concentration minimale inhibitrice pour *Mycobacterium aurum*, *Bacillus sp.* et *Staphylococcus aureus* était de 1/250 (v/v), tandis que les souches les plus résistantes étaient *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* et *Salmonella sp.* Avec une CMI de 1/125 (v/v). D'autre part, Medjkane *et al.* (2016) ont signalé une forte activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. contre les isolats cliniques algériens de *Helicobacter pylori* avec une CMI de 1/5000 (v/v).

Dans cette étude, l' $\alpha$ -pinène (42,13%) est le principal composé d'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. étudié. Plusieurs auteurs ont indiqué que les huiles essentielles riches en  $\alpha$ -pinène ont démontré une activité antibactérienne potentielle. L'efficacité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. est due à un certain nombre de ses composants fonctionnant de manière synergique (Derwich *et al.*, 2010).





Figure. 57. Concentration minimale inhibitrice des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L. vis à vis *Helicobacter pylori*.



A decorative graphic consisting of a thin vertical line on the left side, a thin horizontal line at the top, and a wider vertical bar on the left side, all in light gray.

# Conclusion



## Conclusion

Les bactéries multirésistantes du tube digestif humain, sont des agents étiologiques de pathologies gastro-intestinales telles les gastrites chroniques et les ulcères. Ils jouent un rôle important dans la genèse des cancers gastriques.

Ceci a conduit à réviser le traitement, du fait que le germe incriminé est résistant aux antibiotiques prescrits (Huwez et Thirlwell, 1998). Les traitements antibiothérapeutiques restent cependant impuissants devant une telle circonstance.

La méthode traditionnelle de l'utilisation de plantes médicinales reste une issue pour traiter les pathologies d'origine microbienne.

*Pistacia lentiscus* L. est notre plante de choix, nos ancêtres l'utilisaient pour guérir les maux d'estomac en mâchant le mastic excrété par cet arbre au niveau du tronc. En effet ce dernier contient des huiles essentielles susceptibles de donner un effet thérapeutique satisfaisant (Baudoux, 2008).

Nous nous sommes intéressés d'exploiter les autres parties de la plante et en extraire les huiles essentielles des feuilles et des rameaux par l'hydrodistillation, dont l'intention d'éradiquer les germes multirésistants.

Ce travail a été réalisé pour étudier la composition chimique des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L. et pour évaluer son activité antibactérienne *in vitro*. Sur la base des résultats de l'analyse de composition de l'huile, l' $\alpha$ -pinène a été détecté comme composé principal. Les résultats des tests d'activité antibactérienne indiquent que l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. présentait un degré élevé d'activité inhibitrice contre la plupart des agents pathogènes testés.

### Perspectives

Dans l'ensemble, cette étude appuie davantage 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'agents antimicrobiens pour des applications industrielles telles que la conservation des produits pharmaceutiques, de la parfumerie et des aliments.

Néanmoins, des études *in vivo* devraient être menées pour justifier et évaluer l'utilisation potentielle des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L.



A vertical grey bar is positioned on the left side of the page, extending from the top to the bottom. A thin black horizontal line crosses the top of the page, intersecting the vertical bar.

# **Références Bibliographiques**

## REMERCIEMENTS

Avant tout, je remercie « **ALLAH** » tout puissant de m'avoir donné la force, la volonté et le courage pendant toutes ces années d'études pour concrétiser ce travail.

Je tiens à remercier en deuxième lieu mon pays et l'Université Algérienne.

Sans oublier d'exprimer mes plus vifs remerciements à :

- **Mr. MIKHALDI Abdelkader** ; Professeur à l'Université de Mostaganem qui m'a fait l'honneur de présider le jury de thèse.
- **Mr. DJIBAOUI Rachid** ; Directeur de thèse et Professeur à l'Université de Mostaganem, qu'il soit assuré de ma plus profonde reconnaissance et de mes chaleureux remerciements pour son soutien et sa disponibilité tout au long de cette étude.
- **Mr. BELAHCENE Miloud** ; Professeur au Centre Universitaire de Ain-Timouchent, qui m'a fait l'honneur de participer au Jury de soutenance ; je le remercie profondément.
- **Mr. BEKADA Ahmed Mohamed Ali** ; Professeur au Centre Universitaire de Tissemsilet, d'avoir accepté d'être examinateur de mon travail.
- **M<sup>me</sup>. MALIHAC Caterine** et **Mr. OTMANE Mohamed** ; Maîtres de Conférences A au niveau de l'université du Havre, France, pour l'encadrement pendant mon stage pratique.
- **M<sup>me</sup>. OUAR KORICHI Mounira** ; Professeur et chef de service et aussi **M<sup>me</sup>. TALAB Farida** ; Laborantine et tout le personnel du service d'Entérobactériologie au niveau de l'Institut Pasteur d'Algérie (Alger), qui ont préparé l'environnement idéal pour réaliser une grande partie de ce travail de recherche.
- **Mr. DAHLOUM Lahouari** ; Maîtres de Conférences B à l'Université de Mostaganem, pour son encouragement sur tous les plans et tout au long de cette thèse.
- **Dr ITTALHI. M, NEKKA. H, REZIGA. C, MORALENT. B, AMRANE. H** et tout le personnel du Laboratoire de l'Hôpital de Ain-Tedeles.
- ✓ **Mr. BENALIWA, BENYAMINA. M, WAHIOUN. L, RAHOU. N** et tout le personnel du Laboratoire d'hygiène de Mostaganem, pour leur soutien au cours de ces études.
- ✓ **M<sup>elle</sup>. LAZRAGUE. H, M<sup>me</sup>. AMIR. F et M<sup>me</sup>. HAMED. D, M<sup>elle</sup>. TEHLAITI. A** ; laborantins de l'Université de Mostaganem, pour leurs rôles importants dans l'achèvement de cette expérimentation.
- ✓ **M<sup>elle</sup>. HAMANI. F** ; pour sa présence durant la période de la récolte de la plante.
- ✓ **Mes parents**, mes frères et sœurs, mes remerciements les plus chaleureux, pour leurs soutiens, leurs amours, gentillesse et encouragement tout au long de mes études.
- ✓ Je tiens à exprimer mes remerciements les plus chaleureux à ma femme **M<sup>me</sup>. ARABI-SISBANE. I** ; pour son soutien et sa présence continue au cours de la réalisation de ce travail.
- ✓ **M<sup>me</sup>. MAZOUZ. OK, Mr. BELHALHALI. K, Mr. Azeddine, Mr. Moussa, Mr. Youcef et Mr. Samir**, je leur exprime ici toute ma reconnaissance pour m'avoir donné la possibilité de réaliser mon stage au Havre.
- ✓ Je voudrais également remercier l'ensemble de mes collègues ; **HAMOUM. H, DAHAH. H, IDER. A, AREZKI. M, OUAINI. A, LATTAB. A, BECHELAGHEM. N, ABDELI. W, CHIBANI. H, KACEM. I, ZERGOUG. A, BENCHOUK. A, BENGUENEB. A et BENSLIMANE. S**, avec lesquels j'ai vécu de bons moments.
- ✓ **Mr. Le Doyen** de la Faculté des sciences mathématiques et informatiques, ainsi les agents de sécurité du site II, pour le respect tout au long de ce travail.
- ✓ **Mr. Ahcen, Mr. Abdelkader, Mr. Kamel, Mr. Mofdi, Mr. Mounir, Mr. Bilal, M<sup>me</sup>. Boubchiche** ; Chercheurs aux centres de recherches : CSC, CNRDPA et l'école ENSSMAL, pour la réalisation de mon stage pratique à Alger.

Mes remerciements vont également à l'adresse de mes amis **BOUAGUADA. D, BENOTMANE. K, BOUTEBAL. A, ELKETROUSSI MA et BENSSEKRANE. M** et de toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

*ARABI Abed*

A vertical grey bar is positioned on the left side of the page, starting from the top horizontal line and extending downwards. A thin black horizontal line spans the width of the page near the top.

# **Annexes**



## Techniques

### Coloration de Gram

- Réaliser un frottis ou un étalement.
- Fixer la préparation à la flamme sans dépasser 50 - 60° (brièvement supportable à la main), ce qui les sèche puis laisser refroidir la lame.
- Immerger (ou inonder) les lames dans la solution de Cristal Violet pendant 1mm.
- Lavage à l'eau en transvasant les lames ou sous le robinet.
- Immerger (ou inonder) les lames dans du Lugol pendant 1 mn en les agitant.
- Laver à nouveau à l'eau.
- 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.
- Laver à l'eau.
- Contre colorer avec la solution de safranine diluée ou de fuchsine diluée pendant 20 à 30 secondes.
- Laver à l'eau et sécher à l'air ou en chauffant vers 50° . Les lames doivent être parfaitement sèches.
- Observer à l'objectif x 100, en immersion avec de l'huile à immersion.

### Coagulase

#### MODE D'EMPLOI

- Reprendre le lyophilisat en y ajoutant aseptiquement 6 mL d'eau distillée stérile.
- Agiter le flacon plusieurs fois de façon à assurer une complète dissolution, tout en évitant la formation de mousse.
- Dans un tube à hémolyse introduire successivement :
  - 0,3 mL de Plasma de Lapin reconstitué.
  - 0,1 mL d'une culture de 24 heures pratiquée dans un bouillon coeur-cervelle (BK015), à partir du staphylocoque à tester.
- Bien homogénéiser.
- Incuber les tubes au bain d'eau thermostaté à 37 °C.

#### LECTURE

La réaction est considérée comme positive lorsque le coagulum occupe les 3/4 du volume initialement mis en jeu. En principe, la coagulation se manifeste en moins de 3 heures et le plus souvent le caillot adhère aux parois du tube. Parfois la coagulation se produit plus lentement; dans ce cas la réaction doit être considérée comme positive, si un caillot apparaît en moins de 24 heures.

A titre de contrôle, ajouter 0,1 mL de bouillon coeur-cervelle (BK015) stérile à 0,3 mL de Plasma de Lapin reconstitué. Ce tube témoin ne devra pas montrer de signe de coagulation en 24 heures d'incubation.





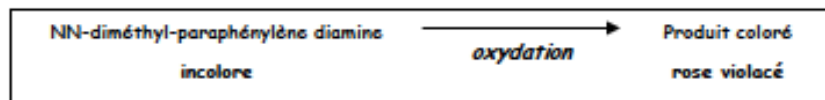
## L'OXYDASE

### 1. Intérêt

La recherche de l'oxydase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram -.

### 2. Principe

Le test consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif incolore (la NN-diméthyl-paraphénylène diamine) en un dérivé rose violacé.



### 3. Technique

- placer un disque non imprégné sur une lame à l'aide d'une pince flambée,
- déposer une goutte de réactif sur le disque non imprégné,
- avec une pipette Pasteur prélever une colonie sur milieu solide (GO) et la déposer doucement sur le disque



#### Remarques :

- o Ne pas utiliser l'anse métallique pour prélever les bactéries. En effet, le métal peut être recouvert d'un oxyde et donner un résultat faussement positif.
- o Le milieu solide ne doit pas contenir d'indicateur de pH, ni de glucides

### 4. Lecture

Pas de lecture avant 30 secondes environ

Tâche rose violette	Pas de tâche rose violette
La bactérie possède l'activité oxydase, elle est dite :	La bactérie ne possède pas l'activité oxydase, elle est dite :
Oxydase +	Oxydase -

#### Causes d'erreurs :

- o réalisation du test sur un milieu glucidique (une fermentation peut cacher une respiration)
- o humidification trop importante du disque, entraînant une élimination du réactif
- o quantité de bactéries insuffisante
- o réactif périmé (l tester avec une souche oxydase + et une souche oxydase -)
- o utilisation d'un instrument « oxydase + »
- o lecture trop tardive : au delà de 30 secondes



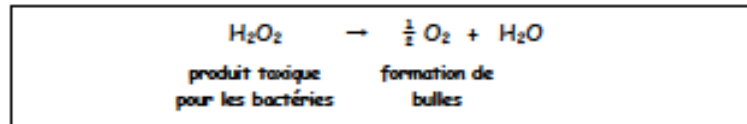
## LA CATALASE

### 1. Intérêt

La recherche de la catalase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram +.

### 2. Principe

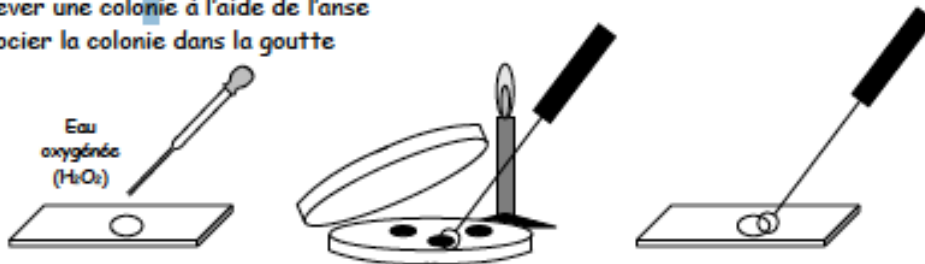
La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) :



Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles.

### 3. Technique

- déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (= peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur
- prélever une colonie à l'aide de l'anse
- dissocier la colonie dans la goutte



**Remarque :** l'utilisation de l'anse est possible à condition qu'elle ne possède pas d'action catalasique, ce que l'on vérifiera facilement par un test sans bactérie.

### 4. Lecture

Bulles d'oxygène	Pas de bulle
La bactérie possède la catalase, elle est dite :	La bactérie ne possède pas la catalase, elle est dite :
Catalase + <span style="display: inline-block; border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; vertical-align: middle; text-align: center; margin-left: 20px;"> </span>	Catalase - <span style="display: inline-block; border: 1px solid black; width: 40px; height: 40px; vertical-align: middle; text-align: center; margin-left: 20px;"> </span>

#### Causes d'erreurs :

- o réalisation du test sur un milieu contenant la catalase  
Exemple : réalisation du test à partir de colonies prélevées sur gélose au sang (l'hémoglobine possède une activité catalasique pouvant donc donner des résultats faussement positifs)
- o quantité de bactéries insuffisante
- o eau oxygénée périmée (la tester avec une souche catalase +)

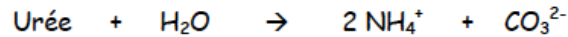


## Uréase

### Principe

- recherche de l'uréase

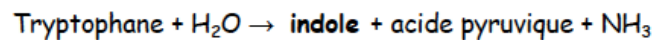
L'**uréase** dégrade l'urée selon la réaction suivante :



Les ions  $\text{CO}_3^{2-}$  vont entraîner une **forte alcalinisation** du milieu qui sera révélée par un virage de l'indicateur de pH (le rouge de phénol) à sa teinte basique (rouge).

- recherche de la production d'indole (mise en évidence de la tryptophanase)

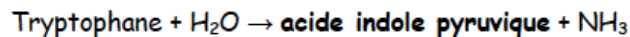
La **tryptophanase** hydrolyse le tryptophane selon la réaction suivante :



L'**indole** forme un **complexe coloré en rouge** en présence d'un réactif : le **réactif de Kovacs**.

- recherche de la tryptophane désaminase

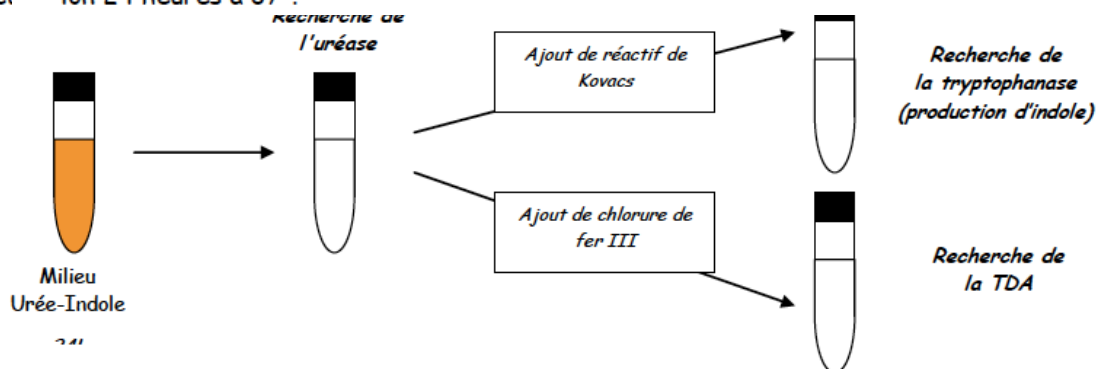
La **TDA** dégrade le tryptophane selon la réaction suivante :





L'**acide indole pyruvique** forme un **précipité marron foncé** en présence d'un réactif : le **chlorure de fer en solution acide**.

### Ensemencement

- Ensemencer avec quelques gouttes de suspension bactérienne ou avec une colonie prélevée à l'anse sur un milieu solide.
- Incuber 24 heures à 37°.



Caractère recherché	Observation	Interprétation	Conclusion
Uréase (lecture après 24 heures d'incubation)	 Milieu rouge	Alcalinisation du milieu due à la dégradation de l'urée	La bactérie possède l'uréase Elle est dite <b>uréase +</b>
	 Milieu orangé (inchangé)	Pas d'alcalinisation du milieu	La bactérie ne possède pas l'uréase Elle est dite <b>uréase -</b>





## Milieux de culture



### Gélose lactosée au BCP

#### DOMAINE D'UTILISATION

La gélose lactosée au pourpre de bromocrésol (BCP) est un milieu non sélectif, utilisé pour les détection et isolement des entérobactériacées dans l'eau et les produits alimentaires.

#### HISTORIQUE

Initialement décrit par Wurtz en 1892, le tournesol a été remplacé par le pourpre de bromocrésol, plus sensible et plus stable.

#### PRINCIPES

- La fermentation du lactose en acide est révélée, en présence de pourpre de bromocrésol, par le virage du bleu violacé au jaune.
- Les germes lactose-négatif donnent des colonies de couleur bleue.

#### PREPARATION

- Mettre en suspension 31,0 g de milieu déshydraté (BK023) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

#### NOTA :

Une liquéfaction partielle de l'agar entraînera inévitablement une altération significative de la consistance du gel du milieu solidifié, après stérilisation et refroidissement.

#### MODE D'EMPLOI

- Refroidir et maintenir le milieu à 44-47°C.
- Couler en boîtes de Petri stériles.
- Laisser solidifier sur une surface froide.
- Faire sécher les boîtes à l'étuve, couvercle entrouvert.
- Ensemencer en stries l'inoculum.
- Incuber à 37°C de 18 à 24 heures.

#### NOTA :

Cette durée d'incubation ne doit pas être dépassée, sinon l'acidification du milieu peut entraîner des erreurs d'interprétation.





## LECTURE

Les colonies lactose-positif sont de couleur jaune et se différencient en fonction des aspects suivants :

- colonies muqueuses : *Klebsiella*, *Escherichia coli*.
- colonies bleutées à la périphérie : *Escherichia coli* lactose-lent.
- colonies "smooth" ou "rough", laissant passer la lumière lorsqu'elles sont examinées par transparence : *Escherichia coli*, *Citrobacter*.

Les colonies lactose-négatif sont de couleur bleue.

## FORMULE - TYPE

(pouvant être ajustée de façon à obtenir des performances optimales)

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....	5,0 g
- Extrait de viande.....	3,0 g
- Lactose.....	10,0 g
- Pourpre de bromocrésol.....	25,0 mg
- Agar agar bactériologique.....	13,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,0 ± 0,2.

## CONTRÔLE QUALITE

- Milieu déshydraté : poudre beige vert, fluide et homogène.
- Milieu préparé : gélose violette.
- Réponse culturale typique après 24 heures d'incubation à 37°C :

Microorganismes	Croissance	Fermentation du lactose
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	bonne, score 2	positive
<i>Escherichia coli</i> RIVM WR1	bonne, score 2	positive
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	bonne, score 2	positive
<i>Salmonella</i> Enteritidis CIP 82.97	bonne, score 2	négative
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP 82.118	bonne, score 2	négative

## STOCKAGE / CONSERVATION

Milieu déshydraté : 2-30°C.

- La date de péremption est mentionnée sur l'étiquette.
- Milieu préparé en flacons : 6 mois à 2-8°C, à l'obscurité (à titre indicatif).
- Milieu préparé en boîtes : 15 jours à 2-8°C, à l'obscurité (à titre indicatif).

## PRESENTATION

Code

Milieu déshydraté :

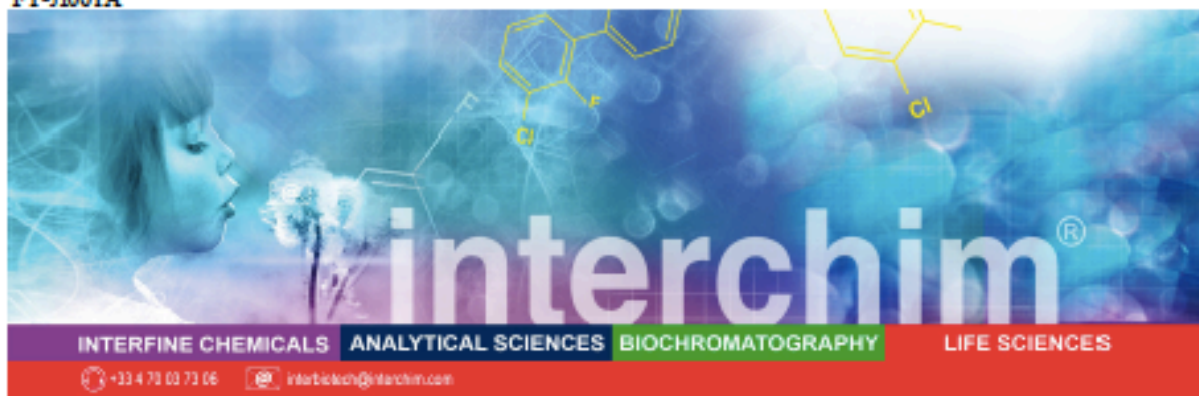
- Flacon de 500 g

BK023HA





FT-JI061A



## Brain Heart Infusion Broth (BHI Broth)

*For the growth of pathogenic cocci and other microorganisms including aerobic and anaerobic bacteria from a variety of clinical and nonclinical materials*

### Product Description

<b>Name :</b>	<b>Brain Heart Infusion Broth</b>			
<b>Catalog Number :</b>	JI061A, 500 g			
<b>Formula in g/l :</b>	Gelatin Peptone	10.00	Sodium Chloride	5.00
	Beef Heart Infusion	10.00	Disodium Phosphate	2.50
	Calf Brain Infusion	7.50	Dextrose	2.00
	<b>Final pH 7.4 ± 0.2 at 25°C</b>			

**Storage** 2-25°C. Once opened keep powdered medium closed to avoid hydration.

### Directions for use

#### Preparation

Suspend 37 grams of the medium in one liter of distilled water. Mix well and dissolve by heating with frequent agitation. Boil for one minute until complete dissolution. Dispense into appropriate containers and sterilize at 121°C for 15 minutes. The prepared medium should be stored at 2-8°C. The color is amber. For best results, the medium should be used on the same day or, if not, heated in a boiling water bed to expel the dissolved oxygen and left to cool before using.

The dehydrated medium should be homogeneous, free-flowing and light toasted in color. If there are any physical changes, discard the medium.

#### Guidelines for use

BRAIN HEART INFUSION BROTH (BHIB) is a liquid medium rich in nutrients, suitable for the cultivation of several fastidious strains of bacteria, such as streptococci, meningococci and pneumococci, fungi and yeasts. BHIB is recommended in Standard Methods for water testing and in antimicrobial susceptibility tests.

Tubes of 0.5 ml BHI broth are used to cultivate bacteria used in the preparation of inocula for use in microdilution minimal inhibitory concentration (MIC) and identification (ID) test panels.

The nutritionally rich base of Beef heart and Calf brain infusions and Peptone mixture provide nitrogen, vitamins, minerals and amino acids essential for growth of a variety of microorganisms. Dextrose is the carbon energy source and Sodium chloride maintains the osmotic balance.

LIFE SCIENCES



interchim

211 bis, avenue JF Kennedy  
BP 1140 - 03100 Montluçon  
Fax +33 4 70 03 82 60

Hotline +33 4 70 03 73 06 • interbiotech@interchim.com





## FT-JI061A

This medium is very versatile and supports the growth of many fastidious organisms. With the addition of 0.1% agar, the medium is used for the cultivation of anaerobes. Adding 0.1% agar reduces the flow of oxygen convection currents and encourages the development of anaerobes and microorganisms.

BHI Broth is recommended for the preparation of the culture of *S.aureus* for use in coagulase tests.

Inoculate and incubate at  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  for 18-24 hours.

**Microbiological test**

The following results were obtained in the performance of the medium from type cultures after incubation at a temperature of  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  and observed after 18 - 24 hours.

Microorganisms		Growth
<i>Neisseria meningitidis</i>	ATCC 13090	Good with turbidity
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 6303	Good with turbidity
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615	Good with turbidity
<i>Brucella abortus</i>	ATCC 4315	Moderate

**References**

- Chapman. Trans. N.Y. Acad. Science. 9:52. 1946. Newman. J. Milk and Food Technol. 13:226. 1950.
- Roseburg, Epps, and Clark. J. Infection Diseases, 74:131. 1944. APHA Diagnostic Procedures and Reagents. 3rd Edition, 1951.

**Ordering information**

Catalog size quantities and prices may be found at <http://www.interchim.com>.

Please inquire for higher quantities (availability, shipment conditions).

For any information, please ask : Uptima / Interchim; Hotline : +33(0)4 70 03 73 06

[Order on-line](#) or [Contact](#) your local distributor

**Disclaimer :** Materials from Uptima are sold for research use only, and are not intended for food, drug, household, or cosmetic uses. Uptima is not liable for any damage resulting from handling or contact with this product.





## Sélénite F (bouillon)

**DM210.** Milieu de pré-enrichissement des salmonelles.

**Présentation:** voir étiquette sur la boîte.

### Formule\*

Composants:	Concentration :
Mélange de peptones	5.0g/litre
Lactose	4.0g/litre
Phosphate de sodium	10.0g/litre
Hydrogénosélénite de Sodium	4.0g/litre
pH final: 7,1 ± 0,2	

### Conservation

Toutes les boîtes doivent impérativement être bien fermées et stockées jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette dans un endroit sec à une température ne dépassant pas 25°C. Certains milieux se conservent à 2-8°C, se référer à l'étiquette de l'emballage.

### Précautions

Usage In Vitro uniquement. Observer les règles de sécurité et d'hygiène en vigueur. Ne peut être utilisé que par du personnel de laboratoire qualifié. Stériliser les effluents biologiques dangereux avant de les éliminer. Se référer à la fiche de sécurité du produit (disponible sur demande ou via le site internet MAST).

Le bouillon Sélénite F possède les étiquettes de sécurité suivantes :

- R20/22: Nocif par Inhalation et par ingestion.  
R33: Danger d'effets cumulatifs.  
R51/53: Toxique pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique.  
S28: Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment à l'eau.  
S44: En cas de malaise, consulter un médecin (si possible, lui montrer l'étiquette).  
S61: Éviter le rejet dans l'environnement. Consulter les instructions spéciales/la fiche de données sécurité.

### Matériels nécessaires non fournis

Réactifs et équipements microbiologiques standards (anses, suppléments sélectifs MAST, écouvillons, ensemencement, autoclaves et incubateurs, etc...) ainsi que des réactifs sérologiques et biochimiques et des additifs tels que le sang.

### Préparation

1. Se référer à l'étiquette de la boîte pour les volumes et quantités nécessaires. Préparer le bouillon Sélénite F MAST (DM210) en dissolvant la poudre dans de l'eau distillée ou désionisée.
2. Chauffer doucement pour dissoudre.
3. Répartir dans les récipients adéquats (flacons ou tubes). Une hauteur d'au moins 5 cm est recommandée, car la Salmonella survit mieux à des taux d'oxygène bas.
4. Stériliser en portant à ébullition dans un bain marie ou en cuisant à la vapeur, pendant 10 minutes.
5. Un précipité jaune peut se former. Cela n'a pas d'effets sur les propriétés de croissance du milieu. Trop chauffer donnera un précipité orange et cela peut affecter les propriétés du milieu. NE PAS AUTOCLAVER.
6. Ensemencer directement avec les selles. L'examen des urines est meilleur lorsque l'on ajoute un volume équivalent pour doubler la concentration du bouillon Sélénite F MAST.
7. Incuber à 35-43°C pendant 12-24 heures.

### Interprétation des résultats

Après incubation noter la croissance des germes, indiquée par la turbidité du milieu.

### Contrôle de qualité

Le tableau ci-dessous reprend les résultats de certaines souches de contrôle utilisées en routine, et qui peuvent être facilement obtenues par l'utilisateur à partir de la gamme MAST QC STICKS™:

Souches test	Résultat
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Croissance
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inhibition partielle à forte

Contrôle de qualité de l'utilisateur: vérifier tous signes de détérioration. Le contrôle de qualité doit être effectué avec au moins une souche pour qu'il soit valide. Ne pas utiliser le produit si le résultat d'une souche de contrôle est incorrect.

### Références

Bibliographie disponible sur demande.





**Mast Group Ltd.**  
Mast House, Derby Road, Bootle  
Liverpool, Merseyside, L20 1EA  
United Kingdom  
Tel: + 44 (0) 151 472 1444  
Fax: + 44 (0) 151 944 1332  
email: sales@mastgrp.com  
Web: www.mastgrp.com

**Mast Diagnostica GmbH**  
Feldstrasse 20  
DE-23858 Reinfeld  
Germany  
Tel: + 49 (0) 4533 2007 0  
Fax: + 49 (0) 4533 2007 68  
email: mast@mast-diagnostica.de  
Web: www.mastgrp.com

**Mast Diagnostic**  
12 rue Jean-Jacques Mention  
CS91106, 80011 Amiens, CEDEX 1  
France  
Tél: + 33 (0) 3 22 80 80 67  
Fax: + 33 (0) 3 22 80 99 22  
email: info@mast-diagnostic.fr  
Web: www.mastgrp.com



## Brucella (gélose)

**DM107.** Milieu pour l'isolement et la culture de Brucella.

**Présentation:** voir étiquette sur la boîte.

### Formule\*

Composants:	Concentration :
Mélange de peptones	17,5 g/litre
Extrait de levure	1,0 g/litre
D-Glucose	10,0 g/litre
Chlorure de sodium	5,0 g/litre
Agar	12,0 g/litre
Final pH: 7,5 ± 0,2	

### Conservation

Toutes les boîtes doivent impérativement être bien fermées et stockées jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette dans un endroit sec à une température de 10 à 25°C.

### Précautions

Usage In Vitro uniquement. Observer les règles de sécurité et d'hygiène en vigueur. Ne peut être utilisé que par du personnel de laboratoire qualifié. Stériliser les effluents biologiques dangereux avant de les éliminer. Se référer à la fiche de sécurité du produit (disponible sur demande ou via le site internet MAST).

### Matériels nécessaires non fournis

Réactifs et équipements microbiologiques standards (anses, suppléments sélectifs MAST, écouvillons, ensemenceurs, autoclaves et incubateurs, etc...) ainsi que des réactifs sérologiques et biochimiques et des additifs tels que le sang.

### Préparation

1. Dissoudre 45.5g de poudre dans 1 litre d'eau distillée ou desionisée.
2. Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.
3. Refroidir à 50°C et ajouter 5% de sérum de cheval inactivé (inactiver en portant à 56°C pendant 30 minutes).
4. Si nécessaire, le milieu peut devenir sélectif par ajout de divers suppléments sélectifs MAST.
5. Bien mélanger puis couler le milieu en boîte de Pétri (15 à 20 ml par boîte) et laisser reposer.
6. Les boîtes préparées peuvent être utilisées immédiatement ou stockées dans des sacs en plastiques à 2 à 8°C pendant une semaine au plus.
7. Ensemencer les boîtes en surface, par épuisement pour obtenir des colonies isolées.
8. Incuber les boîtes en aérobie à 35 à 37°C pendant 24 à 72 heures. Quelques espèces de *Brucella abortus* peuvent aussi nécessiter la présence de 5 à 10% de CO<sub>2</sub> pendant l'isolement primaire.

### Interprétation des résultats

Après incubation noter la croissance des germes. Les caractères typiques à noter comprennent: taille et morphologie des colonies et hémolyse sur gélose au sang.

### Contrôle de qualité

Vérifier tous signes de détérioration. Le contrôle de qualité doit être effectué avec au moins une souche pour qu'il soit valide. Ne pas utiliser le produit si le résultat d'une souche de contrôle est incorrect. La liste ci-dessous montre la performance de souches de contrôle que l'utilisateur peut se procurer facilement.

Souches test	Résultat
<i>Brucella abortus</i> ATCC® 4315	Croissance
<i>Brucella melitensis</i> ATCC® 4309	Croissance
<i>Brucella suis</i> ATCC® 4314	Croissance

### Références

Bibliographie disponible sur demande.

IFU308 FR 12/16 V6  
MAST est une marque déposée  
ATCC est une marque déposée de American  
Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA.  
\*La formule peut varier pour optimiser les performances du milieu





**Mast Group Ltd.**  
Mast House, Derby Road, Bootle  
Liverpool, Merseyside, L20 1EA  
United Kingdom  
Tel: + 44 (0) 151 472 1444  
Fax: + 44 (0) 151 944 1332  
email: sales@mastgrp.com  
Web: www.mastgrp.com

**Mast Diagnostica GmbH**  
Feldstrasse 20  
DE-23858 Reinfield  
Germany  
Tel: + 49 (0) 4533 2007 0  
Fax: + 49 (0) 4533 2007 68  
email: mast@mast-diagnostica.de  
Web: www.mastgrp.com

**Mast Diagnostic**  
12 rue Jean Jacques Mention  
CS91106, 80011 Amiens, CEDEX 1  
France  
Tél: + 33 (0) 3 22 80 80 67  
Fax: + 33 (0) 3 22 80 99 22  
email: info@mast-diagnostic.fr  
Web: www.mastgrp.com

**Mast  
Group**



## Cœur-cervelle (gélose)

**DM104.** Milieu polyvalent pour la culture des germes exigeants.

**Présentation:** voir étiquette sur la boîte.

### Formule\*

Composants:	Concentration:
Mélange spécial de peptones	12,0 g/litre
Extrait de levure	2,0 g/litre
Infusion de cervelle et de cœur (solides)	3,5 g/litre
Hydrolysate pancréatique de caséine	10,0 g/litre
Glucose	2,0 g/litre
Chlorure de sodium	5,0 g/litre
Phosphate disodique	0,6 g/litre
Agar	12,0 g/litre
pH final: 7,3 ± 0,2	

### Conservation

Toutes les boîtes doivent impérativement être bien fermées et stockées jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette dans un endroit sec à une température de 10 à 25°C.

### Précautions

Usage In Vitro uniquement. Observer les règles de sécurité et d'hygiène en vigueur. Ne peut être utilisé que par du personnel de laboratoire qualifié. Stériliser les effluents biologiques dangereux avant de les éliminer. Se référer à la fiche de sécurité du produit (disponible sur demande ou via le site internet MAST).

### Matériels nécessaires non fournis

Réactifs et équipements microbiologiques standards (anses, suppléments sélectifs MAST, écouvillons, ensemencement, autoclaves et incubateurs, etc...) ainsi que des réactifs sérologiques et biochimiques et des additifs tels que le sang.

### Préparation

1. Dissoudre 47.0g de poudre dans 1 litre d'eau distillée ou desionisée.
2. Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.
3. Refroidir à 50 à 55°C puis maintenir à cette température dans un bain marie. Ajouter 5 à 7% de sang de mouton ou de cheval défibriné et stérile. Les géloses au sang cuit (gélose chocolat) peuvent aussi être préparées. D'autres suppléments de croissance peuvent être utilisés.
4. Si nécessaire, le milieu peut devenir sélectif par ajout de divers suppléments sélectifs.
5. Couler le milieu en boîte de Pétri (15 à 20 ml par boîte) et laisser reposer.

6. Les boîtes préparées peuvent être utilisées immédiatement ou stockées dans des sacs en plastique à 2 à 8°C pendant une semaine au plus.
7. Ensemencer la boîte par épuisement pour obtenir des colonies isolées.
8. Incuber les boîtes en aérobie pendant 18 à 24 heures à 35 à 37°C (ou à d'autres températures selon la méthode suivie).

### Interprétation des résultats

Après incubation noter la croissance des germes. Les caractères typiques à noter comprennent: taille et morphologie des colonies, pigmentation et hémolyse sur gélose au sang.

### Contrôle de qualité

Vérifier tous signes de détérioration. Le contrôle de qualité doit être effectué avec au moins une souche pour qu'il soit valide. Ne pas utiliser le produit si le résultat d'une souche de contrôle est incorrect. La liste ci-dessous montre la performance de souches de contrôle que l'utilisateur peut se procurer facilement.

Souches test	Résultat
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Croissance, colonies grises
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212	Croissance, colonies gris/vert
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	Croissance, colonies grises
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	Croissance, colonies blanc/doré

### Références

Bibliographie disponible sur demande.

IFU305 FR 07/16 V5  
MAST est une marque déposée  
ATCC est une marque déposée de American  
Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA.  
\*La formule peut varier pour optimiser les performances du milieu





**Mast Group Ltd.**  
Mast House, Derby Road, Bootle  
Liverpool, Merseyside, L20 1EA  
United Kingdom  
Tel: + 44 (0) 151 472 1444  
Fax: + 44 (0) 151 944 1332  
email: sales@mastgrp.com  
Web: www.mastgrp.com

**Mast Diagnostica GmbH**  
Feldstrasse 20  
DE-23858 Reinfeld  
Germany  
Tel: + 49 (0) 4533 2007 0  
Fax: + 49 (0) 4533 2007 68  
email: mast@mast-diagnostica.de  
Web: www.mastgrp.com

**Mast Diagnostic**  
12 rue Jean Jacques Mention  
CS91106, 80011 Amiens, CEDEX 1  
France  
Tél: + 33 (0) 3 22 80 80 67  
Fax: + 33 (0) 3 22 80 99 22  
email: info@mast-diagnostic.fr  
Web: www.mastgrp.com

**Mast  
Group**



## Columbia (gélose)

**DM115.** Gélose nutritive pour la croissance des germes difficiles.

**Présentation:** voir étiquette sur la boîte.

### Formule\*

Composants:	Concentration
Mélange spécial de peptones	20,0 g/L
D-Glucose	0,5 g/L
Amidon	1,0 g/L
Chlorure de sodium	5,0 g/L
Agar A	12,5 g/L
pH final: 7,3 ± 0,2	

### Conservation

Toutes les boîtes doivent impérativement être bien fermées et stockées jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette dans un endroit sec à une température de 10 à 25°C.

### Précautions

Usage In Vitro uniquement. Observer les règles de sécurité et d'hygiène en vigueur. Ne peut être utilisé que par du personnel de laboratoire qualifié. Stériliser les effluents biologiques dangereux avant de les éliminer. Se référer à la fiche de sécurité du produit (disponible sur demande ou via le site internet MAST).

### Matériels nécessaires non fournis

Réactifs et équipements microbiologiques standards (anses, suppléments sélectifs MAST, écouvillons, ensemencateurs, autoclaves et incubateurs, etc...) ainsi que des réactifs sérologiques et biochimiques et des additifs tels que le sang.

### Préparation

1. Dissoudre 39.0g de poudre dans 1 litre d'eau distillée ou desionisée.
2. Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.
3. Refroidir à 50 à 55°C puis maintenir à cette température dans un bain marie. Ajouter 5 à 7% de sang de mouton ou de cheval défibriné et stérile. Les géloses au sang cuit (gélose chocolat) peuvent aussi être préparées. D'autres suppléments de croissance peuvent être utilisés.
4. Si nécessaire, le milieu peut devenir sélectif par ajout de divers suppléments sélectifs.
5. Couler le milieu en boîte de Pétri (15 à 20 ml par boîte) et laisser reposer.
6. Les boîtes préparées peuvent être utilisées immédiatement ou stockées dans des sacs en plastiques à 2 à 8°C pendant une semaine au plus.
7. Ensemencer la boîte par épuisement pour obtenir des colonies isolées.

8. Incuber les boîtes en aérobie pendant 18 à 24 heures et en anaérobie pendant 72 heures au plus à 35 à 37°C (ou à d'autres températures selon la méthode suivie).

### Interprétation des résultats

Après incubation noter la croissance des germes. Les caractères typiques à noter comprennent : taille et morphologie des colonies, pigmentation et hémolyse sur gélose au sang.

### Contrôle de qualité

Vérifier tous signes de détérioration. Le contrôle de qualité doit être effectué avec au moins une souche pour qu'il soit valide. Ne pas utiliser le produit si le résultat d'une souche de contrôle est incorrect. La liste ci-dessous montre la performance de souches de contrôle que l'utilisateur peut se procurer facilement.

Souches test	Résultat
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC® 19615	Croissance, β-hémolyse
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	Croissance, pigmentation
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC® 49766	Croissance

### Références

Bibliographie disponible sur demande.

IFU312 FR 06/16 V5  
MAST est une marque déposée  
ATCC est une marque déposée de American  
Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA.  
\*La formule peut varier pour optimiser les performances du milieu





Mast House, Derby Road, Bootle, Merseyside L20 1EA, United Kingdom.  
Tel: +44 (0)151 933 7277 Fax: +44 (0)151 944 1332  
www.mastgrp.com

## Mannitol Salt Agar

**DM 160** A selective medium for the isolation of pathogenic staphylococci.

Typical formula*	grams per litre
Peptone	8.0
Yeast extract	2.0
Lactalbumin	3.0
Sodium chloride	30.0
Mannitol	10.0
Phenol red	0.0225
Lithium chloride	7.0
Glycine	1.0
Sodium pyruvate	3.0
Agar B	12.0

pH approx.7.4

### Directions

1. Suspend by swirling 76g of powder in 1 litre or the contents of the sachet in the stated volume of distilled or deionised water.
2. Autoclave at 121°C (15p.s.i.) for 15 minutes.
3. Mix well before pouring.

### Description

Following the observation by Koch<sup>1</sup> that usually only staphylococci are able to grow on 7.5% salt agar, Chapman<sup>2</sup> described the use of Mannitol Salt Agar for the differential isolation of pathogenic staphylococci. It is worth noting that Gunn *et al*<sup>3</sup> improved the medium by the addition of 2% egg yolk which identified 94.7% of coagulase producing strains. Recent work has shown that some strains of staphylococci may be partially inhibited by the high level of sodium chloride in Chapman's medium.<sup>4,5</sup> To overcome this, the medium has been modified by reducing the sodium chloride concentration from 7.5 to 3.0%.

Inhibition of Gram negative bacilli has been maintained by the inclusion of Lithium chloride. Pyruvate and glycine are included as growth promoters to enhance the recovery of *S.aureus* from samples containing small numbers of the organism.<sup>6,7</sup>

The medium is suitable for use with Oxacillin Selectatab™ (MS29) for the detection of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) using the method described by Lally *et al*<sup>8</sup>.

### In Use

Inoculate plates by spreading the sample over the surface of the medium and incubate at 37°C for up to 48 hours. Pathogenic staphylococci grow well and ferment mannitol, indicated by yellow zones around the colonies, whereas non-pathogenic staphylococci produce smaller white colonies indicating non-fermentation of mannitol.

### References

1. Koch FE. *Zentbl Bakt ParasitKde (Abt.1)* 1942; **149**: 122-124.
2. Chapman GH. *J Bact.* 1945; **50**: 202-203.
3. Gunn BA, Dunkelberg WE, Creitz JR. *Am J Clin Path.* 1972; **57**: 236-240.
4. Van Enk RA, Thompson DK. *J Clin Microbiol.* 1992; **30**: 504-505.
5. Faiers M, George R, Jolly J, Wheat P. *Multipoint Methods in the Clinical Laboratory - A Handbook.* p41 PHLS, Lon 6.
6. Baird Parker AC. *J Appl Bact.* 1962; **25**: 12.
7. Giolloti C, Cantoni C. *J Appl Bact.* 1966; **29**: 395-398.
8. Lally RT, Ederer MN, Woolfrey BF. *J Clin Microbiol.* 1985; **22**: 501-504





**Mast Group Ltd.**  
Mast House, Derby Road, Bootle  
Liverpool, Merseyside, L20 1EA  
United Kingdom  
Tel: + 44 (0) 151 472 1444  
Fax: + 44 (0) 151 944 1332  
email: sales@mastgrp.com  
Web: www.mastgrp.com

**Mast Diagnostica GmbH**  
Feldstrasse 20  
DE-23858 Reinfeld  
Germany  
Tel: + 49 (0) 4533 2007 0  
Fax: + 49 (0) 4533 2007 68  
email: mast@mast-diagnostica.de  
Web: www.mastgrp.com

**Mast Diagnostic**  
12 rue Jean Jacques Mention  
CS91106, 80011 Amiens, CEDEX 1  
France  
Tél: + 33 (0) 3 22 80 80 67  
Fax: + 33 (0) 3 22 80 99 22  
email: info@mast-diagnostic.fr  
Web: www.mastgrp.com

**Mast  
Group**



## Mueller Hinton (Gélose)

**DM170** Gélose standardisée pour les tests de sensibilité aux antibiotiques.

**Présentation:** voir étiquette sur la boîte.

### Formule\*

Composants:	Concentration :
Hydrolysate acide de caséine	17,5 g/litre
Extrait de cœur en pâte	5,0 g/litre
Amidon	1,5 g/litre
Agar	12,0 g/litre
pH final: 7,4 ± 0,2	

### Conservation

Toutes les boîtes doivent impérativement être bien fermées et stockées jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette dans un endroit sec à une température de 10 à 25°C.

### Précautions

Usage In Vitro uniquement. Observer les règles de sécurité et d'hygiène en vigueur. Ne peut être utilisé que par du personnel de laboratoire qualifié. Stériliser les effluents biologiques dangereux avant de les éliminer. Se référer à la fiche de sécurité du produit (disponible sur demande ou via le site internet MAST).

### Matériels nécessaires non fournis

Réactifs et équipements microbiologiques standards (anses, suppléments sélectifs MAST, écouvillons, ensemenceurs, autoclaves et incubateurs, etc...) ainsi que des réactifs sérologiques et biochimiques et des additifs tels que le sang.

### Préparation

- Se référer à l'étiquette sur la boîte pour les volumes et quantités nécessaires. Préparer la gélose Mueller Hinton MAST (DM170) en dissolvant la poudre dans de l'eau distillée ou désionisée. Pour les sachets de milieu, dissoudre tout le contenu du sachet dans le volume d'eau inscrit sur l'étiquette.
- Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.
- Si nécessaire refroidir à 50 à 55°C et maintenir à cette température dans un bain marie. Si nécessaire, ajouter 5 à 7% de sang stérile défibriné pour accroître la croissance des germes difficiles, ou ajouter des antibiotiques (MAST ADATAB™) pour l'étude des CMI.
- D'autres suppléments de croissance peuvent être ajoutés.
- Couler le milieu en boîte de Pétri (15 à 20 ml par boîte) et laisser reposer.
- Les boîtes préparées peuvent être utilisées immédiatement ou stockées dans des sacs en plastiques à 2 à 8°C pendant une semaine au plus.
- L'antibiogramme doit être effectué dans le respect des normes fixés par les organismes réglementaires tels que le CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la

Société Française de Microbiologie), le CLSI® (Clinical and Laboratory Standards Institute) et le EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

### Interprétation des résultats

Après incubation noter le diamètre de la zone d'inhibition ou la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). Interpréter les résultats comme sensible, intermédiaire ou résistant par rapport aux critères donnés par les organismes cités ci-dessus.

### Contrôle de qualité

Vérifier tous signes de détérioration. Le contrôle de qualité doit être effectué avec au moins une souche pour qu'il soit valide. Ne pas utiliser le produit si le résultat d'une souche de contrôle est incorrect. La liste ci-dessous montre la performance de souches de contrôle que l'utilisateur peut se procurer facilement.

Souches test	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212	Croissance et antibiogramme corrects
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Croissance et antibiogramme corrects
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	Croissance et antibiogramme corrects
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	Croissance et antibiogramme corrects

### Références

Bibliographie disponible sur demande.

IFU335 FR 07/16 V3

MAST est une marque déposée

ATCC est une marque déposée de American  
Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA.

\*La formule peut varier pour optimiser les performances du milieu





**Mast Group Ltd.**  
Mast House, Derby Road, Bootle  
Liverpool, Merseyside, L20 1EA  
United Kingdom  
Tel: + 44 (0) 151 472 1444  
Fax: + 44 (0) 151 944 1332  
email: sales@mastgrp.com  
Web: www.mastgrp.com

**Mast Diagnostica GmbH**  
Feldstrasse 20  
DE-23858 Reinfeld  
Germany  
Tel: + 49 (0) 4533 2007 0  
Fax: + 49 (0) 4533 2007 68  
email: mast@mast-diagnostica.de  
Web: www.mastgrp.com

**Mast Diagnostic**  
12 rue Jean Jacques Mention  
CS91106, 80011 Amiens, CEDEX 1  
France  
Tél: + 33 (0) 3 22 80 80 67  
Fax: + 33 (0) 3 22 80 99 22  
email: info@mast-diagnostic.fr  
Web: www.mastgrp.com



## T.S.I. (gélose)

**DM224.** Milieu pour la différenciation des entérobactéries basée sur la production de sulfure d'hydrogène et la fermentation du lactose, du saccharose et du D-glucose.

**Présentation:** voir étiquette sur la boîte.

### Formule\*

Composants:	Concentration:
Mélange de peptones	18,0 g/litre
Extrait de levure	3,0 g/litre
Extrait de viande	4,0 g/litre
Lactose	10,0 g/litre
Saccharose	10,0 g/litre
D-glucose	1,0 g/litre
Chlorure de sodium	5,0 g/litre
Citrate d'ammonium ferrique	0,3 g/litre
Thiosulfate de sodium	0,3 g/litre
Rouge de phénol	0,025 g/litre
Agar	14,0 g/litre
pH final: 7,4 ± 0,2	

### Conservation

Toutes les boîtes doivent impérativement être bien fermées et stockées jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette dans un endroit sec à une température de 10 à 25°C.

### Précautions

Usage In Vitro uniquement. Observer les règles de sécurité et d'hygiène en vigueur. Ne peut être utilisé que par du personnel de laboratoire qualifié. Stériliser les effluents biologiques dangereux avant de les éliminer. Se référer à la fiche de sécurité du produit (disponible sur demande ou via le site internet MAST).

### Matériels nécessaires non fournis

Réactifs et équipements microbiologiques standards (anses, suppléments sélectifs MAST, écouvillons, ensemenceurs, autoclaves et incubateurs, etc...) ainsi que des réactifs sérologiques et biochimiques et des additifs tels que le sang.

### Préparation

- Se référer à l'étiquette de la boîte pour les volumes et quantités nécessaires. Préparer la gélose T.S.I. MAST (DM224) en dissolvant la poudre dans de l'eau distillée ou désionisée. Pour les sachets de milieu, dissoudre tout le contenu du sachet dans le volume d'eau inscrit sur l'étiquette.
- Porter à ébullition pour dissoudre totalement.
- Bien mélanger et répartir dans les récipients adéquats (ex : tubes ou flacons).
- Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.
- Laisser reposer les tubes en position inclinée de manière à avoir une gélose en pente avec un culot de 3,5 cm.

- Obtenir une culture pure de germes à tester à partir d'échantillons cliniques ou alimentaires.
- En utilisant un fil de platine, ensemercer la pente de la gélose en strie centrale puis piquer en profondeur jusqu'à 3 à 5 mm du fond du tube.
- Retirer le fil de platine et strier la surface de la pente.
- Desserrer le couvercle/la fermeture avant l'incubation.
- Une gélose en pente à l'urée (DM228) doit être utilisée en parallèle pour différencier les *Proteus* et certains autres germes.
- Incuber pendant 18 à 48 heures à 35 à 37°C.

### Interprétation des résultats

Après incubation, observer les tubes et noter la production d'acide sur la pente et dans le culot, et les productions de gaz et d'H<sub>2</sub>S. Une pente alcaline et un culot acide (rouge/jaune) indique la fermentation du D-glucose uniquement. Une pente acide et un culot acide (jaune/jaune) indique la fermentation du D-glucose, du lactose et/ou du saccharose. Une pente alcaline et un culot alcalin (rouge/rouge) indique que ni le D-glucose ni le lactose n'ont été fermentés. Des fissures ou des bulles dans le milieu indiquent une production de gaz. Un précipité noir dans le culot indique une production d'H<sub>2</sub>S.

### Contrôle de qualité

Vérifier tous signes de détérioration. Le contrôle de qualité doit être effectué avec au moins une souche pour qu'il soit valide. Ne pas utiliser le produit si le résultat d'une souche de contrôle est incorrect. La liste ci-dessous montre la performance de souches de contrôle que l'utilisateur peut se procurer facilement.

Souches test	Pente	Culot	Gaz	H <sub>2</sub> S
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	A(K)	A	+(-)	-
<i>Shigella sonnei</i> ATCC® 25931	K	A	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC® 29906	K(A)	A	+	+++
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC® 13883	A	A	++	-

A= Acide, K= Alcaline,  
(-)= indique des réactions occasionnelles.

### Références

Bibliographie disponible sur demande.

IFU354 FR 07/16 V3

MAST est une marque déposée  
ATCC est une marque déposée de American  
Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA.

\*La formule peut varier pour optimiser les performances du milieu





**Mast Group Ltd.**  
Mast House, Derby Road, Bootle  
Liverpool, Merseyside, L20 1EA  
United Kingdom  
Tel: + 44 (0) 151 472 1444  
Fax: + 44 (0) 151 944 1332  
email: sales@mastgrp.com  
Web: www.mastgrp.com

**Mast Diagnostica GmbH**  
Feldstrasse 20  
DE-23858 Reinfeld  
Germany  
Tel: + 49 (0) 4533 2007 0  
Fax: + 49 (0) 4533 2007 68  
email: mast@mast-diagnostica.de  
Web: www.mastgrp.com

**Mast Diagnostic**  
12 rue Jean Jacques Mention  
CS91106, 80011 Amiens, CEDEX 1  
France  
Tél: + 33 (0) 3 22 80 80 67  
Fax: + 33 (0) 3 22 80 99 22  
email: info@mast-diagnostic.fr  
Web: www.mastgrp.com



## Wilkins Chalgren (gélose)

**DM235** Milieu recommandé pour la culture et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies.

**Présentation:** voir étiquette sur la boîte.

### Formule\*

Composants:	Concentration:
Hydrolysate enzymatique de caséine	10,0 g/litre
Hydrolysate pancréatique de gélatine	10,0 g/litre
Extrait de levure	5,0 g/litre
Glucose	1,0 g/litre
Chlorure de sodium	5,0 g/litre
Hydrochlorure de L-arginine	1,0 g/litre
Pyruvate de sodium	1,0 g/litre
Hémine	0,005 g/litre
Ménadione	0,0005 g/litre
Agar	12,0 g/litre
pH final: 7,1 ± 0,2	

### Conservation

Toutes les boîtes doivent impérativement être bien fermées et stockées jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette dans un endroit sec à une température de 10 à 25°C.

### Précautions

Usage In Vitro uniquement. Observer les règles de sécurité et d'hygiène en vigueur. Ne peut être utilisé que par du personnel de laboratoire qualifié. Stériliser les effluents biologiques dangereux avant de les éliminer. Se référer à la fiche de sécurité du produit (disponible sur demande ou via le site internet MAST).

### Matériels nécessaires non fournis

Réactifs et équipements microbiologiques standards (anses, suppléments sélectifs MAST, écouvillons, ensemencement, autoclaves et incubateurs, etc...) ainsi que des réactifs sérologiques et biochimiques et des additifs tels que le sang.

### Préparation

- Se référer à l'étiquette sur la boîte pour les volumes et quantités nécessaires. Préparer la gélose Wilkins Chalgren MAST (DM235) en dissolvant la poudre dans de l'eau distillée ou désionisée. Pour les sachets de milieu, dissoudre tout le contenu du sachet dans le volume d'eau inscrit sur l'étiquette.
- Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.
- Refroidir à 50 à 55°C et maintenir à cette température dans un bain marie.
- Si nécessaire, ajouter 5 à 7% de sang de mouton stérile et défibriné pour améliorer la croissance des anaérobies exigeants.

- L'antibiogramme doit être effectué dans le respect des normes fixées par les organismes réglementaires tels que le CA-SFM (Comité de l'antibiogramme – Société Française de Microbiologie), le CLSI® (Clinical and Laboratory Standards Institute).
- Préparer les boîtes pour les tests de sensibilité aux antibiotiques en ajoutant à la gélose les solutions d'antibiotiques appropriées. Un comprimé ADATAB™ MAST peut être dissout dans un diluant adéquat et des dilutions en série peuvent être réalisées à partir de la solution mère.
- Couler le milieu en boîte de Pétri (20 ml par boîte de 100 mm de diamètre ou autres volumes selon la méthode suivie) et laisser reposer.
- Les boîtes préparées doivent être utilisées immédiatement.
- Préparer une suspension bactérienne de chaque germe de densité équivalente à 0,5 McFarland standard. Ensemencer sur chaque test et contrôler la boîte en utilisant par exemple l'ensemencementur SCANURIDOT™, pour délivrer 1 à 5 µl de chaque germe à la surface de la gélose.
- Incuber les boîtes en anaérobiose pendant 48 heures à 35 à 37°C.

### Interprétation des résultats

Après incubation noter la croissance et déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) du germe test. Interpréter les résultats comme sensible, intermédiaire ou résistant par rapport aux critères donnés par les organismes cités ci-dessus.

### Contrôle de qualité

Vérifier tous signes de détérioration. Le contrôle de qualité doit être effectué avec au moins une souche pour qu'il soit valide. Ne pas utiliser le produit si le résultat d'une souche de contrôle est incorrect. La liste ci-dessous montre la performance de souches de contrôle que l'utilisateur peut se procurer facilement.

Souches test	
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC® 25285	Croissance et antibiogramme corrects
<i>Bacteroides</i> <i>thetaiotaomicron</i> ATCC® 29741	Croissance et antibiogramme corrects

### Références

Bibliographie disponible sur demande.

IFU360 FR 07/16 V3  
MAST est une marque déposée  
ATCC est une marque déposée de American  
Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA.  
\*La formule peut varier pour optimiser les performances du milieu





Mast House, Derby Road, Bootle, Merseyside L20 1EA, United Kingdom.  
Tel: +44 (0)151 933 7277 Fax: +44 (0)151 944 1332  
www.mastgrp.com

## Mannitol Salt Agar

**DM 160** A selective medium for the isolation of pathogenic staphylococci.

Typical formula*	grams per litre
Peptone	8.0
Yeast extract	2.0
Lactalbumin	3.0
Sodium chloride	30.0
Mannitol	10.0
Phenol red	0.0225
Lithium chloride	7.0
Glycine	1.0
Sodium pyruvate	3.0
Agar B	12.0
pH approx.7.4	

### Directions

1. Suspend by swirling 76g of powder in 1 litre or the contents of the sachet in the stated volume of distilled or deionised water.
2. Autoclave at 121°C (15p.s.i.) for 15 minutes.
3. Mix well before pouring.

### Description

Following the observation by Koch<sup>1</sup> that usually only staphylococci are able to grow on 7.5% salt agar, Chapman<sup>2</sup> described the use of Mannitol Salt Agar for the differential isolation of pathogenic staphylococci. It is worth noting that Gunn *et al*<sup>3</sup> improved the medium by the addition of 2% egg yolk which identified 94.7% of coagulase producing strains. Recent work has shown that some strains of staphylococci may be partially inhibited by the high level of sodium chloride in Chapman's medium.<sup>4,5</sup> To overcome this, the medium has been modified by reducing the sodium chloride concentration from 7.5 to 3.0%.

Inhibition of Gram negative bacilli has been maintained by the inclusion of Lithium chloride. Pyruvate and glycine are included as growth promoters to enhance the recovery of *S.aureus* from samples containing small numbers of the organism.<sup>6,7</sup>

The medium is suitable for use with Oxacillin Selectatab™ (MS29) for the detection of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) using the method described by Lally *et al*<sup>8</sup>.

### In Use

Inoculate plates by spreading the sample over the surface of the medium and incubate at 37°C for up to 48 hours. Pathogenic staphylococci grow well and ferment mannitol, indicated by yellow zones around the colonies, whereas non-pathogenic staphylococci produce smaller white colonies indicating non-fermentation of mannitol.

### References

1. Koch FE. *Zentbl Bakt ParasitKde* (Abt.1) 1942; **149**: 122-124.
2. Chapman GH. *J Bact.* 1945; **50**: 202-203.
3. Gunn BA, Dunkelberg WE, Creitz JR. *Am J Clin Path.* 1972; **57**: 236-240.
4. Van Enk RA, Thompson DK. *J Clin Microbiol.* 1992; **30**: 504-505.
5. Faiers M, George R, Jolly J, Wheat P. *Multipoint Methods in the Clinical Laboratory - A Handbook.* p41 PHLS, Lon 6.
6. Baird Parker AC. *J Appl Bact.* 1962; **25**: 12.
7. Giollioti C, Cantoni C. *J Appl Bact.* 1966; **29**: 395-398.
8. Lally RT, Ederer MN, Woolfrey BF. *J Clin Microbiol.* 1985; **22**: 501-504

\*Formulation may be changed to meet performance criteria  
MAST is a Registered Trademark





**Mast Group Ltd.**  
Mast House, Derby Road, Bootle  
Liverpool, Merseyside, L20 1EA  
United Kingdom  
Tél: + 44 (0) 151 472 1444  
Fax: + 44 (0) 151 944 1332  
email: sales@mastgrp.com  
Web: www.mastgrp.com

**Mast Diagnostica GmbH**  
Feldstrasse 20  
DE-23858 Reinfeld  
Germany  
Tél: + 49 (0) 4533 2007 0  
Fax: + 49 (0) 4533 2007 68  
email: mast@mast-diagnostica.de  
Web: www.mastgrp.com

**Mast Diagnostic**  
12 rue Jean Jacques Mention  
CS91106, 80011 Amiens, CEDEX 1  
France  
Tél: + 33 (0) 3 22 80 80 67  
Fax: + 33 (0) 3 22 80 99 22  
email: info@mast-diagnostic.fr  
Web: www.mastgrp.com



## SS (gélose)

**DM205.** Milieu sélectif pour l'isolement des bactéries entéro-pathogènes.

**Présentation:** voir étiquette sur la boîte.

### Formule\*

Composants:	Concentration :
Extrait de bœuf	7,5 g/litre
Peptone	9,0 g/litre
Lactose	10,0 g/litre
Thiosulfate de sodium	2,0 g/litre
Citrate d'ammonium ferrique	2,0 g/litre
Sels biliaires	1,0 g/litre
Citrate trisodique	5,0 g/litre
Rouge neutre	0,025 g/litre
Agar	14,0 g/litre
pH final: 7,4 ± 0,2	

### Conservation

Toutes les boîtes doivent impérativement être bien fermées et stockées jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette dans un endroit sec à une température de 10 à 25°C.

### Précautions

Usage In Vitro uniquement. Observer les règles de sécurité et d'hygiène en vigueur. Ne peut être utilisé que par du personnel de laboratoire qualifié. Stériliser les effluents biologiques dangereux avant de les éliminer. Se référer à la fiche de sécurité du produit (disponible sur demande ou via le site internet MAST).

### Matériels nécessaires non fournis

Réactifs et équipements microbiologiques standards (anses, suppléments sélectifs MAST, écouvillons, ensemencement, autoclaves et incubateurs, etc...) ainsi que des réactifs sérologiques et biochimiques et des additifs tels que le sang.

### Préparation

- Se référer à l'étiquette de la boîte pour les volumes et quantités nécessaires. Préparer la gélose SS MAST (DM205) en dissolvant la poudre dans de l'eau distillée ou désionisée et bien mélanger. Pour les sachets de milieu, dissoudre tout le contenu du sachet dans le volume d'eau inscrit sur l'étiquette.
- Porter à ébullition jusqu'à totale dissolution. NE PAS AUTOCLAVER.
- Bien mélanger puis couler le milieu en boîtes de Pétri (15 à 20 ml par boîte) et laisser reposer.
- Les boîtes préparées peuvent être utilisées immédiatement ou stockées dans des sacs en plastique à 2 à 8°C pendant une semaine au plus.
- Bien ensemencer les boîtes avec les échantillons de selles ou de matériel suspect.

- Incuber les boîtes en aérobic pendant 18 à 24 heures à 35 à 37°C.
- Ensemencer parallèlement une boîte contenant un milieu non inhibiteur, tel que la gélose sans sel MacConkey MAST (DM140).

### Interprétation des résultats

Après incubation noter la croissance des germes. Les caractères typiques à noter comprennent: taille, couleur et morphologie des colonies. Après une nuit de croissance, les colonies lactose négatives sont incolores tandis que les colonies lactose positives sont roses ou rouges. La plupart des salmonelles et des shigelles ne fermentent pas le lactose et donnent des colonies incolores. Pour les salmonelles on note souvent un pigment noir au centre de la colonie indiquant la production de H<sub>2</sub>S.

### Contrôle de qualité

Vérifier tous signes de détérioration. Le contrôle de qualité doit être effectué avec au moins une souche pour qu'il soit valide. Ne pas utiliser le produit si le résultat d'une souche de contrôle est incorrect. La liste ci-dessous montre la performance de souches de contrôle que l'utilisateur peut se procurer facilement.

Souches test	Résultat
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Colonies rose/rouge (inhibition)
<i>Shigella sonnei</i> ATCC® 9290	Colonies incolores ou jaune pâle
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212	Pas de croissance
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	Pas de croissance
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC® 14028	Colonies incolores ou jaune pâle

### Références

Bibliographie disponible sur demande.

IFU345 FR 07/16 V4  
MAST est une marque déposée  
ATCC est une marque déposée de American  
Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA.  
\*La formule peut varier pour optimiser les performances du milieu





**Mast Group Ltd.**  
Mast House, Derby Road, Bootle  
Liverpool, Merseyside, L20 1EA  
United Kingdom  
Tel: + 44 (0) 151 472 1444  
Fax: + 44 (0) 151 944 1332  
email: sales@mastgrp.com  
Web: www.mastgrp.com

**Mast Diagnostica GmbH**  
Feldstrasse 20  
DE-23858 Reinfeld  
Germany  
Tel: + 49 (0) 4533 2007 0  
Fax: + 49 (0) 4533 2007 68  
email: mast@mast-diagnostica.de  
Web: www.mastgrp.com

**Mast Diagnostic**  
12 rue Jean Jacques Mention  
CS91106, 80011 Amiens, CEDEX 1  
France  
Tél: + 33 (0) 3 22 80 80 67  
Fax: + 33 (0) 3 22 80 99 22  
email: info@mast-diagnostic.fr  
Web: www.mastgrp.com



## Hektoen (gélose)

**DM134.** Milieu sélectif pour l'isolement et la différenciation des shigelles et des salmonelles.

**Présentation:** voir étiquette sur la boîte.

### Formule\*

Composants:	Concentration :
Mélange de peptone	25,0 g/litre
Lactose	10,0 g/litre
Saccharose	12,0 g/litre
Salicine	1,0 g/litre
Chlorure de sodium	2,0 g/litre
Thiosulfate de sodium	1,0 g/litre
Citrate d'ammonium ferrique	2,0 g/litre
Citrate trisodique	1,25 g/litre
Sels biliaries	1,5 g/litre
Acide fuschique	0,025 g/litre
Bleu de bromothymol	0,05 g/litre
Agar A (RM10)	14,0 g/litre
pH final: 7,2 ± 0,2	

### Conservation

Toutes les boîtes doivent impérativement être bien fermées et stockées jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette dans un endroit sec à une température de 10 à 25°C.

### Précautions

Usage In Vitro uniquement. Observer les règles de sécurité et d'hygiène en vigueur. Ne peut être utilisé que par du personnel de laboratoire qualifié. Stériliser les effluents biologiques dangereux avant de les éliminer. Se référer à la fiche de sécurité du produit (disponible sur demande ou via le site internet MAST).

### Matériels nécessaires non fournis

Réactifs et équipements microbiologiques standards (anses, suppléments sélectifs MAST, écouvillons, ensemencement, autoclaves et incubateurs, etc...) ainsi que des réactifs sérologiques et biochimiques et des additifs tels que le sang.

### Préparation

- Se référer à l'étiquette de la boîte pour les volumes et quantités nécessaires. Préparer la gélose Hektoen MAST (DM134) en dissolvant la poudre dans de l'eau distillée ou désionisée. Pour les sachets de milieu, dissoudre tout le contenu du sachet dans le volume d'eau inscrit sur l'étiquette.
- Laisser reposer pendant environ 15 minutes et porter à ébullition jusqu'à dissolution totale. NE PAS AUTOCLAVER.
- Laisser refroidir à 50 à 55°C, bien mélanger puis couler le milieu en boîte de Pétri (15 à 20 ml par boîte) et laisser reposer.

- Les boîtes préparées peuvent être utilisées immédiatement ou stockées dans des sacs en plastique à 2 à 8°C pendant une semaine au plus.
- Ensemencer directement les boîtes avec des selles, des écouvillons rectaux ou des subcultures effectuées à partir du milieu d'enrichissement approprié. Ensemencer par épuisement pour obtenir des colonies isolées.
- Incuber les boîtes en aérobie pendant 18 à 24 heures à 35 à 37°C. Il est important que l'incubation ne dépasse pas 24 heures car cela laisserait le pH des germes non-pathogènes s'inverser.

### Interprétation des résultats

Après incubation noter la croissance des germes. Les caractères typiques à noter comprennent: taille et morphologie des colonies et pigmentation.

Souches	Morphologie des colonies
<i>Shigella</i> spp	Colonies vertes et humides
<i>Salmonella</i> spp.	Colonies bleu/vert avec ou sans centre vert
Coliformes	Colonies rose saumon à orange entourées d'un précipité de bile

### Contrôle de qualité

Vérifier tous signes de détérioration. Le contrôle de qualité doit être effectué avec au moins une souche pour qu'il soit valide. Ne pas utiliser le produit si le résultat d'une souche de contrôle est incorrect. La liste ci-dessous montre la performance de souches de contrôle que l'utilisateur peut se procurer facilement.

Souches test	Résultat
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Inhibition partielle
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC® 29212	Inhibition partielle
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC® 14028	Croissance
<i>Shigella flexneri</i> ATCC® 12022	Croissance

### Références

Bibliographie disponible sur demande.

IFU320 FR 06/16 V3

MAST est une marque déposée

ATCC est une marque déposée de American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA.

\*La formule peut varier pour optimiser les performances du milieu





## Produits, réactifs et équipements



3050 Spruce Street  
 Saint Louis, Missouri 63103 USA  
 Telephone 800-325-5832 • (314) 771-5765  
 Fax (314) 286-7828  
 email: techserv@sial.com  
 sigma-aldrich.com

## Product Information

### Dimethyl sulfoxide

Product Number D 8418  
 Store at Room Temperature

#### Product Description

Molecular Formula: C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS  
 Molecular Weight: 78.13  
 CAS Number: 67-68-5  
 Melting Point: 18.45 °C  
 Boiling Point: 189 °C  
 Density: 1.1 g/ml  
 Dielectric Constant: 45  
 Viscosity: 1.1 centipoises (27 °C)  
 Synonyms: DMSO, methyl sulfoxide, dimethyl sulphoxide

This product is designated as Molecular Biology grade and is suitable for molecular biology applications. It has been analyzed for the presence of nucleases and proteases.

Dimethyl sulfoxide (DMSO) is a highly polar organic reagent that has exceptional solvent properties for organic and inorganic chemicals. Among its uses in organic synthesis is the oxidation of thiols and disulfides to sulfonic acids.<sup>2</sup> Other reactions in which DMSO participates include the hydrolysis of epoxides, the thioalkylation of phenols, and the oxidation of primary alcohols, primary halides, and esters of primary alcohols to aldehydes.<sup>3</sup>

Protocols have been reported for the use of DMSO in column-loading buffers for poly(A)<sup>+</sup> RNA selection, in buffers for the transformation of competent *E. coli*, in the polymerase chain reaction (PCR), the amplification of cDNA libraries, DNA sequencing, DEAE-dextran mediated transfection of cells, and polybrene-mediated DNA transfection.<sup>4</sup> A procedure that uses DMSO to recover DNA from membrane filters for subsequent PCR amplification has been described.<sup>5</sup> A capillary electrophoresis technique for DNA sequencing incorporates 2 M urea with 5% DMSO (v/w), and can be modified to use 100% DMSO as needed.<sup>6</sup> A study of the contribution of various DMSO concentrations to melting temperatures in oligonucleotides has been published.<sup>7</sup>

DMSO is also widely utilized in the storage of human and animal cell lines and bacteriophage  $\lambda$  as a cryoprotective agent.<sup>4</sup> A protocol to prepare a DMSO solution for freezing cells is as follows:

- 1) Prepare freezing medium containing culture medium with 10-20% serum and 5-10% DMSO.
- 2) Remove adherent cells with trypsin or other appropriate means. (For optimal results, cells should be in the log phase of growth.)
- 3) Gently pellet the cells by centrifugation (10 minutes at 250 × g, 4 °C) and remove the culture medium.
- 4) Resuspend the cells in the freezing medium at 10<sup>6</sup> -10<sup>7</sup> cells/ml.
- 5) Aliquot into freezing vials.
- 6) Freeze cells according to standard freezing protocols. Store at -70 °C or below.

For cell fusion, a 10% DMSO solution in 40-50% polyethylene glycol (PEG) may be prepared.<sup>4</sup>

The use of DMSO in the modification of phosphoserine and phosphothreonine residues in proteins for MS analysis of phosphorylation states has been described.<sup>8</sup> A study of leuprolide degradation in water and in DMSO has been reported.<sup>9</sup>

The compatibility of DMSO with various materials is listed below:

- Compatible: LDPE, HDPE, polypropylene, PPCO (polypropylene copolymer), polymethylpentene, nylon, teflon FEP
- Moderately compatible: polystyrene, ECTFE/ETFE
- Incompatible: polysulfone, flexible and rigid PVC tubing, polycarbonate

#### Precautions and Disclaimer

For Laboratory Use Only. Not for drug, household or other uses.





### Preparation Instructions

This product is miscible in water (1 ml DMSO + 1 ml H<sub>2</sub>O), yielding a clear, colorless solution. DMSO is a very hygroscopic liquid and should be protected from exposure to moisture. DMSO is also soluble in ethanol, acetone, ether, benzene, and chloroform.<sup>1</sup>

### Storage/Stability

DMSO supercools easily and remelts slowly at room temperature. The product may arrive as a solid instead of a liquid. The solidified product can be reliquified by warming to room temperature without detriment to the product. DMSO is stable up to 100 °C in alkaline, acidic and neutral conditions. At temperatures approaching its boiling point, DMSO is stable in neutral or alkaline conditions.

To prepare a sterile filtered DMSO solution, it is recommended to use a teflon or nylon membrane. Cellulose acetate membranes are not recommended.

### References

1. The Merck Index, 12th ed., Entry# 3308.
2. Lowe, O. G., Oxidation of thiols and disulfides to sulfonic acids by dimethyl sulfoxide. *J. Org. Chem.*, **41**(11), 2061 - 2064 (1976).
3. *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, March, J., John Wiley & Sons (New York, NY: 1991), pp. 376-377, 1168, 1193-1195.
4. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Sambrook, J. and Russell, D.W., CSHL Press (Cold Spring Harbor, NY: 2001), pp. 1.105-1.106, 2.36, 7.16, 8.9, 8.23, 11.64, 12.39, 16.28, 16.43-16.45.
5. Chong, K. Y., et al., Post-hybridization recovery of membrane filter-bound DNA for enzymatic DNA amplification. *Biotechniques*, **14**(4), 575-578 (1993).
6. Kotler, L., et al., DNA sequencing of close to 1000 bases in 40 minutes by capillary electrophoresis using dimethyl sulfoxide and urea as denaturants in replaceable linear polyacrylamide solutions. *Electrophoresis*, **23**(17), 3062-3070 (2002).
7. von Ahsen, N., et al., Oligonucleotide melting temperatures under PCR conditions: nearest-neighbor corrections for Mg<sup>2+</sup>, deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas. *Clin. Chem.*, **47**(11), 1956-1961 (2001).
8. Thaler, F., et al., A new approach to phosphoserine and phosphothreonine analysis in peptides and proteins: chemical modification, enrichment via solid-phase reversible binding, and analysis by mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **376**(3), 366-373 (2003).
9. Hall, S. C., et al., Characterization and comparison of leuprolide degradation profiles in water and dimethyl sulfoxide. *J. Pept. Res.*, **53**(4), 432-441 (1999).

GCY/ALF/HLD/NSB 12/03

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc.  
Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.





## OXOID QUALITY ASSURANCE

### PRODUCT SPECIFICATION

#### HELICOBACTER PYLORI SELECTIVE SUPPLEMENT (DENT) (OXOID) SR0147E

##### Formula

Per vial (each vial is sufficient to supplement 500ml of medium)

Vancomycin	5.0 mg
Trimethoprim	2.5 mg
Cefsulodin	2.5 mg
Amphotericin B	2.5 mg

##### Description

A selective supplement for the isolation of *Helicobacter pylori* from clinical specimens.

##### Directions

To one vial aseptically add 2ml of sterile distilled water and mix gently to dissolve the contents completely. Avoid frothing. Add the contents of 1 vial aseptically to 500ml of sterile Columbia Blood Agar Base (CM0331), cooled to 50°C and add 35ml laked horse blood (SR0048). Mix well and pour into sterile Petri dishes.

##### Physical Characteristics

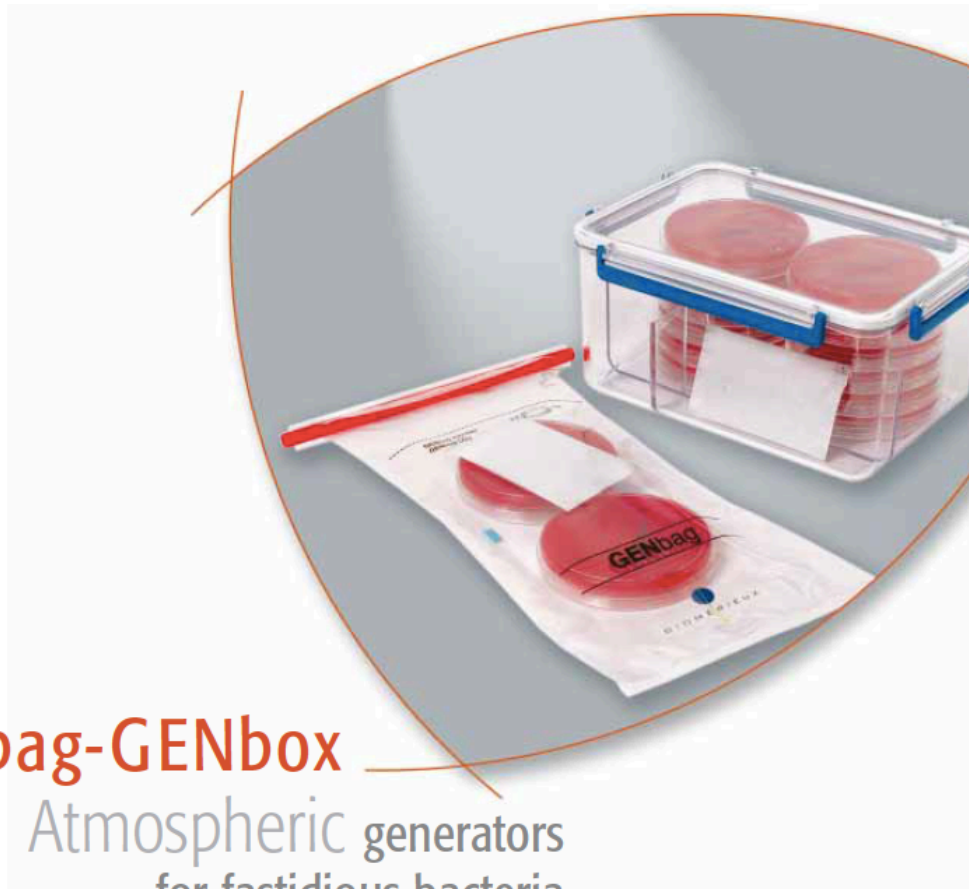
Pale yellow pellet  
Sterility - passes test



##### Bacteriological Tests using Optimum Inoculum Dilution

Reactions after incubation at 37°C for 3-5 days under microaerophilic conditions  
(for details refer to Oxoid Manual - Atmosphere Generation Systems)

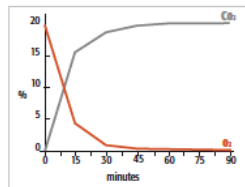
<i>Helicobacter pylori</i>	ATCC® 43526	Pinpoint-0.5mm colourless colonies
<i>Helicobacter pylori</i>	ATCC® 43504	Pinpoint-0.5mm colourless colonies
<i>Proteus hauseri</i>	ATCC® 13315	1mm grey spreading colonies
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC® 27853	1-2mm grey colonies
<i>Candida albicans</i>	ATCC® 10231	No growth
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC® 19433	No growth
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922	No growth



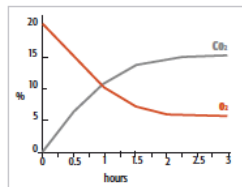
## GENbag-GENbox

### Atmospheric generators for fastidious bacteria

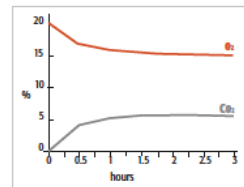
**High-performance** : atmosphere required in less than one hour



Anaerobic bacteria :  
GENbag anaer  
GENbox anaer



Microaerophilic bacteria  
(*Campylobacter*, *Helicobacter*,  
*Mycoplasma*, ...) :  
GENbag microaer  
GENbox microaer



Capnophilic bacteria (requiring CO<sub>2</sub> :  
*Neisseria*, *Haemophilus*, ...) :  
GENbag CO<sub>2</sub>  
GENbox CO<sub>2</sub>

#### Practicability

GENbag-GENbox range is adapted to all laboratory requirements :  
1.GENbag : transparent bag, for incubation of single specimens,  
1.GENbox : transparent and stackable, for more practical use.  
The cultures can be observed without opening the system.

**Security** : no hydrogen release thereby making them completely user-safe.

**Economy** : no additional material required (pipette, syringe, maintenance and replacement of the palladium catalyst, ...).

  
BIOMÉRIEUX





## GENbag-GENbox

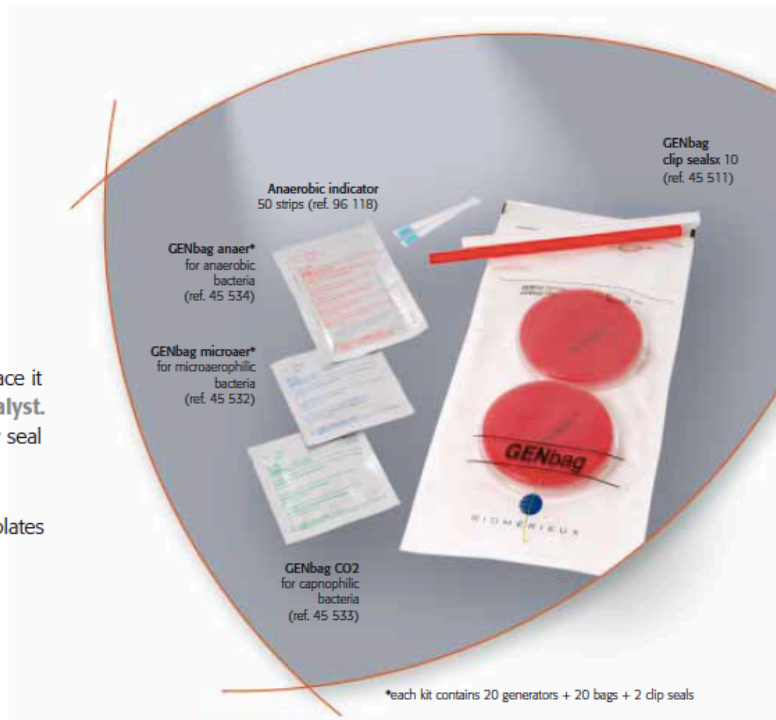
### Easy-to-use

#### GENbag

Place the plates in the airtight bag.  
Open the protective aluminium foil pouch.  
Remove the generator and immediately place it into the bag. **Do not add water or a catalyst.**  
Place the clip seal on the bag, immediately seal the pouch and incubate.

GENbag enables the incubation of 1 or 2 plates (up to 5 plates with GENbag anaer), identification or susceptibility testing strips, 1 microtitration plate...  
Bacterial growth can be observed without opening, through the transparent bag.

For more details, refer to package inserts

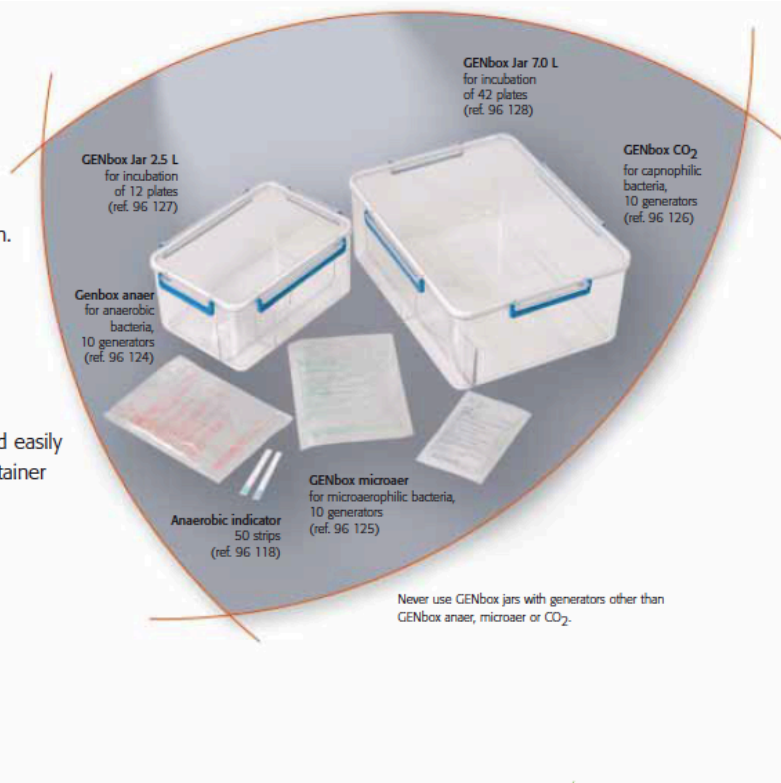


#### GENbox

Place the plates in the jar. For GENbox anaer, add the anaerobic indicator stick.  
Open the protective aluminium foil pouch.  
Remove the generator and immediately place 1 generator for GENbox jar 2.5L or 3 for GENbox 7.0 L.  
**Do not add water or a catalyst.**  
Immediately seal the jar and incubate.

Rectangular GENbox jars are compact and easily stackable. The transparent cover and container enable direct observation of cultures.

For more details, refer to package inserts



bioMérieux S.A.  
69280 Marcy l'Etoile  
France  
Tel. : 33 (0)4 78 87 20 00  
Fax : 33 (0)4 78 87 20 90

[www.biomerieux.com](http://www.biomerieux.com)





## API 20 E – SYSTÈME D'IDENTIFICATION DES ENTEROBACTERIACEAE ET AUTRES BACILLES GRAM-NÉGATIFS

d'après bioMérieux sa

TESTS	SUBSTRATS	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
ONPG	ortho-nitro-phenyl-galactoside	beta-galactosidase	incolore	jaune (1)
ADH	arginine	arginine dihydrolase	jaune	rouge/ orangé (2)
LDC	lysine	lysine décarboxylase	jaune	orangé
ODC	ornithine	ornithine décarboxylase	jaune	rouge/ orangé (2)
[CIT]	citrate de sodium	utilisation du citrate	vert pâle/ jaune	bleu-vert/ bleu (3)
H <sub>2</sub> S	thiosulfate de sodium	production d'H <sub>2</sub> S	incolore/ grisâtre	dépôt noir/ fin liseré
URE	urée	uréase	jaune	rouge/ orangé
TDA	tryptophane	tryptophane desaminase	TDA / immédiat	
			jaune	marron foncé
IND	tryptophane	production d'indole	JAMES/ immédiat ou IND/ 2 mn	
			JAMES incolore	JAMES rose
			Vert pâle-jaune	IND Anneau Rouge
			IND jaune	
[VP]	pyruvate de sodium	production d'acétoïne	VP 1 + VP 2 / 10 mn	
[GEL]	gélatine de Kohn	gelatinase	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	glucose	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
MAN	mannitol	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
INO	inositol	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
SOR	sorbitol	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
RHA	rhamnose	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
SAC	saccharose	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
MEL	melibiose	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
AMY	amygdaline	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
ARA	arabinose	fermentation/ oxydation (4)	bleu/ bleu-vert	Jaune
OX	sur papier filtre	cytochrome-oxydase	OX / 1-2 mn	
			incolore	violet
NO <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub>	tube GLU	production de NO <sub>2</sub>	NIT 1 + NIT 2 / 2-3 mn	
			jaune	rouge
			Zn	
		réduction au stade N <sub>2</sub>	rouge	jaune
MOB	(API M) (microscope)	mobilité	immobile	mobile
MAC	milieu de MacConkey	culture sur	absence	présence
OF	glucose (API OF)	fermentation : sous huile oxydation : à l'air	vert	jaune
			vert	jaune

(1) Une très légère couleur jaune est également positive.

(2) Une couleur orange apparaissant APRÈS 24 H d'incubation doit être considérée négative.

(3) lecture dans la cupule (zone aérobie)

(4) la fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans la cupule.





TABLEAU D'IDENTIFICATION / PERCENTAGE TABLE / PROZENTTABELLE / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE / TABLA DE IDENTIFICACION

**api 20 €** (V32)

	ONPG	ADH	LDC	DOC	LCIT	H <sub>2</sub> S	LRC	TDA	IND	V <sub>P</sub>	GEL	GLU	MAN	IND	SDR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OK	NO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	MOB	MUC	OFD	OFB
<i>Buttiauxella agrestis</i>	100	0	3	85	66	0	0	0	0	0	0	100	100	0	9	100	0	82	100	100	0	100	0	100	100	100	100
<i>Budvicia aquatica</i>	100	0	0	0	0	0	60	0	0	0	0	100	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	100	100
<i>Cedecea davisae</i>	100	77	0	100	77	0	0	0	0	85	0	100	100	15	0	0	100	0	100	0	0	99	0	87	100	100	100
<i>Cedecea lapagei</i>	90	100	0	0	90	0	0	0	0	100	0	100	90	0	0	0	0	10	100	10	0	99	0	87	100	100	100
<i>Cedecea neteri</i>	100	80	0	0	100	0	0	0	0	80	0	100	100	20	100	0	100	0	100	20	0	99	0	87	100	100	100
<i>Citrobacter diversus/amalonicus</i>	97	50	0	93	82	0	2	0	92	0	0	100	99	4	92	94	27	17	96	95	0	100	0	95	100	100	100
<i>Citrobacter freundii</i>	83	32	0	32	73	69	3	0	7	0	0	100	98	11	95	98	35	66	61	99	0	98	0	95	100	100	100
<i>Edwardsiella hoshinae</i>	0	0	100	99	0	94	0	0	100	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	75	0	100	0	100	100	100	100
<i>Edwardsiella tarda</i>	0	0	100	99	1	94	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	100	0	98	100	100	100
<i>Enterobacter cloacae</i>	98	75	1	88	85	0	1	0	0	85	0	100	98	12	80	79	96	83	99	99	0	100	0	95	100	100	100
<i>Enterobacter aerogenes</i>	98	0	98	98	60	0	2	0	0	73	0	99	99	93	99	93	99	99	99	99	0	100	0	97	100	100	100
<i>Enterobacter agglomerans 1</i>	99	0	0	1	16	0	3	2	1	60	8	99	99	20	13	66	77	26	57	84	0	85	0	85	100	100	100
<i>Enterobacter agglomerans 2</i>	100	0	0	0	92	0	0	3	97	51	23	100	87	46	67	86	98	83	100	100	0	85	0	85	100	100	100
<i>Enterobacter agglomerans 3</i>	100	2	1	2	88	0	0	1	30	80	24	99	97	11	19	94	99	91	100	97	0	85	0	85	100	100	100
<i>Enterobacter agglomerans 4</i>	96	0	0	3	62	0	1	1	1	93	1	99	99	90	51	96	62	84	86	96	0	85	0	85	100	100	100
<i>Enterobacter agglomerans 5</i>	99	0	0	13	44	0	13	13	56	1	1	99	91	31	13	99	1	88	99	99	0	85	0	85	100	100	100
<i>Enterobacter amnigenus 1</i>	96	26	1	100	52	0	0	0	0	78	0	100	99	0	1	100	99	96	99	99	0	100	0	92	100	100	100
<i>Enterobacter amnigenus 2</i>	98	79	1	100	90	0	0	0	0	40	0	100	99	0	99	100	5	100	99	99	0	100	0	100	100	100	100
<i>Enterobacter intermedius</i>	99	1	2	100	1	0	0	0	0	11	0	100	95	0	68	100	32	100	99	99	0	100	0	92	100	100	100
<i>Enterobacter gergoviae</i>	100	0	35	100	70	0	95	0	0	91	0	100	99	25	0	100	99	100	99	100	0	100	0	90	100	100	100
<i>Enterobacter sakazakii</i>	100	93	0	89	94	0	1	0	41	81	37	100	100	85	44	99	99	99	99	99	0	100	0	96	100	100	100
<i>Enterobacter taylorae</i>	100	68	0	99	98	0	0	0	0	89	0	100	100	0	0	100	1	0	100	100	0	100	0	99	100	100	100
<i>Erwinia spp</i>	13	3	1	0	5	0	0	0	0	88	17	97	77	3	26	1	91	19	42	41	0	85	0	85	100	100	100
<i>Erwinia nigrifluens</i>	11	0	0	11	0	0	0	0	0	67	56	100	100	78	99	100	100	100	100	100	0	85	0	85	100	100	100
<i>Escherichia coli 1</i>	88	5	74	70	0	3	2	0	89	0	0	99	97	3	90	82	41	67	20	82	0	100	0	95	100	100	100
<i>Escherichia coli 2</i>	47	10	45	30	0	2	1	0	77	0	0	97	84	2	42	35	4	34	12	90	0	98	0	5	100	100	100
<i>Escherichia fergusonii</i>	96	1	99	100	1	0	0	0	99	3	0	100	99	0	0	87	0	3	99	97	0	100	0	93	100	100	100
<i>Escherichia hermannii</i>	100	0	6	100	5	0	0	0	100	0	0	100	100	0	0	97	44	0	97	99	0	100	0	99	100	100	100
<i>Escherichia vulneris</i>	100	64	42	0	0	0	1	0	0	0	0	100	100	0	1	95	7	78	85	100	0	100	0	100	100	100	100
<i>Ewingella americana</i>	90	0	0	0	96	0	0	0	0	99	1	100	100	0	0	5	0	0	90	1	0	100	0	60	100	100	100
<i>Hafnia alvei 1</i>	62	1	98	95	57	0	15	0	0	56	0	99	99	0	1	97	1	0	26	98	0	100	0	85	100	100	100
<i>Hafnia alvei 2</i>	52	1	97	98	5	0	1	0	0	15	0	95	92	0	1	1	1	0	5	18	0	100	0	0	100	100	100
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	100	0	92	99	92	0	75	0	100	50	0	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	0	0	100	100	100	100
<i>Klebsiella oxytoca</i>	89	0	80	0	89	0	78	0	99	44	0	100	100	98	100	94	100	100	100	100	0	100	0	0	100	100	100
<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>	100	0	73	0	79	0	75	0	0	75	0	100	90	73	99	95	100	99	99	99	0	100	0	0	100	100	100
<i>Klebsiella pneumoniae ozaenae</i>	94	23	30	0	20	0	1	0	0	1	0	98	94	49	57	55	8	79	90	83	0	92	0	0	100	100	100
<i>Klebsiella pneumoniae rhinoscleromatis</i>	25	0	2	0	1	0	1	0	0	1	0	92	100	71	71	42	67	1	92	25	0	100	0	0	100	100	100
<i>Kluyvera spp</i>	89	0	30	99	56	0	0	1	76	0	0	100	99	0	37	93	89	99	95	99	0	95	0	94	100	100	100
<i>Koserella trabulsii</i>	100	0	100	100	100	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	100	0	100	100	100	0	100	0	0	100	100	100
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	100	0	0	0	0	0	15	0	86	0	30	100	100	0	4	100	55	100	99	100	0	100	0	100	100	100	100
<i>Moellerella wisconsensis</i>	86	0	0	0	29	0	0	0	21	7	0	100	0	0	0	0	100	100	0	0	0	90	0	0	100	100	100
<i>Morganella morganii</i>	1	1	5	98	2	1	99	91	97	0	0	97	1	0	0	0	1	0	0	1	0	88	0	95	100	100	100
<i>Proteus mirabilis</i>	1	1	1	98	57	83	99	98	2	4	63	96	1	0	0	0	1	1	1	1	0	93	0	95	100	100	100
<i>Proteus penneri</i>	0	0	0	0	3	17	100	99	0	0	17	100	0	0	0	0	100	0	1	0	0	99	0	85	100	100	100
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0	0	0	31	83	98	99	92	0	52	97	1	1	0	4	89	0	65	1	0	100	0	94	100	100	100
<i>Providencia alcalifaciens</i>	0	0	0	0	94	0	0	99	99	0	0	99	2	2	0	0	8	0	0	2	0	100	0	96	100	100	100
<i>Providencia rettgeri</i>	1	1	0	0	70	0	98	99	90	0	0	98	82	78	2	42	34	0	11	1	0	98	0	94	100	100	100
<i>Providencia stuartii</i>	1	0	0	0	89	0	30	90	97	0	0	98	3	84	0	0	16	0	0	3	0	100	0	85	100	100	100
<i>Rahnella aquatilis</i>	100	0	0	0	66	0	0	7	0	100	0	100	100	0	98	98	100	85	98	95	0	100	0	6	100	100	100
<i>Salmonella arizonae</i>	98	48	96	98	50	97	0	0	0	0	0	100	99	0	99	96	1	64	0	99	0	100	0	99	100	100	100
<i>Salmonella choleraesuis</i>	0	22	97	97	4	65	0	0	0	0	0	100	99	0	85	95	0	20	0	0	0	100	0	95	100	100	100
<i>Salmonella paratyphi A</i>	0	1	0	99	0	5	0	0	0	0	0	100	99	0	99	99	0	96	0	99	0	100	0	95	100	100	100
<i>Salmonella spp</i>	3	69	96	95	75	85	0	0	0	0	0	100	97	33	93	93	2	78	1	94	0	100	0	94	100	100	100
<i>Salmonella typhi</i>	0	2	99	0	0	8	0	0	0	0	0	100	99	0	99	0	0	94	0	0	0	100	0	97	100	100	100





# Japi 20 € (V32)

	ONPG	ADH	LDC	DDC	CTI	H <sub>2</sub>	URE	TDA	IND	V <sub>P</sub>	LEL	GLU	MAN	IND	SCR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	MOS	MeC	DF/O	DF/F
Serratia ficaria	100	0	0	0	100	0	0	0	0	50	81	100	100	50	85	92	100	75	96	96	0	92	0	100	100	100	100
Serratia fonticola	100	0	85	99	60	0	0	0	0	0	0	100	100	88	100	96	18	99	100	95	0	99	0	91	100	100	100
Serratia liquefaciens	96	0	81	99	77	0	6	0	0	52	60	100	99	75	98	10	99	70	97	97	0	100	0	95	100	100	100
Serratia marcescens	94	0	95	95	96	0	28	0	1	60	85	100	99	71	91	1	98	68	97	19	0	95	0	97	100	100	100
Serratia odorifera 1	95	0	97	84	87	0	0	0	99	40	90	100	99	99	99	99	100	99	99	95	0	99	0	100	100	100	100
Serratia odorifera 2	95	0	96	2	87	0	0	0	99	65	90	100	99	99	99	99	0	99	99	95	0	99	0	100	100	100	100
Serratia plymuthica	99	0	0	0	65	0	0	0	0	65	50	100	90	55	58	8	100	85	95	98	0	99	0	50	100	100	100
Serratia rubidaea	99	0	73	0	83	0	4	0	0	69	76	98	98	58	1	3	84	82	94	99	0	100	0	85	100	100	100
Shigella spp	7	0	0	4	0	0	0	0	39	0	0	96	63	0	15	7	7	22	0	52	0	100	0	0	100	100	100
Shigella sonnei	96	0	0	97	0	0	0	0	0	0	0	100	99	0	1	75	2	1	0	97	0	100	0	0	100	100	100
Tatumella pyseos	0	0	0	0	10	0	0	72	0	5	0	99	0	0	0	0	80	27	9	1	0	90	0	0	100	100	100
Yersinia aldovae	25	0	25	50	0	0	100	0	0	0	0	95	100	90	100	0	6	0	5	50	0	100	0	0	100	100	100
Yersinia enterocolitica	81	0	0	90	0	0	93	0	66	8	0	99	99	25	98	2	100	4	88	69	0	98	0	2	100	100	100
Yersinia fredericksonii	95	0	0	99	0	0	98	0	99	1	0	100	99	11	95	100	100	0	97	57	0	98	0	5	100	100	100
Yersinia intermedia	95	0	0	100	0	0	97	0	97	2	0	100	99	63	95	99	99	97	98	52	0	98	0	5	100	100	100
Yersinia kristensenii	87	0	0	87	0	0	100	0	99	0	0	99	99	62	99	0	0	0	99	87	0	98	0	5	100	100	100
Yersinia pestis	68	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	99	97	0	71	0	0	0	18	23	0	47	0	0	99	100	100
Yersinia pseudotuberculosis	77	0	0	0	13	0	96	0	0	0	0	98	97	0	0	77	0	70	22	29	0	95	0	0	100	100	100
Acinetobacter spp	0	0	0	0	48	0	1	1	0	10	10	60	0	0	0	2	1	60	2	56	0	3	0	0	90	98	0
Moraxella spp	0	0	0	0	1	0	1	0	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	9	0	0	35	0	0
Pasteurella aerogenes	70	0	0	95	0	0	95	0	0	0	0	99	0	90	0	10	99	0	0	80	85	100	0	0	100	100	100
Pasteurella multocida	4	0	0	25	0	0	0	0	88	0	0	29	74	0	68	0	77	0	0	0	79	52	0	0	2	23	23
Pasteurella spp	60	0	1	10	0	0	25	0	15	7	3	35	10	10	10	1	35	1	2	1	80	59	0	0	9	33	33
Pseudomonas aeruginosa	0	87	0	0	92	0	35	0	0	2	74	57	0	0	0	0	1	11	0	18	97	12	56	97	100	98	0
Pseudomonas cepacia	58	0	32	16	72	0	1	0	0	4	46	65	3	1	1	0	14	0	24	18	90	40	0	99	88	97	0
Pseudomonas fluorescens/putida	0	74	0	0	68	0	1	0	0	22	27	41	0	0	0	3	0	25	1	20	97	26	0	100	96	93	0
Pseudomonas pseudomallei	0	72	0	0	18	0	0	0	0	1	91	95	79	75	79	0	72	0	64	18	100	0	92	100	100	100	0
Pseudomonas spp	3	10	0	0	54	0	3	0	0	25	10	10	0	0	0	2	1	6	1	9	93	48	35	99	85	49	0
Xanthomonas maltophilia	60	0	48	0	76	0	0	0	0	0	89	2	0	0	0	0	0	0	0	0	4	26	1	100	91	49	0
Aeromonas hydrophila/caviae	98	90	6	0	18	0	0	0	85	20	85	100	100	1	3	10	97	1	75	84	100	97	0	95	99	99	99
Aeromonas salmonicida	5	60	0	0	2	0	0	0	15	1	75	46	54	0	0	1	1	0	5	0	96	98	0	95	99	99	99
Aeromonas sobria	99	97	80	1	80	0	0	0	85	80	95	97	99	1	1	1	80	1	75	20	99	98	0	95	99	99	99
Listonella damsela	0	100	61	0	0	0	94	0	0	10	6	50	0	0	0	0	6	0	0	0	100	100	0	25	99	99	99
Plesiomonas shigelloides	95	95	100	100	0	0	0	0	100	0	0	99	0	99	0	0	0	0	0	0	100	99	0	95	99	99	99
Vibrio alginolyticus	0	0	97	62	60	0	2	0	100	10	55	100	100	0	0	0	100	0	5	2	100	47	0	100	99	94	94
Vibrio cholerae	94	1	94	96	62	0	0	0	100	40	87	98	97	0	0	0	94	0	5	0	100	96	0	100	96	99	99
Vibrio hollisae	6	0	0	0	0	0	0	0	94	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	5	100	100	0	0	99	99	99
Vibrio metschnikovii	20	85	88	0	30	0	0	0	50	63	100	100	100	30	30	5	100	0	0	0	0	0	0	60	99	99	99
Vibrio mimicus	99	1	85	90	65	0	0	0	90	3	95	99	95	0	0	0	0	0	1	0	100	95	0	100	95	99	99
Vibrio parahaemolyticus	0	0	100	89	63	0	8	0	100	5	63	100	96	0	0	3	1	0	12	36	100	63	0	100	98	99	99
Vibrio vulnificus	100	0	68	90	81	0	0	0	99	18	99	100	36	0	0	0	0	0	90	1	99	54	0	100	99	99	99
Achromobacter spp	5	1	0	0	85	0	45	1	0	10	1	1	1	1	1	5	1	1	4	1	100	42	60	99	99	47	0
Bordetella/Alcaligenes spp	0	0	0	0	60	0	59	2	0	28	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	95	62	1	99	90	0	0
Chromobacterium violaceum	0	98	0	0	59	0	0	0	19	0	89	96	0	0	0	0	11	0	0	0	92	75	0	99	99	99	99
Chryseomonas luteola	86	59	0	0	94	0	0	0	0	43	13	84	0	13	0	16	4	16	2	78	1	30	0	100	91	94	0
Flavobacterium indologenes	20	0	0	0	12	0	92	0	85	0	84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	20	0	0	57	90	10
Flavobacterium meningosepticum	70	0	0	0	18	0	1	0	81	1	91	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	6	0	0	48	93	6
Flavobacterium odoratum	0	0	0	0	56	0	85	0	0	7	71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	84	2	2
Flavimonas oryzihabitans	0	0	0	0	95	0	0	0	0	60	6	40	0	15	1	2	0	11	0	60	0	7	0	100	99	99	0
Shewanella putrefaciens	0	0	0	80	83	90	0	0	0	6	93	6	0	0	0	0	9	0	0	2	100	96	0	100	96	9	0
Sphingobacterium multivorum	96	0	0	0	30	0	92	0	0	75	10	46	0	0	0	0	25	2	7	17	96	0	0	0	84	96	0
Sphingomonas paucimobilis	73	0	0	0	35	0	6	0	0	31	7	10	0	0	0	2	23	0	3	12	50	0	0	92	0	85	0
Weeksella virosa	0	0	0	0	8	0	0	0	85	0	88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	0	0	3	0	0
Weeksella zoohelcum	0	0	0	0	2	0	95	0	25	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0

% de réactions positives après 24-48h à 35/37°C

% of positives reactions after 24-48h at 35/37°C / % der positiven reaktionen nach 24-48 St. bei 35/37°C

% de las reacciones positivas después de 24-48 H a 35/37°C / % di reazioni positive dopo 24-48 ore a 35/37°C





## API 20 NE – SYSTÈME D'IDENTIFICATION DES BACILLES À GRAM NÉGATIF NON ENTÉROBACTÉRIES

d'après bioMérieux sa

**TABLEAU DE LECTURE**

TESTS	SUBSTRATS	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
NO <sub>3</sub>	nitrate de potassium	réduction des nitrates en nitrites	<u>NIT 1 + NIT 2 / 5 min</u>	
			incolore	rose-rouge
		réduction des nitrates en azote	<u>Zn / 5 min</u>	
			rose	incolore
TRP	tryptophane	formation d'indole	<u>JAMES / immédiat</u>	
			incolore vert pâle / jaune	rose
<u>GLU</u>	glucose	fermentation	bleu à vert	jaune
<u>ADH</u>	arginine	arginine dihydrolase	jaune	orange / rose / rouge
<u>URE</u>	urée	uréase	jaune	orange / rose / rouge
ESC	esculine	hydrolyse (β-glucosidase)	jaune	gris / marron / noir
GEL	gélatine (à l'encre de chine)	hydrolyse (protéase)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	p-nitrophényl-β-D- galactopyranoside	β-galactosidase	incolore	jaune
<u>GLU</u>	glucose	assimilation	transparence	trouble
<u>ARA</u>	arabinose	assimilation	transparence	trouble
<u>MNE</u>	mannose	assimilation	transparence	trouble
<u>MAN</u>	mannitol	assimilation	transparence	trouble
<u>NAG</u>	N-acétyl-glucosamine	assimilation	transparence	trouble
<u>MAL</u>	maltose	assimilation	transparence	trouble
<u>GNT</u>	gluconate	assimilation	transparence	trouble
<u>CAP</u>	caprate	assimilation	transparence	trouble
<u>ADI</u>	adipate	assimilation	transparence	trouble
<u>MLT</u>	malate	assimilation	transparence	trouble
<u>CIT</u>	citrate	assimilation	transparence	trouble
<u>PAC</u>	phényl-acétate	assimilation	transparence	trouble
OX	tétraméthyl-p- phénylène diamine	cytochrome-oxydase	<u>OX / 1-2 min</u>	
			incolore	violet





**TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / PROZENTTABELLE /  
TABLA DE IDENTIFICACION / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE**

% de réactions positives après 24-48 h à 30°C / % of positive reactions after 24-48 hrs at 30°C /

% der positiven Reaktionen nach 24-48 Std. bei 30°C /

% de las reacciones positivas después de 24-48 h a 30°C / % di reazioni positive dopo 24-48 ore a 30°C

API 20 NE	V6.0	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLUa	ARaA	MNEa	MANa	NAGa	MALa	GNTa	CAPa	ADLa	MLTa	CITa	PACa	OX
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		96	0	0	80	20	1	92	1	99	1	1	89	84	1	97	98	91	98	99	1	98
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		27	0	0	80	1	1	39	1	99	71	97	89	85	1	99	99	10	99	99	16	99
<i>Pseudomonas mendocina</i>		100	0	0	94	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	99	100	0	100	100	0	100
<i>Pseudomonas putida</i>		3	0	1	88	1	0	0	1	99	56	57	5	2	1	97	99	1	100	99	58	99
<i>Pseudomonas stutzeri</i>		94	0	0	1	1	0	1	0	98	1	10	67	0	75	87	87	1	99	85	1	100
<i>Burkholderia cepacia</i>		39	0	24	1	1	46	70	72	100	75	99	96	99	8	97	99	93	100	99	99	91
<i>Burkholderia pseudomallei</i>		100	0	0	98	0	5	100	0	100	0	99	100	100	0	100	100	99	100	99	94	100
<i>Brevundimonas diminuta/Oligella urethralis</i>		1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	1	99	33	0	100
<i>Brevundimonas vesicularis</i>		16	0	0	0	0	98	12	34	72	1	1	3	10	72	1	1	1	40	0	0	98
<i>Comamonas acidovorans</i>		96	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	76	0	0	99	71	89	99	28	83	100
<i>Comamonas testosteronii/Ps.alcaligenes</i>		75	0	0	6	4	0	4	1	11	3	3	4	1	2	42	55	38	87	32	3	98
<i>Chryseomonas paucimobilis</i>		78	0	13	71	1	100	30	98	99	99	99	88	12	76	85	62	1	94	94	1	2
<i>Flavimonas oryzae</i>		0	0	0	0	1	0	11	1	100	99	99	100	0	84	99	88	2	99	99	0	1
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>		21	0	0	0	76	0	0	0	21	40	0	0	1	0	7	0	5	75	8	0	99
<i>Ralstonia pickettii</i>		32	0	1	1	3	0	1	0	96	35	1	10	14	0	99	86	62	99	98	16	99
<i>Shewanella putrefaciens</i>		96	0	1	0	1	71	95	0	6	11	0	0	95	10	1	71	1	90	2	0	100
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>		10	0	0	0	1	97	1	90	99	83	75	15	64	95	34	9	3	61	45	1	73
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		37	1	0	0	0	99	99	87	84	3	95	2	98	99	2	1	0	99	98	0	7
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>		2	0	8	0	1	1	1	0	67	70	1	1	1	1	20	98	80	100	99	87	0
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>		1	0	14	0	0	0	96	0	1	0	0	0	0	0	99	2	99	81	1	0	0
<i>Acinetobacter junii/johnsonii</i>		1	0	0	0	1	0	0	0	24	8	2	0	0	0	99	4	95	70	0	0	0
<i>Acinetobacter lwoffii</i>		3	0	0	0	2	0	0	0	11	1	0	1	1	0	0	70	20	46	1	36	0
<i>Acinetobacter radioresistens</i>		2	2	0	2	0	0	0	0	19	2	0	0	2	0	0	97	100	2	2	97	0
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>		99	89	99	78	1	89	97	98	99	80	78	99	99	99	95	84	1	99	37	1	99
<i>Aer. salm. ssp. masoucida/achromogenes</i>		100	21	9	0	0	2	33	0	66	0	33	50	2	21	2	0	0	2	0	0	100
<i>Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida</i>		100	0	57	36	0	100	99	18	84	1	0	96	84	99	99	0	1	99	1	0	100
<i>Aeromonas sobria</i>		100	86	96	86	0	1	99	99	100	12	99	99	99	100	100	93	0	99	81	0	100
<i>Agrobacterium radiobacter</i>		98	0	0	0	65	99	1	99	100	100	100	100	99	99	90	2	0	100	0	1	99
<i>Alcaligenes denitrificans</i>		93	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	86	20	96	99	94	93	100
<i>Alcaligenes faecalis 1</i>		1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	3	77	7	100	97	97	98
<i>Alcaligenes faecalis 2</i>		78	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	99	73	91	100	69	73	100
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>		81	0	0	1	0	0	1	0	99	0	30	1	1	1	100	81	94	99	98	96	100
<i>Bergeyella zoohelcum</i>		0	0	0	0	99	0	74	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	99
<i>Bordetella avium</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	99	100	100	95
<i>Bordetella bronchiseptica</i>		76	0	0	0	96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	94	85	91	80	100	100
<i>CDC gr. IV C-2</i>		1	0	0	0	23	0	1	0	1	1	0	1	0	1	89	89	86	99	96	14	98
<i>Chromobacterium violaceum</i>		97	1	99	100	0	0	100	0	100	0	66	10	97	0	100	75	0	100	36	0	97
<i>Chryseobacterium indologenes</i>		20	81	1	0	70	98	99	22	55	12	37	1	0	66	1	0	1	12	12	99	99
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>		0	83	1	0	5	99	95	93	86	1	80	76	70	61	0	0	1	0	25	0	99
<i>Myroides spp</i>		0	1	0	0	94	1	99	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	100
<i>Moraxella lacunata</i>		90	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	1	0	99
<i>Moraxella spp</i>		34	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	17	1	0	1	1	99
<i>Ochrobactrum anthropi</i>		80	0	0	0	84	1	0	1	82	75	60	20	75	76	34	34	4	99	47	1	99
<i>Oligella ureolytica</i>		71	0	0	0	99	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	95	95	26	96
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>		60	0	0	0	95	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	0	100
<i>Sphingobacterium multivorum</i>		0	0	1	0	95	100	1	99	99	91	99	0	99	99	0	0	0	1	0	0	99
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>		0	0	0	0	1	100	0	100	100	1	99	10	100	100	0	0	0	0	0	0	99
<i>Weeksella virosa/Empedobacter brevis</i>		12	5	0	0	0	1	100	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	3	1	0	98
<i>Pasteurella aerogenes</i>		100	0	97	0	100	0	0	100	99	75	97	1	80	99	97	0	0	95	0	0	77
<i>Pasteurella haemolytica</i>		95	0	2	0	0	2	0	85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	85
<i>Pasteurella multocida</i>		96	96	1	0	0	0	0	10	1	0	2	1	1	2	1	0	1	1	0	0	86
<i>Pasteurella pneumotropica</i>		100	61	26	0	85	0	0	83	6	1	6	0	6	3	6	0	1	6	0	0	84
<i>Pasteurella spp</i>		96	1	2	2	1	1	1	4	19	1	1	1	1	1	1	0	1	13	1	0	87
<i>Photobacterium damsela</i>		99	0	94	99	99	2	0	11	11	0	6	0	1	6	0	0	0	63	0	0	100
<i>Plesiomonas shigelloides</i>		99	99	98	98	0	0	0	86	94	0	12	0	77	98	99	77	0	94	0	0	99
<i>Vibrio alginolyticus</i>		98	93	93	0	0	65	91	10	76	1	18	75	57	74	76	1	0	99	1	0	99
<i>Vibrio cholerae</i>		99	100	99	0	0	1	99	99	88	0	30	78	75	97	98	1	0	99	97	1	100
<i>Vibrio hollisae</i>		100	100	31	0	0	0	0	3	10	67	68	0	24	1	41	0	0	94	0	0	100
<i>Vibrio metschnikovii</i>		0	50	64	0	0	7	100	50	100	0	71	99	99	99	17	0	99	50	0	0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		99	99	100	1	6	1	98	97	90	81	82	99	51	98	90	0	1	99	21	1	99
<i>Vibrio vulnificus</i>		100	95	95	0	1	95	99	99	9	0	10	9	1	6	28	0	0	95	91	0	100





# API 20 STREP

## SYSTÈME D'IDENTIFICATION DES STREPTOCOQUES

d'après bioMérieux sa

TABLEAU DE LECTURE

TESTS	SUBSTRATS	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS			
			NEGATIF		POSITIF	
VP	Pyruvate	Production d'acétolïne	VP 1 + VP 2 / jusqu'à 10 min (3)			
			Incolore		Rose-Rouge	
HIP	Hippurate	Hydrolyse	NIN / jusqu'à 10 min			
			Incolore/Bleu pâle		Bleu foncé/Violet	
ESC	Esculine	$\beta$ -glucosidase	4 h	24 h	4 h	24 h
			Incolore Jaune pâle	Incolore Jaune pâle Gris clair	Noir Gris	Noir
PYRA	Pyrrolidonyl 2 naphtylamide	Pyrrolidonyl arylamidase	ZYM A + ZYM B / 10 min (PYRA à LAP) (1) au besoin décoloré par éclaircissement intense			
			Incolore ou Orange très pâle		Orange	
$\alpha$ GAL	6-Bromo-2-naphtyl $\alpha$ -D-galactopyranoside	$\alpha$ -galactosidase	Incolore		Violet	
$\beta$ GUR	Naphtol AS-BI $\beta$ -D-glucuronate	$\beta$ -glucuronidase	Incolore		Bleu	
$\beta$ GAL	2-naphtyl- $\beta$ -D- galactopyranoside	$\beta$ -galactosidase	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
PAL	2-naphtyl phosphate	Phosphatase alcaline	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
LAP	L-leucine-2-naphtylamide	Leucine arylamidase	Incolore		Orange	
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune		Rouge	
			4 h	24 h	4 h	24 h
<u>RIB</u>	Ribose	Acidification	Rouge	Orange/Rouge	Orange/Jaune	Jaune
<u>ARA</u>	L-Arabinose	Acidification	Rouge	Orange/Rouge	Orange/Jaune	Jaune
<u>MAN</u>	Mannitol	Acidification	Rouge	Orange/Rouge	Orange/Jaune	Jaune
<u>SOR</u>	Sorbitol	Acidification	Rouge	Orange/Rouge	Orange/Jaune	Jaune
<u>LAC</u>	Lactose	Acidification	Rouge	Orange/Rouge	Orange/Jaune	Jaune
<u>TRE</u>	Trehalose	Acidification	Rouge	Orange/Rouge	Orange/Jaune	Jaune
<u>INU</u>	Inulin	Acidification	Rouge	Orange/Rouge	Orange/Jaune	Jaune
<u>RAF</u>	Raffinose	Acidification	Rouge	Orange/Rouge	Orange/Jaune	Jaune
<u>AMD</u>	Amidon (2)	Acidification	Rouge	Orange/Rouge	Orange/Jaune	Jaune
GLYG	Glycogène	Acidification	Rouge ou Orange		Jaune franc	

(1) Lors d'une deuxième lecture après 24 heures d'incubation, on peut remarquer un dépôt dans les tubes où ont été ajoutés les réactifs ZYM A et ZYM B. Ce phénomène est normal et ne doit pas être pris en considération.

(2) L'acidification de l'amidon est fréquemment moins forte que celle des autres sucres.

(3) Une coloration rose pâle obtenue après 10 minutes doit être considérée négative.





**TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / PROZENTTABELLE /  
TABLA DE IDENTIFICACION / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE**

% de réactions positives après 4/24 h à 35-37°C / % of positive reactions after 4/24 hrs. at 35-37°C /

% der positiven Reaktionen nach 4/24 Std. bei 35-37°C /

% de las reacciones positivas después de 4/24 H a 35-37°C / % di reazioni positive dopo 4/24 ore a 35-37°C

API 20 STREP V6.0	VP	HIP	ESC	PYRA	AGAL	BGUR	BGAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYG	HEM
<i>Aerococcus viridans 1</i>	13	50	96	54	33	16	37	1	5	1	83	33	85	70	83	99	33	41	70	33	1
<i>Aerococcus viridans 2</i>	15	70	50	76	10	20	25	1	5	5	25	1	35	2	70	89	1	5	24	1	5
<i>Aerococcus viridans 3</i>	22	88	99	40	85	48	14	14	1	1	8	2	82	5	91	99	37	99	14	1	1
<i>Alloicoccus otitis</i>	0	25	0	100	0	3	100	1	90	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus avium</i>	99	60	99	94	15	0	24	1	99	0	99	40	100	95	95	99	1	40	15	0	1
<i>Enterococcus durans</i>	100	43	100	97	32	2	76	0	91	100	99	15	2	0	84	76	0	0	56	0	18
<i>Enterococcus faecalis</i>	99	46	99	97	1	0	21	4	99	94	98	0	98	92	92	100	0	0	96	2	1
<i>Enterococcus faecium</i>	94	43	99	95	42	1	90	3	97	93	85	70	78	18	84	98	26	9	73	3	1
<i>Enterococcus gallinarum</i>	99	99	100	100	95	45	99	0	99	99	99	100	99	1	100	100	99	99	83	20	0
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0	95	0	0	0	1	53	0	99	0	46	6	1	0	1	0	0	0	73	53	0
<i>Gemella haemolysans</i>	25	0	0	70	0	0	1	84	40	1	1	0	20	10	5	2	0	0	10	5	1
<i>Gemella morbillorum</i>	3	0	0	35	0	0	10	35	86	4	5	0	1	0	1	11	3	1	16	5	0
<i>Lactococcus lactis ssp cremoris</i>	98	15	41	1	13	0	41	4	89	0	27	0	17	0	96	30	0	20	25	0	0
<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	90	40	99	35	3	0	35	3	96	95	95	15	45	1	72	87	4	5	90	3	1
<i>Leuconostoc spp</i>	91	1	60	5	55	0	65	2	70	10	37	35	29	4	35	65	0	42	11	0	0
<i>Listeria spp</i>	97	79	98	0	0	0	0	0	85	0	6	0	0	0	49	92	1	1	72	0	26
<i>Abiotrophia adiacens</i>	0	0	10	80	0	25	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Abiotrophia defectiva</i>	25	0	15	99	100	0	100	0	92	0	0	0	0	0	99	100	5	93	99	0	0
<i>Streptococcus acidominimus</i>	1	95	4	13	1	66	30	60	96	18	17	0	42	10	70	65	0	0	10	0	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	100	99	1	1	4	79	1	96	99	99	98	0	1	1	50	87	0	1	35	4	75
<i>Streptococcus anginosus</i>	100	0	100	0	44	0	1	99	100	100	0	0	33	0	99	88	0	44	97	0	37
<i>Streptococcus bovis I</i>	97	2	100	2	71	4	14	0	97	0	2	13	86	0	100	90	63	90	100	90	0
<i>Streptococcus bovis II 1</i>	95	4	97	1	86	1	17	0	100	1	0	14	0	0	93	30	61	99	73	65	0
<i>Streptococcus bovis II 2</i>	86	4	100	13	85	88	94	0	100	13	0	1	0	0	99	99	13	72	40	13	0
<i>Streptococcus canis</i>	0	1	25	4	95	1	80	100	100	100	100	0	0	0	99	1	0	1	99	0	100
<i>Streptococcus constellatus</i>	100	1	27	0	0	0	5	99	100	100	0	0	0	0	10	72	0	0	12	0	61
<i>Streptococcus dys.ssp dysgalactiae</i>	0	0	1	1	1	99	0	100	99	100	99	0	1	50	86	100	0	1	99	30	2
<i>Streptococcus dys.ssp equisimilis</i>	0	1	25	1	1	99	1	99	100	97	97	1	1	1	45	99	0	1	98	40	94
<i>Streptococcus equi ssp equi</i>	1	0	1	0	0	100	0	100	100	100	0	0	0	0	1	0	0	100	100	100	0
<i>Streptococcus equi ssp zooepidemicus</i>	0	1	15	0	0	100	1	99	100	99	85	0	0	99	100	0	0	0	99	99	99
<i>Streptococcus equinus</i>	100	0	95	0	28	0	1	1	100	0	0	0	30	0	25	7	25	15	17	10	0
<i>Streptococcus group L</i>	0	75	1	0	0	100	1	100	100	100	100	0	0	0	75	100	0	0	100	98	94
<i>Streptococcus intermedius</i>	100	0	87	0	0	0	44	99	100	100	0	0	0	0	99	99	3	3	99	0	40
<i>Streptococcus mitis 1</i>	1	0	3	1	21	0	25	35	99	19	14	1	0	1	94	7	3	26	67	5	0
<i>Streptococcus mitis 2</i>	0	0	3	0	31	0	35	50	100	99	1	0	1	0	100	1	1	31	84	0	0
<i>Streptococcus mutans</i>	99	0	99	1	64	0	1	1	100	18	0	0	99	90	90	100	81	81	1	0	1
<i>Streptococcus oralis</i>	0	0	1	1	50	0	46	72	100	5	1	0	1	0	99	32	1	72	96	0	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0	0	39	60	70	3	79	3	100	57	3	0	0	0	99	98	64	87	84	10	1
<i>Streptococcus porcinus</i>	100	5	99	1	19	99	1	97	97	100	98	0	88	88	83	99	0	0	50	0	100
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0	1	5	98	0	15	0	100	100	99	0	0	8	1	99	98	0	1	61	22	98
<i>Streptococcus salivarius ssp salivarius</i>	85	0	98	1	8	0	70	20	100	0	0	0	5	1	86	67	34	88	74	1	1
<i>Streptococcus sanguis</i>	0	1	42	0	63	0	1	5	100	90	0	0	1	48	83	98	33	55	67	0	0
<i>Streptococcus suis I</i>	0	1	82	53	80	94	76	1	100	91	0	0	7	0	94	100	75	0	100	89	0
<i>Streptococcus suis II</i>	0	1	70	41	91	91	52	3	100	95	0	0	3	1	99	98	63	93	99	96	2
<i>Streptococcus uberis</i>	99	98	100	35	10	86	5	30	100	98	99	0	99	98	99	100	89	10	50	20	0





# API STAPH SYSTÈME D'IDENTIFICATION DES STAPHYLOCOQUES ET MICROCOQUES

d'après bioMérieux sa

TABLEAU DE LECTURE

TESTS	SUBSTRATS	REACTIONS / ENZYMES	RESULTAT	
			NEGATIF	POSITIF
0	Aucun	Témoin négatif	rouge	—
GLU FRU MNE MAL LAC TRE MAN XLT MEL	D-Glucose D-Fructose D-Mannose Maltose Lactose D-Trehalose D-Mannitol Xylitol D-Mélibiose	(Témoin positif)  Acidification à partir du carbohydate	rouge	jaune
NIT	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 10 min	
			incolore-rose pâle	rouge
PAL	$\beta$ -naphtyl ac. phosphate	Phosphatase alcaline	ZYM A + ZYM B / 10 min	
			jaune	violet
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétyl méthyl-carbinol	VP 1 + VP 2 / 10 min	
			incolore	violet-rose
RAF XYL SAC MDG NAG	Raffinose Xylose Saccharose $\alpha$ -méthyl-D-glucoside N-acétyl-glucosamine	Acidification à partir du carbohydate	rouge	jaune
<u>ADH</u>	Arginine	Arginine dihydrolase	jaune	orange-rouge
<u>URE</u>	Urée	Uréase	jaune	rouge-violet

Les tests d'acidification doivent être lus comparativement aux témoins négatif (0) et positif (GLU).

Les tests MNE et XLT peuvent être oranges, lorsqu'ils sont entourés ou précédés de tests positifs. On doit alors les considérer comme négatifs.





**TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / PROZENTTABELLE /  
TABLA DE IDENTIFICACION / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE**

% de réactions positives après 24 h à 35-37°C / % of reactions positive after 24 hrs. at 35-37°C /  
% der positiven Reaktionen nach 24 Std. bei 35-37°C /  
% de las reacciones positivas después de 24 H a 35-37°C / % di reazioni positive dopo 24 ore a 35-37°C

API STAPH V4.0	0	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	LSTR
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	100	100	95	96	88	91	80	0	0	83	97	78	1	0	97	2	90	80	80	0
<i>Staphylococcus auricularis</i>	0	100	99	36	72	10	90	9	0	0	81	0	1	0	0	40	0	15	90	1	0
<i>Staphylococcus capitis</i>	0	100	99	80	43	22	2	36	0	0	86	23	90	0	0	50	0	1	85	35	0
<i>Staphylococcus caprae</i>	0	100	99	70	10	75	74	10	0	0	99	95	99	0	0	0	0	1	99	60	0
<i>Staphylococcus carnosus</i>	0	100	100	99	0	99	99	99	0	0	99	83	83	0	0	0	0	100	100	0	0
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	0	100	100	99	79	100	100	13	0	0	96	96	1	0	1	100	0	31	89	95	0
<i>Staphylococcus cohnii ssp cohnii</i>	0	100	99	66	99	2	97	88	33	0	21	66	94	0	0	2	0	9	2	1	0
<i>Staph. cohnii ssp urealyticum</i>	0	100	100	99	98	98	100	94	64	0	1	94	87	0	0	0	0	98	0	99	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	100	99	70	99	81	2	0	0	1	80	84	68	1	0	97	4	18	73	88	0
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0	99	75	5	99	80	91	60	0	1	78	3	57	0	0	98	13	83	85	1	0
<i>Staphylococcus hominis</i>	0	98	94	41	97	50	86	28	0	1	82	27	70	1	0	97	4	50	43	84	0
<i>Staphylococcus hyicus</i>	0	100	99	99	0	87	99	0	0	0	90	90	15	0	0	99	2	93	100	68	0
<i>Staphylococcus lentus</i>	0	100	100	100	100	100	100	100	7	99	92	21	57	100	100	100	28	100	0	1	0
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	0	100	89	88	99	66	99	0	0	0	99	16	99	0	0	100	0	90	1	50	0
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0	100	99	2	97	90	99	88	22	0	35	14	79	1	0	96	1	70	30	65	0
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	0	100	80	100	0	1	71	0	0	0	99	97	99	0	0	0	0	94	99	0	0
<i>Staphylococcus sciuri</i>	0	99	99	99	99	70	93	98	0	0	83	67	30	0	16	95	7	68	0	0	0
<i>Staphylococcus simulans</i>	0	100	100	57	11	95	92	73	4	0	83	27	38	0	4	97	2	90	97	84	0
<i>Staphylococcus warneri</i>	0	99	99	50	98	19	96	70	0	0	23	16	90	0	0	99	0	6	77	97	0
<i>Staphylococcus xylosus</i>	0	100	100	92	81	85	95	90	30	9	82	75	67	11	82	87	10	80	5	90	0
<i>Kocuria kristinae</i>	0	99	96	99	90	9	84	3	0	0	6	3	93	0	0	90	12	0	0	0	97
<i>Kocuria varians/rosea</i>	0	91	92	8	1	1	8	1	0	0	75	4	8	4	8	4	0	1	1	29	95
<i>Micrococcus spp</i>	0	2	4	0	1	0	1	0	0	0	8	15	1	0	0	1	0	1	11	11	91



# API CAMPY – SYSTÈME D'IDENTIFICATION DES CAMPYLOBACTER

d'après bioMérieux sa

TABLEAU DE LECTURE

TESTS	REACTIONS	RESULTATS	
		NEGATIF	POSITIF
URE	UREase	jaune	orange / rouge
NIT	Réduction des NITrates	<u>NIT 1 + NIT 2 / 5 min</u>	
		incolore	rose / rouge
EST	ESTérase	incolore bleu-pâle	turquoise
HIP	HIPpurate	<u>NIN / 5 min</u>	
		incolore	violet
GGT	Gamma Glutamyl Transférase	<u>FB / 5 min</u>	
		incolore	orange intense
TTC	Réduction du Chlorure de Triphényl Tétrazolium	incolore rose pâle	rose / rouge ou dépôt au fond de la cupule
PyrA ArgA AspA PAL	Pyrrolidonyl Arylamidase L-Arginine Arylamidase L-Aspartate Arylamidase Phosphatase ALcaline	<u>FB / 5 min (PyrA → PAL)</u>	
		incolore incolore incolore incolore	orange orange orange pourpre
H <sub>2</sub> S	production d'H <sub>2</sub> S	incolore	noir
[GLU]	GLUcose (Assimilation)	transparence  (absence de croissance ou sensibilité)	trouble (même très faible)  (croissance ou résistance)
[SUT]	SUccinaTe (Assimilation)		
[NAL]	Acide NALidixique (Sensibilité)		
[CFZ]	CéFaZoline (Sensibilité)		
[ACE]	ACEtate (Assimilation)		
[PROP]	PROPionate (Assimilation)		
[MLT]	MaLaTe (Assimilation)		
[CIT]	CltraTe (Assimilation)		
[ERO]	ERythrOmycine (Sensibilité)		





**TABLEAU D'IDENTIFICATION / IDENTIFICATION TABLE / PROZENTTABELLE / TABLA DE IDENTIFICACION / TABELLA DI IDENTIFICAZIONE**

% de réactions positives après 24 H à 35-37°C / % of positive reactions after 24 hrs at 35-37°C / % der positiven Reaktionen nach 24 Std. bei 35-37°C / % de las reacciones positivas después de 24 H a 35-37°C / % di reazioni positive dopo 24 ore a 35-37°C

API CAMPY	V2.0	URE	NIT	EST	HIP	GGT	TTC	Pyra	ArgA	AspA	PAL	H <sub>2</sub> S	GLUa	SUT	NAL	CFZ	ACE	PROP	MLTa	CITa	ERO	CAT
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>		20	82	68	0	0	42	0	0	0	82	0	0	57	5	1	76	35	6	0	0	99
<i>Campylobacter coli</i>		0	99	80	0	1	63	0	73	0	77	0	0	98	10	79	61	73	20	25	30	100
<i>Campylobacter fetus ssp fetus</i>		0	97	24	0	1	54	0	55	0	14	0	0	98	79	35	71	3	55	7	2	100
<i>Campylobacter fetus ssp venerealis</i>		0	91	1	0	0	30	0	27	0	0	0	0	94	43	2	36	0	26	0	0	100
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>		0	70	9	0	0	50	0	28	0	27	72	0	98	75	5	95	4	60	4	4	100
<i>Campylobacter jejuni ssp jejuni 1</i>		0	98	68	91	0	43	10	4	1	81	0	0	91	4	84	47	2	84	33	1	100
<i>Campylobacter jejuni ssp jejuni 2</i>		0	92	78	99	100	39	15	9	2	73	0	0	96	4	93	59	4	84	25	4	100
<i>Campylobacter jejuni ssp jejuni 3</i>		0	100	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Campylobacter jejuni ssp doylei</i>		0	0	29	100	55	33	0	11	3	92	0	0	55	0	6	40	0	37	25	0	100
<i>Campylobacter lari</i>		0	84	5	0	21	18	0	65	1	9	13	0	6	3	1	2	0	2	1	0	100
<i>"Campylobacter lari ssp UPTC"</i>		100	80	0	0	0	47	0	4	14	0	4	0	4	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Campylobacter mucosalis</i>		0	0	30	0	0	2	0	7	85	45	80	0	96	48	0	96	0	87	0	3	0
<i>"Campylobacter sputorum ssp fecalis"</i>		0	100	45	0	1	75	0	37	90	15	99	0	99	45	0	99	0	82	0	2	99
<i>Campylobacter sputorum ssp bubulus</i>		0	72	20	0	0	60	0	1	72	4	88	0	52	20	4	44	0	32	0	0	1
<i>Campylobacter upsaliensis</i>		0	78	7	8	1	35	0	1	20	70	2	0	30	0	1	16	1	5	1	0	30
<i>Helicobacter cinaedi</i>		0	81	5	0	0	3	0	0	0	14	0	0	15	0	0	31	5	6	0	0	100
<i>Helicobacter fennelliae</i>		0	5	88	0	0	1	0	25	1	90	0	0	40	0	0	0	0	70	0	0	99
<i>Helicobacter pylori</i>		98	0	1	0	91	0	0	4	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100



Choisissez votre langue : français



Si vous êtes enregistré  
entrez votre login et mot de passe :

Login

Mot de passe

[J'ai oublié mon mot de passe](#)

Si vous désirez devenir un utilisateur apiweb™, cliquez sur le bouton suivant :

XCSOURCE Pied à Coulisse Numérique Jauge de Précision Electronique 100mm / 0.1 mm, 4 pouces/0,01 micromètre MA488



Localisation de la région de Hassi Mameche sur la carte



A decorative graphic consisting of a thin vertical line on the left, a thin horizontal line at the top, and a wider vertical grey bar on the left side, all intersecting at the top-left corner.

# **Travaux Scientifiques**



## **Travaux scientifiques**

### **Publication et participation à des congrès**

#### **Publications**

- **ARABI Abed**, Djibaoui Rachid, Malihac Catherine, Sisbane Ismahene, Lattab Aicha, Bechelaghem Nadia, Dahah Hichem, Reziga Charef, Ettalhi Mehdi, TALEB Farida, Ouar Korichi Mounira, Dahloum Lahouari. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves and twigs of *Pistacia lentiscus* growing in Mostaganem Province (Algeria). *International Journal of Biosciences | IJB |*, Vol. 10, No. 5, p. 146-158, 2017.
- Lattab Aicha, Djibaoui Rachid and **Arabi Abed**. Antibacterial Activity and Anti-Biofilm Formation of Henna (*Lawsonia inermis*) Extracts against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 7(5), 92-104, 2017.
- Lattab Aicha, Djibaoui Rachid, **Arabi Abed**, Dahah Hichem. Effect of salicylic acid on biofilm formation and on some virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Biosciences*, 10(1), 60-71, 2017.
- Lattab Aicha, Belkacem Imane, Djibaoui Rachid, Rebai Oifa, Chibani Abdelwaheb, **Arabi Abed**. Eradication of *Pseudomonas* biofilm by disinfectants and some plants extracts. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 5(1), 6-16, 2015.
- Bechelaghem Nadia, Djibaoui Rachid, Ettalhi Mehdi, **Arabi Abed**. Diagnosis of a chronic vaginitis: Characterization of *Candida albicans* and *in vitro* antagonistic activities of vaginal *Lactobacillus*. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 5(4), 143-150, 2015.
- DAHLOUM Lahouari, HALBOUCHE Miloud, **ARABI Abed**. Evaluation de la qualité des œufs chez deux phénotypes de poules locales : cou nu-frisées et normalement emplumées. Comparaison avec les œufs de souche commerciale. *Revue Agriculture*, 9, 10-18, 2015.





**Communications Internationales par affiche avec actes sur résumé**

- **Abed ARABI**, Aicha LATTAB, Farida TALEB, Mounira OUAR KORICHI, Rachid DJIBAOUI and Lahouari DAHLOUM. Antimicrobial Effect of Essential Oils of *Pistacia lentiscus L* on *Helicobacter pylori*. 8<sup>es</sup> Journées Scientifiques Internationales sur la valorisation des Bioressources, Monastir (Tunisie), 05-07 Mai, 2017 (Attestation de participation).
- Aicha LATTAB, Rachid DJIBAOUI et **Abed ARABI**. In vitro, effet antibactérien et anti-biofilm formation des extraits acétatique et butanolique de *Lawsonia inermis* vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa*. 8<sup>es</sup> Journées Scientifiques Internationales sur la valorisation des Bioressources, Monastir (TUNISIE), 05-07 Mai 2017. (Attestation de participation).
- Aicha LATTAB, Rachid DJIBAOUI, **Abed ARABI** et Hichem Dahah. Action antibactérienne des extraits de henné (*Lawsonia inermis*) sur *Pseudomonas aeruginosa*. International Conference on Integrated Environmental Management For Sustainable Development, Sousse (Tunisia), 27-30 October 2016.

**Communications Nationales par affiche avec actes sur résumé**

- Aicha LATTAB, Rachid DJIBAOUI et **Abed ARABI**. Salicylic acid affects biofilm formation and some virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. VII<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (Université de Mostaganem, Algérie), 26 et 27 Avril 2017. (Attestation de participation)
- DAHAH Hicham, **ARABI Abed**, DJIBAOUI Rachid, NEMMICHE Said. Etude des métabolites à effet antimicrobien chez *Pseudomonas* : caractérisation et effet sur quelques germes pathogènes. V<sup>èmes</sup> journées scientifiques de la faculté des sciences de la nature et de la vie (Université de Mostaganem, Algérie), 07 et 08 Mai 2014. (Attestation de participation).
- **Abed ARABI**, Farida TALEB et Rachid DJIBAOUI. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus L* sur *Helicobacter pylori*. IV<sup>èmes</sup>





Journées Scientifiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (Université de Mostaganem, Algérie), 09 et 10 Avril 2013. (Attestation de participation).

### **Antimicrobial effect of essential oils of *Pistacia lentiscus* L. on *Helicobacter pylori***

**Abstract:** Failures eradication of microorganisms responsible for infectious diseases, are mainly due to multidrug resistance of these antibiotics commonly used in therapy. Indeed the use of medicinal plants can provide direct answers to some health problems.

*Helicobacter pylori* lives exclusively in the human stomach and is one of the few known microorganisms can survive in an acid environment also *Helicobacter pylori* resistance to common antibiotics pushed us exploited the antibacterial effects of essential oils of a medicinal plant in Algeria, *Pistacia lentiscus* L.

The bacterium was isolated from biopsies of inpatients, on Columbia agar supplemented with 10% horse blood. Practically, the essential oils are extracted from then 500 grams of fresh leaves and twigs of *Pistacia lentiscus* L. by Clevenger device. The antimicrobial activity of essential oils tested is achieved by determining the MIC on solid medium.

The colonies obtained on Columbia agar supplemented with 10% horse blood being 1 mm in diameter, transparent, glossy, discretely convex, round and regular contour. About the effect of the essential oils of *Pistacia lentiscus* L. on *Helicobacter pylori*, for values ; 50% and 25% there was complete absence culture thus a sensitivity of effect, while very meaningful to 12.5% with a diameter of 40 mm, 6.25% with a diameter of 36 mm, 12% with a diameter of 26 mm and 1.56% with a diameter of 22 mm. The diameter of the two zones of inhibition was 40 mm, the values for 0.78% and 0.39% no zone of inhibition was detected. So what germ is resistant to these two percentage values.

The antibiothérapeutiques treatments, however, remain powerless before such a circumstance. The traditional method of use of medicinal plants remains an issue for treating microbial diseases.

*Pistacia lentiscus* L., the plant is our choice, our ancestors used it to cure stomach pain while chewing mastic excreted by the tree at the trunk.

**Keywords :** *Helicobacter pylori*, *Pistacia lentiscus* L., essential oils and antibacterial effect.





## Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves and twigs of *Pistacia lentiscus* growing in Mostaganem Province (Algeria)

ARABI Abed<sup>1\*</sup>, Djibaoui Rachid<sup>1</sup>, Malihac Catherine<sup>2</sup>, Sisbane Ismahene<sup>3</sup>, Lattab Aicha<sup>1</sup>, Bechelaghem Nadia<sup>1</sup>, Dahah Hichem<sup>1</sup>, Reziga Charef<sup>4</sup>, Ettalhi Mehdi<sup>4</sup>, TALEB Farida<sup>5</sup>, Ouar Korichi Mounira<sup>5</sup>, Dahloum Lahouari<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Microbiology and Plant Biology, University of Mostaganem, Algeria

<sup>2</sup>Organic and Macromolecular Chemistry Research Unit, University of Le Havre, France

<sup>3</sup>Laboratory of Food Technology and Nutrition, University of Mostaganem, Algeria

<sup>4</sup>Laboratory of Medical Analysis, Health Public Department, Public Hospital of Aïn-Tedeles, Mostaganem, Algeria

<sup>5</sup>Laboratory of Enterobacteriology, Pasteur Institut, Algiers, Algeria

<sup>6</sup>Laboratory of Animal and Applied Physiology, University of Mostaganem, Algeria

**Key words:** *Pistacia lentiscus*, Essential oil, Chemical composition, Antimicrobial activity.

<http://dx.doi.org/10.12692/ijb/10.5.146-158>

Article published on May 18, 2017

### Abstract

This study was designed to examine the chemical composition and the antibacterial activity of essential oil of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) from Mostaganem province (northwest of Algeria). Oil was obtained using the hydrodistillation method (Clevenger type) and subsequently analyzed by Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS). The *in vitro* antimicrobial activity against some clinical pathogens was evaluated using the agar diffusion method, the minimum inhibitory concentrations (MIC) were also determined against the same microorganisms using the microdilution method. Among the 50 constituents identified (representing 99.9% of the oil composition) of which the monoterpene hydrocarbons are the dominated (72.43%);  $\alpha$ -pinene (42.13%), sabinene (6.46%),  $\gamma$ -terpinene (6.21%) et  $\alpha$ -terpinolene (2.18%) being the main components. Antimicrobial activity revealed that the essential oil had promising anti-microbial effects against several multiresistant bacteria, giving satisfactory zone diameter values (40.00, 24.71, 24.60, 23.54, 16.07, 14.58 and 12.86 mm) and MIC values (0.05, 0.1, 0.1, 0.2, 0.2, 0.2 and 0.1%) for gram-negative bacteria: *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Enterobacter cancerogenus* and *Serratia fonticola* and gram-positive bacteria: *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*, respectively.

\* Corresponding Author: Arabi Abed ✉ [arabi.abed@univ-mosta.dz](mailto:arabi.abed@univ-mosta.dz)

## Introduction

Medicinal plants have been used in traditional medicine since ages. Currently, despite the multiplicity of curative substances, the search on medicinal plants have led to discover novel drug against diverse diseases (Derwich *et al.* 2010). The World Health Organization (WHO) has also indicated that herbal medicines serve the health needs of about 80 percent of the world's population ; especially for millions of people in the vast rural areas of developing countries (Hosseinzadeh *et al.*, 2015). Essential oils, also called volatile odoriferous oil, are aromatic oily liquids extracted from different parts of plants :Leaves, peels, barks, flowers, buds, seeds, and so on (Tongnuanchan and Benjakul, 2014). There are at least 150 types of essential oils that have been traded in the international market (Kusuma and Mahfud, 2017). *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) is known by its long utilisation in folk medicine since the ancient Greeks. It is an evergreen shrub or small tree from 1 to 8 meters tall (Iauk *et al.*, 1996). *P. lentiscus* is very common in the mediterranean basin, it is found in the wild, in scrub and scrubland in all types of soil, although it prefers siliceous soils (More and White, 2005). The essential oil and gum of the cited plant have been widely used as food and drink additives in the Mediterranean region, without any toxicity reported (Loutrari *et al.*, 2006; Ghalem and Mohamed, 2009).

The essential oil of *Pistacia lentiscus* is also used in cosmetics, perfumery and as a flavoring agent in food preparations (Daferera *et al.*, 2002). In Algeria, the leaves of *Pistacia spp.* were used to purify water and to increase the time of conservation of dry figs and sun-dried tomatoes; they are also used as natural preservatives for fish and meat products (Djenane *et al.*, 2011). Scientific findings also revealed the wide pharmacological activities from various parts of *Pistacia*, such as antioxidant, antimicrobial, antiviral, anticholinesterase, anti-inflammatory, antinociceptive, antidiabetic, antitumor, antihyperlipidemic, antiatherosclerotic, and hepatoprotective activities and also their beneficial effects in gastrointestinal disorders (Bozorgiet

*al.*, 2013; Remila *et al.*, 2015; Della *et al.*, 2013). According to Van der Berg (1998), the essential oil of this plant has an anti-*Helicobacter pylori* activity and can be beneficial in the treatment of peptic ulcer.

Therefore, due to the importance of this plant, we conducted the present study to investigate the chemical composition of essential oil of *Pistacia lentiscus* harvested from Mostaganem region (Algeria) and to evaluate its antibacterial potential against many of pathogens.

## Material and methods

### Study area and plant material

The samples of aerial parts (leaves and twigs) of *Pistacia lentiscus* (Fig. 1), were harvested in March 2016 from the Mostaganem province located at 35°55'52" N, 0°05'21" E, at an altitude of 85 m and with an area of 2269 km<sup>2</sup> large. The region is characterized by a Mediterranean climate and showed relatively abundant populations of *Pistacia*. The average yearly temperatures and total precipitation amounts are 17.9°C and 347mm (www.fr.climate-data.org).

### Essential oil extraction

A sample of 250 g of whole fresh leaves and twigs of *Pistacia lentiscus* were subjected to hydrodistillation in a Clevenger apparatus (Fig. 2) for 3 h with 2000 ml of distilled water according to Duru *et al.* (2003). The essential oil obtained was dried over anhydrous sodium sulfate (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). The oil was finally stored in obscurity at 4°C until further analysis (Gardeli *et al.*, 2008). The yield of essential oil was calculated using the equation below (Kusuma and Mahfud, 2017).

$$y = \frac{V}{w} \times 100$$

Where: y is the oil yield (% w/w), V is the weight of extracted oil (g), and W is the weight of fresh plant parts (g).

### Essential oil analysis

The analysis of the essential oil was performed using a Shimadzu GC-2010 chromatograph connected to an MS-QP2010 SE mass spectrometer at Organic and Macromolecular Chemistry Research Unit (URCOM),

University of Le Havre, France.

Essential oil was initially diluted to 1/100 (v/v) in ethanol 96°. The separation of compounds was carried out on a ZB-5MS capillary column (5% phenyl, 95% dimethylsiloxane, 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm film thickness). The carrier gas used was Helium (He) at a flow rate of 1 ml/min. The volume of injections was 1 µL of an ethanol-solution oil, injected in split mode (ratio split 1/50). The column was programmed initially at 50°C for 3 min, increased gradually to 270°C with a 5 °C/min heating ramp and subsequently maintained for 15 min. The mass spectrometer was operated in electron impact mode with ionization energy of 70 eV, the analyzer is carried out in the scanning range of 35-300 m/z. Oils components were identified by co-injection with standards (wherever possible) and confirmed with National Institute of Standards and Technology (NIST) V.2.0 GC-MS library. The relative concentration of each compound in the essential oil was expressed as percentage by peak area normalization (Babushok *et al.*, 2011).

#### *Antibacterial activity of essential oil*

The essential oil of *Pistacia lentiscus* was screened against seven bacterial species relatively resistant to the antibiotics usually used in therapy: five Gram-negative (*Helicobacter pylori*, *E.coli*, *Morganella morganii*, *Enterobacter cancerogenus* and *Serratia fonticola*) and two gram positive (*Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*). *Helicobacter pylori* was isolated from gastric biopsies of a patient suffering from a gastric ulcer at the Pasteur Institute, Algiers, while the other bacteria were isolated from the stools of 20 patients hospitalized in Ain Tedeles district, Mostaganem. All bacteria were identified by studying their cell morphology and by biochemical tests using API system (API 20 E, API 20 NE, STAPH and API CAMPY bioMérieux Marcy-l'Étoile, France).

The chromatogram is a lab test that allows phytotherapists to analyze in vitro the antibacterial activity of essential oils and to more accurately select those essential oils best able to suppress or destroy

the targeted germs (Peter and Kate Damian, 1995). Different types of chromatograms, in solid, liquid, are exploitable. However, in everyday practice, the solid medium is the simplest and most easily reproducible (Pibiri, 2005).

The antibacterial activity of essential oils was determined by the agar diffusion method (Hazzit *et al.*, 2009). Hense, Petri dishes (90 mm) were prepared by pouring 20 ml of Muller Hinton Agar (MHA) medium and allowed to solidify and to dry for 30 min. McFarland density of bacterial culture was adjusted in normal saline (85%, v/v) using densitometer to achieve the final concentration of ~10<sup>6</sup> UFC/ml of each test bacteria individually (Mohapatra *et al.*, 2011) and 0.1 ml of standardized inoculum suspension (0.5 McF ~10<sup>6</sup> UFC/ml) was poured and uniformly extended and the inoculum was allowed to dry for 5 min.

To prepare the sample stock solution, a volume of pure essential oil was dissolved at 10% (v/v) in dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich-Química, S.A.). Then, sterile filter paper discs of 6 mm diameter (Filter LAB ANOIA, Barcelona, Spain) were impregnated with 5 µL of essential oil using a micropipette. The dishes were left for 15 min at room temperature to allow diffusion of the essential oil and then incubated at 37 °C for 24 hours. A negative control was carried out by deposition of 5 µl of DMSO on disks stored on a previously inoculated medium of the tested bacterium. Each assay in this study was replicated 3 times.

Laboratory growth of *Helicobacter pylori* is difficult and can be achieved by using complex media containing serum, blood, or blood derivatives (Olivieri *et al.*, 1993). For the Antimicrobial test against *Helicobacter pylori*, the inoculated plates were incubated in MHA plus 10% horse blood for 48 h at 37°C under microaerophilic environment, obtained with a GENbox Microaer paper sachet (Biomérieux) inside an anaerobic jar (oxygen concentration, 5%; CO<sub>2</sub> concentration, 10%) and incubated for 48-72 h at 37°C (Medouakh, 2010). After incubation, the

diameter of the clear zone around the disc was measured using a slurry foot and expressed in millimeters (mm) as antimicrobial activity. The sensitivity of the tested bacteria to the essential oil is classified according to the halos of inhibition diameters :  $\emptyset < 8$  mm: resistant bacteria;  $9 \text{ mm} < \emptyset < 14$  mm: sensitive bacteria;  $15 \text{ mm} < \emptyset < 19$  mm: very sensitive bacteria and  $\emptyset > 20$  mm: extremely sensitive bacteria (Ponce *et al.*, 2003).

The antibacterial tests and the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) are carried out according to the method reported by Remmal *et al.* (1993) and Farah *et al.* (2001). The essential oil is emulsified in 10% (DMSO) in order to disperse the compounds and to improve their contact with the microorganisms tested. Dilutions were prepared at 1/10, 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/300, 1/400 and 1/500 in DMSO solution. A volume of 1.5 ml of each of the dilutions is added to test tubes containing 13.5

ml of the nutrient agar MHA previously sterilized for 20 min at 120°C, cooled to 45°C and poured into Petri dishes. The final concentrations of essential oil are : 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/3000, 1/4000 and 1/5000 (v/v). Negative Controls containing culture medium and DMSO alone were also prepared.

## Results and discussion

### Chemical composition of *Pistacia lentiscus* essential oil

The average yield of the essential oil extracted from leaves and twigs of *Pistacia lentiscus* was 0,39 %. This finding agrees with results of Arab *et al.* (2014) in the Boumerdes province, Algeria, Zrira *et al.* (2003) in Morocco and Congiu *et al.* (2002) in Sardinia. Our values were however highest than those reported in Tunisia (Amri *et al.*, 2012) and Grec (Tsokou *et al.*, 2007).

**Table 1.** Chemical composition of volatile oil isolated by hydrodistillation from *Pistacia lentiscus* from Mostaganem region, Algeria.

Compound <sup>a</sup>	RT (min)	RI	Area	%
Tricyclene	7.475	921	601719	0.24
$\alpha$ -Thujene	7.6	925	594140	0.24
$\alpha$ -Pinene	7.87	934	104477800	42.13
Camphen	8.34	949	2910112	1.17
Sabinene	9.07	972	16021996	6.46
$\beta$ -Pinene	9.21	976	4370203	1.76
$\beta$ -Myrcene	9.575	988	3367891	1.36
$\alpha$ -phellandrene	10.11	1005	1521771	0.61
$\alpha$ -Terpinene	10.45	1016	10162820	4.1
<i>o</i> -Cymene	10.69	1023	1792977	0.72
Limonene	10.84	1028	4471214	1.8
$\beta$ -Phellandrene	10.89	1030	4329380	1.75
E- $\beta$ -Ocimene	11.05	1035	502755	0.2
Z- $\beta$ -Ocimene	11.385	1045	3715100	1.5
Butyrate iso amyl	11.705	1055	1205552	0.49
$\gamma$ -Terpinene	11.77	1057	15413257	6.21
$\alpha$ -Terpinolene	12.615	1084	5417549	2.18
2-Nonanone	12.77	1089	1987035	0.8
Linalool	13.065	1098	297633	0.12
Nonanol	13.125	1100	1046866	0.42
iso-Amyl isovalerate	13.275	1105	426275	0.17

Terpinen-4-ol	15.575	1180	15434061	6.22
$\alpha$ -Terpineol	16	1194	7313787	2.95
Isopentyl hexanoate	17.565	1248	915591	0.37
Isopamyl hexanoate	17.625	1250	509819	0.21
Bornyl acetate	18.565	1282	2562876	1.03
2-Undecanone	18.77	1289	2615408	1.05
2-Tridecanol	19.05	1299	243635	0.1
$\beta$ -Elemene	21.435	1388	316135	0.13
Charyophelene	22.265	1420	10991141	4.43
Isoamyl benzoate	22.685	1437	655542	0.26
$\alpha$ -Humulene	23.18	1456	1810825	0.73
$\beta$ -Cadinene	23.575	1471	234555	0.09
$\gamma$ -Muurolene	23.645	1474	597657	0.24
Germaacrene D	23.82	1481	3357121	1.35
Valencene	24.18	1495	309789	0.12
$\alpha$ -Muurolene	24.23	1497	563572	0.23
$\gamma$ -Cadinene	24.6	1512	391191	0.16
Cubebol	24.715	1517	2397832	0.97
Spathulenol	26.155	1576	423032	0.17
Caryophyllene oxide	26.305	1582	250775	0.1
Globulol	26.38	1585	328341	0.13
Cubenol	27.255	1621	280067	0.11
T-Muurolol	27.345	1625	586024	0.24
Epi-Cadinol	27.705	1639	3847662	1.55
Muurolol	27.77	1642	833174	0.34
$\alpha$ -Cadinol	27.975	1651	4920965	1.98
Bisabolol	28.07	1654	237741	0.1
Benzyl Benzoate	30.42	1751	279968	0.11
Manool oxyde	35.105	1943	255446	0.1
<i>Monoterpenes</i>				
Hydrocarbons				72.43
Oxygenated				9.29
<i>Sesquiterpenes</i>				
Hydrocarbons				7.48
Oxygenated				5.69
Ketones				
Alcohols				
Esters				
Unknown				
Total identified				99.9

<sup>a</sup> Compounds listed in order of elution from an ZB-5MS capillary column.

RT: Retention time obtained by chromatogram (Fig. 3).

RI: Retention index.

The oil yield of *Pistavia lentiscus* seems to depend on the nature of plant parts used, the extraction method and geographical origin. According to Okoh *et al.* (2007), the yield of essential oil showed a maximum at the full flowering stage (0.97%) and a minimum during the pre-flowering stage (0.13%).

The constituents of leaves and twigs essential oil of *Pistacia lentiscus* are listed in order of their elution on the ZB-5MS capillary column (Fig. 3).

The GC-MS analysis of the *Pistacia lentiscus* essential oil resulted in the detection of 50 components

comprising 99.9% of the oil (Table 1). The essential oil was characterized by a high percentage of monoterpene hydrocarbons (72.43%), followed by oxygenated monoterpenes (9.29%) and sesquiterpene hydrocarbon (7.48%), while the oxygenated sesquiterpenoid fraction was 5.69%. Similar findings have been reported in the literature (Dob *et al.*, 2006). Different compounds have been observed in several studies of the chemical composition of essential oils of *pistacia lentiscus* in the Mediterranean countries (Castola *et al.*, 2000; Ben Douissa *et al.*, 2005; Derwich *et al.*, 2010).

**Table 2.** Antibacterial activity of essential oil of *Pistacia lentiscus* collected in the region of Mostaganem, Algeria against seven pathogenic bacterial strains.

Strain	Oil concentrations								NC
	1/100	1/250	1/500	1/1000	1/2000	1/3000	1/4000	1/5000	
<i>Hp</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Ec</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Mm</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Enc</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sf</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sa</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Ef</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+

- : inhibition ; + : growth ; *Hp* : *Helicobacter pylori* ; *Ec* : *Escherichia coli* ; *Mm* : *Morganella morganii* ; *Enc* : *Enterobacter cancerogenus* ; *Sf* : *Serratia fonticola* ; *Sa* : *Staphylococcus aureus* ; *Ef* : *Enterococcus faecalis*, NC = negative control.

In this study  $\alpha$ -pinene (42.13%) was the major compound of the essential oil. This compound was also abundant in the samples from Oran, Algeria (19.0%) (Dob *et al.*, 2006), France (31.9%) (Castola *et al.*, 2000), Spain (13.0%) (Ana Fernández *et al.*, 2000) and Morocco (16.1% - 38.5%) (Zrira *et al.*, 2003). The other main constituents of the oil were sabinene (6.46%), terpinen-4-ol (6.22%),  $\gamma$ -terpinene (6.21%), caryophellene (4.43%),  $\alpha$ -terpinene (4.1%),  $\alpha$ -terpineol (2.95%) and  $\alpha$ -terpinolene (2.18%). Furthermore, this majority is also observed in the chemical composition of the essential oil of *pistacia lentiscus* in Spain, whose main compounds were  $\alpha$ -pinene (24.9%) followed by terpinen-4-ol (6.8%), sabinene (4.6%),  $\gamma$ -terpinene (3.3%),  $\alpha$ -terpineol

(2.5%),  $\alpha$ -terpinene (2.2%) and trans-caryophyllene (2.0%) (Ana Fernández *et al.*, 2000). However, the oils obtained from fresh leaves of *Pistacia lentiscus* collected in Tunisia (Aissiet *et al.*, 2016) displayed a different profile than that detected in the present study since it consisted mainly of germacrene D (11.9%),  $\alpha$ -pinene (9.9%), limonene (8.5%),  $\delta$ -cadinene (8.5%),  $\beta$ -caryophyllene (8.2%) and terpinen-4-ol (5.1%). Similarly, comparing our results with those reported by Kivçak *et al.* (2004), the major compounds in Turkey were terpinene-4-ol (29.2%),  $\beta$ -caryophyllene (29.2%) and p-cymene (7.1%). According to Olga Tzakou *et al.*, (2017) the common feature for the samples of *Pistacia atlantica* studied, as well as for the most studied *Pistacia* species, is the biosynthesis of monoterpenoids as the

main class of compounds in their essential oils, irrespective of the observed variability of the terpene composition of the oils.

The chemical composition of essential oils can vary among species and among the different plant parts in the same species. Boelens and Jimenez (1991) reported that the main constituents of the gum oil were: 79%  $\alpha$ -pinene and 3%  $\beta$ -myrcene; of the leaf oil: 11%  $\alpha$ -pinene and 19%  $\beta$ -myrcene; of the unripe-fruit

oil: 22%  $\alpha$ -pinene and 54%  $\beta$ -myrcene, and of the ripe-fruit oil: 11%  $\alpha$ -pinene and 72%  $\beta$ -myrcene. Other factors can affect the oil chemical composition such as climate, soil quality, harvest season, genetics (Cunha *et al.*, 2013) and nutrients (Djenane *et al.*, 2011). Otherwise, yield and composition of the oils were correlated with herbivores, weather parameters (day length, temperature and humidity) and to the attack of fungal pathogens, particularly in the months of rainfall (Hassiotis *et al.*, 2010).

**Table 3.** Mean values of Diameter of Inhibition Zone (DIZ, mm) and Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of essential oil of *Pistacia lentiscus* collected in the region of Mostaganem against seven pathogenic bacterial strains.

Strain	DIZ	MIC %	Oil sensitivity
<i>Helicobacter pylori</i>	40.00	0.05	ExS
<i>E.coli</i>	24.71	0.1	ExS
<i>Morganella morganii</i>	24.60	0.1	ExS
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	16.07	0.2	VS
<i>Serratia fonticola</i>	14.58	0.2	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	23.54	0.2	ExS
<i>Enterococcus faecalis</i>	12.86	0.1	S

ExS= Extra sensitive ; VS= Very sensitive ; S= Sensitive.

### Antimicrobial activity

Lately it has been targeted the interest for biologically active molecules, isolated from plant species to eradicate pathogenic microorganisms.

The *in vitro* antibacterial activity of *Pistacia lentiscus* essential oil were qualitatively and quantitatively assessed by the presence or absence of inhibition zones and MIC values, respectively.

As seen in tables 2 and 3, the essential oil of *Pistacia lentiscus* has displayed an important inhibitory activity against both gram positive and gram negative bacteria tested where the average diameter of inhibition zone ranged from 12.86 to 40.00 mm (table 3) as also reported in the literature (Magiatis *et al.*, 1999; Koutsoudaki *et al.*, 2005; Mharti *et al.*, 2011).

The diameters of the inhibition zones allowed us to classify the bacterial strains according to their

sensitivity to the essential oil tested according to the spectrum indicated above (Ponce *et al.*, 2003). For gram-negative bacteria, the largest zones of inhibition were obtained for *Helicobacter pylori*, *E. coli* and *Morganella morganii* (40.00, 24.71 and 24.60 mm, respectively). It was thus considered that these organisms were extra sensitive to the oil. In addition, *Enterobacter cancerogenus* was found to be more sensitive to the oil than *Serratia fonticola* (16.07 and 14.58 mm, respectively). In the case of gram positive bacteria, *Staphylococcus aureus* has proved to be more sensitive than *Enterococcus faecalis* with inhibition diameters of 23.54 and 12.86 mm, respectively.

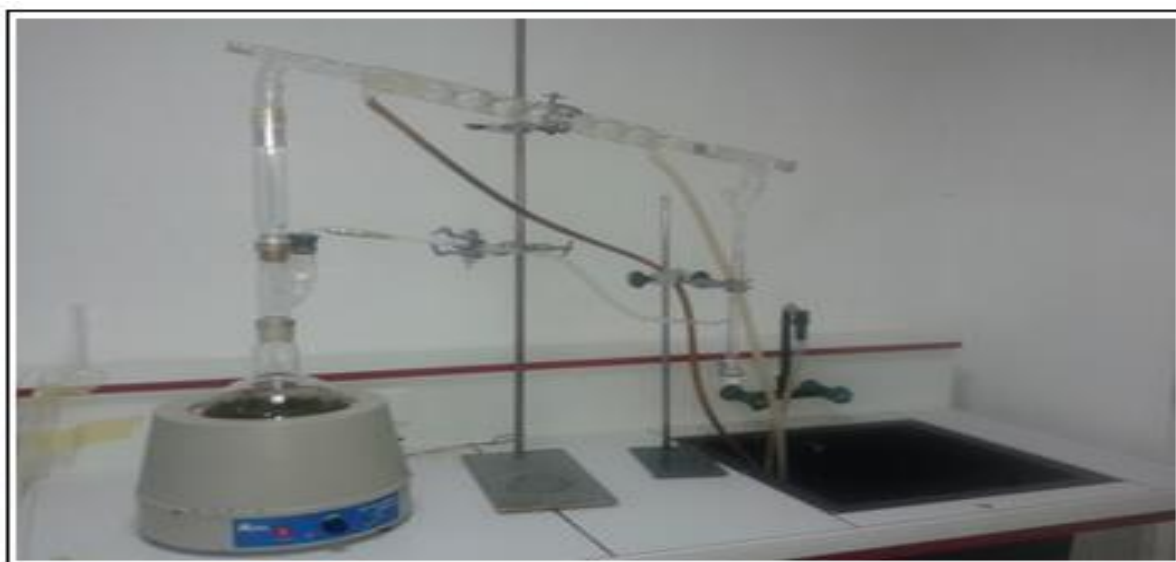
The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was defined as the lowest concentration of the test samples where the absence of growth was recorded (Ponce *et al.*, 2003). The MIC of essential oil of *Pistacia lentiscus* was tested at concentrations ranging from 1/100 to 1/5000 (v/v).



**Fig. 1.** *Pistacia lentiscus* of Mostaganem province, Algeria.

As seen in table (3), the essential oil of *Pistacia lentiscus* revealed a strong inhibitory activity against all germs tested. Although, the microorganisms studied did not express the same sensitivity. The data indicated that *Helicobacter pylori* is inhibited at a concentration of 1/1000 (v/v), while *Escherichia coli*,

*Morganella morganii* and *Staphylococcus aureus* were inhibited at a concentration of 1/500 (v/v). However, a higher MIC value (1/250) (v/v) was obtained with *Enterobacter cancerogenus* and *Enterococcus faecalis*.



**Fig. 2.** The experimental setup for *Pistacia lentiscus* essential oil extraction by hydrodistillation (Clevenger type).

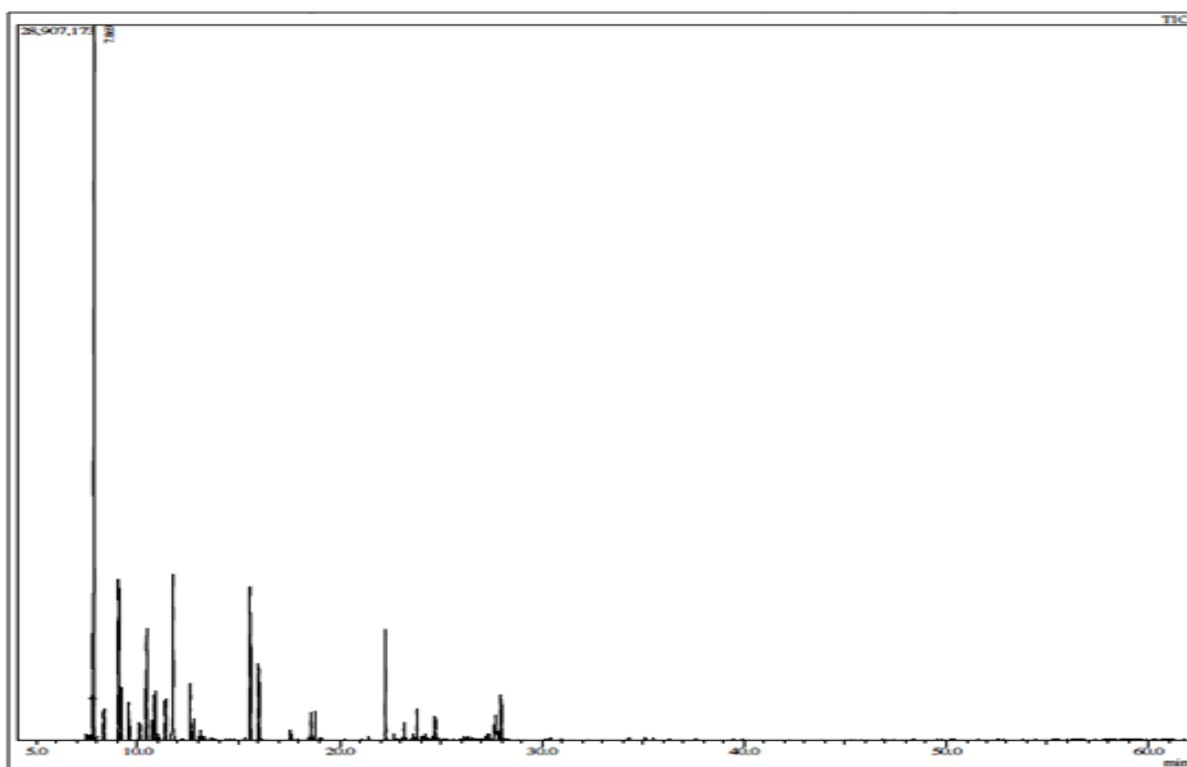
Differences in MIC values of bacteria may be related to differential susceptibility of bacterial cell wall, which is the functional barrier to minor differences present in the outer membrane in the cell wall composition (Zhao *et al.*, 2001). Gram-negative bacteria are surrounded by a thin peptidoglycan cell

wall, which itself is surrounded by an outer membrane containing lipopolysaccharide which creates a barrier toward hydrophobic compounds such as those found in essential oils. While, gram-positive bacteria lack an outer membrane but are surrounded by layers of peptidoglycan many times

thicker than is found in the gram-negatives (Silhavy *et al.*, 2010).

Koutsoudaki *et al* (2005) and Burt (2004) reported that plant extracts are more active against gram-positive than gram-negative bacteria. However, results of this study are supported by Zaika (1988) hypothesis who proposed that gram-positive bacteria are more resistant than gram-negative bacteria to the antibacterial properties of plant volatile oils. Indeed, several researchers have reported that there is a relationship between the most abundant volatile compounds in the essential oil tested and the antimicrobial activity (Ghalem and Mohamed, 2009; Koutsoukadi *et al.*, 2005). According to Rios and Recio (2005), extracts or oils from plant species with MIC values below 100 µg/ml are considered

promising as potential antimicrobial agents. Halouiet *al*(2015) reported that leaves essential oil exhibit a higher antibacterial effect with MIC values of 0.015, 0.5, 1 and 4 % fold least compared to twigs essential oil with MIC values of 0.5, 4, 4 and 16% against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. According to Hafset *al.* (2017) the minimum inhibitory concentration for *Mycobacterium aurum*, *Bacillus sp.* and *Staphylococcus aureus* was 1/250 (v/v), while the most resistant strains were *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* and *Salmonella sp.* with an MIC of 1/125 (v/v). In an other hand, Medjkane *et al*(2016) reported a strong antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* essential oil against algerian clinical isolates of *Helicobacter pylori* with a MIC of 1/5000 (v/v).



**Fig. 3.** Chromatogram of *Pistacia lentiscus* from Mostaganem, Algeria.

In the present work,  $\alpha$ -pinene (42.13%) is the main compound of essential oil of *Pistacia lentiscus* studied. Several authors reported that essential oils rich in  $\alpha$ -pinene have demonstrated potential antibacterial activity. Naturally, the antibacterial efficacy of essential oil of *pistacia lentiscus* is due to a number of its components working synergistically

(Derwich *et al.*, 2010).

### Conclusion

This work was carried out to study the chemical composition of the essential oils of *Pistacia lentiscus* and to evaluate its antibacterial activity in vitro. Based on the results of composition analysis of oil,  $\alpha$ -

pinene was detected as the main compounds. The results of the antibacterial activity tests indicate that essential oil of *Pistacia lentiscus* exhibited high degree of inhibitory activity against most of the seven tested pathogens. Overall, this study further support the view that *Pistacia lentiscus* are promising as nature source with antibacterial activity and thus confirm its potential uses as antimicrobial agents for industrial applications such as pharmaceutical, perfumery and food preservation. Nonetheless, *in vivo* studies should be conducted to justify and evaluate the potential use of *Pistacia lentiscus* oil.

### Acknowledgements

We gratefully acknowledge Lazreg Hafida, Maazouz Oum Keltoum (Faculty of life and natural sciences, University of Mostaganem) and Othman Mohamed (URCOM EA 3221, University of Le Havre, France) for their logistical assistance and support. We wish also to thank Debba Mohamed Bachir (Department of agricultural sciences, University of Mostaganem) for his kind identification of plant material.

### References

- 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 Product* **91**, 56-65.  
<http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.06.025>.
- Amri I, Hamrouni L, Manana M, Jamoussi B.** 2012. Chemical composition and herbicidal effects of *Pistacia lentiscus* L. essential oil against weeds. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants* **2**, 558-565.
- Arab K, Bouchenak O, Yahiaoui K.** 2014. Phytochemical and evaluation of the antimicrobial and antioxidant activity of essential oils and phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L. *Journal of Fundamental and Applied Sciences* **6(1)**, 79-93.  
<http://dx.doi.org/10.4314/jfas.v6i1.7>.
- Babushok VI, Linstrom PJ, Zenkevich IG.** 2011. Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical Chemistry* **40**.  
<http://doi.org/10.1063/1.3653552>.
- Boelens MH, Jimenez R.** 1991. Chemical Composition of the Essential Oils from the Gum and from Various Parts of *Pistacia lentiscus* L. *Flavour and Fragrance Journal* **6**, 271-275.  
<http://dx.doi.org/10.1002/ffj.2730060406>.
- Bozorgi M, Memariani Z, M Mobli, Mohammad Hossein, Salehi Surmaghi, Mohammad Reza Shams-Ardekani, Roja Rahimi.** 2013. Five *Pistacia* species (*Pistacia vera*, *Pistacia atlantica*, *Pistacia terebinthus*, *Pistacia khinjuk* and *Pistacia lentiscus*) : A Review of their traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. *The Scientific World Journal*.  
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/219815>.
- Burt S.** 2004. Essential oil : their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology* **94**, 223-253.  
<http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>.
- Castola V, Bighelli A, Casanova J.** 2000. Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Corsica. *Biochemical Systematics and Ecology* **28**, 79-88.  
[http://doi.org/10.1016/S0305-1978\(99\)00038-1](http://doi.org/10.1016/S0305-1978(99)00038-1).
- Congiu R, Falconieri D, Marongiu B, Piras A, Porcedda S.** 2002. Extraction and isolation of *Pistacia lentiscus* L. essential oil by supercritical CO<sub>2</sub>. *Flavour and Fragrance Journal* **17**, 239-244.  
<http://doi.org/10.1002/ffj.1095>.
- Cunha LCS, de Moraes SAL, Martins CHG, Martins MM, Chang R, de Aquino FJ T, A de Oliveira, Moraes TS, Machado FC, da Silva CV, Evandro A do Nascimento.** 2013. Chemical composition, cytotoxic and antimicrobial activity of

essential oils from *Cassia bakeriana Craib*. against aerobic and anaerobic oral pathogens. *Molecules* **18**, 4588-4598.

<http://dx.doi.org/10.3390/molecules18044588>.

**Daferera D, Pappas C, Tarantilis PA, Polisiou M.** 2002. Quantitative analysis of  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -myrcene in mastic gum oil using FT-Raman spectroscopy. *Food Chemistry* **77**, 511-515.

[http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00382-X](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00382-X).

**Damian P, Damian K.** 1995. Aromatherapy : scent and psyche : using essential oils for physical and emotional well-being. Healing Arts Press edition (September 1).

**Dellai A, Souissi H, Borgi W, Bouraoui A, Chouchane N.** 2013. Antiinflammatory and antiulcerogenic activities of *Pistacia lentiscus* L. leaves extracts. *Industrial Corps and Products* **49**, 879-882.

<http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.010>.

**Derwich E, Manar A, Benziane Z, Boukir A.** 2010. GC/MS Analysis and in vitro antibacterial activity of the essential oil isolated from leaf of *pistacia lentiscus* growing in Morocco. *World Applied Sciences Journal* **8(10)**, 1267-1276.

**Djenane D, Yanguéla J, Montañés L, Djerbal M, Roncalés P.** 2011. Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media : Efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control* **22**, 1046-1053.

<http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.12.015>.

**Dob T, Dahmane D, Chelghoum C.** 2006. Chemical composition of the essential Oils of *Pistacia lentiscus* L. from Algeria. *Journal of Essential Oil Research* **18**, 335-338.

<http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2006.9699105>.

**Duru ME, Cakir A, Kordali S, Zengin H, Harmadar M, Izumi S, Hirata T.** 2003. Chemical

composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *Fitoterapia* **74**, 170-176.

[http://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00318-0](http://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00318-0).

**Farah A, Satrani B, Fechtal M, Chaouch A, Talbi M.** 2001. Composition chimique et activités antibactérienne et antifongique des huiles essentielles d'*Eucalyptus camaldulensis* et son hybride naturel (clone 583). *Acta Botanica Gallica* **148** (3), 183-190.

<http://dx.doi.org/10.1080/12538078.2001.10515886>.

**Fernández A, Camacho A, Fernandez C, Altarejos J, Perez P.** 2000. Composition of the essential oils from galls and aerial parts of *Pistacia lentiscus* L. *Journal of Essential Oil Research* **12**, 19-23.

<http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2000.9712031>.

**Gardeli C, Vassiliki P, Athanasios M, Kibouris T, Komaitis M.** 2008. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L. : Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. *Food Chemistry* **107**, 1120-1130.

<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.036>.

**Ghalem BR, Mohamed B.** 2009. Antimicrobial activity evaluation of the oleoresin oil of *Pistacia vera* L. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* **3** (3), 092-096.

**Hafse M, Fikri Benbrahim K, Farah A.** 2017. Biological activities of taouate's *pistacia lentiscus* essential oil. *Journal of Advances in Biology* **10(1)**, 2039-2043.

<https://doi.org/10.24297/jab.v10i1.5976>.

**Haloui T, Farah A, Balouiri M, Chraibi M, Fadil M, Fikri Benbrahim K, Belrhiti Alaoui A.** 2015. Bacteriostatic and bactericidal profile of leaves and twigs essential oils of Moroccan *Pistacia lentiscus* L. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **5(06)**, 050-053.

<http://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50607>.

**Hassiotis CM, Lazari DM, Vlachonasios KE.**

2010. The effects of habitat type and diurnal harvest on essential oil yield and composition of *Lavandula angustifolia* Mill. Fresenius Environmental Bulletin **19(8)**, 1491-1498.

**Hazzit M, Baaliouamer A, Veríssimo AR, Faleiro ML, Miguel MG.** 2009. Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. Food Chemistry **116**, 714-721.  
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.018>.

**Hosseinzadeh S, Jafarikukhdan A, Hosseini A, Armand R.** 2015. The application of medicinal plants in traditional and modern medicine : A review of *Thymus vulgaris*. International Journal of Clinical Medicine **6**, 635-642.

**Iauk L, Ragusa S, Rapisarda A, Franco S, Nicolosi VM.** 1996. In vitro antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* L. extracts : Preliminary report. Journal of Chemotherapy **8(3)**, 207-209.  
<http://doi.org/10.1179/joc.1996.8.3.207>.

**Kivçak B, Akay S, Demirci B, Baser K.** 2004. Chemical composition of essential oils from leaves and twigs of *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var. chia and *Pistacia terebinthus* from Turkey. Pharmaceutical biology **42**, 360-366.  
<http://dx.doi.org/10.1080/13880200490519677>.

**Koutsoudaki C, Krsek M, Rodger A.** 2005. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of *Pistacia lentiscus* var. chia. Journal of Agricultural and Food Chemistry **53(20)**, 7681-7685.  
<http://dx.doi.org/10.1021/jf050639s>.

**Kusuma HS, Mahfud M.** 2017. The extraction of essential oils from patchouli leaves (*Pogostemon cablin* Benth) using a microwave air-hydrodistillation method as a new green technique. The Royal Society of Chemistry **7**, 1336-1347.  
<http://dx.doi.org/10.1039/C6RA25894H>.

**Loutrari H, Magkouta S, Pyriochou A, Koika**

**V, Kolisis FN, Papapetropoulos A, Roussos C.** 2006. Mastic oil from *Pistacia lentiscus* var. chia. inhibits growth and survival of human K562 leukemia cells and attenuates angiogenesis. Nutrition and Cancer **55(1)**, 86-93.  
[http://dx.doi.org/10.1207/s15327914nc5501\\_11](http://dx.doi.org/10.1207/s15327914nc5501_11).

**Magiatis P, Melliou E, Shaltsounis AL, Chinou IB, Mitaku S.** 1999. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. chia. Planta Medica **65**, 749-752.  
<http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-960856>.

**Medjkane M, Allem R, Medjahed H, Taleb F, Merouane A, Mouffok F.** 2016. Antimicrobial activity of the essential oil isolated from *Pistacia lentiscus* leaves against *Helicobacter pylori* algerian clinical isolates. Journal of essential oil-bearing plants **19**, 466-474.  
<http://doi.org/10.1080/0972060X.2015.1119659>.

**Medouakh L.** 2010. Mise en evidence de *Helicobacter pylori* à partir des biopsies gastriques et son antagonisme avec les lactobacilles. Thèse de Doctorat es sciences, université dOran, Algérie. 234 p.

**Mharti FZ, Lyoussi B, Abdellaoui A.** 2011. Antibacterial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* used in Moroccan folkloric medicine. Natural Product Communications-Journals **6(10)**, 1505-1506.

**Mohapatra DP, Thakur V, Brar SK.** 2011. Antibacterial efficacy of raw and processed honey. Biotechnology Research International. 6 pages.  
<http://dx.doi.org/10.4061/2011/917505>.

**More D, White J.** 2005. Encyclopédie des arbres plus de 1800 espèces et variétés du monde. Flammarion **18**, 797.

**Okoh OO, Sadimenko AA, Afolayan AJ.** 2007. The effects of Age on the yield and composition of the essential oils of *Calendula officinalis*. Journal of Applied Sciences **7(23)**, 3806-3810.

<http://doi.org/10.3923/jas.2007.3806.3810>.

**Olivieri R, Bugnoli M, Armellini D, Bianciardi S, Rappuoli R, Bayeli PF, Abate L, Esposito E, De Gregorio L, Aziz J, Basagni C, Figura N.** 1993. Growth of *Helicobacter pylori* in media containing cyclodextrins. *Journal of Clinical Microbiology* **31**, 160-162.

**Pibiri MC.** 2005. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen des huiles d'huile essentielle. Thèse de Doctorat. Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, EPFL.

**Ponce AG, Fritz R, Del Valle C, Roura SI.** 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Food Science and Technology* **36**, 679-684.

[http://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00088-4](http://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00088-4).

**Remila S, Atmani-Kilani D, Delemasure S, Connat JL, Azib L, Richard T, Atmani D.** 2015. Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. *European Journal of Integrative Medicine* **7**, 274-286.

<http://doi.org/10.1016/j.eujim.2015.03.009>.

**Remmal A, Tantaoui-Elaraki A, Bouchikhi T, Rhayour K, Ettayebi M.** 1993. Improved method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *Journal of Essential Oil Research* **5**, 1179-1184.

**Rios JL, Recio MC.** 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* **100**, 80-84.

<http://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.025>.

**Silhavy TJ, Kahne D, Walker S.** 2010. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**, 1-16.

<http://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>.

**Tongnuanchan P, Benjakul S.** 2014. Essential Oils : Extraction, Bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of Food Science* **79**, 1231-1249.

<http://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>.

**Tsokou A, Georgopoulou K, Melliou E, Magiatis P, Tsitsa E.** 2007. Composition and enantiomeric analysis of the essential oil of the fruits and the leaves of *Pistacia vera* from Greece. *Molecules* **12**, 1233-1239.

<http://doi.org/10.3390/12061233>.

**Tzakou O, Bazos I, Yannitsaros A.** 2007. Volatile metabolites of *Pistacia atlantica* Desf. From Greece. *Flavour Fragr Journal* **22**, 358-362.

<http://dx.doi.org/10.1002/ffj.1805>.

**Van der Berg KJ, Horst J, Boon JJ, Sudmeijer O.** 1998. Cis-1,4- poly-  $\beta$ -myrcene; the structure of the polymeric fraction of mastic resin (*Pistacia lentiscus* L.) elucidated. *Tetrahedron Letters* **39**, 2645-2648.

[http://doi.org/10.1016/S0040-4039\(98\)00228-7](http://doi.org/10.1016/S0040-4039(98)00228-7).

**Zaika LL.** 1988. Spices and herbs : their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Nutrition* **9**, 97- 118.

**Zhao WH, Hu ZO, Okubo S, Hara Y, Shimamura T.** 2001. Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and  $\beta$ -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother* **45**, 1737-1742.

<http://doi.org/10.1128/AAC.45.6.1737-1742.2001>.

**Zrira S, Elamrani AA, Bendjilali B.** 2003. Chemical composition of essential oil of *Pistacia lentiscus* L. From Morocco-a seasonal variation. *Flavour And Fragrance Journal* **18**, 475-480.

<http://doi.org/10.1002/ffj.1221>.