

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de  
la Recherche Scientifique



Université Abou Bekr Belkaïd-Tlemcen  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de  
l'Univers  
Département de Biologie  
Laboratoire :  
Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique  
(LapSab)

Mémoire  
En vue de l'obtention du diplôme de  
Master en Biologie  
Option : Biochimie Appliquée

Thème

**Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des  
cendres de bois du chêne vert «Kourriche ou Ballout »  
(*Quercus ilex*)**

Présentée par : M<sup>lle</sup> Khebichat Asma

Président : Mr Boucherit Kebir	Professeur	C.U. Nâama
Examineur : Mr Rahmoun Mohammed Nadjib	Maitre Assistant A	U. Tlemcen
Promoteur : M <sup>me</sup> Boucherit-Otmani Zahia	Professeur	U. Tlemcen

Année Universitaire : 2012-2013

## REMERCIEMENTS

Je remercie mon dieu le tout puissant pour le travail que j'ai réalisé.

Mes premiers remerciements vont à Mme Boucherit-Otmani Zahia Professeur à la faculté des Sciences de la Nature et de la vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, directrice du laboratoire «Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, synthèse et activité biologique », à qui j'adresse ma profonde gratitude d'avoir accepté la charge de m'encadrer. Je la remercie vivement pour son aide précieuse, pour ces conseils éclairés au long de ce travail et pour la qualité de son encadrement si sérieux. Son enthousiasme, son dynamisme, sa générosité et sa grande patience m'ont chaque fois permis de rebondir dans les moments difficiles. C'était vraiment un très grand plaisir de travailler avec vous.

J'adresse mes vifs remerciements à Monsieur Boucherit Kebir Professeur au Centre Universitaire de Nâama, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury. Qu'il trouve ici l'assurance de ma respectueuse gratitude.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Rahmoun Mohammed Nadjib Maître Assistant classe A à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'examiner ce travail.

Je remercie également Mme Bouhafsi Djamila pour son aide et ces conseils qu'elle m'a apportés pour la réalisation de ce travail.

Je remercie aussi toutes les personnes qui m'ont écouté, conseillé, aidé, avec patience, rigueur et sympathie, dans mes tâches quotidiennes : Melles Gheffour Kamila, Lahfa Imene, Mezerai Rabiha.

Je n'oublierais pas tous les autres avec qui j'ai pu travailler ou échanger de très bons moments dans le laboratoire: Djahida, Hidayet, Amina, Sara, Khedra, Wassila, Soumia, Téma, Narimen, Rabiaa, Asma, Rabab, Meriem, Houria, Abd el Fettah, Meriem, Nouredine et Ismahane.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à toute personne qui a participé de près ou de loin à l'accomplissement de ce modeste travail.

# SOMMAIRE

Première partie : Synthèse bibliographique	1
Deuxième partie : Matériel et méthodes	11
1. Matériel	11
1.1. Collection et préparation de cendre de bois	11
1.2. Matériel biologique	11
2. Méthodes	11
2.1. Extraction	11
2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne des différentes concentrations des cendres de bois du chêne vert	11
2.2.1. Méthode de diffusion sur gélose (méthode de puits)	12
2.2.2. Méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur milieu solide	12
2.2.3. Méthode de contact direct sur milieu liquide	13
Troisième partie : Résultats et discussion	14
1. Evaluation de l'activité antibactérienne des cendres de bois	14
2. Evaluation de l'activité antifongique des cendres de bois	17

Quatrième partie : Conclusion générale ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò .. 21

Cinquième partie : Références bibliographiques ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò ò 22

# Synthèse bibliographique

L'utilisation d'antibiotiques et d'autres agents antimicrobiens a augmenté régulièrement depuis 1950, ce qui a incité un grand nombre de recherches dans la production de nouveaux agents antimicrobiens à base de produits naturels pour répondre aux besoins de soins de santé. Ceci est lié à la toxicité des produits chimiques, au coût élevé des médicaments et à l'éloignement et/ou l'insuffisance des centres de santé surtout en milieu rural, qui limitent une prise en charge véritable des problèmes de santé publique [(Anon, 1980); (Soro et coll., 2010)].

Par ailleurs, la maîtrise des infections bactériennes et fongiques devient complexe du fait de l'émergence de bactéries et de champignons résistants à de nombreux antimicrobiens conventionnels. En effet, plusieurs bactéries multirésistantes sont rapportées [(Benbachir et coll., 2001) ; (Kacou et coll., 2001); (Akoua et coll., 2004)]. Pourtant, la plus part de ces infections sont comptées parmi les maladies opportunistes surtout chez les personnes immunodéprimées et les sujets âgés. Face à ces problèmes de santé publique, la médecine traditionnelle pourrait apporter une réponse thérapeutique adaptée aux moyens financiers et à l'environnement socioculturel des populations. Les remèdes à base de produits naturels constituent une alternative dans les systèmes de soins primaires et donc, une voie prometteuse pour le développement des médicaments traditionnellement améliorés (Soro et coll., 2010).

Les cendres font parti de ces remèdes, en raison de leurs différentes propriétés physiques et chimiques notamment comme détergent, agent moussant, fertilisant agricole, additif alimentaire, conservateur, blanchisseur des dents

La cendre représente le résidu minéral obtenu après la combustion de matières organiques. Elle est formée de composés inorganiques et même parfois de résidus organiques. A la fin de la combustion, il ne reste théoriquement que environ 1 % (qui représente la cendre) de la masse introduite (Temitope et coll., 2010).

Le potentiel de production de cendres varie d'une plante à l'autre. Il est à noter que la composition des cendres dépend de la source, de l'espèce, de la matière végétale et de la nature du sol où pousse la plante. Les cendres provenant de la combustion

de matières végétales mixtes (tels que des déchets de bois utilisés comme bois de feu) auront des compositions différentes de celles des bois purs (Babayemi et coll., 2010).

La température de combustion est un autre facteur important qui détermine le taux de cendres d'un matériel végétal. La présence de particules noires (particules de bois carbonisés) dans les cendres indique généralement une combustion incomplète. En effet, l'usage des températures plus élevées (ne dépassant généralement pas 600 °C) peut accélérer et assurer une combustion complète, même si cela dépend de la taille des particules et / ou de la nature de la matière végétale.

De plus, la solubilité des cendres dépend de la quantité des composants de métaux alcalins et d'autres sels solubles (comme les chlorures et sulfates de sodium et de potassium) présents dans les cendres, ce qui est en relation directe avec l'espèce de plantes brûlés (Babayemi et coll., 2010).

Chaque arbre a son propre métabolisme et donc une utilisation différente des éléments que la nature lui offre. Par conséquent, chaque arbre produit par combustion ses cendres qui lui sont spécifiques (tableau n° 01) (Yvon, 1979).

**Tableau n° 01** : Pourcentage des cendres issu de différents arbres (Yvon, 1979).

Arbres	Frêne	Hêtre	Bouleau	Orme	Érable	Chêne	Peuplier	Sapin	Pin
Cendre (%)	0,3	0,7	0,3	0,7	1,4	0,15	0,7	0,8	0,1

Les cendres ont des compositions très variées, influencées par la nature de l'espèce végétale sélectionnée, la partie prélevée (feuillage, branche, tronc, etc.), la saison et le sol où poussent les végétaux (Turner, 1956). De manière générale, les cendres possèdent une composition moyenne de :

- 20 à 50 % de calcium ;
- 12 à 14 % de silice ;
- 2 à 9 % de potassium ;
- 1 à 4 % de magnésium ;
- 0,5 à 2 % de phosphore ;
- des métaux lourds en proportions variables (fonction de l'essence et du traitement éventuel du bois).

Ces résidus minéraux ne contiennent pas de  $\text{N}_2$ , et généralement, leurs pH est compris entre 10 et 13 (Couturier et Brasset, 2005).

Le résidu sec concentre en particulier les oligo-éléments minéraux qui contient ce qui donne des analyses très différentes des cendres de bois (tableau n°02).

**Tableau n°02** : Composition chimique des cendres de quelques arbres et d'arbustes (acacia, aubépine, chêne vert, olivier, orme, peuplier, pommier) et céréales (blés, maïs, riz) (Colomban et Tournié, 2010).

Plantes	Poids initial (g)	Différents composants des cendres de chaque plante (%)									
		$\text{SO}_4$	$\text{SiO}_2$	$\text{Al}_2\text{O}_3$	$\text{Fe}_2\text{O}_3$	$\text{TiO}_2$	CaO	MgO	$\text{K}_2\text{O}$	$\text{Na}_2\text{O}$	$\text{P}_2\text{O}_5$
<b>Acacia</b>	100	4,46	22,31	7,25	2,45	0,47	16,53	9,25	25,34	1,02	10,92
<b>Aubépine</b>	100	3,55	22,34	1,71	0,76	0,11	31,39	5,33	27,45	0,89	6,47
<b>Chêne vert</b>	100	0	2,87	1,27	0,3	0,05	84,33	1,81	7,47	0,12	1,78
<b>Olivier</b>	100	1,63	6,21	2,95	0,7	0,14	70,62	4,7	9,32	0,58	3,16
<b>Orme</b>	100	2,91	16,25	1,21	0,71	0,05	58,89	4,89	8,89	0,4	5,81
<b>Peuplier</b>	100	5,85	46,01	4,76	1,32	0,18	27,3	1,9	10,15	0,58	1,95
<b>Pommier</b>	100	0,57	12,2	1,81	1,13	0,08	62,57	4,6	11,92	0,11	5
<b>Blé</b>	100	0,46	65,15	1,01	0,91	0,06	8,69	3,34	16,67	0,21	3,5
<b>Maïs</b>	100	0	76,98	3,33	0,77	0,14	6,44	2,35	6,83	0,3	2,87
<b>Riz</b>	100	0	93,81	0,22	0,2	0	1,09	0,88	2,74	0,11	0,95

Les cendres des bois ont été utilisées depuis l'antiquité en raison de leurs propriétés et de leurs compositions. Les domaines d'application de ces résidus minéraux sont nombreux. Ils ont été utilisés depuis des siècles par nos ancêtres pour le nettoyage des vêtements.

Le processus de fabrication de la lessive à partir des cendres par le mélange d'une quantité de cendre avec de l'eau. Ensuite, ce mélange est chauffé jusqu'à ébullition. Après un certain moment, la lessive est récupérée par une simple filtration.

Sur le plan chimique, le sodium et le potassium contenus dans les cendres saponifient les graisses souvent chargées de pollution biologique et les rendent alors solubles dans l'eau, ce qui les enlèvera au rinçage. Ces propriétés alcalines détruisent de nombreux germes, et permettent un séchage efficace et rapide des vêtements.

Ces substances alcalines sont aussi des antiseptiques puissants. Une étude sur le potentiel antibactérien des racines et l'écorce de *Cocos nucifera* L. a montré que la cendre exerce un effet antiseptique (Sivakumar et coll., 2011).

Ces mêmes propriétés, rendent la cendre un puissant dégraissant. Il s'agit donc d'un effet détergent.

En plus de ces propriétés, les cendres de bois exercent aussi un effet anticalcaire. Elles sont utilisées pour le polissage des pots en cuivre et appliquées sur les vitres et les objets de décoration.

D'un point de vue biologique, les cendres de bois sont efficaces pour le nettoyage des dents et pour l'hygiène buccodentaire. Ils sont utilisés pour lutter contre le jaunissement des dents causé par l'alimentation variée et même contre les aphtes. Ils ont le même effet que le bicarbonate de sodium, en inhibant la prolifération des micro-organismes oraux. En raison de cet effet, les cendres de bois peuvent être utilisées, à l'avenir, en tant qu'agent pour le traitement de diverses maladies associées à la cavité buccale (Bidkar et coll., 2011).

Les cendres de bois sont utilisées également en jardinage pour leur propriétés insecticides et molluscides. Ces résidus minéraux sont efficaces pour éloigner les insectes, les vers de terre, les limaces, les escargots et les fourmis (Couturier et Brasset, 2005).



Les cendres de bois sont aussi connues pour leur effet anti acide (pH basique 11). Cet effet est d'une extrême importance dans le traitement du problème d'acidité gastrique.

En agronomie, les cendres de bois possèdent des valeurs fertilisantes intéressantes. Elles sont riches en calcium, en potassium, en phosphore et en magnésium. Pour cette raison, les cendres peuvent être, avantageusement, utilisées comme fertilisants en agriculture, en arboriculture et en sylviculture.

Comme tout fertilisant, les cendres doivent être utilisées en proportion raisonnables par rapport aux besoins du sol et des plantes. Une dose très faible est inefficace. En revanche, une dose très forte peut être à l'origine d'un blocage ou d'un déséquilibre dans la nutrition des plantes.

De ce fait, la richesse des cendres en résidus minéraux, indique leur capacité à maintenir ou augmenter le pH des sols, autrement dit, à réduire l'acidité excessive des sols.

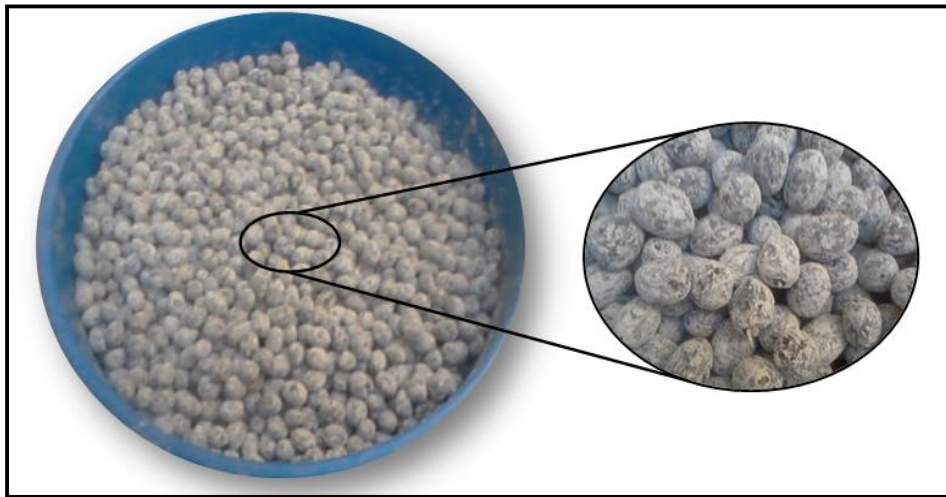
Par ailleurs, les cendres de bois possèdent de nombreux effets thérapeutiques. Elles ont été utilisées comme substance hémostatique en médecine populaire arabes à l'ère préislamique. Ces substances sont surtout efficaces pour les plaies superficielles (saignements capillaires). Elles sont utilisées aussi contre certaines maladies de la peau. Il s'agit notamment des cendres de l'écorce de *Juniperus communis* (appelé aussi genévrier commun) (Mansouri et coll., 2011).

Par ailleurs, les cendres sont utiles pour le stockage des grains. Une étude au Nigeria a montré que les cendres de bois de certains arbres de forêts tropicales constituent exclusivement un moyen de lutte biologique contre les champignons et les moisissures. C'est une méthode privilégiée pour le stockage et la conservation des grains (Temitope et coll., 2010).

Depuis plusieurs années, les cendres de bois ont été utilisées dans la région de BENI SNOUS (une daïra de la wilaya de Tlemcen), dans différents domaines de la vie quotidienne des habitants.

Cette région est connue par la production importante d'huile d'olive et des olives de très bonne qualité et avec une longue durée de conservation en utilisant les cendres des bois résultant de la cuisson (figure n°01).

Après la récolte, les olives sont mélangées avec les cendres et un peu d'eau. La quantité de ces résidus minéraux doit être égale à celle des olives. Après une quinzaine de jours, les olives sont récupérées, rincées et prêtes à la consommation.



**Figure n°01** : Aperçu du mélange des olives avec les cendres de bois du chêne vert.

Cette pratique s'est montrée efficace, car elle assure une bonne conservation pendant une longue durée et a été utilisée par les ancêtres de cette région et persiste à ce jour. Comme le chêne vert est l'un des arbres les plus répandus dans la région de BENI SNOUS, son bois a été utilisé pour le chauffage et la cuisson (figure n°02) et à la fin de chaque combustion de bois, les cendres seront récupérées pour conserver les olives.

C'est pourquoi, nous avons jugé important d'étudier l'effet antimicrobien des cendres obtenues du chêne vert (*Quercus ilex*).



**Figure n°02** : le bois du chêne vert de la région de BENI SNOUS.

Le chêne vert (*Quercus ilex* L.) est une espèce sempervirente de la famille des Fagacées. Elle est considérée comme l'une des espèces les plus caractéristiques de la région méditerranéenne. Cet arbre, encore appelé «Yeuse» et connu en arabe sous le nom de « Kourriche ou Ballout », occupe dans la systématique de la flore la place suivante:

Règne : Végétal

Embranchement : Trachéophytes

Sous-embranchement: Ptéropsidés

Classe : Angiospermes

Sous classe : Dicotylédones

Ordre : Fagales

Famille : Fagaceae

Genre : *Quercus*

Sous genre : Sclérophyllodys

Genre espèce : *Quercus ilex* L, 1753 (section *ilex*) (Dahmani, 1984).

Le chêne vert est un arbre de 5 à 10 mètres de hauteur, mais qui peut atteindre 20 mètres en milieu humide. Il est micro à mésophanérophyte, munie d'un tronc unique, trapu, tortueux et robuste, à écorce finement fissurée, de couleur brune grisâtre et qui apparaît sous forme de petits carrés (figure n°03).



**Figure n°03** : Aperçu de l'ensemble du chêne vert (*Quercus ilex*)

A : chêne vert sur pied, B : Feuille (chatons), C : fruit (gland), D : écorce (tronc)

Le chêne vert présente un système racinaire pivotant pouvant atteindre 10 mètres de profondeur (Girardet, 1980).

Les feuilles sont alternes, coriaces, petites (3 à 8 cm de long, 1 à 3 cm de large), de forme variable. Elles peuvent être entières, dentées ou épineuses, elliptiques, lancéolées, arrondies. Elles sont luisantes, vert foncé sur le dessus et pubescentes, blanchâtres à grisâtres sur le dessous. Comme leur durée de vie est de deux ans, l'arbre est persistant (Benia, 2010).

Les fleurs sont unisexuées (arbre monoïque) et la floraison ne se fait que sur la première pousse de l'année pour les fleurs femelles mais peut se retrouver sur la pousse de l'année précédente pour les fleurs mâles. La floraison se fait du mois d'avril au mois de Mai (Floret et coll., 1992).

Les fruits sont des akènes appelés glands, de dimensions variant de 1 à 3 cm de long. Ils sont regroupés sur un pédoncule commun au nombre de 1 à 5. Les glands mûrissent en un an. Ils sont bruns striés et légèrement pointus au sommet.

La fructification est annuelle et se fait du mois de Novembre au mois de Décembre, mais ne commence que lorsque l'arbre atteint environ 12 ans. En effet, la pollinisation se fait par les insectes, mais les fruits sont dispersés par les animaux.

La régénération du chêne vert est très lente, ceci représente son principal handicap dans la concurrence avec les autres essences forestières. Sa vitalité est

remarquable du fait qu'il rejette des souches jusqu'à un âge très avancé. Sa longévité moyenne est de 200 à 300 ans et plus (Boudy, 1952).

Le chêne vert est une essence robuste, très plastique, qui s'accommode à différents types de climats. Il supporte autant les froids hivernaux que les grandes sécheresses estivales. En effet, le chêne vert peut supporter un indice xérothermique de 0 à 150°C (Benia, 2010).

Dans l'étage semi-aride il représente le type xérophile de la chênaie verte, localisée en Algérie, dans les Aurès et les montagnes du sud Oranais mais c'est dans les étages sub-humides et humides qu'il connaît son plein développement en peuplant de vastes massifs forestiers surtout dans la partie occidentale de l'Algérie.

Le chêne vert est l'espèce emblématique du midi méditerranéen puisqu'il constitue, avec le pin d'Alep et les genévriers, l'espèce dominante de la garrigue. On le retrouve dans la plupart des pays bordant la Méditerranée (Espagne, Portugal, Italie, Maroc, Algérie, Tunisie). Il peut, cependant, s'adapter à un climat non-méditerranéen (Achhal, 1979).

Le chêne vert occupe une très grande partie de la surface forestière Algérienne ; on le trouve partout, aussi bien sur l'Atlas saharien que l'Atlas Tellien où il forme de belles forêts en Kabylie et sur les monts de Tlemcen (Benia, 2010).

Par ailleurs, différentes parties du chêne vert, y compris l'écorce, les feuilles et les glands, sont utilisées en médecine traditionnelle.

En usage interne, cet arbre peut être utilisé pour traiter les hémorroïdes, les leucorrhées, les hémorragies, les hémoptysies, les diarrhées tenaces, les selles sanglantes, les gastralgies persistantes, la paresse digestive, la dysenterie, et l'incontinence urinaire. Il sert aussi comme traitement d'appoint de la tuberculose. Il suffit de prendre des tisanes ou infusions ou de décoction de la matière végétale dans l'eau, selon le type de la maladie.

En usage externe, le Chêne vert peut être utilisé pour soigner les angines, les stomatites, les pharyngites, les ulcères atones, les engelures, les dermatoses, la transpiration des pieds, les fissures anales, les métrites et les hémorroïdes.

Pour le traitement de la blennorrhagie, les métrites et les leucorrhées, des injections vaginales froides avec une décoction de l'écorce ou des feuilles de Chêne vert dans l'eau, sont conseillées. De même, contre les dermatoses, les ulcères de jambes,

l'impétigo, les gerçures, les fissures anales et les hémorroïdes, il est nécessaire de faire des pansements ou des bains de siège avec la décoction des feuilles de la plante. En revanche, pour le traitement des angines, les stomatites et les pharyngites, il est conseillé de faire des gargarismes avec une décoction de l'écorce ou des feuilles de Chêne vert dans l'eau.

Contre les engelures et la transpiration excessive des pieds, une décoction d'écorce moulue en bains de pieds chauds est conseillée (Morigane, 2000).

Partant de toutes ces données, nous avons entrepris cette étude qui porte sur l'évaluation du pouvoir antibactérien et antifongique des cendres de bois du chêne vert. Ces résidus minéraux sont utilisés pour conserver et préserver la qualité organoleptique des olives. Cette méthode de conservation est efficace et donne de bons résultats et sans inconvénients par rapport à l'utilisation des produits chimiques et a tendance à être plus durable dans ses effets.

C'est pour cela que nous avons jugé intéressant d'évaluer et tester l'activité des cendres vis-à-vis de nombreuses souches de référence pathogènes et notamment les principaux contaminants des dérivés alimentaires.

Notre protocole expérimental pour l'évaluation du pouvoir antimicrobien des cendres, est réalisé par trois méthodes :

- Méthode de diffusion en gélose (méthode de puits);
- Méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI) en milieu solide;
- Méthode de détermination des CMI des cendres en milieu liquide.

# Matériel et méthodes

Ce travail est effectué au laboratoire « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique » Université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen.

## **1. Matériel**

### **1.1. Collection et préparation des cendres de bois**

Les cendres de bois du chêne vert (*Quercus ilex*) proviennent de la région de Béni Snous dans le mois d'octobre 2012. Ces dernières sont tamisées, ensuite conservées à température ambiante dans un bocal fermé pour préserver leur qualité initiale.

### **1.2. Matériel biologique**

Nous avons utilisé deux souches de référence de levures *Candida albicans* ATCC 10231 et *Candida albicans* IP444 et neuf souches de bactéries dont quatre à Gram positif à savoir *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633, et cinq souches à Gram négatif à savoir *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 et *Proteus mirabilis* ATCC 35659. Les souches proviennent toutes du laboratoire Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique.

## **2. Méthodes**

### **2.1. Extraction**

L'extrait aqueux est préparé par macération. Une quantité de 50g de la cendre de bois du chêne vert est mise en contact avec 100mL d'eau distillée puis soumise à une agitation continue à 200 tours/min durant 3 heures. La solution ainsi obtenue est filtrée sur papier filtre (LF.F150SCM). Le filtrat est gardé séparément dans un flacon hermétiquement fermé, et conservé à 4°C à l'abri de la lumière.

### **2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne des différentes concentrations des cendres de bois du chêne vert**

Nous avons testé l'activité des cendres de bois à différentes concentrations vis-à-vis de quelques microorganismes (bactéries, levures).

L'étude de l'activité antibactérienne et antifongique vis-à-vis des souches de références est réalisée par des techniques différentes et complémentaires :



- la technique de diffusion sur gélose (méthode de puits) ;
- Méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI) sur milieu solide;
- la technique de contact direct sur milieu liquide.

### 2.2.2. Méthode de diffusion sur gélose (méthode de puits)

C'est la technique de base utilisée pour étudier la capacité d'une substance à exercer un effet anti microbien, elle est aussi appelée : la technique de dilution en gélose pour la détermination des extraits actifs.

Des boîtes de Pétri contenant du milieu Sabouraud dextrose agar additionné de 2% de glucose (pour les levures) et Mueller Hinton agar (pour les bactéries) sont ensemencées aseptiquement par une suspension de  $10^6$  cellules/mL qui provient d'une culture jeune de levures ou de bactéries respectivement. L'ensemencement se fait par écouvillonnage.

Après le séchage des boîtes, la gélose est perforée au centre à l'aide de la partie supérieure d'une pipette Pasteur. Les cavités ainsi formées sont remplies de la solution aqueuse de la cendre à une concentration de 100g/L (environ 40  $\mu$ L par puits).

Les boîtes sont mises à incubées dans une étuve à 30°C pendant 48h pour les levures, et à 37°C pendant 24h pour les bactéries.

L'action inhibitrice se manifeste par la formation d'une auréole autour des puits. La lecture des résultats se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition. Un produit est considéré actif, si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 8 mm (ELA et coll., 1996).

### 2.2.3. Méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sur milieu solide

Cette méthode permet la détermination de la CMI à partir d'une gamme de concentrations de la substance antimicrobienne en milieu solide. Les essais de détermination de la CMI sont effectués selon la méthode de dilution standard sur milieu Mueller Hinton agar gélosé pour les bactéries et la gélose Sabouraud supplémentée de glucose (2%) pour les levures.

Des séries de dilutions des solutions aqueuses de la cendre de bois du chêne vert (5, 10, 15, 20, 40 et 80%) sont réalisées. 1 mL de chaque dilution est ajouté à 19 mL des milieux

gélifiés maintenus en surfusion. Le mélange est immédiatement agité et versé dans la boîte Pétri et laissé à refroidir.

Des spots de 2 µL d'un inoculum standardisé à  $10^8$  cellules/mL sont déposés sur la surface des boîtes Pétri qui contiennent les différentes concentrations. Les boîtes sont incubées pendant 24 h à 37°C. La CMI de l'extrait est définie à partir de la première boîte de la gamme dépourvue de croissance microbienne (NCCLS, 1999).

#### **2.2.4. Méthode de contact direct sur milieu liquide**

A partir d'une culture jeune sur gélose nutritive pour les bactéries et gélose Sabouraud pour les levures, nous avons prélevé quelques colonies que nous avons suspendues dans 5 mL de bouillon Brain-Heart Infusion Broth (bactéries) et le bouillon Sabouraud (levures). Pour les bactéries, l'inoculum est ajusté à  $10^8$  cellules/mL (une DO de 0,08 à 0,1) par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 625 nm. La concentration cellulaire finale doit être fixée à  $10^6$  cellules/mL. Pour les levures, l'inoculum est ajusté par dénombrement des cellules viables sur cellule de Thomas pour avoir une concentration cellulaire finale de  $10^6$  cellules/mL.

Pour un même microorganisme, une série de tube conique stérile de 50 mL (08) et contenant 25 mL du milieu de culture liquide approprié (BHIB pour les bactéries et Sabouraud pour les levures), sont ensemencés avec la suspension microbienne préalablement préparée (bactéries ou levures). Nous avons ajouté des quantités croissantes des cendres en poudre dans chaque tube conique ensemencé de manière à obtenir des concentrations finales en cendres de : 1, 5, 10, 15, 20, 40, et 80%.

Il est à noter que nous avons utilisé un huitième tube comme un contrôle positif de croissance sans aucune addition.

Les cultures ainsi préparées sont placées dans un incubateur de paillasse pendant 3h à 37°C et sous une agitation à 320 tours/min. L'incubation est poursuivie dans une étuve à 37°C pendant une nuit.

Chaque culture est par la suite homogénéisée et agitée à l'aide d'un vortex et centrifugée à 500g pendant 4min.

5 µL du surnageant ainsi obtenu, sont prélevés, déposés et étalés sous forme de stries à la surface de boîte Pétri contenant le Mueller Hinton agar (pour les bactéries) et le Sabouraud agar (pour les levures). Les boîtes sont, ensuite, séchées et incubées pendant 24h à 37°C pour les bactéries et 48h à 30°C pour les levures.

# Résultats et discussion

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des cendres de bois par la méthode de diffusion sur gélose (méthode de puits) et la méthode de détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI) sur milieu solide, n'a donné aucun résultat. Cela est probablement lié à une faible diffusion de ces résidus minéraux en milieu solide. C'est pourquoi, nous avons utilisé une nouvelle technique qui permet un contact direct des cendres avec les microorganismes en milieu liquide.

### **1. Evaluation de l'activité antibactérienne des cendres de bois**

Les résultats relatifs à l'activité antibactérienne des différentes concentrations des cendres de bois sur les bactéries à Gram+ sont présentés sur le tableau N°3 et les photos N°1 et 2. Nous remarquons que l'effet antibactérien est proportionnel à la concentration utilisée. En effet, l'inhibition de la croissance de *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* par les différentes concentrations des cendres est plus importante par rapport aux autres bactéries testées, une inhibition totale de la croissance est obtenue pour 10% de cendre.

Pour *Bacillus subtilis* et *Enterococcus faecalis*, une inhibition totale de leur croissance est observée pour une concentration finale en cendre égale à 20%.

Le tableau N°4 regroupe les résultats relatifs à l'activité antibactérienne des différentes concentrations des cendres de bois sur les bactéries à Gram-.

Nous constatons que en présence des cendres, la croissance est proportionnelle à la concentration de cendres testée.

Une inhibition totale de la croissance de toutes les souches testées est obtenue pour une concentration finale en cendres égale à 20%.

**Tableau N°3:** Effet de concentrations croissantes des cendres de bois sur la croissance des bactéries à Gram positif.

Bactéries	Les concentrations des cendres de bois						
	0%	1%	5%	10%	20%	40%	80%
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	+	+	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	+++	+	+	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	+++	+	+	+/-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+	+	+/-	-	-	-

**Tableau N°4:** Effet de concentrations croissantes des cendres de bois sur la croissance des bactéries à Gram négatif.

Bactéries	Les concentrations des cendres de bois						
	0%	1%	5%	10%	20%	40%	80%
<i>Escherichia coli</i>	+++	+	+	+	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+++	+	+	+/-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	+++	+	+	+	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+++	+	+	+	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	+++	+	+	+/-	-	-	-

(+++): Croissance élevé

(+): Croissance faible

(+/-): Croissance très faible

(-): pas de croissance

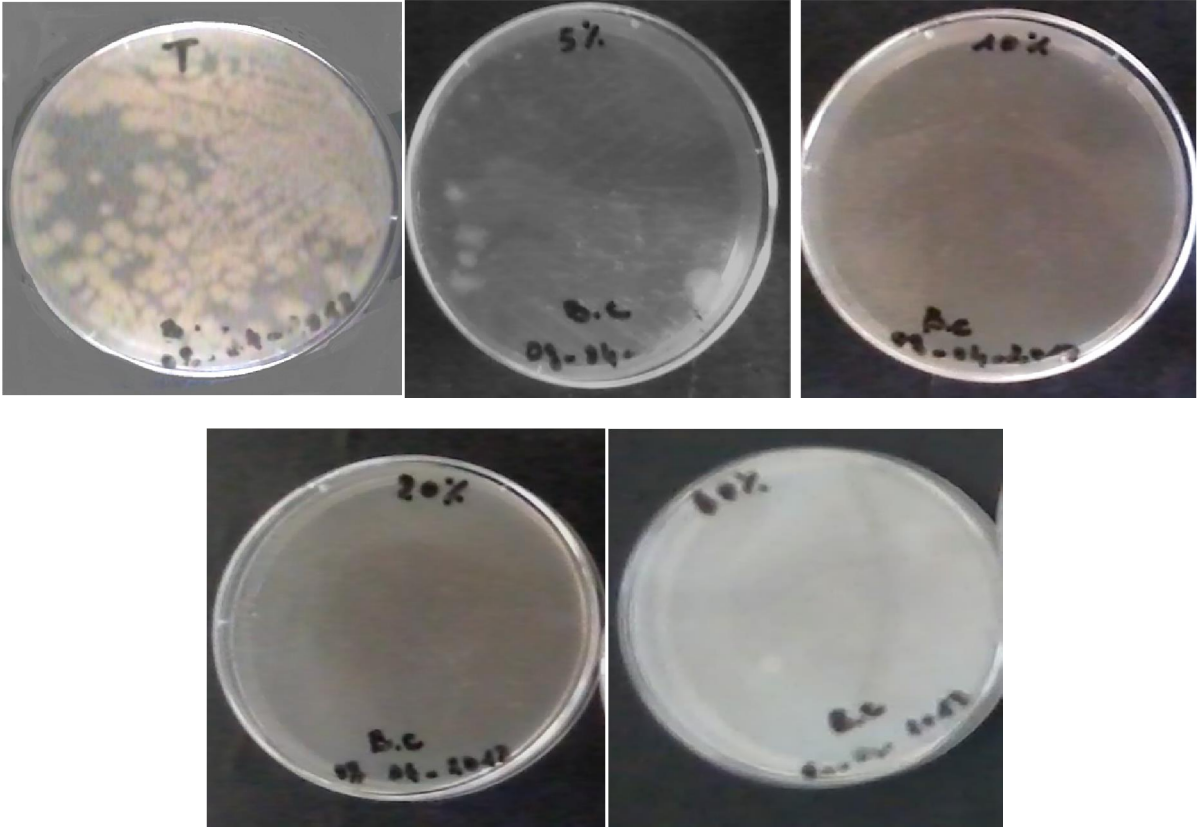


Photo N°1 : Inhibition de la croissance de *Bacillus cereus* vis-à-vis les concentrations des cendres.

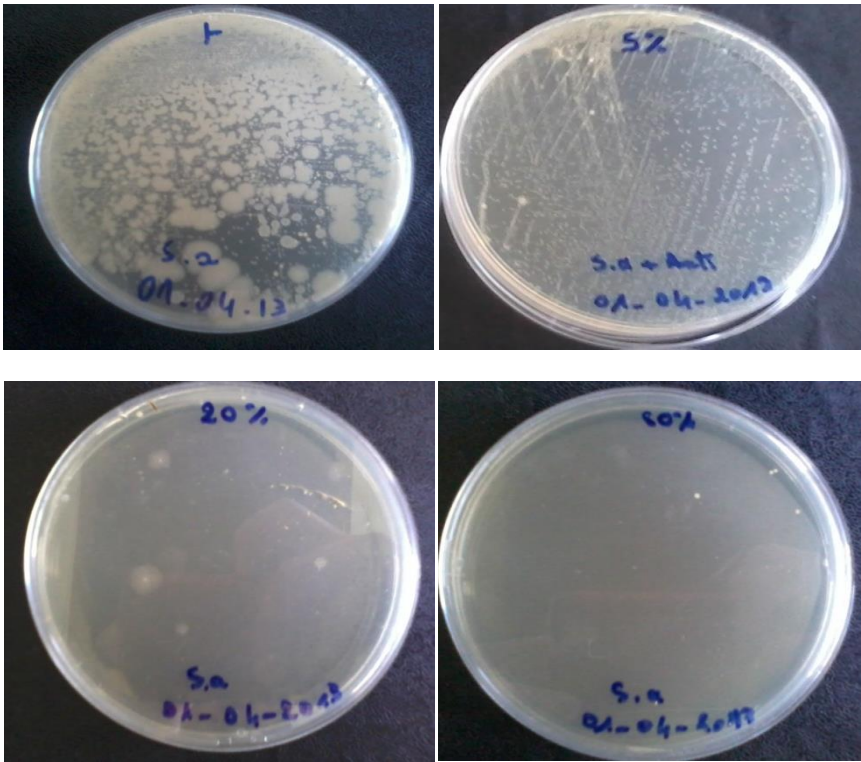


Photo N°2 : Inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis les concentrations des cendres.

## 2. Evaluation de l'activité antifongique des cendres de bois

Les mycoses se définissent comme des maladies infectieuses dues au développement et à la multiplication de champignons pathogènes dans différents tissus et organes chez l'homme ou chez l'animal (Guillot, 1999).

Les infections fongiques systémiques ou profondes sont de plus en plus fréquentes non seulement en nombre mais aussi en gravité et en diversité des espèces incriminées. Ces infections sont greffées d'une importante morbidité et d'une lourde mortalité (Chavanet, 1997).

Il s'agit d'infections sévères et invasives qui se propagent dans le corps provoquant une atteinte grave d'un ou plusieurs organes. Les levures de genre *Candida* sont responsables d'une mortalité de 40% des patients fragilisés (Kettani et coll., 2006).

Les molécules antifongiques disponibles à l'heure actuelle ne réunissent pas les critères définissant l'antifongique idéal : toxicité spécifique vis-à-vis du champignon pathogène, bonne diffusion dans l'organisme, large spectre d'action *in vivo*, absence de problèmes liés à l'apparition de souches résistantes et d'effets secondaires. Au vu de l'éventail restreint des molécules utilisées en antifongothérapie et avec l'apparition des levures émergentes, l'industrie pharmaceutique et les chercheurs se sont orientés vers la recherche de nouvelles molécules antifongiques plus performantes et moins agressives pour l'organisme (Badji et coll., 2005).

Les recherches actuelles tiennent beaucoup plus compte des produits à base naturel qui demeure un espoir pour trouver et identifier de nouveaux remèdes antifongiques. Cette partie de notre étude a pour objectif d'évaluer au même temps l'activité antifongique des cendres de bois du chêne vert vis-à-vis de deux souches de référence de *Candida albicans* et déterminer les concentrations minimales inhibitrices fongicides par la méthode de contact direct sur milieu liquide.

Les résultats obtenus sont présentés sur le tableau N°5 et sur les photos N°3 et 4.

Nous constatons qu'une inhibition totale de la croissance des deux levures testées est obtenue pour une concentration finale de cendres de bois équivalente à 5%.

**Tableau N°5** : Effet de concentrations croissantes des cendres de bois sur la croissance de *Candida albicans* ATCC 10231 et *Candida albicans* IP 444.

Levures	Les concentrations des cendres de bois					
	0%	1%	5%	10%	15%	20%
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	+++	+	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> IP444	+++	+	-	-	-	-

(+++): Croissance élevé

(+): Croissance faible

(-): pas de croissance



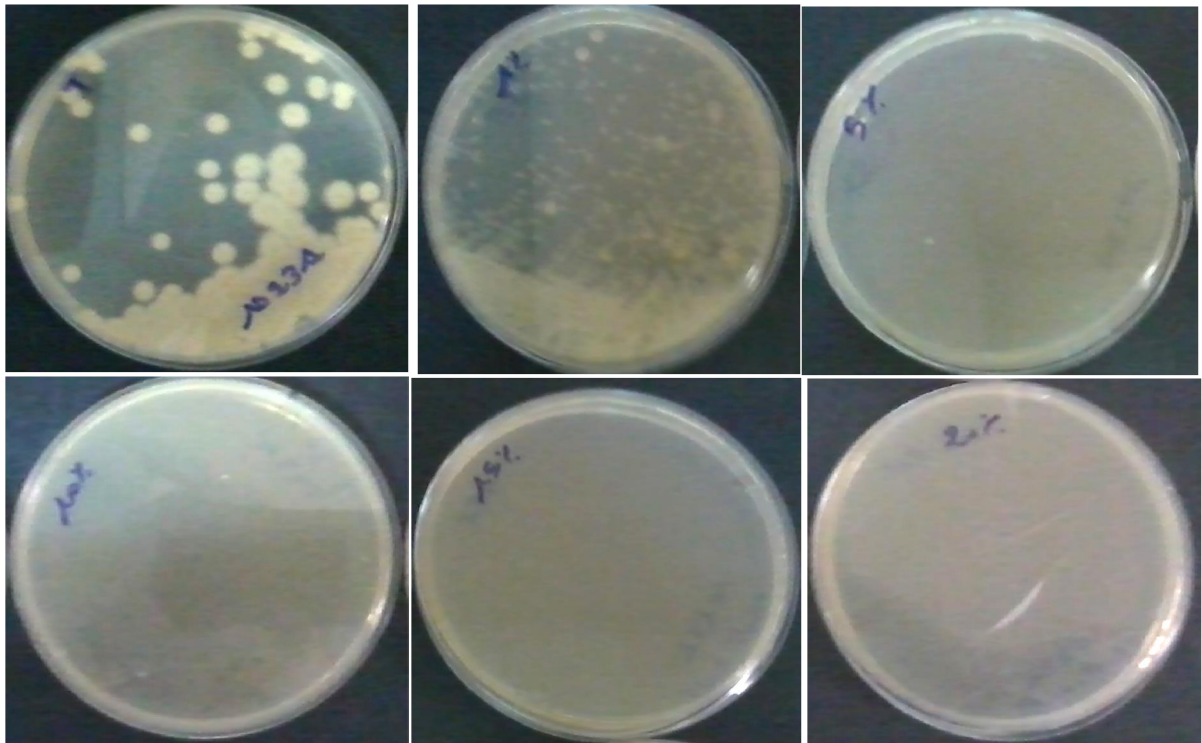


Photo N°3 : Inhibition de la croissance de *Candida albicans* ATCC 10231 vis-à-vis les concentrations des cendres.

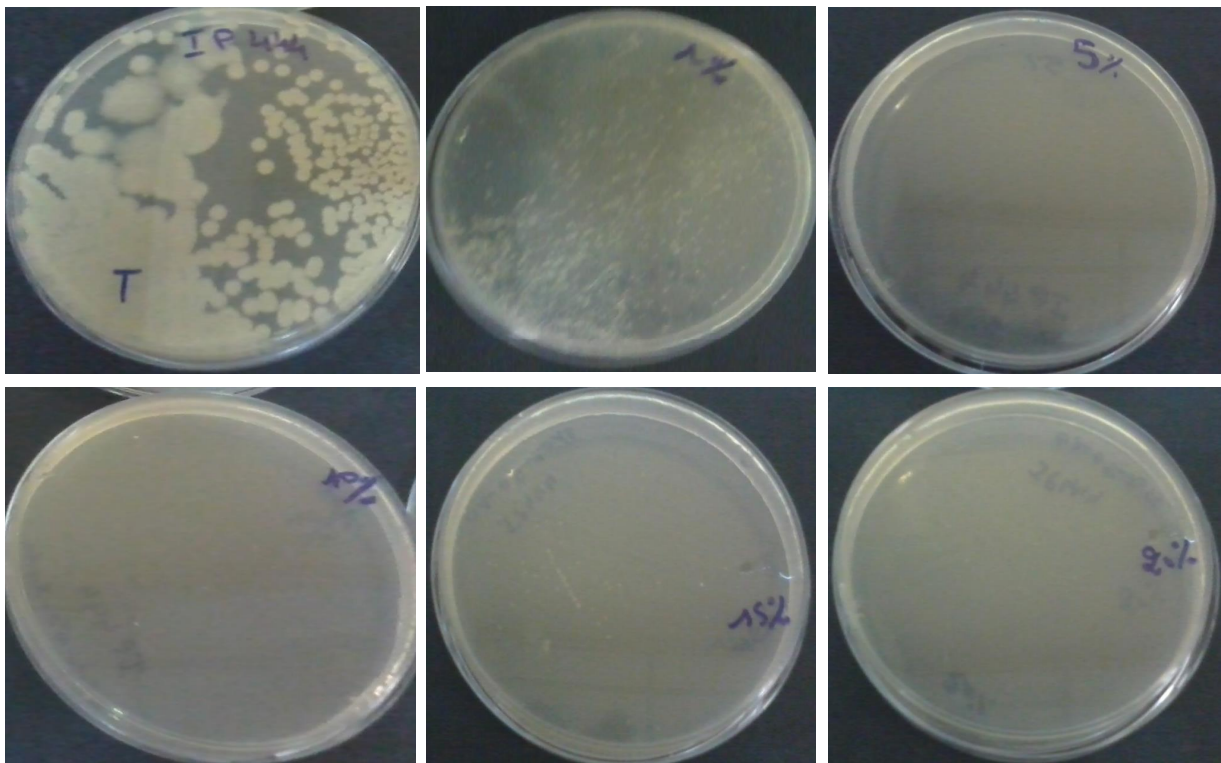


Photo N°4 : Inhibition de la croissance de *Candida albicans* IP444 vis-à-vis les concentrations des cendres.

## Discussion

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

*Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* sont les souches les plus sensibles vis-à-vis les différentes concentrations des cendres de bois ;

*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter cloacae* révèlent une sensibilité moyenne ;

*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus mirabilis* sont intermédiairement sensibles vis-à-vis les différentes concentrations des cendres de bois ;

Les bactéries à Gram négative sont plus résistantes aux cendre de bois que les bactéries à Gram positif ;

Cette résistance est probablement liée à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces micro-organismes qui contient une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries à Gram+ ;

La concentration des cendres de bois de 20%, s'est avérée la plus active vis-à-vis de toutes les bactéries testées.

On pense que l'action des cendres sur les microorganismes dépend, d'une part de la structure membranaire de la cellule cible, puisque elles possèdent un effet inhibiteur beaucoup plus sur les bactéries à Gram+ que sur les bactéries à Gram-, et d'autre part de la composition des cendres elles-mêmes qui leur confère un pH basique (pH= 12,4).

Par ailleurs, les cendres de bois ont montré une meilleure activité vis-à-vis des levures testées (*Candida albicans* ATCC 10231 et *Candida albicans* IP444) ceci est probablement liée au pH basique des cendres. Il est a noté que la croissance des levures se tente à pH acide (pH. 5 - 6).

Une étude en 2010, réalisée par Temitope et Adedotun sur la Conservation des graines contre les champignons en utilisant les cendres de bois de certains arbres des forêts tropicales au Nigeria a montré que la cendre de bois des arbres *Nauclea diderrichii* et *Piptadeniastrum africanum* était capable de prévenir un certain nombre de champignons pathogènes en raison de la présence de certains composés actifs en eux. Les différentes expériences menées dans ce travail ont montré que la cendre de bois à des effets fongicides qui expliquent sans doute pourquoi les cendres de *N. diderrichii* et *P. africanum* ont réussi à empêcher l'invasion de ravageurs et de la croissance microbienne.

# Conclusion générale

Dans cette étude, nous avons évalué l'activité antibactérienne et antifongique des cendres de bois du chêne vert (*Quercus ilex*).

Il ressort de cette étude que :

Les bactéries à Gram positif sont plus sensibles que les bactéries à Gram négatif ;

Les levures testées étaient plus sensibles que les bactéries ;

La concentration moyenne de la cendre, qui confère cet effet antimicrobien contre la pluparts des souches testées est d'environ 10%.

En raison de sa composition chimique, son pH basique et ses propriétés physico-chimiques, surtout pour son pouvoir d'absorber l'humidité, la cendre de bois peut être une source primordiale pour produire de futurs remèdes naturels contre différents micro-organismes et suggère son utilisation à l'avenir comme un agent antimicrobien dans le traitement de divers maladies bactériennes ou fongiques.

En termes de limites, il convient de placer ce travail dans un contexte plus prospectif, car sur de nombreux points, il ouvre plusieurs nouvelles voies de recherche.

Étudier d'autres cendres issues de différentes arbres et plantes pour sélectionner celles qui présentent de meilleures activités antimicrobiennes.

Étude du mode d'action de ce produit en déterminant leurs cibles.

# Références bibliographiques

1. Achhal H., Akabli O., Barbero M., Benabid A., Mchirit O., Peyre C., Quezel P., River- Martinez S. (1979) A propos de la valeur bioclimatique et dynamique de quelques essences forestières du Maroc. *Ecol. Méditerranéenne*; 5 pp. 211-249.
2. Akoua Koffi C., Guessennnd N., Gbonon V., Faye-Kette A. Y. H., Dosso M. (2004) Methicillinresistant of *staphylococcus aureus* in Abidjan. A new hospital problem. *Medicines et maladies infectieuses*; 34 (3) pp. 132-136.
3. Anon (1980) The Use of Antimicrobial Agents: In The Effects on Human Health of Sub therapeutic use of Antimicrobials in Animal feeds. *Washington D.C National Academy of Science*; pp. 1-11.
1. Babayemi JO., Dauda KT., Nwude DO., Kayode A. (2010) Evaluation of the Composition and Chemistry of Ash and Potash from Various Plant Materials-A Review. *Journal of Applied Sciences*; 5(1) pp. 1.
2. Badji B., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A. et Sabaou N. (2005) Activité antifongique d'une souche d'*Actinomyces* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigenes. *Journal de Mycologie Médicale* ; 14 pp. 211-219.
3. Benbachir M., Benredjeb S., Boye C. S., Dosso M., Belabbes H., Kamoun A., Kane O., Elmdaghri N. (2001) Two-year surveillance of antibiotic resistance in *streptococcus pneumonia* in four African cities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* ; 45 (2) pp. 627-629.
4. Benia F. (2010) Étude de la faune entomologique associée au chêne vert (*Quercus ilex* L.) dans la forêt de Tafat (Sétif, Nord-est d'Algérie) et bio-écologie des espèces les plus représentatives. *Thèse de doctorat, Département de biologie. Faculté des Sciences. Université Ferhat Abbas Sétif.*
5. Bidkar J. S., Poojari S. K., Dama G. Y., Bidkar S. J. (2011) An inhibitory study on oral microflora of *homo sapiens* by the water extract of *cocus nucifera* shell ash. *International Journal of Pharma research and development- Online (IJPRD)*; 4(1) pp. 173.
6. Boudy P. 1952. Guide du forestier en Afrique du Nord. *Ed. La Maison Rustique, Paris* ; pp. 505.
7. Chavanet P. (1997) Amphotéricine B désoxycholate (Fungizone ®): vieux médicament, nouvelles version. *Rev Med Interne*; 18 pp.153-165.

8. Colomban Ph. et Tournié A. (2010) Les cendres végétales, matières premières des verres et des émaux : un exemple, les cendres de végétaux utilisées par Fr. D de Montmolin. *Laboratoire de Dynamique, Interaction et Réactivité - UMR7075 CNRS. Université Pierre-et-Marie-Curie (UPMC), France.*
9. Couturier C. et Brassat T. (2005) Gestion et valorisation des cendres de chaufferies bois, Valorisation agricole . Exemple d'une petite chaufferie, *ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie); 7(2) pp. 2-5.*
10. Dahmani-Megrerouche M., (1984) Contribution à l'étude des groupements à chêne-vert (*Quercus rotundifolia* Lamk.) des monts de Tlemcen (Ouest-Algérien) : Approche phytoécologique et phytosociologique. *Thèse de Doc.3ème Cycle, Inst. Biol. Univ. Sc. Tech. Houari Boumediène, Alger.*
11. Ela M.A., El-Shaer N.S. et Ghanem N.B. (1996) Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. *Pharmazie; 51 pp.993-995.*
12. Floret C., Galan M.J., LE-Floch E., Romane F. (1992) Dynamics of holm oak (*Quercus ilex* L.) coppices after clearcutting in southern France. *Veg. 99 (100) pp. 97-105.*
13. Girardet P. (1980) Chêne vert (*Quercus ilex*). *Bull. Vulg. (Secrétariat d'Etat aux forêts et à la mise en valeur des terres) Alger. Ed.C.A.V.I.F. ; pp. 6.*
14. Guillot J. (1999) Diagnostic biologique des mycoses animales. *Revue française des laboratoires ; 310 : 57-64.*
15. Kacou-N'Douba A., Bouzid S. A., Guessenned K. N., Kouassi M. Bengue A. A., Faye-Kette A.Y. H. Dosso M. (2001) Antimicrobial resistance of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* in health carriers/ report of a study in 5-year-olds in marocory; Abidjan Côte d'Ivoire. *Annals of Tropical Paediatrics: International child health; 21 (2) pp.149-154.*
16. Kettani A., Belkhadir Z.H., Mosadik A., Faroudy M., Abadou A., Lazreg C. et Sbihi A. (2006) traitement antifongique des candidoses systémiques en réanimation. *Journal de Mycologie Médicale ; 16 pp. 16-25.*
17. Mansouri N., Satrani B., Ghanml M., El Ghadraoui L., Guedira A., Aafi A. (2011) Composition chimique, activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle de *juniperus communis* du maroc. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège; 14 (1) pp. 792.*

18. Morigane (2000), *Grimoire des Plantes*. ed. Creative Commons BYNCND (Disponible sur : <<http://vraiechipie.perso.neuf.fr/SITE/magie/Grimoire-des-Plantes.pdf>> [Consulté le 15 Mai 2013] ; pp. 48.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, June 1999. *Approved Standard; NCCLS document M31-A*, 1999.
20. Sivakumar K., Moideen M., Varghese R., Kumar S. (2011) Antibacterial potential of root and bark of *Cocos nucifera* Linn. Against isolated urinary tract infection causing pathogens. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*; 2(4) pp. 491.
21. Soro D., Kone M.W., Kamanzi K. (2010) Évaluation des activités antimicrobiennes et anti-radicaux libres de quelques taxons bioactifs de Côte d'Ivoire. *European Journal of Scientific Research*; 40(2) pp. 308.
22. Temitope O. Oguntade A. Adedotun A. Adekunle. (2010) Preservation of seeds against fungi using wood-ash of some tropical forest trees in Nigeria. *African Journal of Microbiology Research* ; 10(2) pp. 279- 280.
23. Turner W. E. S. (1956) Studies in ancient glasses and glass making processes. Part III The chronology of glass making constituents, *Journal of the Society Glass Technology*; 40 pp. 39-52.
24. Yvon B. (1979) La combustion efficace du bois. Service de la construction et du machinisme agricoles, Agriculture Québec. *Université Laval Canada*.