

**AFPP – CINQUIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE
SUR LES MÉTHODES ALTERNATIVES DE PROTECTION DES PLANTES
LILLE – 11 AU 13 MARS 2015**

ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE DEUX EXTRAITS DE *FRAXINUS EXCELSIOR*

S. AMAMRA⁽¹⁾, L. ARRAR^{(1)*}, O. BELHADDAD⁽¹⁾, S. MEZAACHE-AICHOURE⁽²⁾, N. CHAREF⁽¹⁾,
N. HAICHOURE⁽²⁾, M.M. ZERROUG⁽²⁾, A. BAGHIANI⁽¹⁾

⁽¹⁾ Laboratory of Applied Biochemistry, Faculty of Nature and Life Sciences, University Sétif 1(El Bez),
Setif 19000, ALGÉRIA. * email: lekharar@hotmail.com

⁽²⁾ LMA Departement de Microbiologie, Faculté SNV, Université Ferhat ABBES Sétif 1(EL BEZ), Sétif
19000, ALGÉRIE.

RÉSUMÉ

Les produits naturels représentent une bonne alternative pour les produits chimiques utilisés dans la lutte en agriculture. Deux extraits de *Fraxinus excelsior* ; l'extrait méthanolique et éther de pétrole ont été testés contre *Bacillus sp.* et *Pseudomonas sp.* Comparé au standard, l'extrait de l'éther de pétrole a légèrement inhibé les deux souches avec des zones d'inhibition de $9,11 \pm 0,64$ et $10,33 \pm 0,93$ mm, respectivement. Par contre l'extrait méthanolique a inhibé *Pseudomonas* avec une zone d'inhibition de $18,44 \pm 1,69$ mm.

Mots-clés : Activité antibactérienne, *Fraxinus excelsior*, extraits de plantes médicinales.

ABSTRACT

Natural products represent a good alternative for chemicals used in agriculture in the fight. Two extracts from *Fraxinus excelsior*; methanol and petroleum ether extract were tested against *Bacillus sp.* and *Pseudomonas sp.* Compared to the standard, petroleum ether extract slightly inhibited both strains with inhibition zones of 9.11 ± 0.64 and 10.33 ± 0.93 mm, respectively. The methanol extract exhibited a good action against *Pseudomonas* with inhibition zone of 18.44 ± 1.69 mm.

Keywords: Antibacterial activity, *Fraxinus excelsior*, medicinal plants extracts.

INTRODUCTION

Les bactéries et les champignons pathogènes de plantes sont économiquement d'une grande importance dans le monde entier. Ils agissent sur un grand nombre de cultures agricoles importantes soit au cours de la saison de culture ou pendant le stockage (Rabea and Steurbaut, 2010). Le contrôle de ces contaminations et infections est particulièrement important et peut être atteint par les pesticides synthétiques. Malheureusement, ces produits de synthèse présentent de plus en plus des problèmes environnementaux (Houeto *et al.*, 1995). En outre, la résistance a été développée chez les agents pathogènes. L'identification de nouveaux agents capables de combattre les pathogènes (bactéries et champignons) vont présenter une alternative aux antibiotiques ou pesticides actuellement utilisés.

Pseudomonas aeruginosa, connu comme pathogène pour l'Homme est également capable d'infecter les racines d'*Arabidopsis* et du basilic (*Ocimum basilicum*), in vitro et dans le sol, et peut causer leur mortalité en sept jours après l'inoculation (Walker *et al.* 2004). Ces auteurs ont montré que la bactérie colonise les racines en formant des biofilms comme dans le cas des tissus humains. Il a été également montré que *Staphylococcus aureus* peut infecter *Arabidopsis* et y libérer ses endotoxines, identiques à celles qui sont à l'origine des contaminations du lait destiné aux nouveau-nés (Prithiviraj *et al.*, 2005). De plus, *K. pneumoniae* est une bactérie Gram-négative de la famille des *Enterobacteriaceae* avec une grande distribution causant des maladies chez divers groupes d'hôtes dont l'Homme, les animaux et les plantes. Cette bactérie présente des résistances importantes aux antibiotiques (Gowsiya *et al.* 2014). D'autre part, *Enterobacter cloacae* cause la désintégration du bulbe de l'oignon (Bishop and Davis, 1990).

Malheureusement l'utilisation intensive des produits chimiques pour traiter les maladies des plantes peut conduire, dans certains cas à la résistance et la fréquence des isolats résistants qui deviennent de plus en plus importants et conduire à des échecs de la lutte chimique. Dans ce contexte, l'utilisation de produits naturels, tels que les extraits de plantes apparaît comme alternative prometteuse. Plusieurs études ont montré que les plantes aromatiques et médicinales sont des sources de grande variété de métabolites secondaires comme les tanins, alcaloïdes et des flavonoïdes, qui possèdent in vitro des propriétés antimicrobiennes (Staub, 1991 ; Leroux, 1993).

MATERIEL ET MÉTHODES

MATERIEL BIOLOGIQUE

La plante de frêne *Fraxinus sp.* est récoltée dans la région de M'sila en Août 2010 et en Avril 2011. Les fruits sont séchés à l'ombre, broyés en poudre puis soumis à l'extraction.

Cinq souches bactériennes, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923, et *Enterobacter cloacae*, ont été utilisées dans cette étude.

METHODES

Extraction

L'extraction à partir des fruits de frêne est réalisée par macération dans le méthanol 85 % pendant sept jours puis cinq jours après renouvellement du solvant. Le méthanol est ensuite évaporé par évaporation rotative (rotavapor Büchi) et l'extrait est obtenu par séchage final à 37° C. L'extrait obtenu était visqueux, par conséquent une deuxième extraction (des huiles) a été réalisée par l'éther de pétrole.

L'activité antibactérienne

A partir d'une culture pure (18-24 heures), une suspension d'inoculum est préparée dans l'eau physiologique à une concentration au standard de turbidité McFarland 0,5 ($\sim 10^8$ UFC/cm³) équivalente à 500 µl de l'inoculum dans 5 ml d'eau physiologique stérile pour chaque souche bactérienne utilisée. Cet inoculum est ensuite ensemencé sur des géloses de Mueller Hinton dans des boîtes de Petri (Sahin *et al.*, 2004). L'ensemencement est effectué par écouvillonnage, à partir de

la suspension bactérienne fraîchement préparée. Des disques de papier Whattman stérile de 6 mm de diamètre imbibés de 15 µl d'extrait méthanolique ont été déposés à la surface de la gélose en les appliquant délicatement avec une pince stérile. Après 24 heures d'incubation à 37°C, le diamètre d'inhibition est mesuré. Le témoin négatif était le DMSO, le témoin positif était constitué des antibiotiques, gentamycine 10µg (*Bacillus*, *Klebsiella*), ampicilline 10µg (*Enterobacter*), 5 mg trimethoprim (*Staphylococcus*, *Pseudomonas*).

RESULTATS

Les résultats obtenus montrent que les deux extraits (méthanolique et éther de pétrole) du frêne ont inhibé la croissance bactérienne de quatre souches bactériennes, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 avec des zones d'inhibition de 9,55 ; 9,66 ; 10,11 et 18,55 mm respectivement (tableau 1). Par contre il était inactif contre *Bacillus cereus* ATCC 10876. Sur la base de l'indice d'activité (AI), on remarque que l'extrait méthanolique était très actif contre trois souches bactériennes, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 avec des valeurs de 0.42, 0.53 et 1.86, respectivement.

Tableau 1. Activité antibactérienne des extraits méthanolique et éther de pétrole du frêne
Table 1: (antibacterial activity of ash methanolic and petroleum ether extracts)

Bacteria strains	FEPE		FEME	
	ZI	AI	ZI	AI
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	9.11 ± 0.51	0.25	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10.16 ± 0.44	0.48	10.11 ± 0.77	0.42
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	23.66 ± 0.34	2.37	18.55 ± 1.17	1.855
<i>Enterobacter cloacae</i>	8.11 ± 0.51	0.25	9.66 ± 0.58	0.29
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	8.22 ± 0.19	0.55	9.55 ± 1.02	0.53

FEPE : extrait éther de pétrole (*Fraxinus excelsior* petroleum ether extract); FEME : extrait méthanolique (*Fraxinus excelsior* methanolic extract). Antibiotiques utilisés: gentamycine 10 µg (*Bacillus*, *Klebsiella*), ampicilline 10 µg (*Enterobacter*), 5 mg trimethoprim/25 mg sulfadiazine (*Staphylococcus*, *Pseudomonas*). Used antibiotics: 10 µg gentamicin (*Bacillus*, *Klebsiella*), ampicillin 10 µg (*Enterobacter*), 5 mg trimethoprim/25 mg sulfadiazin (*Staphylococcus*, *Pseudomonas*), ZI : zone of inhibition, AI : activity index.

DISCUSSION

Les résultats obtenus indiquent que les extraits (méthanolique et éther de pétrole) du frêne sont doués d'activité antibactérienne importante. Cette activité a été confirmée par d'autres auteurs qui ont testé des extraits méthanoliques du frêne. Middleton *et al.* (2005) rapportent que l'extrait méthanolique de *Fraxinus excelsior* a inhibé la croissance des bactéries *S. aureus* NCTC 10788, *E. coli* NCIMB 8110, *K. aerogenes* NCTC 9528 et *P. aeruginosa* NCTC 6750.

Les deux extraits du frêne étaient plus actifs contre les bactéries Gram négative à savoir *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*. Ces résultats prouvent qu'en plus de la sensibilité rapportée par la littérature des bactéries Gram positives (Hulin *et al.*, 1998), que les bactéries Gram négatives peuvent être plus sensibles lors de l'utilisation des extraits différents.

D'après Fawzi *et al.* (2009) les extraits de plantes peuvent être utilisés comme fongicides naturels pour contrôler les champignons pathogènes et réduire ainsi la dépendance à l'égard des fongicides de synthèse. La présente étude montre que ces extraits peuvent également être utilisés comme antibactériens pour le traitement, non seulement de maladies humaines, mais aussi de pathologies des plantes.

CONCLUSION

Les résultats obtenus au cours de ce travail montrent que les extraits sont plus actifs contre les bactéries Gram négative ce qui suggère des études plus avancées et des tests sur un grand nombre de bactéries notamment phytopathogènes afin d'établir d'une manière plus concrète ces résultats en vue d'une éventuelle utilisation de ces extraits *in situ*.

BIBLIOGRAPHIE

- Bishop AL and Davis RM. 1990. Internal decay of onions caused by *Enterobacter cloacae*. *Plant Dis.* 74, 692-694.
- De Waard MA, Georgopoulos SG, Hollomon DW, Ishii H, Leroux P, Ragsdale NN, Schwinn FJ. 1993. Chemical control of plant diseases: Problems and prospects. *Ann Rev Phytopathol* 31: 403-421.
- Fawzi EM, Khalil AA, Afifi AF. 2009. Antifungal effect of some plant extracts on *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*. *Afr J Biotechnol* 8 (11): 2590-2597.
- Gowsiya S, Sujatha N and Mehar SK. 2014. Medicinal plants as source of antibacterial agents to counter *Klebsiella pneumoniae* Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 4 (01), pp. 135-147.
- Houeto P, Bindoula G and Hoffman JR. 1995: Ethylene-bisdithiocarbamates and ethylenethiourea: possible human health hazards. *Environmental Health Perspective*, 103: 568-573.
- Hulin V, Mathot AG, Mafart P and Dufossé L. 1998. Les propriétés antimicrobiennes antimicrobienne des huiles essentielles et composés d'arôme. *Sci. Aliments* 18:563-582
- Leroux P. 1993. - Fongicides : prévoir, une résistance peut en cacher une autre. *Perspect Agric*: 185: 95-98.
- Middleton P, Stewart F, Al-Qahtani S, Egan P, O'Rourke, Abdulrahman A, Byres M, Middleton M, Kumarasamy Y, Shoeb M, Nahar L, Delazar A and Sarker SD. 2005. Antioxidant, Antibacterial Activities and General Toxicity of *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior* and *Papaver rhoeas*. *Iranian J. Pharm. Res.* 4: 101-103
- Prithiviraj B, Bais HP, Jha AK and Vivanco JM. 2005. *Staphylococcus aureus* pathogenicity on *Arabidopsis thaliana* is mediated either by a direct effect of salicylic acid on the pathogen or by SA-dependent, NPR1-independent host responses. *Plant J.* 42(3):417-432.
- Rabea EI and Steurbaut W. 2010. Chemically Modified Chitosans as Antimicrobial Agents against Some Plant Pathogenic Bacteria and Fungi. *Plant Protect. Sci.* 46, , No. 4: 149-158
- Sahin F, Gulluce M, Daferera D, Sokmen A, Polissiou M, Agar G and Ozer H. 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control* 15: 549-557.
- Staub T. 1991 - Fungicide resistance: practical experience with antiresistance strategies and the role of integrated use. *Ann Rev Phytopathol* 29: 421-442.
- Walker TS, Bais HP, De'ziel E, Schweizer HP., Rahme LG., Fall R and. Vivanco JM. 2004. *Pseudomonas aeruginosa*-Plant Root Interactions. Pathogenicity, Biofilm Formation, and Root Exudation. *Plant Physiol.* 134, 320-331.