

République algérienne démocratique populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
UNIVERSITE BLIDA (1)
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de biotechnologie

Mémoire de fin d'étude
En vue de l'obtention du diplôme master académique
Spécialité : biotechnologie végétales

Thème :

Introduction du Pistachier lentisque
(Pistacia lentiscus L.)* à la culture *in vitro

Présenté par :

DJETTOU BESSMA
HAMMOUCHE CHAHINEZE

DEVANT LE JURY :

Président : Mme CHAOUIA C.	MCA	USDB
Promotrice : Mme CHAOUCH F.Z.	MCA	USDB
Examinatrice : Mme OUKARA F.Z.	Attachée de recherche INRF	INRF
Examinatrice : Mme BRADEA M.S.	MCA	USDB

Promotion : 2014/2015.

Résumé

Le but du présent travail est un essai de multiplication *in vitro* du *Pistachier lentisque L.* Pour l'obtention d'une grande quantité du matériel végétale utilisé ultérieurement pour l'extraction du mastic

Le grande pourcentage de contamination obtenue au début a été diminuée par l'utilisation du l'hypochlorite de calcium avec un changement des concentrations (8%,10% et 15%) et par plusieurs temps de trempage (15min ,20min et 25min)

L'utilisation d'un fongicide, le muthomyl 0,5g/l nous a permis d'éliminée totalement la contamination cryptogamique dans les tabes a essaie.

L'élimination des phénols a été réalise par l'utilisation du l'acide ascorbique a une concentration de 5 g/l pendant 60 minutes

L'élimination du grand pourcentage de contamination a permis l'obtention d'un développement végétative des explants en proportion de 2%.

Mots clé : *Pistachier*, contamination, fongicide, phénols.

Summary

المخلص

الغرض من هذا العمل هو في المختبر الضرب اختبار الفستق للحصول على كمية كبيرة من المواد النباتية المستخدمة في وقت لاحق لاستخراج الماستيك

نسبة عالية من التلوث وقدم في بداية يقلل من استخدام هيبوكلوريت الكالسيوم مع تغيير تركيزات (8% و 10% و 15%)
و بتغير مدة النقع 15 دقيقة و 20 دقيقة و 25 دقيقة

باستخدام فطريات الميتوميل فقد مكن 0.5 غرام / لتر لنا أن القضاء تماما على التلوث الفطري في احدى المحاولات

إزالة الفينول تم انجازه عن طريق استخدام حامض الاسكوريك لديها بتركيز 5 غ / لتر لمدة 60 دقيقة

وقد مكن إزالة نسبة تلوث للحصول على تنمية الخضري للفسيلاات بنسبة 2% .

كلمات البحث: الفستق، التلوث، فطريات، الفينول

Liste des figures

Figure n°1 : fruits au stade de développement (originale).....	06
Figure n°2 : écoulement de Mastique au niveaux de l'écorce	07
Figure n° 3 : caractéristique du climatique.....	07
Figure n° 4 : caractéristique du sol.....	08
Figure n° 5 : répartition géographique de pistacia lentisque . Dans le monde	09
Figure n° 6 : Contamination par champignons des nœud.....	29
Figure n°7 : nécrose totale des explants herbacée, et brunissement de leur milieu de culture sous l'effet des phénols (eaux début de cet essai).....	33
Figure n°8 : Résultats de 2 ^{eme} essai de la désinfection des feuilles (Absence de débourement).....	35
Figure n° 9 : débourement d'un explant.(a la fine de cette essai).....	37

Liste des tableaux

Tableau n°1 : Mode de désinfection des nœud et des apex	18
Tableau n°2 : Mode de désinfection des grains et des feuilles	19
Tableau n°3 : Mode de désinfection des nœud et des apex	20
Tableau n°4 : Mode de désinfection des grains et des feuille	22
Tableau n° 5 : les déférentes concentrations des hormones utilisées.....	22
Tableau n° 6 : les déférentes compositions et concentration de milieu de culture	24
Tableau n° 7 : l'influence de l'hypochlorite de calcium sur la contamination des nœuds et l'apex.....	30
Tableau n° 8 : l'influence de la concentration de l'hypochlorite de calcium sur les contaminations (pour les feuilles et les grains).	31
Tableau n° 9 : Taux de contamination des nœud et des apex	34
Tableau n° 10 : Taux de contamination des feuilles et les grains.....	35
Tableaux n°11 : taux de débourrement des micro-boutures dans le milieu MURASHIGE et SKOOG(1962).....	36

Liste Des Abréviations, Symboles

AIA : acide indol acétique

AIB : acide indol butyrique

BA : benzyladenine

EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique

G : milieu de culture gamborg

GC-MS : chromatographie en phase gazeuse couplée a le spectrophotomètre da mase

HE : Huile essentiel

M : milieu

MS : MURASHIGE et SKOOG

OMS : l'organisation mondiale de la santé

T : traitement

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement, afin de traiter et de soigner toutes sortes de maladies (Lee, 2004).

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

Certaines plantes africaines connaissent un regain d'intérêt, comme le géranium africain (*Pelargonium asperum*), le prunier d'Afrique (*Pygeum africanum*), et la *Sutherlandia frutescens* (Baguenaudier d'Éthiopie). Cette dernière, qui ne pousse qu'en Afrique du Sud, est utilisée en complément des thérapies de lutte contre le SIDA (Harnett et al., 2005). L'industrie pharmaceutique moderne s'inspire encore largement des métabolites secondaires des végétaux, (le produit Taxol est un exemple éloquent). Depuis 1993, le Taxol a été également approuvé pour le traitement du cancer avancé du sein et le cancer du poumon des grandes cellules (NSCLC), ce qui a permis à plus d'un million de patients de bénéficier de ce traitement.

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

À partir du XIX^{ème} siècle, les molécules responsables des effets thérapeutiques ont été isolées et ont servi de prototypes à l'élaboration de médicaments conventionnels [(Butler, 2004); (Patwardhan, 2005)].

Plus de 120 composés provenant de plantes sont aujourd'hui utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont utilisés selon leur usage traditionnel [(Farnsworth et al., 1985); (Cordell et Colvard, 2005)].

La flore algérienne est caractérisée par une grande diversité florale à savoir: méditerranéenne, saharienne et une flore paléo-tropicale, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques (Ozenda, 1997). Ces espèces sont pour la plupart spontanées avec un nombre non négligeable (15%) d'espèces endémiques (Ozenda, 1997).

Introduction

Ce qui a donnée à la pharmacopée traditionnelle une richesse inestimable.

Le genre *Pistacia* est de part sa dioïcie et ses fleurs nues, un genre particulier de la famille des Anacardiacees (Gaussen, 1982). *Pistacia lentiscus* L. est une espèce médicinale. Cet arbuste des maquis de toute la région méditerranéenne, se développe sur tout type de sol, dans l'Algérie sub-humide et semi-aride.

Dans le présent travail, nous nous somme intéressées eu premier à faire la multiplication végétative de l'espèce *Pistacia lentiscus in vitro*. Notre travail présente plusieurs aspecte :

- La première partie est consacrée à une étude bibliographique a la famille des Anacardiacees, avec le genre de *Pistacia*, la classification botanique, et l'intérêt biologique de l'espèce.
- Le deuxième parie est consacrée au matériel et méthode utilisées.
- La troisième parie englobe les résultats obtenus ainsi que les interprétations des techniques utilisées, suivi d'une conclusion générale.

Présentation de *Pistachier*

I. Généralité sur l'espèce :

Le genre *Pistacia* de la famille des Anacardiaceae comprend au moins 11 espèces, ayant en quasi-totalité une aire de répartition tropicale ou sub-tropicale [(Zohary, 1952) ; (Kokwaro et Gillett, 1980)]. Il compte quatre régions phytogéographiques : méditerranéenne, irano-touranienne, shino-japonaise et mexicaine (Seigue, 1985). De part sa dioïcie et ses fleurs nues, *Pistacia* est un genre particulier pouvant constituer une famille à part (Gaussen et al., 1982).

II. Position systématique de l'espèce :

II.1. Classification taxonomique : (Quezel et Santa, 1962).

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

- *Pistacia atlantica* — pistachier de l'Atlas.
- *Pistacia chinensis*
- *Pistacia lentiscus* L. — pistachier lentisque
- *Pistacia terebinthus* L. — pistachier térébinthe
- *Pistacia vera* L. — pistachier vrai
- *Pistacia integerrima*
- *Pistacia palestina*
- *Pistacia khinjuk*

En Algérie, le genre *Pistacia* est représenté par quatre espèces, en l'occurrence *Pistacia lentiscus*, *Pistacia terebinthus*, *Pistacia vera* et *Pistacia atlantica*.

Le *Pistacia lentiscus* L. est un arbrisseau très commun en Algérie [(Mitcheh, 1986) ; (Baudière et al., 2002)], il appartient à :

- Règne : Plantae
- Embranchement : Spermatophyta (Angiospermae).

- Classe : Dicotylédones
- Ordre : Sapindales
- Famille : Anacardiaceae (Pistaciaceae)
- Genre : *Pistacia*
- Espèce : *Pistacia lentiscus* L.

II.1.1. Synonymes : selon Torkelson.,(1996),et Feidemann., (1997) le pistachie port plusieurs appellation, a savoir :

Lentiscus massiliensis (Mill.) Fourr.

Lentiscus vulgaris Fourr.

Pistacia brevifolia Gand.

Pistacia chia Desf.

Pistacia gummifera Salisb.

Pistacia narbonensis Mill.

Terebinthus lentiscus (L.) Moench

Terebinthus vulgaris Fourr.

II.2. Description botanique:

Le *Pistacia lentiscus* (lentisque) qu'on appelle aussi arbre à mastic car sa résine (le "mastic de Chios") est utilisée pour la réalisation d'une gomme à l'odeur prononcée. Il a été décrit pour la première fois par le botaniste Linné en 1753. C'est un arbrisseau dioïque, thermophile de 1 à 3 mètres, à odeur résineuse forte (Coste, 1937). Il est particulièrement représentatif des milieux les plus chauds du climat méditerranéen, que l'on retrouve en association avec l'oléastre (olivier sauvage), et le myrte dans un groupement végétal nommé "l'Oléolentisque", mais également dans les boisements clairs à pin d'Alep ou d'autres formations de garrigues basses. Selon More et White (2005), cette espèce est caractérisée par :

Ecorces: rougeâtre sur les jeunes branches et vire au gris avec le temps. Quand on incise l'écorce, la plante laisse s'écouler une résine irritante non colorée à odeur forte.

Branches : tortueuses et pressées, forment une masse serrée (figure n:01)

Feuilles : persistantes, composées, possédant un nombre pair de folioles (4 à 10), d'un vert sombre de forme elliptiques, obtuses, luisantes en dessus, glabres, coriaces et dont le pétiole est bordé d'une aile verte.

Fleurs : Elles sont unisexuées d'environ 3 mm de large, se présentent sous forme de grappe, Elles apparaissent au printemps et sont très aromatiques. Les fleurs femelles sont vert jaunâtre et les fleurs mâles sont rouge foncé [(Iserin, 2001), (More et White, 2005)].

Les fleurs mâles et femelles poussent sur des arbustes différents, les fleurs mâles ont 5 petits sépales dont émergent 5 étamines rougeâtres reposant sur un disque nectarifère. Les fleurs femelles présentent, à 3 ou 4 sépales ; un ovaire supère avec un style court à 3 stigmates. La floraison se déroule de Mars à Mai.

Fruit : est une baie globuleuse de 2 à 3 mm, monosperme, d'abord rouge, il devient brunâtre à sa maturité en automne (figure 01)



Figure 1: Fruits au stade de développement (original)

Mastic : L'incision du tronc de cet arbuste fait écouler un suc résineux nommé mastic qui, une fois distillé, fournit une essence employée en parfumerie (Figure 02)



Figure 02: Ecoulement de Mastic au niveau de l'écorce (original)

Le lentisque est largement répandu en Algérie. Son aire s'étend d'Est à l'Ouest en pénétrant jusqu'aux régions sub-sahariennes. Il est connu comme indicateur des sols argileux. La plante a une odeur aromatique typique des maquis méditerranéens. Le lentisque est souvent associé à l'olivier dans l'Ouest méditerranée.

III. Exigences pédoclimatique :

Dans la zone d'origine, le lentisque est une espèce qui préfère la lumière, et la chaleur (figure N °03 et 04)

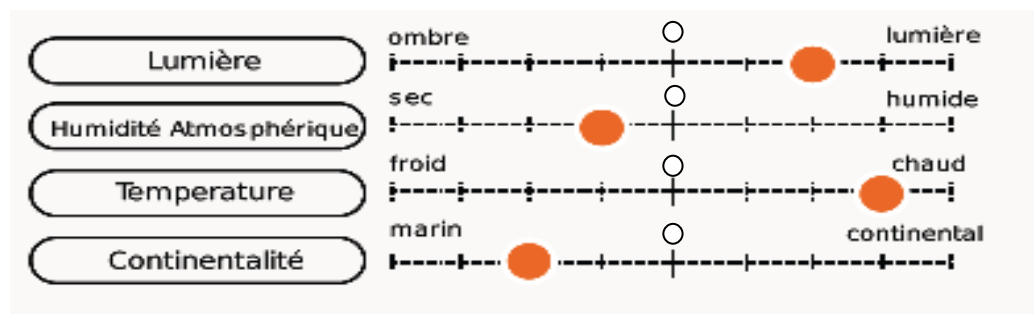


Figure n° 03 : Caractéristiques du climat.

Pour ce qui est des caractéristiques du sol, le lentisque est sensible à la salinité, il s'adopte à des sols sec, et pauvre (figure n °: 04)

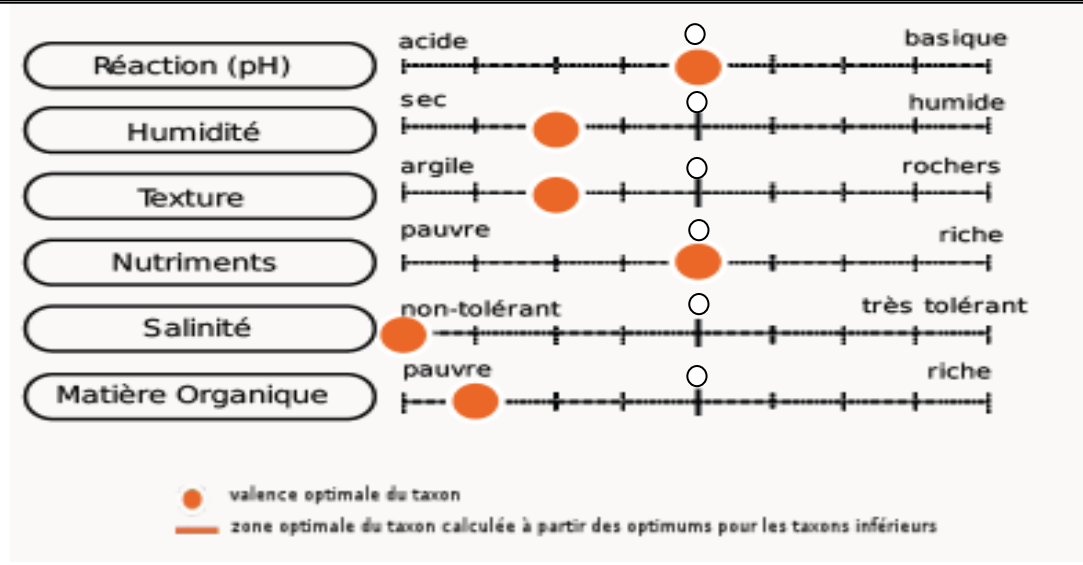


Figure n° 04 : Caractéristiques du sol.

IV. Aire de répartition :

IV.1. Dans le monde :

Pistacia lentiscus est un arbrisseau que l'on trouve couramment en sites arides Asiatique, et en région méditerranéenne de l'Europe et d'Afrique (Figure n°05), jusqu'aux Canaries (Bellakhdar, 2003).

Il pousse à l'état sauvage dans la garrigue et sur les sols en friche.

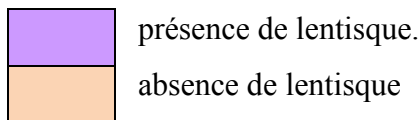
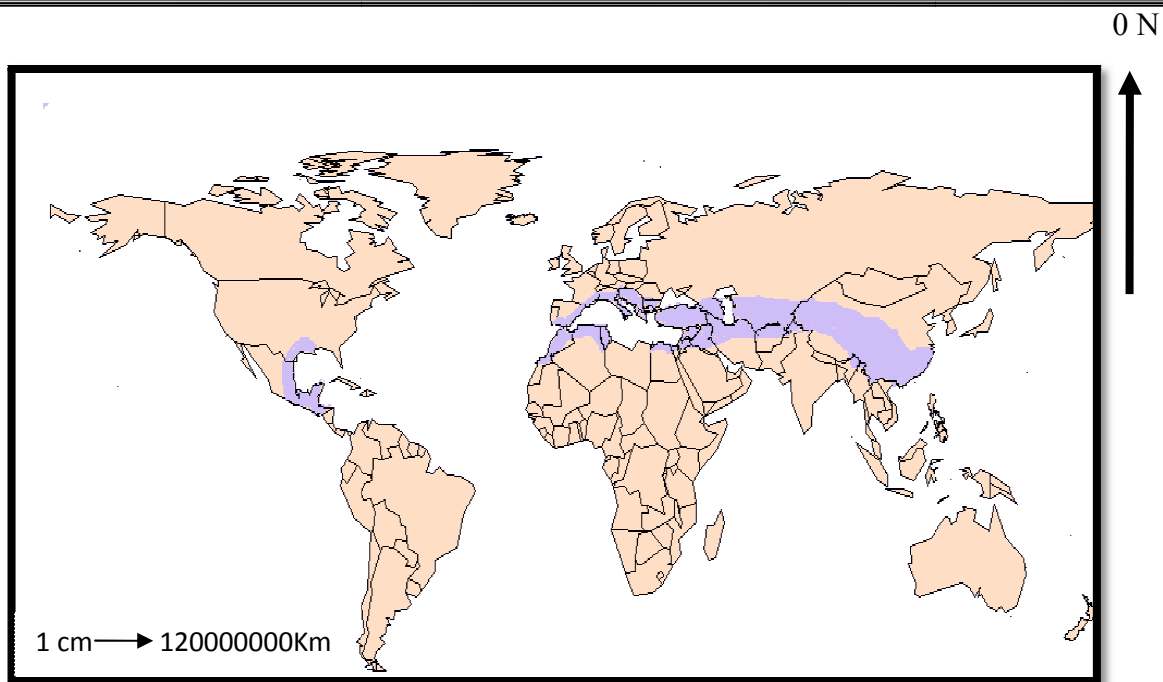


Figure n°05: répartition géographique de genre *Pistacia*. dans le monde
(Seigue , 1985).

IV.2.En Algérie :

On le trouve à l'état sauvage ou il occupe l'étage thermo-méditerranéen et dans les zones forestières (More et White, 2005) subhumide et semi-aride (Smail-Saadoun, 2002), plus précisément dans le bassin du Soummam en association avec le pin d'alep, le chêne vert et le chêne liège (Belhadj, 2000). Sa limite méridionale se situe aux environs de Saida, Sa présence au Sud de l'Atlas saharien n'est pas signalée.

V. Multiplication de *Pistacia lentiscus* L.:

V.1.Multiplication par semis :

Les semis s'effectuent au printemps à une température comprise entre 10 et 15°C. Les graines avant le semis sont posées au frais (dans le bac à légumes du réfrigérateur par exemple)

pendant 2 mois .

V.2.Multiplication par bouturage :

* La méthode de multiplication la plus utilisée est le bouturage. Les bouturages herbacés de tiges se font en été, et la plantation s'effectue en automne. Les sujets vendus en conteneurs peuvent être mis en terre toute l'année, hors période de gel.

* Une taille de mise en forme est à effectuer au mois de Janvier ou Février, elle consiste à éliminer le bois mort et à équilibrer la ramure si nécessaire.

* les boutures sont relativement peu gourmand en eau et généralement, les eaux de pluie sont suffisantes, il convient simplement d'effectuer des apports d'eau au moment de la plantation pour lui permettre de bien s'implanter.

V.3.Multiplication *in vitro* :

La multiplication *in vitro* n'est pas réalisé habituellement sur le *Pictacia lentiscus L.*

VI. Les régulateurs de croissance :

*Permis les régulateurs de croissance, il se trouvait et les auxines et les cytokinines

VI.1.Les auxines :

L'auxine est une hormone végétale appelée aussi phytohormone. Elle joue un rôle majeur dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes ; Elle est aussi un régulateurs de croissance, qui possède plusieurs propriétés : contrôle de la croissance apicale et formation des racines et leur élongation, elle stimule la synthèse de certaines enzymes, telles que la cellulase et la peroxydase (HELLER ,1982).

L'acide indolyacétique (AIA) est l'auxine naturelle la plus fréquente dans les plantes,

Il faut noter que les fortes concentrations de cette auxine peuvent être phytotoxique. L'AIA est généralement instable, elle présente une faible stabilité à la lumière.

VI.2. Les cytokinines :

Les cytokinines stimulent la division cellulaire des pousses herbacées, favorisent la synthèse des protéines, lèvent la dormance de certaines graines et s'opposent à la dominance de bourgeon apical sur les méristèmes.

La forme naturelle de cytokinine est la zeatine, Il existe aussi des formes synthétiques La biosynthèse des cytokinine semble se faire essentiellement dans l'extrémité des racines et dans les jeunes fruits.

VII. Intérêt du *Pistacia lentiscus* :

Pistacia lentiscus est connue pour ses propriétés médicinales depuis l'antiquité (Palevitch et Yaniv, 2000). Plusieurs produits dérivés du pistacia sont obtenues de nos jours

- Produits et dérivés à base de *Pistacia lentiscus*

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

***La résine :** des branches et du tronc exsude naturellement ou par incision une résine jaune claire fortement aromatique, qui durcit au contact de l'air, Elle est appelée mastic ou gomme mastic d'où son nom commun d'arbre à mastic, Généralement la production de cet résine est d'environ 4 à 5 kilogrammes par arbuste. La résine est produite à grande échelle dans de vastes plantations dans la région d'Emporio et Mesta, qui est d'ailleurs appelée "mastihohoria" qui se traduit par village à mastic, d'où le nom commercial répandu de « Mastic de Chio ». Le mastique entraine dans la confection d'eau-de-vie et de liqueurs, comme aromatiser de certaines confitures dans la confection des pâtes ou des gommes à mâcher parfumées ou pastilles, utilisées comme douceurs favorites des sultans de l'empire ottoman et des femmes du Moyen-Orient. Aujourd'hui encore le mastic est employé dans l'industrie agro-alimentaire (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.

***L'essence de Mastic:** après distillation du mastic, est récupérée une essence qui entre dans la Confection de parfums, des produits cosmétologiques et pharmaceutiques, ou de vernis de grande qualité (recherché par les peintres) et aussi dans l'industrie photographique.

***L'essence des feuilles et rameaux:** est extraite une huile essentielle qui est utilisée en aromathérapie et phytothérapie pour ses propriétés décongestionnantes, Il est prescrite

aussi pour traiter les problèmes veineux dont les hémorroïdes.

-L'huile de lentisque : du fruit comestible est extraite une huile qui autrefois était couramment utilisée pour l'alimentation, l'éclairage et aussi dans la confection de savons.

L'huile est produite à l'Est de l'Algérie, et dans les zones côtières (El Milia, Skikda), où l'espèce abonde. Un procédé traditionnel est utilisé à cet effet : Les fruits atteignent leur maturité vers la fin d'été début de l'automne. Les baies prennent alors une coloration noire au lieu du rouge. Les baies sont récoltées à la main, macérées dans de l'eau chaude puis écrasées à l'aide d'une presse. Des baies s'exultent un liquide épais de couleur jaune vert. L'huile est récupérée par décantation.

VII.1 Huiles essentielles

L'étude bibliographique sur les huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* a montré la richesse en mono-terpènes et les sesquiterpènes.

L'étude réalisée par Barazani (2003) sur l'extrait T-butyl méthyl éther d'huile de feuilles de *Pistacia lentiscus* a montré la présence 12 mono-terpènes, 7 sesquiterpènes et un seul mono-terpène linéaire. des Sabinene et, limonène , caryophyllène et germacrene D ; Ces constituants majoritaires sont identifiés par la méthode GC-MS.

Une étude phytochimique réalisé par Kivkok (2005) sur le l'huile des feuilles de *Pistacia lentiscus* a permis d'identifier quantitativement tocophérol .

Le travail de Castola et al (2000) effectué sur 105 échantillons d'huiles essentielles des feuilles de *Pistacia lentiscus* de Corse, révèle la présence des constituants majoritaires comme myrcène , limonène , terpinène 4-ol , pinène , phellandrene .

L'étude physico-chimique (GC et GC-MS) réalisée par ;(Duru et al.,(2003) indique que la présence de pinène, pinène, limonène, terpinène-4 ol et terpinéol sont les constituants majoritaires des huiles essentielles des feuilles de *Pistacia lentiscus*, *Pistacia therbintus* et de *Pistacia vera* .

En Algérie, une étude phytochimique été effectuée sur les huiles essentielles obtenues à partir des parties aériennes de *Pistacia lentiscus* de régions d'Alger, Tizi-Ouzou et d'Oran, par l'utilisation de méthodes GC et GC / MS (Dob et al, 2006). Les résultats indiquent la présence de Longifolène comme un composé majoritaire dans les huiles d'Alger (12,8%) et de Tizi-Ouzou (16,4%), tandis que pinène (19,0%) constitue le principal constituant de

l'huile d'Oran. Les autres composés étaient présents en quantités importantes dans les différentes huiles ; ainsi dans l'huile d'Alger: on trouve du cadinene (6,2%), trans-terpinéol (5,0%) et acomeol (4,6%); dans l'huile de Tizi-Ouzou: ils ont trouvé du trans-terpinéol (15,6%), terpinén-4-ol (7,0%) et muurolene (5,7%); dans l'huile d'Oran ; du trans-terpinéol (13,1%), sabinene (12,6%) et pinene (6,5%).

L'étude de l'effet de la variation saisonnière de l'extrait méthanolique de l'huile essentielle de la partie aérienne de *Pistacia lentiscus*, avec la méthode GC-MS ont montre que cinquante-sept constituants représentent environ 89,6%, 92,8% et 97,5% du total des huiles essentielles pour le mois de Février, Mai et août respectivement (Gardeli et al, 2008). Les principaux composés trouvés sont ; pinène (9.4-24.9%) et limonène (9.0-17.8%), tandis que germacrene D (2.7-13.5%), terpinén-4-ol (6.8-10.6%) , cymene (0.5-7.5%) , β -pinène (2.0-6.9%), sabinene (1.0-6.7%) , terpinene (3.1-3.6%) et de l'terpinéol (2.5-4.0%) sont présents à des pourcentages relativement élevés (Gardeli et al , 2008).

VII.2.Mode d'obtention de l'huile :

La méthode d'extraction de l'huile grasse de lentisque est très ancienne. La récolte de baies se fait entre les mois de Novembre et de Décembre. Après avoir récolté une quantité suffisante de baies mures on procède comme dans le cas de l'olive, (en appliquant le même principe). Après séchage pendant 7 jours, l'ensemble des baies dont la pulpe a été suffisamment désintégrée est bouillonné dans l'eau. On recueille le bouilli, pour remplir deux sacs de toile longue et étroite et pratiquer par la suite le pressage à l'aide de deux queues de bois pour extraire une huile un peu siccative (Hmimza, 2004). Cette méthode est très proche de la méthode d'extraction utilisée dans les îles de Sardaigne (Lafranchi, 1998). En Algérie, la récupération de l'huile de lentisque passe par la macération dans de l'eau chaude du fruit, suivie d'une décantation (région est d'Algérie, El-harouch).

VIII. Intérêt de la culture in vitro

La méthode de la culture in vitro nous permet :

- *une multiplication rapide et conforme de clones
- *une propagation rapide de plant pour les espèces ou les graines seraient dure a obtenir.
- *une propagation des espèces qui sont difficile a multiplié végétativement de façon naturelle, le bouturage par exemple.
- * une obtention de clones sur toute l'année.

*une manipulation des végétaux à l'état unicellulaire et notamment transformé le génome d'une seule cellule pour obtenir une plante.

*une élimination des virus des plans infectés [(ZRYD et al., 1988) ; (AUGE et al.,1989) ; (ANONYME ,2000)].

IX. Intérêt de *Pistacia lentiscus* dans la culture in vitro :

Le *Pistacia lentiscus* a une grande inertie dans la production des huiles essentielles.

Les huiles essentielles obtenues par la distillation à la vapeur d'eau des rameaux feuillés, présentent une odeur puissante et âpre, presque râpeuse. Les feuilles froissées de la plante ont elles aussi cet arôme bien caractéristique. De rendement très faible (généralement inférieur à 1kg d'huile essentielle pour une tonne de plante), sont obtenues habituellement avec un coût relativement élevé, pour cela, nous avons utilisé cette plante en culture in vitro ; et avec le but de augmenter la production des huiles essentielles sans détruire la nature

I. Lieu de l'expérimentation :

L'expérimentation a été réalisée au laboratoire d'amélioration des plantes au niveau de département de biotechnologies de la faculté des sciences de la nature et de la vie, de l'université de Blida à partir du mois Décembre au mois de Mai 2015.

II. matériel végétal utilise :

Nous avons utilisé des feuilles, des nœuds, des apex et des graines récupérées à partir des fruits matures, pour régénérer un matériel végétal juvénile nécessaire aux essais de calogènes et de micro-bouturage de *Pistacia lentisque*. ces explants proviennent de la région de Blida aux niveaux de l'université Saad Dahleb, au niveau de département de biotechnologie végétale. Les pieds mère sont spontanés.

Les échantillons des jeunes feuilles, des nœuds et des apex sont prélevés aux niveaux des extrémités des arbres, pour assurer la juvénilité du végétal. Ainsi nous avons utilisé des graines matures.

III. Désinfection du matériel végétal :

Avant d'être désinfectées, les boutures sont fragmentées en micro-boutures comportant 1 à 2 nœud et des micro-boutures comportant l'apex et des feuille aux niveaux de l'extrémité des plants, puis on a rincé le matériel végétale à l'eau de robinet puis avec de l'eau distillée stérile pour éliminiez la poussière et les micro-organismes.

La désinfection s'est effectuée en deux façons :

- désinfection sans fongicide et sans acide ascorbique (témoin)
- désinfection avec fongicide et avec acide ascorbique

III.1. Désinfection sans fongicide et sans acide ascorbique:

➤ **Pour les nœuds et les apex :**

La désinfection s'est effectuée sous hotte à flux laminaire ; le protocole de désinfection est :

*trempage dans l'alcool (Ethanol 95°)

On a effectué 2 essais : trempage pendant 20 secondes.

trempage pendant 25 secondes.

*Trempage dans l'hypochlorite de calcium avec différentes concentrations pendant différents temps (tableau n°1)

*Rinçage à l'eau distillée stérile.

Tableau n°1 : Mode de désinfection des nœuds et des apex

désinfectant utilisé	Concentration et Durée de trempage	
Ethanol	95 °	20 s
		25 s
Hypochlorite de calcium Ca Cl ₂ O	8%	15 min
		20 min
		25 min
	10%	15 min
		20 min
		25 min
	15%	15 min
		20 min
		25 min

➤ **Pour les feuilles et les graines :**

Avant la désinfection on a enlevé la partie charnue des fruit , puis on a fait un prétraitement de scarification chimique avec l'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré pendant 30 min puis 24h dans l'eau distillée pour éliminés l'épicarpe.

La désinfection ce fais de même façon pour les feuille et les graines, s'est effectuée sous hotte à flux laminaire ; le protocole de désinfection est :

La désinfection s'est déroulée dans l'ordre :

*trempage dans l'alcool (Ethanol 95°)

On a fait 2 essais : trempage pendant 20s

trempage pendant 25s

*on a diminuait la concentration de l'hypochlorite de calcium pour n'est pas détruire le matériel végétale (la matérielle végétale déveine noircisse si le pourcentage de l'hypochlorite de calcium est augmente) Trempage dans l'hypochlorite de calcium avec différentes concentrations pendant différents temps (tableau n° 2)

*Rinçage à l'eau distillée stérile.

Tableau n°2 : Mode de désinfection des grains et des feuilles

désinfectant utilisé	Concentration et Durée de Trempage	
Ethanol	95%	20 s
		25s
Hypochlorite de calcium CaCl_2O	8%	4min
		8min
	10%	8 min
		10 min

III.2. Désinfection avec le fongicide (mythomyle) et avec l'acide ascorbique :

➤ Pour les nœuds et les apex

La désinfection ce fais de même façon pour les nœuds et les apex, est effectuée sous hotte à flux laminaire ; le protocole de désinfection est :

* trempage dans le fongicide à 0,5 ; 5 g/l pendant 15 min

* trempage dans acide ascorbique 0,2 g/l ; 1g/l et 5g/l pendant 60min.

* trempage dans l'alcool Ethanol 95% pendant 20s et 25s.

*Trempe dans l'hypochlorite de calcium avec différente concentration pendant différente temps (tableau n° 3)

Tableau n°3 : Mode de désinfection des nœuds et des apex

désinfectant utilisé	Concentration ou pourcentage	Durée de trempage
Fongicide (mythomyle)	0,5 g/l	15 min
	5 g/l	15 min
Acide ascorbique	0,2 g/l	60 min
	1g/l	60 min
	5g/l	60 min
Ethanol	95%	20s
		25s
Hypochlorite de calcium CaCl ₂ O	8%	15 min
		20 min
		25 min
	10%	15 min
		20 min
		25 min
	15%	15 min
		20 min
		25 min

➤ Pour les feuilles et les graines:

Avant la désinfection on a enlevé la partie charnue des fruits, puis on a effectué un prétraitement de scarification chimique avec l'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré pendant 30 min puis laisser 24h dans l'eau distillée pour éliminer l'épicarpe.

La désinfection se fait de même façon pour les graines et les feuilles, est effectuée sous hotte à flux laminaire ; le protocole de désinfection est :

- * trempage dans fongicide 0,5 ; 5 g/l pendant 15 min.
- * trempage dans acide ascorbique 0,2 g/l ; 1g/l et 5g/l pendant 60min.
- * trempage dans l'alcool Ethanol 95% pendant 20s et 25s.
- * trempage dans l'hypochlorite de calcium avec différentes concentrations pendant différents temps (tableau n° 4)
- * Rinçage à l'eau distillée stérile.

Tableau n°4 : Mode de désinfection des feuilles et des graines.

désinfectant utilisé	Concentration ou pourcentage	Durée de trempage
Fongicide (mythomyle)	0,5 g/l	15 min
	5 g/l	15 min
Acide ascorbique	0,2 g/l	60 min
	1g/l	60 min
	5g/l	60 min
Ethanol	95%	20s
		25s
Hypochlorite de calcium CaCl ₂ O	1%	15 min
		20 min
		25 min
	2%	15 min
		20min
		25min

IV. Milieux de cultures utilisés :

Les milieux de culture de base utilisés, lors des différentes phases pour produire des vitro-plants et des vitro-semis de *Pistacia lentiscus L.* est constitué de sels minéraux, éléments majeurs (macro-éléments) et éléments mineurs (micro-éléments) et de vitamines (acide ascorbique). Le saccharose a été additionné comme source de carbone pour chaque milieu de culture utilisé.

Les milieux de culture sont solidifiés à l'agar a une concentration de 8g/l, après ajustement de leurs pH entre à 5,6-5,8. Soit avec NaOH ou avec du Hcl, Tous les milieux sont stérilisés à l'autoclave à température de 120 °C et à une pression d'un bar pendant 20 minutes.

Matériel et méthodes

On a utilisé trois milieux de culture dont : milieu de **GAMBORG** (annexe 1); milieu de **MURASHIGE et SKOOG(1962)** (annexe 2) et milieu de **MURASHIGE et SKOOG(1962)** dilué au demi (annexe 2).

Les milieux sont répartis dans des tubes à essais (2,5x20 cm) à raison de 15 ml par tube, puis stérilisés par autoclavage à 120°C, sous une pression de 1 bar pendant 20 minutes. On a additionné la gélose et ajusté le pH à 5,6- 5,8 avant l'autoclavage pour les 3 milieux.

V. Les régulations de croissances

- pour notre expérimentation On a ajouté au milieu de culture une auxine AIA à des concentrations de 0,2 ; 0,2 ; 0,4 mg/l et une cytokinine BA à des concentrations de 0,4 ; 0,6 ; 0,8 mg/l.
- un 2^{ème} essai on ajouté au milieu de culture une auxine AIB à des concentrations de 0,2 ; 0,2 ; 0,6 mg/l et une cytokinine BA à des concentrations de 0,4 ; 0,6 ; 0,8 mg/l (tableau 5).

Tableau n° 5 : les différentes concentrations des hormones utilisées.

		T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆
Auxines	AIA	0,2	0,2	0,4	/	/	/
	AIB	/	/	/	0,2	0,4	0,6
Cytokinines	BA	0,4	0,6	0,8	0,4	0,6	0,8

VI. Traitement antioxydants (Acide ascorbique) :

Généralement, Les ligneux sont caractérisés par la sécrétion des phénols dans le milieu de culture.

Et pour notre expérience et pour éliminée l'apparition des phénols nous avons trempé les micros-boutures dans l'acide ascorbique à 0.2 g/l, 1 g/l et 5g/l pendant 60 min avant la désinfections, et dans le même bute on à utilisée 0,1 g/l et 1g/l d'acide ascorbique dans le milieu de culture (tableau n° 6)

Matériel et méthodes

Tableau n° 6 : les différentes composition et concentrations en antioxydants.

Milieu	Composition	Concentration		
MS, MS/2 et G	milieu + acide ascorbique	l'acide ascorbique	0,1 g/l	
			1g/l	
	Milieu + l'acide ascorbique +Hormone	Hormone	0,2 AIA, 0,4 BA	0,2 AIB ; 0,4BA
			0,6 AIA, 0,4 BA	0,4 AIB ; 0,6 BA
			0,8 AIA, 0,6 BA	0,6 AIB ; 0,8BA

VII. Mise en culture :

La mise en culture se déroule dans des conditions d'asepsie totale sous une hotte à flux laminaire.

En premier lieu on a fragmenté les boutures en micro-boutures de 1 à 2 cm de hauteur, comprenant 1 ou 2 bourgeons axillaires, selon la longueur des entre-nœuds, puis on a fait la désinfection devant le bec bunsen.

En deuxième étape on a coupé à l'aide d'un scalpel l'extrémité noire au niveau des feuilles, des nœuds et de l'apex pour éviter la sécrétion des phénols dans le milieu de culture puis on a placé les explants dans les tubes contenant le milieu de culture stérilisé.

VIII. Condition de culture :

Les vitro-semis ainsi que les micro-boutures sont maintenus dans un phytotron sous contrôle rigoureux des conditions de la lumière et de température :

Condition n 01

- photopériode est de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité,
- température est de 25 ± 1 ; pendant toute la période de notre essai

Condition n 02

- 24 h d'obscurité.
- température est de 25 ± 1 ; pendant tout la période de notre essai.

I-Micro bouturage :

I. Les contaminations :

Durant notre travail nous avons utilisée plus de 9700 tube a essai pour testé plusieurs méthodes de désinfections ; nous sommes trouvées face à deux sortes de contamination : bactérienne et cryptogamique C'est à partir des observations qu'on a pu détecter le type de contamination :

Dans certains tubes, nous avons observé le développement d'un mycélium qui a une texture feutrée de couleur grisâtre, verdâtre ou blanchâtre, il s'agit de contamination cryptogamique.

Dans d'autres tubes, nous avons observé le développement d'un voile d'aspect laiteux a l'intérieur et à la surface du milieu de culture. Et quelque fois coloré en jaune ou en rose, dans ce cas, il s'agit de contaminations bactériennes.

En ce qui concerne les contaminations cryptogamiques, le taux de contamination est beaucoup plus élevé (89%) par rapport à celui des contaminations bactériennes (11%).

Et dans d'autres tubes, nous avons observé des explants nécrosés, avec une importante apparition de phénols, on a traité par l'acide ascorbique dans la désinfection et dans le milieu de culture.

Les contaminations enregistrées peuvent avoir trois origines possibles. Elles peuvent être dues soit, à la manipulation soit aux conditions d'aseptise insuffisantes niveau du laboratoire.

On considère que le matériel utilisé (instrument, hotte, verrerie.....) est bien stérilisé, il est pratiquement impossible d'affirmer que le matériel végétal soit complètement dépourvu de contamination (champignons, bactérie) après désinfection.

Solon ZRYD, (1988), certains tissus peuvent héberger des parasites internes qui ne sont pas éliminés par les méthodes de désinfection classique, d'où l'utilisation d'antibiotique dans le milieu de culture est obligatoire pour assurer la désinfection.

II. Effet de la désinfection des micro-boutures :

II.1. 1^{er} essai la désinfection sans fongicide et sans acide ascorbique :

Dans la désinfection sans fongicide et sans l'acide ascorbique on obtient un taux de contamination très élevé 100% (bactérie et champignon) avec une nécrose totale des explants herbacés (apex, nœud et feuille), et brunissement de leur milieu de culture sous l'effet des phénols.

L'utilisation de l'hypochlorite de calcium à différentes temps de trempage ne semble pas avoir d'effet sur les contaminants.

Ainsi les contaminations fongiques ont atteint 56% et des bactériennes 21%.

II.1.1 Désinfection des nœuds et l'apex :

Malgré la désinfection du matériel végétal à différentes concentrations de l'hypochlorite de calcium, on a observée l'apparition des champignons et des bactéries, et l'apparition des brunissements dans les 3 milieux de culture ; on a observé un grand pourcentage de contamination 100% mais la contamination a diminué lorsque la concentration de hypochlorite de calcium augmente.



Figure 9 : Contamination par champignons des nœuds

A 15 %de concentration de l'hypochlorite de calcium et un temps de trempage de 20 et 25 min, le taux de contamination diminue de 100%à 80% pour les nœuds.

Et a 15% de concentration de l'hypochlorite de calcium et un temps de trempage de 25 min, le taux de contamination diminue de 100%à 89% pour les apex (tableau 07).

Ce taux reste néanmoins très élevé, car ceci cause la perte du végétal, introduit en in vitro.

Tableau 7 : l'influence de l'hypochlorite de calcium sur la contamination des nœuds et l'apex

	Concentration et Durée de trempage		% de contamination	
			Nœud	apex
Hypochlorite de calcium Ca(ClO) ₂	8%	15 min	100%	100%
		20 min	100%	100%
		25 min	100%	100%
	10%	15 min	100%	100%
		20 min	100%	98%
		25 min	95%	97%
	15%	15 min	86%	95%
		20 min	80%	92%
		25 min	80%	89%

II.1.2 Désinfection des feuilles et les graines :

Les explants des feuilles sont devenus noirs, à 8% de concentration de l'hypochlorite de calcium, le taux de contamination supérieur à 25 %, alors que 10% de concentration de l'hypochlorite de calcium le taux de contamination est diminué jusque 10% lorsque le temps de trempage est de 10min (tableau 8) qui serait un taux acceptable au niveau de culture *in vitro*.

Pour les graines la concentration de l'hypochlorite de calcium à 8% donne un taux de contamination supérieur à 35%, alors que 10% donne le taux de 21% ; donc il y a une amélioration aux niveaux des résultats qui serait un taux acceptable aux niveaux de culture "*in vitro*".

Résultats et discussion

Tableau 8 : l'influence de la concentration de l'hypochlorite de calcium sur les contaminations (pour les feuilles et les grains).

	Concentration et Durée de Trempage		% de contamination	
			Feuille	graine
Hypochlorite de calcium Ca(ClO) ₂	8%	4min	27%	31%
		8min	27%	32%
	10%	8 min	25%	30%
		10 min	10%	21%

- ❖ Cet essai montre que la concentration de l'hypochlorite avec le temps de trempage joue un rôle dans la diminution du taux de contamination.

Pour les feuilles on a obtenu un taux de contamination moins élevé inférieure à 30% mais les feuilles deviennent noires avec brunissement du milieu de culture ; c'est pour ça on à diminué la concentration de l'hypochlorite pour le deuxième essai.

II.2. 2^{ème} essai la désinfection avec fongicide et avec l'acide ascorbique :

Au début de notre expérimentation et dans la désinfection sans fongicide et sans acide ascorbique, les résultats obtenus a un taux de contamination élevé ; et lorsque on a améliorée la désinfection, le taux de contamination est diminuait mais cette diminution n'est pas suffisante , et selon Mestouri (2001) ; le trempage dans 0,2 g/l d'acide ascorbique pendants 60min avant la désinfection et l'addition de 0,1 g/l d'acide ascorbique dans le milieu de culture est dans le but d'éliminer la sécrétion phénolique.

Donc on a amélioré la désinfection avec le fongicide pour éliminée les champignon et avec acide ascorbique pour éliminée la sécrétion phénolique et on a modifiée les condition de culture (24 d'obscurité) .

II.2.1 Désinfection des nœuds et l'apex :

Au début de l'essai, nous avons obtenu des nécroses totales des explants herbacées, avec le brunissement du milieu de culture, ceci du à la libération des phénols (figure 7).



Figure 7 : nécrose totale des explants herbacée (nœud), et brunissement de leur milieu de culture sous l'effet des phénols

Pour les nœuds a concentration de 8% de l'hypochlorite on a obtenu un taux de contamination de 62% c'est pour ça que nous avons augmenté la durée de trempage et la concentration de l'Hypochlorite de calcium pour obtenir 0% de contamination a 15% et a durée de trempage de 20 min

Pour les apex a concentration de 8% de l'hypochlorite on a obtenu un taux de contamination de 52% c'est pour ça que nous avons augmenté la durée de trempage et la concentration de l'Hypochlorite de calcium pour obtenir 0% de contamination a 15% et a durée de trempage de 15 min .(tableau 09)

Afin d'éliminer les parties nécrosés, nous avons coupé les extrémités noircis des explants et nous avons repiqué sur un milieu frais.

Tableau 9 : Taux de contamination des nœuds et des apex

	Concentration	Durée de trempage	% de contamination	
			nœuds	l'apex
Hypochlorite calcium $\text{Ca}(\text{ClO})_2$	8%	15 min	62%	52%
		20 min	60%	25%
		25 min	60%	49%
	10%	15 min	48%	38%
		20 min	42%	30%
		25 min	28%	25%
	15%	15 min	2%	0%
		20 min	0%	-
		25 min	0%	-

Au début le taux de contamination est élevé (62%) pour les nœud et 52% pour les apex , mais le changement de la désinfection permet a diminué la contamination jusque 0%, avec une absence de l'apparition des phénols à cause de l'utilisation de l'obscurité et l'augmentation de l'acide ascorbique a 5g/l avant la désinfection.

II.2.2 Résultats de la désinfection des feuilles et les graines :

Après l'application de plusieurs essais, et pour éviter un taux de contamination élevé, on a proposé d'utiliser l'hypochlorite de calcium à différentes concentrations, nous avons alors pu diminuer le taux de contaminations jusqu'à 0% (Tableau 10). Les explants gardent leur couleur verte, mais sans prolifération cellulaire pour les feuilles, et sous germination pour les graines (figure 8).



Figure 8 : Résultats de 2^{ème} essai de la désinfection des feuilles

(Absence de débourement)

Tableau 10: Taux de contamination des feuilles et les grains

	Concentration ou pourcentage	Durée de trempage	%de contamination	
			Feuille	graine
Hypochlorite de calcium $\text{Ca}(\text{ClO})_2$	1%	15 min	14%	16%
		20 min	10%	15%
		25 min	6%	12%
	2%	15 min	1%	5%
		20 min	0%	2%
		25 min	0%	0%

Durant la désinfection avec fongicide et avec acide ascorbique, les observations faites montrent, une nette amélioration des résultats par rapport aux précédents. Pour les explants herbacés, on remarque un taux de contamination moins élevée (contamination 0%) et une nette diminution du brunissement du milieu de culture sans pour autant faire éliminer les nécroses des explants et le brunissement du milieu de culture.

III. Effet des hormones :

Après l'élimination de contamination on a travaillé sur la balance hormonale, on a essayé plusieurs concentrations de **BA/AIA** et à la fin on a obtenu ce résultat :

Le taux de débourrement des explants (nœud et apex) est très faible, 2% uniquement (figure 13). Ce taux est atteint, après avoir fait des changements au niveau de la balance hormonale, le meilleur rapport semble être, celui composé de 0,6 mg/l de BA et 0,2 mg/l d'AIA sur le milieu **MURASHIGE et SKOOG(1962)** qui donne 2%.

Régulateurs de croissances	Concentrations	Taux de débourrements
BA AIA	0.4ml 0.2ml	0%
BA AIA	0.6 ml 0.2 ml	2%
BA AIA	0.8 ml 0.4 ml	0%

Tableaux n°11 : Taux de débourrement des micro-boutures dans le milieu **MURASHIGE et SKOOG(1962)**.



Figure 9 : débourrement d'un explant.

Le taux de débourrement des explants est très faible, il faut faire des changements au niveau de la balance hormonale, pour obtenir un meilleur résultat.

IV. Discussion générale :

L'expérimentation a été réalisée dans le but d'obtention des vitro-plants et de calcs, Nous avons d'abord essayé, d'enrayer les problèmes de contamination dus aux bactéries et aux champignons. Il est connu que la réussite de toute introduction « *in vitro* » dépend de l'état des explants vis-à-vis des contaminations.

Pour ce qui est des micro-boutures, l'utilisation de l'hypochlorite de calcium CaCl_2O a déféré une concentration pour réduire le taux de contamination, Le taux de contamination diminuait lorsque la concentration de l'hypochlorite augmente.

Nous avons dénombré un taux de nécrose importants, qui soit probablement dus ; d'abord à la libération des phénols dans le milieu de culture, au milieu de culture, et enfin à la nature de matériel végétale (croissance) sachant le *Pistacia lentisque* est un ligneux.

Les phénols sont des inhibiteurs du métabolisme, qui interviennent dans de nombreux processus, comme inhibiteurs des réactions métaboliques (AUGE et *al.*, 1989). Ils sont des pièges d'oxygène, ils s'oxydent très facilement en quinones. Ainsi, la quantité d'oxygène disponible pour le métabolisme des plantes se trouve diminuée d'autant plus que la température soit élevée.

Selon Maroc (2000), au cours des premiers essais de propagation *in vitro* du pistachier de l'Atlas beaucoup de difficultés ont été rencontrées dans la mise en culture des micro-boutures à cause de l'abondante sécrétion phénolique.

Dans le but d'éliminer ces phénols, Mestouri (2001), a testé plusieurs doses d'acide ascorbique et avec différents temps de trempage. Ces essais ont été réalisés sur des micro-boutures ligneuses, semi-ligneuses et herbacées.

Le meilleur résultat a été obtenu avec les micro-boutures herbacées trempées dans 0,2 g/l d'acide ascorbique pendant 60 minutes avant la désinfection et dans le même but aussi il a additionné 0,1 g/l d'acide ascorbique dans le milieu de culture.

La contamination diminuait, mais cette diminution n'est pas insuffisante, pour ce la on a améliorée la façon de la désinfection ; avec le fongicide pour éliminée la contamination cryptogamique ; et l'acide ascorbique pour éliminée l'apparition des phénols.

Résultats et discussion

Le changement de certaines conditions de culture, comme l'utilisation de l'obscurité, et le rapport hormonal composée de 0,2mg/l d'AIA et 0,6mg/l de BA ont donné un très faible taux de débourrement de 2%.

CONCLUSION

Les résultats obtenus dans ce travail, ont perm de définir un certain nombre d'obstacles qui ont entravés l'introduction "*in vitro*" de *Pistacia lentiscus*.

Dans notre première étude, on a obtenu un taux de contamination très élevé, a cause de certaines conditions de laboratoire, on a fait plusieurs essais pour diminuer cette contamination ; Ces essais basés sur l'utilisation de l'hypochlorite de calcium avec un changement de concentration et de temps de trempage,

Le résultat obtenu est une diminution partielle de la contamination. de 100% à 77%.

Au début on a utiliser des explants semis ligneux, une augmentation de concentration d'hypochlorite de calcium 8%, 10% et 15%, Pour réduire au maximum le taux de contamination, On a améliorées la méthode de désinfection; en utilisant le fongicide.

On a pu observer des milieux de culture sans le moindre contaminant, un débourrement observé n'est pas quantifié en utilisant : 0,5 g/l mythomyle puis, en a augmenté la concentration à 5 g/l. cette augmentation de concentration a permis une élimination totale de la contamination cryptogamique.

Après les efforts déployés pour éliminer la contamination, nous nous somme confrontées à un autre problème, qui est l'apparition des phénols dans le milieu, et des nécrose dans micro-boutures.

Nous avons éliminé les phénols, en utilisent l'acide ascorbique à 5g/l pendant 60 min qui ont entravés l'introduction *in vitro* de *Pistacia lentisque*

Ce qui serait souhaitable de faire pour continuer ce travail :

- tester plusieurs hormonales pour provoquer un taux de débourrement plus élevée.

- Abdel-Rahman A et Soad A., (1975).** Mastic as antioxidant. *J Am Oil Chem Soc.* pp (52- 423).
- Al-said M., Ageel A., Parmar N and Tarik M., (1986).** Evaluation of mastic a crude drug obtained from *Pistacia lentiscus* for gastric and duodenal anti-ulcer activity. *J Ethnopharmacol*, Vol 15, pp (271-278).
- Ali-Shtayeh MS., Yaghmour R., Faidi Y., Salem K et Al-Nuri M., (1998).** Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the palestinian area. *J Ethnopharmacol*, Vol 60, pp (265-271).
- Ali-Shtayeh MS., Yaniv Z et Mahajna J., (2000).** Ethnobotanical survey in the palestinian area: a classification of the healing potential of medicinal plants. *J Ethnopharmacol*, Vol 73, pp (221-232).
- Barazani O.Z., Dudai N et Golan-Goldhirs A., (2003).** Comparaison of Mediterranean *Pistacia lentiscus* Genotype by Random Amplified Polymorphic DNA, Chemical, and Morphological Analyses *Journal of Chemical Ecology*, Vol 29, p8.
- Belhadj S., 2000.** Les pistacheraies algériennes: Etat actuel et dégradation, Centre Universitaire de Djelfa, Algérie, p 108.
- Bellakhdar J., 1997.** La pharmacopée marocaine traditionnelle. Editions Le Fennec. Casablanca. pp 766.
- Bellakhdar J., 2003.** Le Maghreb à travers ses plantes: plantes, productions végétales et traditions au Maghreb. Eds. Le fennec.
- Bensegueni A., 2007.** Les onguents traditionnels dans le traitement des plaies et des brûlures. Thèse d'Etat en sciences vétérinaires. Université Mebtouri. Constantine. pp (21-22).
- Butler M.S., 2004.** The roles of natural chemistry in drug discovery. *Journal Natural Product*. Vol 67, pp (2141-2153).
- Cordell G.A. and Colvard M.D., 2005.** Some Thoughts on the Future of Ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 100, pp (5-14).
- Coste H., (1937).** Flore descriptive et illustrée de la France de la Corse et des contrées limitrophes. Second Tirage, Paris - Librairie des Sciences et des Arts.
- Dedoussis G., Kaliora A., Psarras S., Chiou A., Mylona A., Papadopoulos N and Andrikopoulos N K., (2004).** Antiatherogenic effect of *Pistacia lentiscus* via GSH restoration and downregulation of CD36 mRNA expression. *Atherosclerosis*, 174, 293-303.

- Famsworth N.R., Arkererele O., Bingel A.S., Soejarto D.D. and Guo Z., 1985.** Bull. WHO Vol 63, pp (965-981).
- Fleurentin J. and Pelt J.M., 1990.** Les plantes médicinales. La Recherche Vol 21, pp (811-818).
- Gardeli C., Papageorgiou V., Mallouchos A., Theodosis K and Komaitis M (2008).** Essentialoil composition of Pistacia lentiscus L. and Myrtus communis L.: Evaluation of antioxidant capacity of methalonic extracts. *Food Chemistry*, Vol 107, pp(1120-1130).
- Gausсен H., Leroy J.F. and Ozenda P., 1982.** Précis de Botanique. 2 – Les Végétaux Supérieurs, Ed. Masson, 2ème édition, pp 579.
- Giner-Larza E.M., Manez S., Giner-Pons R.M., Recio M.C., Rios J.L., 2000.** On the anti-inflammatory and anti-phospholipase A2 activity of extracts from lanostane-rich species. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 73, pp (61-69).
- Giner-Larza E.M., Manez S., Recio M.C., Giner-Pons R., Prieto J.M. and Cerda-Nicolas M., 2001.** Oleanolic acid, a 3-oxotriterpene from Pistacia, inhibits leukotriene synthesis and has anti-inflammatory ctivity. *European Journal of Pharmacology*, Vol 428, pp (137-143).
- Harnett S.M., Oosthuizen V. and Van de Venter M., 2005.** Anti-HIV activities of organic and aqueous extracts of Sutherlandia frutescens and Lobostemon trigonus. *Journal of ethnopharmacology* Vol 96, pp (113-119).
- Hmimsa Y., 2004.** L'agrobiodiversité dans les agrosystèmes traditionnels de montagnes: Cas du Rifmarocain. Mémoire de troisième cycle. Université Abdelmalek Essaâdi, Faculté des Sciences, Tétouan, Maroc, 100 p.
- Huwez F.U. and Al-Habbal M.J., (1986).** Mastic in the treatment of benin gastric ulcers. *Gastroenterologia Japonica*, Vol 21, pp (273-274).
- Janakat S. and Al-Merie H., (2002).** Evaluation of hepatoprotective effect of Pistacia lentiscus, Phillyrea latifolia and Nicotiana glauca. *J Ethnopharmacol*, Vol 83, pp (135-138).
- Kokwaro J.O. and Gillett J.B., 1980.** Notes on the Anacardiaceae of Eastern Africa. *Kew Bul*, Vol 34, pp (745-760).
- Kordali S, Cakir A, Zengin H and Duru M (2003).** Antifungal activities of the leaves of three Pistacia species grown in turkey. *Fitoterapia*, Vol 74, pp (164-167).
- Lafranchi F.D.E., Bui T.M., 1998.** L'oléastre et le lentisque, plantes oléagineuses sauvages dans l'économie néolithique en Corse et en Sardaigne. *Sardinian and Aegean Chronology: Towards*

the Resolution of Relative and Absolute Dating in the Mediterranean. Studies in Sardinian Archaeology.

Lee K.H. J., 2004. Current development in the discovery and design of new drug candidates from. Plant natural product leads. *J. Nat. Prod.* Vol 67, pp (273-283).

Lev E. and Amar Z., (2002). Ethnopharmacological survey of traditional drugs sold in the Kingdom of Jordan. *J Ethnopharmacol*, Vol 82, pp (131-145).

Magiatis P., Melliou E., Skaltsounis A., Chinou I B. and Mitaku S., (1999). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var.chia. *Planta Med*, Vol 65, pp (749-751).

Marone P., Bono, Leone, Bona, Carretto and Perversi, (2001). Bactericidal activity of *Pistacia lentiscus* mastic gum against *Helicobacter pylori*. *Journal of Chemotherapy*, Vol 13, pp (611-614).

More D. et White J., (2005) Encyclopédie des Arbres plus de 1800 Espèces et Variétés du Monde, Flammarion, pp(18 -797)

Mitcher A., (1986). Tous les Arbres de nos Forêts, édition Bordas, 319p.

Page C.P., Curtis M.J., Walker M.J., Sutter M.C. et Hoffman B.B., 1999. Histoire de la pharmacognosie. Dans pharmacologie integree.Ed: Deboeck universite.Bruxelle, 8p.

Palevitch D. and Yaniv Z., (2000). Medicinal plants of the Holy Land. *Modan Publishing House*, pp (9-88).

Paraschos S., Magiatis P., Mitaku S., Petraki K., Kaliaropoulos A., Maragoudakis P., Mentis A., Sgouras and Skaltsounis., (2007). In vitro and in vivo activity of chios mastic gum extracts and constituents against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother*, Vol 51, pp (551-559).

Patwardhan B., 2005. Ethnopharmacology and drug discovery. *Journal of Ethnopharmacology* Vol 100, pp (50-52).

Prichard A.J.N., (2004). The use of essential oils to treat snoring. *Phytotherapy Research*, Vol18, pp (696-699).

Quezel P. et Santa S., (1962). Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, Tome I, Centre Nationale de la Rrcherche Scientifique, p 611

Seigue A., (1985). La Forêt Circum méditerranéenne et ses Problèmes, Maisonneuve & Larousse, pp (22- 27), pp (137 – 139).

- Seigue A., 1985.** La forêt circum méditerranéenne et ses problèmes. Techniques agricoles et productions méditerranéennes. G.P. Maisonneuve et Larousse. 502 p.
- Smail-Saadoun N., 2002.** Types stomatiques du genre Pistacia: Pistacia atlantica Desf.ssp. Atlantica et Pistacia lentiscus L. p369.
- Torkelson A. R., (1996).** The Cross Name Index to Medicinal Plants, CRC Press, 1160p.
- Tyler V.E., 1999 .** Phytomedicines: back to the future. J. Nat. Prod. Vol 62, pp (1589-1592).
- Vaya J, Mahmood S., (2006).** Flavonoid Content in leaf Extracts of The fig (Ficus carica L.), Carob (Ceratonia siliqua L.) and Pistachio (Pistacia lentiscus L.), Biofactors.;28(3-4):169-75. PubMed PMID: 17473377.
- Verdu M. and Garcia-fayos P., 2002.** Reproductive ecology of *Pistacia lentiscus* L.(Anacardiaceae): an evolutionary anachronism in the Mediterranean shrubland. Rev. Chil.Hist. Nat. Vol 75, pp (57-65).
- Villar A., Sanz M.J. and Payo M., (1987).** Hypotensive effect of *Pistacia lentiscus* L. Int J Crude Drug Res, Vol 25, pp (1-3).
- Yasilada E., Honda G., Sezik E., Tabata M., Fujita T., Tanaka T., Takeda Y. and Takalshi Y. ,(1995).** Traditional medicine in Turkey. V: Folk medicine in the inner Taurus Mountains. *J Ethnopharmacol*, Vol 46, pp (133-152).
- Zohary M., 1952.** A monographic study of the genus Pistacia. Palestine J. Bot. 5, 187228.
- ZRYD J.P., BRETTEL R., DERREUDRE J.,1988.** Cultures des cellules, tissus et organes végétaux. fondement théorique et utilisations pratiques. Press.Polytechniques. Romandes. Suisse.308 p.
- ZRYD et al., 1988 ; AUGÉ et al.,1989 ;ANONYME ,2000.**

ANNEXE

ANNEXES

Annexes n°1 :

Milieu Gomborg	
Eléments	Concentration
Macro-éléments ×(50)	mg/l
NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	150
KNO ₃	3000
(NH ₄) ₂ SO ₄	134
CaCl ₂ , 2H ₂ O	150
MgSO ₄ , 7H ₂ O	500
Micro-éléments × (50)	mg/l
MnSO ₄ , H ₂ O	10mg
H ₃ BO ₃	03mg
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	02mg
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	250mg
CoCl ₂ , 6H ₂ O	25mg
KI	750mg
CuSO ₄	25mg
Saccharose	30g/l
Acide ascorbique	0,1g/l
Agar	8g/l
Le fer EDTA	g/l
FeSO ₄ , 7H ₂ O	2,785
Na ₂ EDTA	3,725

Annexes n°2 :

Milieu MS	
Eléments	Concentration
Macro-éléments ×(20)	g/l
NH ₄ NO ₃	1,65
KNO ₃	1,90
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,37
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,44
KH ₂ PO ₄	0,17
Micro-éléments × (50)	mg/l
MnSO ₄ , H ₂ O	16,9
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,25
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,025
KI	0,83
Saccharose	30g/l
Acide ascorbique	0,1g/l
Agar	8g/l
Le fer EDTA	g/l
FeSO ₄ , 7H ₂ O	2,785
Na ₂ EDTA	3,725