

## Antimicrobial Effects of *Pistacia lentiscus* L. Foliar Extracts on fresh turkey breast cutlets

### Effets antimicrobiens des extraits foliaires de *Pistacia lentiscus* L. dans des escalopes de dinde

H. DEBBABI<sup>1</sup>, K. NEMRI<sup>1,2</sup>, H. RIAHI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of AgroFood Industries, National Agronomic Institute of Tunisia, University of Carthage, Tunisia.

<sup>2</sup> Institut Supérieur des Etudes Technologiques de Sidi Bouzid, Tunisia

<sup>3</sup> Laboratory of Research and Development, Canned food industries Group, Tunis, Tunisia.

\*Corresponding author: debbahih@gmail.com

**Abstract** - Nowadays, the food industry is constantly seeking natural, safe and low-cost antimicrobial agents in an attempt to replace synthetic additives. The objective of this study was to evaluate *Pistacia lentiscus* L. foliar extracts as natural additives to fresh turkey cutlets. First, *in vitro* antimicrobial activity of the aqueous extracts prepared by maceration, infusion, decoction and digestion and essential oil obtained by hydrodistillation of *Pistacia lentiscus* leaves was studied by disc-diffusion method, against seven bacterial and three fungal strains. The infused and digested extracts inhibited *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* more than the essential oil and were inactive towards *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*. They led to an inhibition of the growth of *Penicillium* (35%) and *Fusarium* (19%).

In a second step, the application on fresh turkey breast cutlets of crushed dry leaves and infused aqueous extract led to inhibit the growth of the total aerobic mesophilic flora and the fungal flora during storage at + 4°C for 8 days.

In conclusion, *Pistacia lentiscus* L. foliar extracts can be used to reduce microbial spoilage during storage of fresh turkey breast cutlets.

**Keywords:** food conservation, *Pistacia lentiscus*, plant extracts, mastic tree, total viable counts

**Résumé** - L'objectif de cette étude est d'évaluer les extraits de feuilles de *Pistacia lentiscus* L. comme additifs naturels pour la conservation des escalopes de dinde. Dans un premier temps l'activité antimicrobienne des extraits aqueux préparés par macération, infusion, décoction et digestion et de l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation de feuilles de *Pistacia lentiscus* a été étudiée *in vitro* vis-à-vis de sept souches bactériennes et trois espèces fongiques. Les résultats ont mis en évidence que les extraits aqueux de feuilles sont dotés *in vitro* d'une activité antibactérienne et antifongique dépendant du protocole d'extraction et de la souche bactérienne. Les extraits infusés et digérés ont montré un pouvoir inhibiteur sur *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus* plus important que celui de l'huile essentielle et sont inactifs vis-à-vis d'*Escherichiacoli* et de *Salmonella enteritidis*. Ils inhibent également la croissance de *Penicillium* (-35%) et de *Fusarium* (-19%).

Dans un second temps, une application sur des escalopes de dinde fraîches, de broyat de feuilles sèches et d'extrait aqueux infusé a montré une inhibition de la croissance de la flore mésophile aérobie totale et la flore fongique pendant un stockage de huit jours à +4°C.

En conclusion, les extraits foliaires de *Pistacia lentiscus* L. peuvent être utilisés pour réduire la charge microbienne pendant le stockage d'une semaine des escalopes de dinde fraîches.

**Mots clés:** Conservation des aliments, *Pistacia lentiscus* L., extraits de plantes, arbre au mastic, charge microbienne



## 1. Introduction

L'Arbre au mastic ou Pistachier lentisque ou Lentisque, *Pistacia lentiscus* L., est un arbrisseau dioïque de la famille des Anacardiaceae des garrigues et maquis des climats méditerranéens, à feuilles composées paripennées persistantes, donnant des drupes rouges puis noires. Il est cultivé en Tunisie pour sa résine récoltée après incision de l'écorce en été et en automne (Ghrab et al. 2013).

L'huile essentielle des feuilles est riche en monoterpènes : myrcène (3,4-39,2%), limonène (10,3-43,8%),  $\alpha$ -pinène (2,9-34,2%), terpinène 4-ol (8,2-34,7%),  $\alpha$ -terpinéol (10,4-11,0%),  $\beta$ -pinène (2,2-9,6%),  $\square$ -terpinène (9 %), etc. Elle est aussi riche en sesquiterpènes : germacrène-D (4,3-15,8%),  $\beta$ -gurjunène (0,0-7,8%),  $\square$ -muurolène (1,1-2,9%),  $\alpha$ -humulène (0,9-2,6%), etc. (Ben Douissa et al. 2005 ; Bampouli et al. 2014; Bachrouch et al. 2015; Aissi et al. 2016).

Les extraits éthanoliques des feuilles et l'huile essentielle sont actifs contre des bactéries souvent résistantes telles les mycobactéries (Sqalli et al. 2007), ou *Helicobacter pylori* (Dabos et al. 2010). L'huile essentielle agit sur les spores de *Clostridium botulinum* (Daifas et al. 2004), sur *Listeria monocytogenes* CECT 935 (Djenane et al. 2011), *Staphylococcus aureus* et *Aspergillus niger* (Mezni et al. 2015) ainsi que *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp., *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium aurum*, *Mycobacterium smegmatis* (Hafsé et al. 2013). D'autre part l'extrait éthanolique des feuilles a montré une activité inhibitrice sur *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma* sp. et *Fusarium* sp. (Kordali et al. 2003 ; Benhammou et al. 2008). Par ailleurs les extraits aqueux et éthanoliques des feuilles de lentisque sont antioxydants et piègent le radical libre DPPH(1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl)(Benhammou et al. 2008 ; Bampouli et al. 2014 ; Mezni et al. 2015).

Les activités antimicrobiennes et antioxydantes des extraits aqueux et éthanoliques des feuilles de lentisque sont en partie due à leur richesse en composés polyphénoliques (Romani et al. 2002; Boubakar et al. 2004; Dahmoune et al. 2014): acides phénoliques (acides caféique, gallique, vanillique), flavonols (myricétol et dérivés, dérivés du quercétol), flavanols (catéchine), anthocyanes (cyanidol, delphinidine). Ces activités biologiques intéressantes peuvent expliquer que, depuis 2014, le Pistachier lentisque fait partie de la liste des plantes utilisables dans les compléments alimentaires en France et au sein de la communauté européenne (Arrêté du JORF du 24 juin 2014). Comme il constitue une matière végétale naturelle, facilement disponible à faible coût, il serait dès lors judicieux de tester son potentiel comme agent de conservation.

L'objectif de la présente étude a été d'évaluer les extraits foliaires de *Pistacia lentiscus* L. comme additif alimentaire pour contrôler la croissance microbienne dans une matrice alimentaire en l'occurrence, la viande de dinde au cours du stockage à +4°C pendant 8 jours. L'activité des extraits aqueux et de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. vis-à-vis de sept souches bactériennes et trois espèces fongiques a été préalablement évaluée *in vitro* par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Quatre modes d'extraction aqueuse ont été évalués (macération, décoction, infusion, digestion) dans le but de déterminer la meilleure méthode d'extraction.

## 2. Matériel et Méthodes

### 2.1. Matériel végétal

Les feuilles de *Pistacia lentiscus* L. ont été collectées en mars 2011 dans la région de Tunis (Tunisie). Elles ont été séchées à l'étuve à 40°C pendant 12h, broyées à l'aide d'un pilon dans un mortier de laboratoire, et passées sur une grille de 1 mm de diamètre, et stockées dans des sachets en plastique scellés, à température ambiante, à l'abri de l'humidité et de la lumière.

### 2.2. Préparation des extraits

L'huile essentielle a été extraite par hydrodistillation des feuilles (Ben Douissa et al. 2005).

Différents extraits aqueux de feuilles ont été préparés à raison de 10 g de poudre pour 100 ml d'eau distillée :

- macération à température ambiante trois jours sous agitation ;
- infusion 24 heures dans de l'eau préalablement portée à ébullition ;
- décoction dans de l'eau bouillante maintenue quinze minutes à ébullition ;
- digestion dans de l'eau portée à 50°C pendant 3 h.

Après décantation, les extraits ont été filtrés sur papier-filtre Whatman de porosité 3 mm et concentrés sous vide à l'évaporateur rotatif.

### 2.3. Souches microbiennes

Les souches ont été isolées à partir de prélèvements d'origine clinique (Institut Pasteur de Tunis, Institut Supérieur de Biotechnologie de Sidi Thabet en Tunisie) et alimentaire (Institut Supérieur de Biotechnologie de Sidi Thabet ; Institut National Agronomique de Tunisie). Elles ont été identifiées et confirmées selon les méthodes normalisées et standardisées (Holt 1994 ; Collins et al. 2004):

- Gram + : *Bacillus cereus* (Institut Supérieur de Biotechnologie de Sidi Thabet, Tunisie) ; *Staphylococcus aureus* (Institut Supérieur de Biotechnologie de Sidi Thabet) ; *S. aureus* ATCC 1894 (Institut Pasteur) ; *Enterococcus faecalis* (Institut Pasteur)

- Gram- : *Enterobacter cloacae* (Institut Pasteur) ; *Pseudomonas aeruginosa* (Institut Supérieur de Biotechnologie de Sidi Thabet) ; *P. aeruginosa* ATCC 1893 (Institut Pasteur) ; *Escherichia coli* (Institut Pasteur) ; *Salmonella enteritidis* (Institut Pasteur) ;

Elles sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance.

- Moisissures : *Penicillium digitatum* (colonies vertes), *P. italicum* (colonies bleues) et *Fusarium* sp. (Institut National Agronomique de Tunisie) ; Elles sont cultivées sur le milieu nutritif Sabouraud.

### 2.4. Activité antimicrobienne

#### 2.4.1. Méthode de diffusion sur gélose

Les propriétés antibactériennes des extraits et de l'huile essentielle de feuilles de lentisque ont été évaluées *in vitro* par la méthode de diffusion sur gélose (ou méthode des disques) (Collins et al. 2004). Pour les bactéries, des boîtes de Pétri contenant 15 ml du milieu gélosé Mueller Hinton sont inoculées stérilement par 0,1 ml d'une solution microbienne ( $2-3 \times 10^5$  unités formant colonies UFC/ml) puis sont laissées sécher pendant 5 minutes. Pour les moisissures, trois ml d'inoculum ont été déposés à la surface de la gélose Mueller Hinton, et l'excès de liquide a été retiré à l'aide d'une pipette puis le milieu ainsiensemencé a été séché pendant 15 min à 37°C.

Des disques stériles en papier Whatman (6 mm de diamètre) ont été imprégnés par 5 µl des extraits à l'aide d'une micropipette capillaire (Vitrex®, Socimed, Stains, France) et déposés sur la gélose inoculée. Les boîtes de Pétri sont placées 15 min à 25°C puis incubées 24 h à 37°C.

Les diamètres D des halos d'inhibition formés autour des disques traduisant l'activité antibactérienne sont mesurés à 0,5 mm près (règle d'ingénieur Staedtler®). Selon les diamètres observés, les bactéries ont été classées en non sensibles ( $D \leq 8$  mm), moyennement sensibles ( $9 < D \leq 14$  mm), sensibles ( $15 < D \leq 19$  mm) et très sensibles ( $D > 20$  mm) (Ponce et al. 2003). Le témoin négatif correspond à un disque imprégné d'eau distillée et le témoin positif est la gentamicine (10 mg/disque).

Le pourcentage d'inhibition (PI) de la croissance mycélienne a été calculé selon la formule suivante (Benhammou et al. 2008) :  $PI = (1 - Dn/Do) \times 100$

où Dn est le diamètre moyen des colonies en présence de l'antagoniste et Do le diamètre moyen des colonies témoins.

Chaque essai a été réalisé en triplicata.

#### 2.4.2. Détermination des CMI

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI), c'est-à-dire les plus faibles concentrations capables d'inhiber toute croissance bactérienne, ont été déterminées par dispersion des extraits en milieu liquide (Collins et al. 1994). Les solutions-mères des extraits ont été diluées successivement pour obtenir une gamme de solutions allant de 250 à 15 mg/ml. Les microorganismes ( $10^6$  UFC/ml) ont étéensemencés dans le bouillon nutritif correspondant supplémenté de 10 % de glucose et de rouge phénol, répartis dans des tubes contenant l'extrait à tester, puis incubés 24 h à 37°C. La CMI a été estimée comme la plus petite dilution dans laquelle aucune croissance macroscopique n'est observée, en l'occurrence caractérisée par l'absence de la décoloration du milieu de culture due à l'acidification causée par le catabolisme microbien du glucose. Chaque essai a été répété trois fois.

### 2.5. Essais de conservation de l'escalope de Dinde

#### 2.5.1. Préparation des échantillons

Les escalopes de dinde, *Pectoralis major*, ont été choisies comme modèle à cause des risques importants de contamination qu'elles subissent lors de l'abattage, du découpage, du transport avec d'éventuelles ruptures de la chaîne du froid. Des escalopes (60g ; 24 h *post-mortem*) ont été achetées dans un supermarché de Tunis et réfrigérées dans les 10 minutes après l'achat. Elles ont été réparties en trois

groupes de six échantillons (3 escalopes/échantillon) pour la détermination de la charge microbienne initiale (flore mésophile totale FMT, levures et moisissures), ainsi que celle des coliformes totaux et des entérobactéries.

Les échantillons ont été traités par la poudre de feuilles séchées, par l'extrait infusé et par de l'eau distillée stérile (témoin). Ils ont été ensuite placés dans des sachets en plastique résistants, transparents et refermables, à usage alimentaire (polyéthylène basse densité, Tunisie) et conservés pendant 8 jours à  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ . Les analyses microbiologiques ont été effectuées à 1, 2, 3, 4, 7 et 8 jours de stockage.

### 2.5.2. Analyses microbiennes

Les solutions mères ont été stérilement préparées à partir de 10 g de viande broyée et mélangés dans 90 ml d'eau peptonée (0,1 %), tamponnée et stérile (ISO 6887-2, 2003). Elles ont été homogénéisées et laissées 20 minutes à température ambiante pour la revivification des germes. Des dilutions décimales sont préparées dans de l'eau peptonée stérile (0,1 %)(ISO 6887-2, 2003). Une aliquote de 0,1 ml de chaque dilution a été ensemencée dans des milieux appropriés (Merck Chemicals, Darmstadt, Allemagne) à raison de 15 ml dans des boîtes de Pétri en plastique et incubés comme décrit dans le Tableau 1 (NF V 08-051 1999 ; NF V 08-054 1999 ; NF V 08-060 – 1996 ; NF V08-059 1995).

**Tableau 1.** Milieux et conditions de culture

Microorganismes	Milieu de culture	Incubation
FMT	Plate Count Agar	72 h à $30^\circ\text{C}$
Coliformes totaux	gélose lactosée biliée au vert brillant et au rouge neutre (VBRL)	24 h à $30^\circ\text{C}$
Entérobactéries	gélose VBRL	24 h à $44^\circ\text{C}$
Levures et moisissures	oxytétracycline glucose agar	5 jours à $25^\circ\text{C}$

Les résultats sont exprimés en  $\log_{10}$  unités formant colonies (UFC)/g.

### 2.6. Analyses statistiques

Les calculs de moyenne, d'écart type et l'analyse de variance ANOVA ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 4.00 de 2003.

## 3. Résultats et Discussion

### 3.1. Activité antibactérienne *in vitro* des extraits aqueux et de l'huile essentielle des feuilles de *P. lentiscus*

Les différents extraits aqueux et l'huile essentielle ont une activité inhibitrice sur la croissance *in vitro* des souches bactériennes testées (Tableau 2). Le diamètre d'inhibition du témoin négatif (eau) a été de 6 mm pour chacun des essais.

**Tableau 2 :** Activité antibactérienne des extraits et de l'huile essentielle des feuilles de *Pistacia lentiscus* par la méthode de diffusion sur disque.

Souche bactérienne	Diamètre d'inhibition D (mm)*					
	Infusion	Décoction	Macération	Digestion	Huile essentielle	Gentamycine (positif)
<i>Bacillus cereus</i>	17,7 ± 1,0	14,7 ± 0,6	18,0 ± 1,0	19,7 ± 1,1	13,3 ± 0,6	29,4 ± 1,2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	17,3 ± 0,6	11,0 ± 1,5	9,7 ± 0,6	13,3 ± 1,4	12,7 ± 1,2	27,5 ± 1,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	20,3 ± 1,3	13,3 ± 0,6	17,3 ± 1,5	17,7 ± 0,6	13,3 ± 0,6	29,7 ± 1,21
<i>Enterococcus faecalis</i>	21,3 ± 1,3	10,7 ± 0,7	15,7 ± 1,0	18,7 ± 1,2	14,3 ± 1,1	19,3 ± 1,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	10,7 ± 0,6	9,6 ± 0,5	8,3 ± 0,5	12,3 ± 1,6	10,7 ± 0,6	30,4 ± 1,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10,3 ± 0,6	9,7 ± 0,6	12,0 ± 1,0	11,3 ± 0,6	9,3 ± 0,6	31,3 ± 1,2
<i>Enterobacter cloacae</i>	13,7 ± 1,0	15,0 ± 0,8	20,0 ± 1,2	13,0 ± 0,8	8,7 ± 0,6	24,3 ± 1,1*
<i>Escherichia coli</i>	7,7 ± 0,6	7,7 ± 1,2	7,3 ± 0,6	7,3 ± 0,6	6,7 ± 0,6	30,3 ± 1,2
<i>Salmonella enteritidis</i>	6,0 ± 0,3	6,0 ± 0,3	6,0 ± 0,3	6,0 ± 0,3	6,0 ± 0,3	27,6 ± 1,2

\* le chloramphénicol a été utilisé comme témoin positif à cause de la résistance de cette souche à la gentamycine

L'analyse statistique ANOVA à deux facteurs (protocole d'extraction, souche bactérienne) a indiqué une différence significative pour le facteur (traitement ;  $p < 0,001$ ), le facteur (souche ;  $p < 0,001$ ) et une interaction significative entre ces deux facteurs ( $p < 0,001$ ), indiquant ainsi que l'effet antibactérien sur une souche dépend du protocole d'extraction. L'infusion suivie de la digestion a conduit à la meilleure activité antibactérienne contre *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*. De même, l'infusion apparaît aussi active que la gentamycine contre *Enterococcus faecalis*. La décoction n'a conduit qu'à une sensibilité intermédiaire des bactéries *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, et *Enterococcus faecalis* mais à une sensibilité élevée d'*Enterobacter cloacae*. En revanche, tous les extraits et l'huile essentielle sont inefficaces contre *Salmonella enteritidis* et *Escherichia coli* et peu actifs contre *Pseudomonas aeruginosa*. L'huile essentielle est dotée d'une activité antibactérienne intermédiaire vis-à-vis de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, et *Enterococcus faecalis*.

Les bactéries Gram+ apparaissent donc plus sensibles que les bactéries Gram- aux extraits infusés et digérés ( $D \geq 15$  mm). Les extraits testés n'ont pas montré d'effet inhibiteur contre *Pseudomonas aeruginosa*, qui contient dans sa membrane des porines de faible perméabilité. Rhouma et al. (2009) ont également observé une absence d'activité contre *Pseudomonas*, mais une activité importante des extraits aqueux et éthanoliques de feuilles de *Pistacia vera* et *P. atlantica* vis-à-vis *Bacillus subtilis* et *Agrobacterium tumefaciens*.

Les bactéries *Escherichia coli* et *Salmonella enteritidis* sont résistantes à l'action aussi bien des extraits aqueux que de l'huile, corroborant les travaux de Benhammou et al. (2008) sur des extraits organiques de feuilles de *P. lentiscus*. Les bactéries Gram+ sont sensibles aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH, et les extraits naturels, en raison de l'absence de membrane externe (Haloui et al. 2015). La sensibilité des bactéries Gram+ aux extraits aqueux est attribuée à leur membrane externe hydrophile qui peut favoriser la pénétration de composés hydrophiles dans la membrane cellulaire (Hafsé et al. 2013).

Les extraits aqueux sont plus efficaces que l'huile essentielle contre les bactéries testées ( $p < 0,05$ ), mais moins que l'antibiotique de référence. Cependant, ces extraits ne sont pas des produits purs mais des extraits bruts. Les souches testées n'ont qu'une sensibilité intermédiaire voire nulle vis-à-vis de l'huile essentielle. Ce résultat ne corrobore pas ceux de Ben Douissa et al. (2005), Benhammou et al. (2008), Mezni et al (2015) et de Haloui et al. (2015), qui mettent en évidence une activité antimicrobienne des huiles essentielles de *P. lentiscus*. Cette disparité peut être attribuée à la capacité de l'agent antibactérien de diffuser uniformément dans l'agar (Barra et al. 2007). La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne influe aussi sur les résultats.

L'extrait infusé présente la CMI la plus faible vis-à-vis d'*E. faecalis* (Tableau 3). Les CMI les plus élevées ont été obtenues vis-à-vis de *Pseudomonas*, *E. coli* et *S. enteritidis* pour tous les extraits.

**Tableau 3 :** Concentrations minimales inhibitrices des extraits foliaires aqueux de *Pistacia lentiscus* pour neuf souches bactériennes testées par la méthode de dispersion en milieu liquide.

Souche bactérienne	CMI (mg/ml)			
	Infusion	Décoction	Macération	Digestion
<i>Bacillus cereus</i>	62,5	125	125	62,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	62,5	125	125	125
<i>Staphylococcus aureus</i>	31,3	62,5	62,5	62,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	15,6	31,3	31,3	31,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	250	250	250	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	125	125	125	125
<i>Enterobacter cloacae</i>	125	62,5	62,5	125
<i>Escherichia coli</i>	250	250	250	250
<i>Salmonella enteritidis</i>	250	250	250	250

Les résultats obtenus pour la CMI sont en accord ceux obtenus par la méthode de diffusion sur disques. En effet, ils confirment un pouvoir inhibiteur important de l'extrait infusé sur la croissance important vis-à-vis d'*E. faecalis*. Les valeurs de CMI élevées sont dues au fait que les extraits testés sont bruts et non purs. Les CMI des huiles les plus efficaces sont très faibles, souvent inférieures à 0,1 % (Mezni et al. 2015 ; Haloui et al. 2015). Nos résultats indiquent que la CMI varie du simple au double pour les deux souches de *S. aureus* et celles de *P. aeruginosa*. Cela peut être expliqué soit par la variabilité de

sensibilité des souches de différentes origines soit par le vieillissement de l'une des souches. Les résultats de cette étude confirment les résultats des études de Benhammou et al. (2008) et de Djenane et al. (2011a) indiquant que la force et le spectre d'activité variaient entre le type de Gram de bactéries cibles et le mode d'extraction de *P. lentiscus*.

### 3.2. Activité anti fongique *in vitro* des extraits aqueux et de l'huile essentielle des feuilles de *P. lentiscus*

L'activité antifongique dépend de l'espèce testée et du protocole d'extraction utilisé (Tableau 4).

**Tableau 4 :** Activité antifongique de quatre extraits et de l'huile essentielle des feuilles de *Pistacia lentiscus* par la méthode de diffusion sur gélose

Souche	Extraits aqueux						Huile essentielle			
	Infusion		Décoction		Macération		Digestion		essentielle	
	D(mm)	PI	D(mm)	PI	D(mm)	PI	D(mm)	PI	D(mm)	PI
<i>Penicillium digitatum</i>	53,6 ± 0,6	39,0	61,0 ± 1,0	30,6	73,6 ± 0,6	16,3	53,6 ± 1,1	39,0	87,3 ± 1,1	0,8
<i>Penicillium italicum</i>	56,0 ± 1,0	36,4	65,6 ± 1,5	25,3	77,3 ± 1,2	12,1	52,3 ± 1,0	32,5	89,3 ± 1,5	-1,5
<i>Fusarium</i> sp.	46,7 ± 0,5	15,0	47,0 ± 0,7	14,5	47,3 ± 0,6	14,0	46,7 ± 0,6	15,0	34,7 ± 0,6	23,9

Les résultats sont exprimés sous forme de diamètre d'inhibition D en mm et de pourcentage d'inhibition PI calculé comme décrit dans la section 2.5.1

L'huile essentielle n'est pas dotée d'une activité inhibitrice vis-à-vis des deux espèces de *Penicillium* et faible contre *Fusarium* sp. En revanche, des souches de *Penicillium* sont plus sensibles à l'activité des quatre extraits que *Fusarium* sp. L'activité inhibitrice de la croissance des *Penicillium* est plus forte pour les extraits infusés et digérés. Rhouma et al. (2009) ont également observé une activité antifongique des extraits aqueux et éthanoliques de feuilles de *P.vera* et *P. atlantica*. Cette activité est corrélée positivement avec les contenus en polyphénols dans ces extraits. À l'opposé, l'huile essentielle a montré une activité inhibitrice de la croissance de *Fusarium* plus importante que celle des *Penicillium* testés, qui est absente. Nos résultats sont en accord avec ceux de Kordali et al. (2003), Barra et al. (2007) et El Idrissi et al. (2016) reportant une activité antifongique de l'huile essentielle du lentisque, respectivement vis-à-vis de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium sambucinum* et *Candida albicans*, mais pas vis-à-vis de *Penicillium commune*, activité attribuée à l' $\alpha$ -terpinéol et au terpinène-4-ol (Kordali et al. 2003).

L'activité antimicrobienne des extraits des feuilles est principalement fonction du protocole d'extraction et donc de leur composition chimique. En effet, nos résultats ont mis en évidence que les feuilles séchées sont pourvues de 17 % de composés phénoliques, corroborant les résultats de Boubakar et al. (2003), Benhammou et al. (2008) et Mezni et al. (2015). Les extraits riches en composés phénoliques possèdent généralement une activité antimicrobienne (Field and Lettinga 1992 ; Ben Douissa et al. 2005 ; Rhouma et al. 2009 ; Bisignano et al. 2013, Rigane et al. 2016). Ces composés peuvent agir en privant le milieu de culture des ions métalliques tels le fer, soit en interagissant de façon non spécifique, notamment en établissant des ponts hydrogènes avec les protéines (les adhésines des parois cellulaires ou les protéines de transport de la membrane cytoplasmique) ou les enzymes (protéases, carbohydrases) (Scalbert 1991 ; Cowan 1999). L'activité antimicrobienne des polyphénols et en particulier des tanins dépend de leur poids moléculaire. Les oligomères sont souvent plus actifs car assez grands pour des liaisons hydrogène efficaces avec les protéines, mais suffisamment petits pour pénétrer sur les sites sensibles (Cowan 1999).

### 3.3. Application des feuilles de *Pistacia lentiscus* pour la conservation de l'escalope de dinde au cours du stockage 8 jours à 4°C

La flore aérobie mésophile totale (FMT), les coliformes totaux, les entérobactéries et les levures et moisissures se développent sur les escalopes de dinde au cours du stockage à 4°C en présence de poudre de feuilles ou d'extrait infusé (Tableau 5).

**Tableau 5:** Effet de la poudre et de l'infusion de feuilles de *Pistacia lentiscus* sur la charge microbienne de l'escalope de dinde au cours du stockage 8 jours à 4°C.

Flore log <sub>10</sub> UFC/g	Traitement	Temps de conservation (jours)					
		1	2	3	4	7	8
FMT	témoin	6,73	6,86	6,99	7,08	7,99	8,63
	poudre	6,08	6,00	5,79	5,75	6,63	7,08
	infusé	6,07	5,95	5,93	6,43	6,49	6,65
Coliformes totaux	témoin	4,15	4,18	4,48	4,91	5,70	5,95
	poudre	4,00	4,01	4,41	4,90	5,32	5,88
	infusé	3,98	3,98	4,08	4,26	5,15	5,75
Entérobactéries	témoin	3,91	3,97	3,99	4,02	4,69	4,80
	poudre	3,91	3,99	3,98	3,97	4,26	4,56
	infusé	3,90	3,94	3,99	4,02	4,49	4,58
Levures et moisissures	témoin	4,08	4,11	4,32	5,11	6,32	6,45
	poudre	4,00	3,30	3,34	3,32	3,28	4,38
	infusé	4,00	3,11	3,18	3,26	3,30	4,73

Les résultats des dénombrements sont exprimés en log<sub>10</sub> UFC/g

L'analyse statistique ANOVA à deux facteurs (traitement, jour de stockage) a révélé pour la FMT, un effet significatif pour le facteur (jour de stockage), et le facteur (traitement), mais pas pour l'interaction entre ces deux facteurs, suggérant que l'effet du traitement ne dépend pas de la durée du stockage. Le nombre de bactéries de la FMT dans les escalopes (témoins) est significativement supérieur par rapport aux échantillons traités par la poudre et l'extrait infusé ( $p < 0,001$ ), corroborant ainsi les résultats antimicrobiens observés *in vitro*. En présence de la poudre et de l'extrait infusé une réduction de 1,55 et 1,98 log<sub>10</sub> UFC/g est observée au huitième jour de stockage. En revanche, le traitement par les extraits de Lentisque n'a pas affecté significativement la charge en coliformes totaux ( $p = 0,105$ ) et entérobactéries ( $p = 0,77$ ), en accord avec les observations *in vitro* montrant l'absence d'effet sur *E. coli*.

Pour la flore fongique, l'analyse ANOVA à deux facteurs (traitement, jour de stockage) a révélé un effet significatif non seulement pour le facteur (jour de stockage), et le facteur (traitement), mais aussi pour l'interaction entre ces deux facteurs ( $p < 0,001$ ). La charge fongique des échantillons traités en début de stockage est similaire à celle du témoin. En revanche dès le second jour de stockage une activité fongistatique est observée dans les échantillons de viande traités : au huitième jour de stockage, la charge en levures et moisissures a diminué de 2,07 et 1,72 log<sub>10</sub> UFC/g en présence de la poudre et de l'extrait infusé.

L'application de la poudre de feuilles et des extraits infusés a donc permis de réduire la charge de la flore mésophile totale et des levures et moisissures pendant le stockage à 4°C. Depuis 2014, le Pistachier lentisque figure dans la liste des plantes utilisables dans les compléments alimentaires en France et au sein de la communauté européenne (Arrêté du JORF du 24 juin 2014). D'autres études ont montré que différents composés végétaux seuls ou en synergie avec d'autres procédés de conservation (atmosphère modifiée par exemple) peuvent réduire la charge microbienne ou maîtriser la présence d'agents pathogènes dans les produits alimentaires, tels que les jus de fruits (Tyagi et al. 2014), le lait (Hintz et al. 2015), les œufs (Djenane et al. 2011b), la viande de bœuf (Kim et al. 2013; Babuskin et al. 2014) et le poisson (Bahurmiz et al. 2016). La sensibilité des bactéries à l'effet antimicrobien de ces composés dépend de la composition biochimique et du pH de la matrice alimentaire, la température de stockage et de la quantité d'oxygène dans l'atmosphère entourant le produit (Hintz et al. 2015).

En conclusion, dans le respect des bonnes pratiques d'hygiène, la poudre et l'extrait de feuilles du Pistachier lentisque peuvent être retenus dans la formulation des additifs alimentaires, et pourraient intervenir comme agents de conservation.

#### 4. Références

- Aissi O, Boussaid M, Messaoud C (2016).** Essential oil composition in natural populations of *Pistacia lentiscus* L. from Tunisia: Effect of ecological factors and incidence on antioxidant and antiacetylcholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*, 91 : 56-65.
- Arrêté du 24 juin 2014 établissant la liste des plantes, autres que les champignons, autorisées dans les compléments alimentaires et les conditions de leur emploi JORF n°0163 du 17 juillet 2014 page 11922, texte n° 26
- Babuskin S, Babu PAS, Fayidh MA, Sabina K, Archana G, Sivarajan M, Sukumar M (2014).** Bio protection and preservation of raw beef meat using pungent aromatic plant substances. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(12): 2456-2463.
- Bachrouch O, Msaada K, Wannas WA, Talou T, Ksouri R, Salem M, Marzouk B (2015).** Variations in composition and antioxidant activity of Tunisian *Pistacia lentiscus* L. leaf essential oil. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 149(1): 38-47.
- Bahurmiz O, Ahmad R, Ismail N, Adzitey F, Sulaiman SF (2016).** Antimicrobial Activity of Various Plant Extracts on *Pseudomonas* Species Associated with Spoilage of Chilled Fish. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 4(11) : 1017-1023.
- Bampouli A, Kyriakopoulou K, Papaefstathiou G, Louli V, Aligiannis N, Magoulas K, Krokida M (2015).** Evaluation of total antioxidant potential of *Pistacia lentiscus* var. chia leaves extracts using UHPLC-HRMS. *Journal of Food Engineering*, 167: 25-31.
- Barra A, Coroneo V, Dessi S, Cabras P, Angioni A (2007).** Characterization of the volatile constituents in the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from different origins and its antifungal and antioxidant activity. - *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55(17): 7093-7098.
- Ben Douissa F, Hayder N, Chekir-Ghedira L, Hammami M, Ghedira K, Mariotte AM, Dijoux-Franca MG (2005).** New study of the essential oil from leaves of *Pistacia lentiscus* L. (Anacardiaceae) from Tunisia. *Flavour Fragrance Journal*, 20(4): 410-414.
- Benhammou N, Bekkara FA, Panovska TK (2008).** Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(2): 22-28.
- Bisignano C, Filocamo A, Faulks RM, Mandalari G (2013).** In vitro antimicrobial activity of pistachio (*Pistacia vera* L.) polyphenols. *FEMS microbiology letters*, 341(1) : 62-67.
- Boubakar A, Kayouli C, Buldgen A (2004).** Composition chimique et teneur en composés phénoliques des espèces arbustives du Nord-Ouest de la Tunisie. *Cahiers Options Méditerranée*, 62 : 315-317.
- Collins CH, Lyne PM, Grange JM, Falkinham III JO (2004).** Collins & Lyne's microbiological methods. London: Butterworths, Eight Edition.
- Cowan MM (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4): 564-582.
- Dabos KJ, Sfika E, Vlatta LJ, Giannikopoulos G (2010).** The effect of mastic gum on *Helicobacter pylori*: A randomized pilot study. *Phytomedicine*, 17(3-4): 296-299.
- Dahmoune F, Spigno G, Moussi K, Remini H, Cherbal A, Madani K (2014).** *Pistacia lentiscus* leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction. *Industrial Crops and Products*, 61: 31-40.
- Daifas DP, Smith JP, Blanchfield B, Sanders G, Austin JW, Koukoutisis J (2004).** Effects of mastic resin and its essential oil on the growth of proteolytic *Clostridium botulinum*. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3) : 313-322.
- Djenane D, Yangüela J, Montañés L, Djerbal M, Roncalés P (2011a).** 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(7): 1046-1053.
- Djenane D, Lefsih K, Yangüela J, Roncalés P (2011b).** Composition chimique et activité anti-Salmonella enteritidis CECT 4300 des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*, de *Lavandula angustifolia* et de *Satureja hortensis*. Tests *in vitro* et efficacité sur les œufs entiers liquides conservés à 7 ± 1 °C. *Phytotherapie*, 9(6) : 343-353.
- El Idrissi M, Barbouchi M, Choukrad MB, Louzi L (2016).** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from leaves and twigs of *Pistacia lentiscus* L. Growing wild in Morocco. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(4): 516-524
- Ghrab M, Zrib F, Ben Mimoun M, Ben Salah M (2013).** Inventaire des variétés de pistachier en Tunisie. IRESA, Institut de l'Olivier, 52 p. <http://www.iosfax.agrinet.tn/useruploads/files/inventaire-varietes-pistachier-tunisie.pdf> (consulté le 09/11/2016)
- Hafsé M, Benbrahim KF, Saidi A, Farah A (2013).** Volatile Components and Antibacterial Profile of Essential Oils Extracted from Leaves and Twigs of *Pistacia lentiscus* L. *British Microbiology Research Journal* 3(4): 602-611
- Haloui T, Farah A, Balouiri M, Chraïbi M, Fadil M, Benbrahim KF, Alaoui AB (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

- Hintz T, Matthews KK, Di R (2015).** The use of plant antimicrobial compounds for food preservation. *BioMed research international*, Volume 2015, Article ID 246264, 12 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/246264>
- Holt JG (1994).** *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, Ninth Edition, xviii.
- ISO 6887-2 (2003).** Microbiologie des aliments - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique - Partie 2 : Règles spécifiques pour la préparation des viandes et produits à base de viande : 16 p.
- Kim SJ, Cho AR, Han J (2013).** Antioxidant and antimicrobial activities of leafy green vegetable extracts and their applications to meat product preservation. *Food Control*, 29(1): 112-120.
- Kordali S, Cakir A, Zengin H, Duru ME (2003).** Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. *Fitoterapia*, 74(1-2): 164-167.
- Mezni F, Aouadhi C, Khouja ML, Khaldi A, Maaroufi A (2015).** *In vitro* antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* L. edible oil and phenolic extract. *Natural product research*, 29(6): 565-570.
- NF V 08-051(1999).** Microbiologie des aliments - Dénombrement des micro-organismes par comptage des colonies obtenues à 30°C.
- NF V 08-054 (1999).** Microbiologie des aliments - Dénombrement des entérobactéries par comptage des colonies obtenues à 30°C.
- NF V 08-060 (1996).** Microbiologie des aliments - Dénombrement des coliformes thermotolérants par comptage des colonies obtenue à 44°C.
- NF V08-059 (1995).** Microbiologie des aliments - Dénombrement des levures et moisissures à 25°C.
- Ponce AG, Fritz R, Del Valle C, Roura SI. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT- Food Science and Technology* 36(7):679-684
- Rhouma H, Ben Daoud S, Ghanmi H, Ben Salah M, Romdhane M, Demak M (2009).** Antimicrobial activity of leaf extracts of *Pistacia* and *Schinus* species against some plant pathogenic fungi and bacteria. *Journal of Plant Pathology*, 91(2): 339-345.
- Rigane G, Ghazghazi H, Aouadhi C, Ben Salem R, Nasr Z (2016).** Phenolic content, antioxidant capacity and antimicrobial activity of leaf extracts from *Pistacia atlantica*. *Natural Product Research* : 1-4.
- Romani A, Pinelli P, Galardi C, Mulinacci N, Tattini M (2011).** Identification and quantification of galloyl derivatives, flavonoid glycosides and anthocyanins in leaves of *Pistacia lentiscus* L. - *Phytochem. Anal.*, 13(2): 79-86.
- Scalbert A (1991).** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12): 3875-3883.
- Singleton VL, Ortofer R, Lamuela-Raventos RM (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *In* Abelson J, Simon M, Sies H (Eds.), *Methods in Enzymology*. Orlando: Academic Press, pp. 152-178.
- Sqalli H, El Ouarti A, Ennabili A, Ibnsouda S, Farah A, Haggoud A, Houari A, Iraqui M (2007).** Évaluation de l'effet antimycobactérien de plantes du centre-nord du Maroc. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 146(3-4) : 271-288.
- Tyagi AK, Gottardi D, Malik A, Guerzoni ME (2014).** Chemical composition, *in vitro* anti-yeast activity and fruit juice preservation potential of lemon grass oil. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2) : 731-737.