



HAL
open science

Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'Eucalyptus microcorys Müller, 1860 sur la cultivabilité de quelques bactéries d'importance sanitaire

Antoine Tamsa Arfao

► **To cite this version:**

Antoine Tamsa Arfao. Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'Eucalyptus microcorys Müller, 1860 sur la cultivabilité de quelques bactéries d'importance sanitaire. Ingénierie de l'environnement. Université de Yaoundé 1, 2017. Français. NNT : . tel-02559942

HAL Id: tel-02559942

<https://hal.science/tel-02559942>

Submitted on 30 Apr 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
UNIVERSITY OF YAOUNDE I



FACULTE DES SCIENCES
FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES

DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

LABORATOIRE D'HYDROBIOLOGIE ET ENVIRONNEMENT

LABORATORY OF HYDROBIOLOGY AND ENVIRONMENT

Effet de l'extrait aqueux des feuilles d'*Eucalyptus microcorys* Müller, 1860 sur la cultivabilité de quelques bactéries d'importance sanitaire

Thèse

Présentée et soutenue le 23 juin 2017 en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat/PhD en Biologie des Organismes Animaux

Option : *Hydrobiologie et Environnement*

Par :

TAMSA ARFAO Antoine

Matricule : 05Q399

Master ès-Sciences

Devant le jury composé de :

Président: **FOMENA Abraham**, Professeur, Université de Yaoundé I

Rapporteur: **NOLA Moïse**, Professeur, Université de Yaoundé I

Membres: **NGONO NGANE Rosalie Annie**, Maître de conférences, Université de Douala;

NTSAMA MBALA Claudine, Maître de Conférences, Université de Yaoundé I;

SADO KAMDEM S.L, Maître de Conférences, Université de Yaoundé I;

ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert, Maître de conférences, Université de Yaoundé I.

Année 2017

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DES SCIENCES

ANNEE ACADEMIQUE 2016/2017
(Par Département et par Grade)
DATE D'ACTUALISATION : Mars 2017

ADMINISTRATION

DOYEN : BILONG PAUL, Professeur

VICE-DOYEN / DPSAA : NJOPWOUO Daniel, Professeur

VICE-DOYEN / DSSE : DONGO Etienne, Professeur

VICE-DOYEN / DRC : ESSIMBI ZOBO Bernard, Professeur

Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Marie C. F., Maître de Conférences

Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche : ABOSSOLO Monique, Chargée de Cours

1- DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (41)			
N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
2	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
3	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
4	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
5	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
6	BIGOGA DIAGA Jude	Maître de Conférences	En poste
7	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
8	FOKOU Elie	Maître de Conférences	En poste
9	KANSCI Germain	Maître de Conférences	En poste
10	MINKA Samuel	Maître de Conférences	En poste
11	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
12	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
13	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
14	ACHU Merci BIH	Chargé de Cours	En poste
15	ATOCHO Barbara Mma	Chargé de Cours	En poste
16	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Chargé de Cours	Chef DAF / FS
17	DEMMANO Gustave	Chargé de Cours	En poste
18	DJOKAM TAMO Rosine	Chargé de Cours	En poste
19	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Chargé de Cours	En poste
20	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargé de Cours	En poste
21	EFFA NNOMO Pierre	Chargé de Cours	En poste
22	EVEHE BEBANDOUE Marie-Solange	Chargé de Cours	En poste
23	EWANE Cécile Anne	Chargé de Cours	En poste
24	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
25	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargé de Cours	En poste
26	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Chargé de Cours	<i>CE SEP MINESUP</i>
27	NJAYOU Frédéric Nico	Chargé de Cours	En poste
28	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
29	SHANG Judith DZELAMBONG	Chargé de Cours	En poste
30	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Chargé de Cours	En poste
31	BEBEE Fadimatou	Assistante	En poste
32	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Assistante	En poste
33	DAKOLE DABOY Charles	Assistant	En poste
34	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Assistant	En poste

35	FONKOUA Martin	Assistant	En poste
36	LUNGA Paul KEILAH	Assistant	En poste
37	MANANGA Marlyse Joséphine	Assistante	En poste
38	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistant	En poste
39	PACHANGOU NSANGOU Sylvain	Assistant	En poste
40	TIENTCHEU DJOKAM Leopold	Assistant	En poste

2- DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (44)			
1	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
2	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
3	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
4	KAMTCHOING Pierre	Professeur	En poste
5	MIMPFUNDI REMY	Professeur	En poste
6	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
7	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
8	NOLA Moïse	Professeur	En poste
9	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
10	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Coord. Progr. MINSANTE</i>
11	AJEAGAH Gidéon AGHAINDUM	Maître de Conférences	En poste
12	DJIETO LORDON Champlain	Maître de Conférences	En poste
13	DZEUFIET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
14	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Maître de Conférences	<i>MINSANTE</i>
15	FOTO MENBOHAN Samuel	Maître de Conférences	En poste
16	KAMGANG René	Maître de Conférences	<i>C.S. MINRESI</i>
17	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
18	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
19	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Maître de Conférences	En poste
20	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
21	ALENE Désirée Chantal	Chargé de Cours	En poste
22	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
23	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Chargé de Cours	En poste
24	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
25	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
26	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
27	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
28	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Chargé de Cours	En poste
29	NJATSA Hermine épouse MEGAPTCHE	Chargé de Cours	En Poste
30	TOMBI Jeannette	Chargé de Cours	En poste
31	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
32	BILANDA Danielle Claude	Chargé de Cours	En poste
33	DJIOGUE Séfirin	Chargé de Cours	En poste
34	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargé de Cours	En poste
35	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargé de Cours	En poste
36	NJUA Clarisse Yafi	Chargé de Cours	En poste
37	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
38	YEDE	Chargé de Cours	En poste
39	DONFACK Mireille	Assistante	En poste
40	ETEME ENAMA Serge	Assistant	En poste
41	KANDEDA KAVAYE Antoine	Assistant	En poste
42	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste

43	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Assistant	En poste
44	NOAH EWOTI Olive Vivien	Assistant	En poste
3- DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (26)			
1	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
2	AMBANG Zachée	Professeur	En poste
3	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
4	BELL Joseph Martin	Maître de Conférences	En poste
5	DJOCGOUE Pierre François	Maître de Conférences	En poste
6	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
7	MBOLO Marie	Maître de Conférences	En poste
8	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
9	ZAPFACK Louis	Maître de Conférences	En poste
10	ANGONI Hyacinthe	Chargé de Cours	En poste
11	BIYE Elvire Hortense	Chargé de Cours	En poste
12	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
13	MALLA Armand William	Chargé de Cours	En poste
14	MBARGA BINDZI Marie Alain	Chargé de Cours	<i>CEA MINESUP</i>
15	NGALLE Hermine BILLE	Chargé de Cours	En poste
16	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Chargé de Cours	En poste
17	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Chargé de Cours	En poste
18	NGOOU Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
19	NSOM ZAMO Annie Claude épouse PIAL	Chargée de Cours	<i>Expert national /UNESCO</i>
20	TONFACK Libert Brice	Chargé de Cours	En poste
21	TSOATA Esaïe	Chargé de Cours	En poste
22	DJEUANI Astride Carole	Assistante	En poste
23	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Assistante	En poste
24	NGOMANDJE Christelle	Assistante	En poste
25	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Assistante	En poste
26	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Assistante	En poste

4- DEPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (33)			
1	KETCHA MBADCAM Joseph	Professeur	Chef de Département
2	GHOOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Directeur Cabinet PM</i>
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Directeur Mipromalo</i>
4	LAMINSI Samuel	Professeur	En poste
5	NANSEU Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>ISI MINRESI</i>
7	NENWA Justin	Professeur	En poste
8	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS Univ. Dschang</i>
9	NJOPWOOU Daniel	Professeur	Vice-Doyen / DPSAA
10	AGWARA ONDOH Moïse	Maître de Conférences	<i>Insp. Génér. MINPMEA</i>
11	AVOM Jérôme	Maître de Conférences	<i>Directeur à IAI Gabon</i>
12	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargé Mission P.R.</i>
13	DJOUFAC WOUFMO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
14	ELIMBI Antoine	Maître de Conférences	En poste
15	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
16	NDIKONTAR Maurice KOR	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
17	NGOMO Horace MANGA	Maître de Conférences	<i>S.G. MINESUP</i>
18	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste

19	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
20	BAIZOUMI ZOUA	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINTOUR</i>
21	EMADACK Alphonse	Chargé de Cours	En poste
22	GWET Simon-Pierre	Chargé de Cours	En poste
23	KAMGANG YOUBI Georges	Chargé de Cours	En poste
24	KEUMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Chargé de Cours	En poste
25	NDI NSAMI Julius	Chargé de Cours	En poste
26	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Chargé de Cours	En poste
27	NJOYA Dayirou	Chargé de Cours	En poste
28	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargé de Cours	En poste
29	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargé de Cours	En poste
30	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
31	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Assistant	En poste
32	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Assistant	En poste
5- DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (34)			
1	NKENGFAK Augustin Ephraïm	Professeur	Chef de Département
2	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen / DSSE
3	GHOLOMU TIH Robert Ralph	Professeur	En poste
4	MBAFOR Joseph	Professeur	En poste
5	NGADJUI TCHALEU B.	Professeur	<i>Chef de Dépt FMBS</i>
6	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	En poste
7	NYASSE Barthélemy	Professeur	<i>Chef Cellule MINESUP</i>
8	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Chef Cellule MINESUP</i>
9	WANDJI Jean	Professeur	En poste
10	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>CS Rectorat/UJI</i>
11	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen Univ. Buea</i>
12	KAPNANG Henriette	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
17	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Conseiller Tech. UYII</i>
18	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
19	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
20	AMBASSA Pantaléon	Chargé de Cours	En poste
21	EYONG Kenneth OBEN	Chargé de Cours	En poste
22	FOTSO WABO Ghislain	Chargé de Cours	En poste
23	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
24	KEUMOGNE Marguerite	Chargé de Cours	En poste
25	MKOUNGA Pierre	Chargé de Cours	En poste
26	NGO MBING Joséphine	Chargé de Cours	En poste
27	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Chargé de Cours	En poste
28	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Chargé de Cours	En poste
29	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargé de Cours	En poste
30	TABOPDA KUATE Turibio	Chargé de Cours	En poste
31	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
32	ZONDENDEGOUNBA Ernestine	Chargé de Cours	En poste
33	NGNINTEDO Dominique	Assistant	En poste
34	NGOMO Orléans	Assistant	En poste

6- DEPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (25)			
1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	Chef de Département
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>IA4 MINESUP/Chef Dpt ENS</i>
3	TCHUENTE Maurice	Professeur	<i>PCA UB</i>
4	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
5	CHEDOM FOTSO Donatien	Chargé de Cours	En poste
6	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
7	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
8	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
9	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
10	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste
11	ABESSOLO ALO'O Gislain	Assistant	En poste
12	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
13	DJOUWE MEFFEJA Merline Flore	Assistante	En poste
14	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
15	EBELE Serge	Assistant	En poste
16	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
17	KAMDEM KENGNE Christiane	Assistante	En poste
18	KAMGUEU Patrick Olivier	Assistant	En poste
19	KENFACK DONGMO Clauvice V.	Assistant	En poste
20	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Assistant	En poste
21	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
22	MONTHÉ DJIADEU Valéry M.	Assistant	En poste
23	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
24	TAPAMO Hyppolite	Assistant	En poste
7- DEPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (35)			
1	WAMON François	Maître de Conférences	Chef de Département
2	BEKOLLE David	Professeur	<i>Vice-Recteur UN</i>
3	BITJONG NDOMBOL	Professeur	<i>DAAC UYI</i>
4	DOSSA COSSY Marcel	Professeur	En poste
5	NGUETSENG Gabriel	Professeur	<i>Chef du CUTI UYI</i>
6	NOUTCHEGUEME Norbert	Professeur	En poste
7	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	En poste
8	EMVUDU WONO Yves S.	Maître de Conférences	<i>Chef Cellule MINESUP</i>
9	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
10	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
11	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	En poste
12	TONGA Marcel	Maître de Conférences	En poste
13	AGHOKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	En poste
14	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
15	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
16	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
17	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
18	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
19	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
20	MBEHOU Mohamed	Chargé de Cours	En poste
21	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste
22	MBIANDA Gilbert	Chargé de Cours	En poste
23	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
24	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste

25	NGUIMTSA Charles	Chargé de Cours	En poste
26	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
27	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
28	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
29	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
30	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargé de Cours	En poste
31	DJIADEU NGAHA Michel	Assistant	En poste
32	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
33	NIMPA PEFOUNKEU Romain	Assistant	En poste
34	TANG AHANDA Barnabé	Assistant	<i>Chef Service MINPLAMAT</i>
35	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Assistant	En poste
8- DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MB) (13)			
1	ETOA François Xavier	Professeur	Chef de Département <i>Recteur Université de Douala</i>
2	ESSIA NGANG Jean Justin	Maître de Conférences	En poste
3	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
4	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
5	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
6	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
7	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
8	ENO Anna Arey	Chargé de Cours	En poste
9	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
10	RIWOM Sara Honorine	Chargé de Cours	En poste
11	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
12	NJIKI BIKOÏ Jacky	Assistant	En poste
13	TCHIKOUA Roger	Assistant	En poste
9- DEPARTEMENT DE PHYSIQUE (PH) (40)			
1	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	Chef de Département
2	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
3	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	En poste
4	NJOMO Donatien	Professeur	En poste
5	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
6	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
7	WOAFO Paul	Professeur	En poste
8	BEN- BOLIE Germain Hubert	Maître de Conférences	En poste
9	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	<i>Chef Service UYI</i>
10	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Maître de Conférences	En poste
11	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Maître de Conférences	<i>Chef Dépt. UN</i>
12	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
13	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
14	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Maître de Conférences	<i>Chef Div. MINRESI</i>
15	NOUAYOU Robert	Maître de Conférences	En poste
16	OUMAROU BOUBA	Maître de Conférences	En poste
17	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
18	TABOD Charles TABOD	Maître de Conférences	En poste
19	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste
20	BODO Bernard	Chargé de Cours	En poste
21	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
22	EYEBE FOU DA Jean sire	Chargé de Cours	En poste
23	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	En poste

24	HONA Jacques	Chargé de Cours	En poste
25	MBANE BIOUELE	Chargé de Cours	En poste
26	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
27	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
28	MBOUSSI NKOMIDIO Aïssatou	Chargé de Cours	En poste
29	NDOP Joseph	Chargé de Cours	En poste
30	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	En poste
31	SEIDOU	Chargé de Cours	En poste
32	SIMO Elie	Chargé de Cours	En poste
33	TABI Conrad Bertrand	Chargé de Cours	En poste
34	TCHOFFO Fidèle	Chargé de Cours	En poste
35	VONDOU Derbetini Appolinaire	Chargé de Cours	En poste
36	WAKATA née BEYA Annie	Chargé de Cours	<i>Chef Serv. MINESUP</i>
37	WOULACHE Rosalie Laure	Chargé de Cours	En poste
38	ABDOURAHIMI	Assistant	En poste
39	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
40	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Assistante	En poste
10- DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (42)			
1	BILONG PAUL	Professeur	Chef de Département/ Doyen FS UYI
2	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FS / UDs</i>
3	NDJIGUI Paul-Désiré	Professeur	En poste
4	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
5	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Maître de Conférences	En poste
6	KAMGANG Pierre	Maître de Conférences	En poste
7	MEDJO EKO Robert	Maître de Conférences	<i>Chef Div. Rectorat UYI</i>
8	MVONDO ONDOA Joseph	Maître de Conférences	<i>S / Directeur MINVILLE</i>
9	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Maître de Conférences	En poste
10	NGOS III Simon	Maître de Conférences	En poste
11	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
12	NKOUMBOU Charles	Maître de Conférences	En poste
13	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
14	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. MINEF</i>
15	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Chargé de Cours	<i>Chef div. DAASR / FS</i>
16	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
17	BISSO Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Dir. P. Barrage Memvele</i>
18	EKOMANE Emile	Chargé de Cours	En poste
19	ESSONO Jean	Chargé de Cours	<i>C.E.A. MINES</i>
20	GANNO Sylvestre	Chargé de Cours	En poste
21	GHOGOMU Richard TANWI	Chargé de Cours	En poste
22	LAMILLEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
23	MBIDA YEM	Chargé de Cours	<i>CS/LABOGENIE</i>
24	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>Dir. de Project "Hydro-MIN"</i>
25	MOUAFO Lucas	Chargé de Cours	En poste
26	MOUNDI Amidou	Chargé de Cours	<i>Chef Div. MINIMDT</i>
27	NJOM Bernard de Lattre	Chargé de Cours	En poste
28	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargé de Cours	En poste
29	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargé de Cours	En poste
30	NGUETCHOUA Gabriel	Chargé de Cours	En poste
31	NYECK Bruno	Chargé de Cours	En poste
32	ONANA Vincent	Chargé de Cours	En poste

33	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Chargée de cours	<i>CT / MINRESI</i>
34	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Chargé de Cours	En poste
35	ZO'O ZAME Philémon	Chargé de Cours	<i>S.G. MINTP</i>
36	ANABA ONANA Achille Basile	Assistant	En poste
37	FUH Calistus Gentry	Assistant	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
38	METANG Victor	Assistant	En poste
39	NOMO NEGUE Emmanuel	Assistant	En poste
40	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Assistant	En poste
41	TEHNA Nathanaël	Assistant	En poste
42	TEMGA Jean Pierre	Assistant	En poste

Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
B.C.	5 (1)	8 (3)	17 (12)	10 (3)	40 (19)
B.P.A.	10 (0)	10 (2)	18 (7)	6 (5)	44 (14)
B.P.V.	3 (0)	6 (0)	12 (4)	5 (6)	25 (9)
C.I.	9 (1)	9 (1)	13 (2)	2 (0)	33 (6)
C.O.	9 (0)	10 (3)	13 (4)	2 (0)	34 (7)
I.N.	3 (1)	2 (0)	6 (0)	14 (3)	25 (4)
M.A.	5 (0)	7 (0)	18 (1)	5 (0)	35 (1)
M.B.	1 (0)	4 (1)	6 (2)	2 (0)	13 (3)
P.H.	7 (0)	11 (1)	19 (3)	3 (1)	40 (5)
S.T.	4 (0)	10 (1)	21 (4)	7 (0)	42 (5)
Total	56 (3)	77 (12)	143 (37)	56 (17)	331 (63)

Soit un total de 331 (63) dont :

- Professeurs 56 (3)
- Maîtres de Conférences 77 (12)
- Chargés de Cours 143 (37)
- Assistants 69 (21)

() = Nombre de Femmes

Dédicace

A Dieu Tout Puissant qui, chaque jour, veille sur moi et me donne la force et la santé dont j'ai besoin,

A mon **Père**, pour tous les sacrifices consentis pour mon éducation,

A la mémoire de ma Mère **Thérèse** et de mon petit frère **Frédéric** que Dieu repose leurs âmes en paix,

A toute ma **famille** que Dieu protège :

En témoignage de ma profonde affection. Qu'ils sachent que ce travail est en partie le fruit de leur soutien; je leur suis très reconnaissant.

A tous mes **amis (es)**.

A tous les **miens**.

*« Nous buvons 90% de nos maladies. Une catastrophe...
Désormais, c'est l'eau elle-même qu'il va falloir laver »*

Louis Pasteur

Remerciements

Je tiens à remercier le Professeur **NOLA MOÏSE** qui a dirigé cette recherche. Merci pour ses compétences, sa disponibilité, son soutien pour l'aboutissement des travaux de cette thèse. Qu'il soit assuré de mon grand attachement et veuille bien trouver dans ce document, le témoignage de ma profonde gratitude.

Je tiens aussi à remercier les enseignants du Département de Biologie et Physiologie Animales, dont la rigueur scientifique m'a guidé dans ma formation. Il s'agit des professeurs **BILONG BILONG Charles Félix**, **FOMENA Abraham**, **ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert**, **FOTO MENBOHAM Samuel** et **DJIETO LORDON Champlain**.

Je voudrais exprimer par anticipation, mes remerciements au Président du jury et aux éminents membres du jury qui me feront l'honneur de juger ce travail.

Je remercie le Laboratoire « Microorganismes: Génome & Environnement » de l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand II, le Laboratoire de Physique Corpusculaire d'Auvergne (France) et le Laboratoire de phytobiochimie et des plantes médicinales, contacts sans lesquels ce travail n'aurait jamais été réalisé sous cette forme.

Je me dois d'adresser mes remerciements à toute l'équipe d'Hydrobiologie et Environnement pour avoir toujours manifesté un grand intérêt à l'évolution de mon travail, Je pense notamment aux **Docteurs NOAH EWOTI Olive Vivien et NOUGANG Mireille Ebiane** qui m'ont reçu au sein de l'Unité de recherche.

A tous les membres de la **promotion H₂OOr**, je leur dis merci pour les nombreux encouragements et soutiens. Pour ceux qui sont encore en train de manipuler ou de rédiger, courage à vous, le bout du tunnel est tout proche.

Mes sentiments de reconnaissance vont à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Ma gratitude va aussi à l'endroit de mes oncles, tantes, cousins, cousines et amis, je leur suis extrêmement reconnaissant pour les nombreux soutiens et encouragements reçus tout au long de la réalisation de cette thèse. Que Le Tout Puissant les bénisse.

Sommaire

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DES SCIENCES	i
Dédicace	ix
Remerciements	x
Sommaire	xi
LISTE DES ABREVIATIONS	xv
LISTE DES FIGURES	xvi
LISTE DES TABLEAUX	xix
LISTE DES ANNEXES	xxii
RESUME	xxiii
ABSTRACT	xxv
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE	6
I.1- Généralités sur les écosystèmes aquatiques	7
I.2- Problématique de l'accès à l'eau potable	7
I.3- Quelques bactéries d'importance sanitaire et hygiénique couramment retrouvées dans l'eau	8
I.3.1- Coliformes totaux et fécaux	8
I.3.2- Streptocoques fécaux.....	8
I.3.3- <i>Salmonella typhi</i>	8
I.3.4- <i>Vibrio cholerae</i>	9
I.4- Physiopathologie due à quelques espèces bactériennes d'importance sanitaire et hygiénique.....	9
I.4.1- Physiopathologie due à <i>Escherichia coli</i>	9
I.4.2- Physiopathologie due à <i>Salmonella typhi</i>	10
I.4.3- Physiopathologie due à <i>Vibrio cholerae</i>	10
I.4.4- Physiopathologie due à <i>Enterococcus faecalis</i>	10
I.5- Méthodes de remédiation à la contamination microbiologique des eaux	10
I.5.1- Méthodes classiques de désinfection des eaux à domicile	10

I.5.2- Mode d'action des désinfectants	11
I.5.3- Désinfection de l'eau par les extraits de plante	12
I.6- Généralités sur les plantes du genre <i>Eucalyptus</i>	13
I.6.1- Classification taxonomique	13
I.6.2- Description botanique du genre <i>Eucalyptus</i>	14
I.6.3- Quelques composés phénoliques retrouvés dans la plante du genre <i>Eucalyptus</i>	15
I.6.4- Propriétés pharmacologiques des <i>Eucalyptus</i>	21
I.7- Généralités sur la paroi cellulaire et croissance des bactéries	21
I.7.1- Généralités sur la paroi cellulaire	21
I.7.2- Croissance bactérienne	24
I.8- Adsorption bactérienne aux surfaces et Biofilm	27
I.8.1- Définition et propriétés de l'adsorption bactérienne	27
I.8.2- Définition et description des biofilms	28
I.8.3- Facteur influençant l'adhésion des bactéries	29
I.9- Adhésion et résistance aux agents antimicrobiens	32
I.9.1- Etat physiologique des cellules adhérentes	32
I.9.2- Localisation au sein du biofilm	32
I.10- Destruction du biofilm dans l'environnement aquatique	33
I.11- Méthodes d'analyse bactériologique de l'eau	33
I.11.1- Méthodes classiques de détection et de dénombrement des germes	34
I.11.2- Détection et dénombrement des germes viables	35
I.11.3- Méthodes rapides de dénombrement des germes	35
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	37
II.1- Description de la région de récolte du matériel biologique	38
II.1.1- Relief	38
II.1.2- Climat et réseau hydrographique	38
II.1.3- Végétation	39
II.1.4- Sol : pédologie, pétrographie, pétrologie, minéralogie	39

II.2- Matériel	39
II.2.1- Matériel végétal utilisé et période de collecte.....	39
II.2.2- Bactéries utilisées.....	40
II.2.3- Choix du support solide pour les tests d'adsorption cellulaire	41
II.3- Méthodes.....	42
II.3.1- Préparation des extraits, solutions d'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i> et screening phytochimique.....	42
II.3.2- Isolement, caractérisation culturale et biochimique des microorganismes utilisés	44
II.3.3- Activité des extraits d' <i>Eucalyptus microcorys</i> sur les microorganismes.....	45
II.4- Analyse des données	55
II.4.1-Variations temporelles des densités cellulaires et pourcentage d'inhibition	55
II.4.2- Détermination de la vitesse d'inhibition cellulaire	56
II.4.3- Analyses multivariées et hiérarchisation des facteurs prépondérants intervenant dans les processus étudiés	56
II.4.4- Relations entre variables analysées.....	57
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....	58
III.1- Présentation et analyse des résultats.....	59
III.1.1- Screening phytochimique.....	59
III.1.2- Evolution temporelle des abondances des cellules planctoniques en présence d'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i>	59
III.1.3-Evaluation du pourcentage d'inhibition des cellules planctoniques en présence d'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i>	74
III.1.4- Evaluation des vitesses d'inhibition des cellules planctoniques en présence d'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i> sous diverses températures d'incubation et intensités lumineuses.....	75
III.1.5- Effet de l'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i> sur l'adhésion bactérienne aux différentes phases de croissance cellulaire.....	81
III.1.6- Hiérarchisation des facteurs considérés dans les processus étudiés.....	95
III.1.7- Corrélation de Spearman entre les variables considérées.....	104
III.1.8- Comparaison entre les abondances moyennes des bactéries analysées en présence d'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i> à chaque condition expérimentale.....	107

III.2- DISCUSSION.....	112
III.2.1- Screening phytochimique.....	112
III.2.2- Effet de l'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i> sur les cellules planctoniques.....	112
III.2.3- Importance de la température d'incubation dans l'inhibition des bactéries planctoniques en présence d'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i>	117
III.2.4- Importance de l'intensité lumineuse sur l'inhibition des bactéries planctoniques en présence d'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i>	119
III.2.5- Hiérarchisation des degrés d'implication des facteurs considérés dans l'inhibition des bactéries planctoniques en présence d'extrait d' <i>Eucalyptus Microcorys</i>	122
III.2.6- Effet de l'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i> sur les cellules <i>Escherichia coli</i> entéropathogène adhérees.....	123
III.2.7- Hiérarchisation des degrés d'implication des facteurs considérés sur l'adhésion et/ou détachement des cellules en présence d'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i>	126
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	128
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	131
ANNEXES.....	154
LISTE DES PUBLICATIONS.....	167

LISTE DES ABREVIATIONS

AFD : Analyse factorielle Discriminante
APHA: *American Public Health Association*
CAMWATER: *Cameroon Water Utilities Corporation*
CNR : Centre National de Référence
CPC : Centre Pasteur du Cameroun
DPAC : Durée du Processus d'Adhésion Cellulaire
EPEC : *Escherichia coli* entéropathogène
ETEC : *Escherichia coli* entérotoxinogène
GEI : Gastro-Enterites Infantiles
GSE : Groupe Scientifique de l'Eau
HNC : Herbar National du Cameroun
MANOVA : *Multivariate analysis of variance*
MATH : *Microbial Adhesion To Hydrocarbons*
NPP : Nombre le Plus Probable
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PD : Phase de Déclin
PE : Phase exponentielle
PEHD : Polyéthylène Haute Densité
PI : Pourcentage d'Inhibition
PL : Phase de Latence
PS : Phase Stationnaire
PVC : PolyVinylChloride
SIDA: Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
SODIS : Solar Water Disinfection
SPSS : Statistical Package for Social Sciences
UFC : Unité Formant Colonie
UV : Ultraviolet

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Branche, fleurs et fruits d' <i>Eucalyptus microcorys</i>	14
Figure 2 : Structure de tanins hydrolysables et condensés.....	16
Figure 3 : Terpènes.....	16
Figure 4 : Structure générale de quelques alcaloïdes	17
Figure 5 : Squelette de base des flavonoïdes	18
Figure 6 : Squelettes et configurations des génines stéroïdiques des saponosides et exemples de génines triterpéniques.....	19
Figure 7 : Structure chimique du 1,8-cineole ou eucalyptol.	20
Figure 8 : Représentation schématique d'une paroi des bactéries gram ⁻ et gram ⁺	23
Figure 9 : Courbe de croissance bactérienne.....	25
Figure 10 : Différentes portions du spectre électromagnétique	27
Figure 11 : Grandes étapes de la formation d'un biofilm.....	28
Figure 12 : Angle de contact d'une goutte déposée sur une surface en fonction de leurs affinités ..	31
Figure 13 : Schématisation de la résistance aux biocides des variantes phénotypiques au sein des biofilms.....	33
Figure 14 : <i>Eucalyptus microcorys</i> : Feuille fraîches et Feuilles sèches	40
Figure 15 : Représentation graphique : photographie et microscopie électronique à balayage du polyéthylène.	41
Figure 16 : Solution d'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i>	42
Figure 17 : Solution d'extraits d' <i>Eucalyptus microcorys</i> à différentes concentrations	46
Figure 18 : Dispositif d'exposition sous différentes conditions lumineuses.....	47
Figure 19 : Appareil de mesure des angles de contact : Goniomètre de marque « Krüss », modèle « Easy Drop ».....	48
Figure 20 : Image de la goutte d'eau distillée sur le fragment de polyéthylène	49
Figure 21 : Protocole expérimental de détermination de la durée des phases de croissance cellulaire.....	50
Figure 22 : Photographie du dispositif expérimental	52
Figure 23 : Etapes de la préparation de la suspension à partir d'une culture bactérienne.....	53

Figure 24 : Photographie de l'extrait <i>Eucalyptus microcorys</i> à diverses concentrations dépourvu de substrats et contenant les substrats.	54
Figure 25 : Variation temporelle des abondances des cellules <i>Escherichia coli</i> entéropathogène en présence des extraits d' <i>Eucalyptus microcorys</i> à différentes températures d'incubation.....	61
Figure 26 : Variation temporelle des abondances des cellules <i>Escherichia coli</i> commensale en présence des extraits d' <i>Eucalyptus microcorys</i> à différentes températures d'incubation.....	63
Figure 27 : Variation temporelle des abondances des cellules <i>Salmonella typhi</i> en présence des extraits d' <i>Eucalyptus microcorys</i> à différentes conditions de température d'incubation.	65
Figure 28 : Variation temporelle des abondances des cellules <i>Vibrio cholerae</i> en présence des extraits d' <i>Eucalyptus microcorys</i> à différentes températures d'incubation.	67
Figure 29 : Variation temporelle des abondances des cellules <i>Enterococcus faecalis</i> en présence des extraits d' <i>Eucalyptus microcorys</i> à différentes températures d'incubation.....	69
Figure 30 : Variation temporelle des abondances cellulaires d' <i>Escherichia coli</i> entéropathogène en présence d'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i> , sous différentes intensités lumineuses.	71
Figure 31 : Variation temporelle des abondances cellulaires d' <i>Enterococcus faecalis</i> en présence d'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i> sous différentes intensités lumineuses.....	73
Figure 32 : Evolution de la vitesse d'inhibition cellulaire d' <i>E. coli</i> entéropathogène et d' <i>E. coli</i> commensale en fonction des concentrations de l'extrait aqueux d' <i>Eucalyptus microcorys</i> à différentes températures d'incubation.	78
Figure 33 : Variation des vitesses d'inhibition des cellules <i>Salmonella typhi</i> , de <i>Vibrio cholerae</i> et d' <i>Enterococcus faecalis</i> en fonction des concentrations d'extrait aqueux d' <i>Eucalyptus microcorys</i> à différentes températures d'incubation.	80
Figure 34 : Variation des vitesses d'inhibition des cellules <i>Escherichia coli</i> entéropathogène et d' <i>Enterococcus faecalis</i> en fonction des concentrations de l'extrait aqueux d' <i>Eucalyptus Microcorys</i> à différentes intensités lumineuses.	82
Figure 35 : Variation temporelle de la température des solutions durant l'expérience.....	83
Figure 36 : Courbe de croissance cellulaire <i>E. coli</i> entéropathogène.....	84
Figure 37 : Propriétés physico-chimiques de surface des cellules adhérees d' <i>E. coli</i> entéropathogène	84
Figure 38 : Nombre de cellules d' <i>E. coli</i> entéropathogène adhérees lors du processus d'adhésion cellulaire dans la solution de NaCl	85

Figure 39 : Variation temporelle après les test d'adsorption, des abondances des cellules d' *E. coli* entéropathogène restées adhérees au polyéthylène après un séjour dans les solutions d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* de différentes concentrations.....87

Figure 40 : Variation temporelle après les test d'adsorption, des abondances des cellules d' *E. coli* entéropathogène détachées du polyéthylène après un séjour dans les solutions d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* de différentes concentrations.....88

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Sites d'action des désinfectants	12
Tableau II : Composition chimique des parois des bactéries Gram ⁺ et Gram ⁻	23
Tableau III : Facteurs influençant l'adhésion initiale d'un microorganisme sur une surface solide.....	30
Tableau IV : Caractéristique et origine des espèces bactériennes	41
Tableau V : Screening des constituants chimiques des feuilles d' <i>Eucalyptus microcorys</i>	59
Tableau VI : Pourcentage d'inhibition (PI) d' <i>Escherichia coli</i> entéropathogène, commensale, <i>Salmonella typhi</i> et <i>Vibrio cholerae</i> après contact avec l'extrait de plante, à chaque température d'incubation et après chaque période incubation.....	75
Tableau VII : Pourcentage d'inhibition (PI) d' <i>Enterococcus</i> après contact avec l'extrait de plante, à chaque température d'incubation et après chaque période incubation.....	76
Tableau VIII : Pourcentage d'inhibition (PI) d' <i>Escherichia coli</i> entéropathogène et d' <i>Enterococcus faecalis</i> , après contact avec l'extrait de plante, à chaque condition de luminosité et après chaque période incubation.....	77
Tableau IX : Vitesse d'adhésion cellulaire (et coefficients de régression) des cellules d' <i>E. coli</i> entéropathogène issues de différentes phases de croissance cellulaire.....	86
Tableau X : Pourcentage des cellules détachées (%D) et celles restées adhérentes (%A) d' <i>Escherichia coli</i> entéropathogène.....	90
Tableau XI : Pourcentage d'inhibition d' <i>Escherichia coli</i> entéropathogène, après 1, 2 ou 3 heures d'incubation dans la solution d'extrait de plante de concentration 1, 1,5 et 2 %	94
Tableau XII : Pourcentages des sommes des carrés des facteurs considérés lors des expériences sur les cellules planctoniques sous diverses températures d'incubation.....	96
Tableau XIII : Pourcentages des sommes des carrés des facteurs considérés lors des expériences sur les cellules planctoniques en présence de la lumière.....	97
Tableau XIV : Pourcentages des sommes des carrés des facteurs considérés lors des expériences avec les cellules <i>E. coli</i> entéropathogène détachées et avec les cellules <i>E. coli</i> entéropathogène restées adhérentes.....	98
Tableau XV : Valeur du coefficient Lambda de Wilks, du ratio de Fisher et du seuil de significativité obtenue pour chaque souche bactérienne et pour chaque concentration d'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i> utilisée.....	100

Tableau XVI : Valeur du coefficient Lambda de Wilks, du ratio de Fisher et du seuil de significativité obtenue pour chaque souche bactérienne et pour chaque température d'incubation en présence d'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i>	100
Tableau XVII : Valeur du coefficient Lambda de Wilks, du ratio de Fisher et du seuil de significativité obtenue pour <i>E. coli</i> entéropathogène et <i>Enterococcus faecalis</i> à chaque intensité lumineuse et chaque concentration d'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i>	102
Tableau XVIII : Valeur du coefficient Lambda de Wilks, du ratio de Fisher et du seuil de significativité obtenue en présence d'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i> , pour chaque période d'adsorption, pour les cellules d' <i>E. coli</i> entéropathogène détachées et celles restées adhérees lorsque ces cellules sont issues de chaque phase de croissance.....	103
Tableau XIX : Coefficients de corrélation de Spearman entre les abondances bactériennes et la concentration de l'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i> à chaque température d'incubation, et à chaque durée d'incubation.....	104
Tableau XX : Corrélation de Spearman entre les abondances bactériennes et la température d'incubation à chaque concentration de l'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i>	105
Tableau XXI : Corrélation Spearman entre les abondances bactériennes testées et la durée d'incubation à chaque concentration d'extrait pour l'ensemble des conditions d'éclairement.....	106
Tableau XXII : Corrélation Spearman entre les abondances bactériennes testées et la concentration d'extrait à chaque durée d'incubation.....	106
Tableau XXIII : Corrélation Spearman entre les abondances bactériennes testées et la concentration d'extrait à condition d'éclairement pour l'ensemble des durées d'incubation.....	107
Tableau XXIV : Valeurs des coefficients de significativité résultant de la comparaison entre les abondances moyennes des bactéries planctoniques cultivables enregistrées dans différentes concentrations d'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i> à chaque température d'incubation.....	108
Tableau XXV : Valeurs des coefficients de significativité résultant de la comparaison entre les abondances moyennes des bactéries planctoniques cultivables enregistrées dans différentes température d'incubation pour chaque concentrations d'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i>	109
Tableau XXVI : Valeurs des coefficients de significativité résultant de la comparaison entre les abondances moyennes des bactéries planctoniques cultivables enregistrées dans différentes concentrations d'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i> après chaque période d'incubation.....	109
Tableau XXVII : Valeurs des coefficients de significativité résultant de la comparaison entre les abondances moyennes des bactéries planctoniques cultivables enregistrées dans	

différentes concentrations d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* sous chaque intensité d'éclairage.....110

Tableau XXVIII: Valeurs des coefficients de significativité résultant de la comparaison entre les abondances moyennes des bactéries planctoniques cultivables enregistrées sous différentes intensité d'éclairage pour chaque concentration d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*..... 111

Tableau XXIX: Valeurs des coefficients de significativité résultant de la comparaison entre les phases de croissance, des abondances moyennes de *E. coli* entéropathogène enregistrées, des cellules restées adhérentes d'une part, et celles détachées d'autre part, après séjour dans chaque concentration d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*.....111

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Valeurs des vitesses d'inhibition cellulaire par heure (et leurs coefficients de régression) de quelques bactéries pathogènes à chaque température d'incubation et à chaque concentration d'extrait.....	155
Annexe 2 : Valeurs des vitesses d'inhibition cellulaire par heure (et leurs coefficients de régression) de quelques bactéries commensales à chaque température d'incubation et à chaque concentration d'extrait (h^{-1}).....	156
Annexe 3 : Valeurs des vitesses d'inhibition cellulaire par heure (et leurs coefficients de régression) de quelques bactéries pathogènes à chaque condition de luminosité et à chaque concentration d'extrait (h^{-1}).....	157
Annexe 4 : Analyse des données : Microorganismes planctoniques sous diverses températures d'incubation.....	158
Annexe 5 : Analyse des données: Microorganismes planctoniques sous diverses Intensités lumineuses.....	159
Annexe 6 : Analyse des données: <i>Escherichia coli</i> adhéree et détachée.....	160
Annexe 7 : Analyse factorielle Discriminante (AFD) montrant l'influence des différentes gammes de concentration d' <i>Eucalyptus microcorys</i> et des températures expérimentales sur les abondances cellulaires d' <i>E. coli</i> entéropathogène (A) d' <i>E. coli</i> commensale (B).....	161
Annexe 8 : Analyse factorielle Discriminante (AFD) montrant l'influence des différentes gammes de concentration d' <i>Eucalyptus microcorys</i> et des températures expérimentales sur les abondances cellulaires de <i>Salmonella typhi</i> (A) de <i>Vibrio cholerae</i> (B).....	162
Annexe 9 : Analyse factorielle Discriminante (AFD) montrant l'influence des différentes gammes de concentration d'extrait (A) et des températures expérimentales (B) sur les abondances cellulaires d' <i>Enterococcus faecalis</i>	163
Annexe 10 : Analyse factorielle Discriminante (AFD) montrant l'influence des différentes gammes de concentration d'extrait et d'intensité lumineuse sur les abondances cellulaires d' <i>E. coli</i> entéropathogène (A) et d' <i>Enterococcus faecalis</i> (B) des durées d'incubation.....	164
Annexe 11 : Représentation de la dispersion des abondances cellulaires d' <i>Escherichia coli</i> entéropathogène détachées après influence des différentes gammes de concentration d' <i>Eucalyptus microcorys</i>	165
Annexe 12 : Représentation de la dispersion des abondances cellulaires d' <i>Escherichia coli</i> entéropathogène restées adhérees après influence des différentes gammes de concentration d' <i>Eucalyptus microcorys</i>	166

RESUME

La présence de bactéries pathogènes dans l'eau de consommation pose de sérieux problèmes sanitaires telles que les maladies hydriques comme les gastro-entérites, le choléra et la fièvre typhoïde. Ces dernières années, une attention particulière est axée sur la désinfection de l'eau par l'utilisation des extraits de plante. La présente étude vise à évaluer l'impact de l'extrait aqueux de la plante *Eucalyptus microcorys* sur la cultivabilité de quelques espèces bactériennes d'importance sanitaire.

Dans ce travail, la concentration de l'extrait d'*E. microcorys*, le temps de séjour des bactéries dans la solution d'extrait, la température des solutions d'extrait, l'intensité lumineuse, l'état physique (état planctonique et adhérent au support) et l'état métabolique de la cellule (stade de croissance de la cellule), sont des facteurs qui ont été considérés dans diverses expérimentations conduites en microcosme aquatique. Les bactéries utilisées sont *Escherichia coli* entéropathogène et commensale, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhi* et *Vibrio cholerae*. Dans la première série de tests, les cellules bactériennes planctoniques ont séjourné dans diverses concentrations de la solution aqueuse d'*E. microcorys* (0,05 % ; 0,1 % ; 0,5 % ; 1 % ; 1,5 % ; et 2 %) à des températures d'incubation qui ont varié entre 7 °C et 44 °C, des intensités lumineuses qui ont varié entre 0 et 3000 lux et à des périodes d'incubation qui ont oscillé entre 3 h et 24 h. Dans la deuxième série de tests, les cellules *E. coli* entéropathogène adhérentes, issues des différentes phases de croissance cellulaire, ont séjourné dans la solution aqueuse d'*E. microcorys* pour un temps de contact qui a varié entre 1 et 3 h.

Le criblage phytochimique a montré que les constituants majoritaires de l'extrait aqueux d'*Eucalyptus microcorys* sont les alcaloïdes, les anthraquinones, les flavonoïdes et les saponines. Les anthocyanines, les tannins galliques, les polyphénols et les triterpènes s'y trouvent en quantité infime. De ces expérimentations, on observe que les abondances des bactéries planctoniques subissent une variation temporelle dépendante de la concentration d'extrait et de la durée d'incubation. Les abondances cellulaires les moins élevées ont été notées dans la majorité des cas à la température d'incubation de 44 °C. La plus faible abondance des cellules *E. coli* entéropathogène a été de 6,91 unités Ln (UFC/100 ml), obtenue après 12 heures d'incubation dans la solution d'extrait de concentration 2 %. Celles des cellules *E. coli* commensale et *E. faecalis* ont été de 13,91 et 9,68 unités Ln (UFC/100 ml) respectivement, enregistrées à la température de 44 °C et à la concentration d'extrait de 2 %, après 24 heures et 6 heures d'incubation respectivement. Au cours de l'étude, les abondances cellulaires ont diminué avec l'augmentation de la température d'incubation, la durée d'incubation et la concentration de l'extrait, les cellules étant moins affectées en condition psychrophile. Les cellules planctoniques *E. coli* entéropathogène et commensale, *S.*

typhi, *V. cholerae* et *E. faecalis* ont présenté une résistance relativement élevée aux effets antibactériens des extraits d'*E. microcorys* en condition psychrophile. Les pourcentages d'inhibition atteignant 100 % ont été observés aux températures 37 °C et 44 °C. Une corrélation négative et significative ($P < 0,05$) a été notée d'une part entre la durée d'incubation et les abondances cellulaires, et d'autre part, entre les abondances cellulaires et la température d'incubation ou la concentration d'extrait. En absence de lumière (0 lux), les coefficients d'inhibition horaire pour *E. coli* entéropathogène et *E. faecalis* sont très faibles (0,102 et 0,211 UFC/h respectivement). Ces coefficients augmentent de façon significative ($P < 0,05$) en présence de la lumière (0,662 UFC/h à 3000 lux). La lumière joue ainsi un effet synergique inhibiteur sur les bactéries en présence de l'extrait d'*E. microcorys*. On note également que l'extrait d'*E. microcorys* entraîne un relargage des cellules initialement adhérees au fragment de polyéthylène. L'importance du détachement de cellules adhérees varie non seulement en fonction de la concentration de l'extrait, mais aussi en fonction du temps de séjour des cellules adhérees dans la solution d'extrait. Les pourcentages de détachement cellulaire ont parfois atteint les valeurs de 11,2; 68,8; 48,5 et 55,6 % lorsque ces cellules sont issues respectivement de la phase de latence, exponentielle, stationnaire et de déclin. Une hiérarchisation des différents facteurs pouvant influencer l'effet de l'extrait aqueux d'*E. microcorys* sur la croissance des cellules planctoniques a montré que la concentration de l'extrait est le paramètre le plus influençant, suivie de la température expérimentale, la durée d'incubation, et l'intensité lumineuse.

Les données obtenues de ce travail exploratoire permettent d'envisager l'utilisation des extraits d'*E. microcorys* comme méthode alternative dans la désinfection de l'eau.

Mots clés: Extrait d'*Eucalyptus microcorys*, eau, bactérie, cultivabilité, inhibition.

ABSTRACT

The presence of pathogenic bacteria in drinking water poses serious health problems because of the persistence of water-borne diseases such as gastroenteritises, cholera and typhoid fever. These recent years, a detailed attention has focused on the disinfection of water by the use of plant extracts. The present study is to evaluate the impact of the aqueous extract of *Eucalyptus microcorys* plant on the cultivability of some bacterial species of medical health importance.

In this study, The aqueous extract concentration of *E. microcorys*, contact time of bacteria in the extract solution, temperature of the extract solution, light intensity and the physical (planktonic and adhered state to the substrate) and metabolic (cellular growth phases) states of the bacteria cell, are the factors considered in various experimentation carried out in aquatic microcosm. The bacteria species used in this study were enteropathogenic and commensal *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhi* and *Vibrio cholerae*. In the first series of experimental tests, the planktonic bacterial cells remained in various concentrations (0.05 %, 0.1 %, 0.5 %, 1 %, 1.5 % and 2 %) of the aqueous solution of *E. microcorys* at incubation temperatures which varied between 7 and 44 °C, light intensities which fluctuated between 0 and 3000 lux; and incubation periods which ranged from 3 to 24 hours. For the second series of experimental tests, the adhered enteropathogenic *E. coli* cells, harvested from the different cellular growth phases, were incubated in the aqueous extract solution of *E. microcorys* for a contact time varying between 1 and 3 h.

Phytochemical screening showed that alkaloids, anthraquinones, flavonoïds and saponins are the major components of the aqueous extract of *E. microcorys*. Whereas anthocyanines, gallic tannins, polyphenols and triterpenes are found in negligible quantity. Results of these experiments show that abundances of planktonic cells undergo a temporal variation dependent on the extract concentration and the incubation period. In most cases, the lower cell abundances were registered at a 44 C temperature of incubation. The lowest abundance of the enteropathogenic *E. coli* cells is 6.91 napierian logarithmic units (CFU/100 ml) obtained after 12 hours of incubation in 2 % extract solution concentration. The cell abundance of commensal *E. coli* and *E. faecalis* were 13.91 and 9.68 napierian logarithmic units (CFU/100 ml) respectively, registered at a 44°C incubation's temperature, in 2% extract solution concentration, after 24 and 6 hours of incubation respectively. During the study, cells abundance has decreased with the increase of the incubation's temperature, duration of incubation and the extract concentration; Cells being less affected in psychrophilous condition. Planktonic cells of enteropathogenic and commensal *E. coli*, *S. typhi*, *V. cholerae* and *E. faecalis* appeared to be relatively highly resistant to the antibacterial effects of *E. microcorys* aqueous extracts in psychrophilous condition. Inhibition's percentage reaching 100 % were found at

37 °C and 44 °C incubation's temperature. A negative and significant correlation ($P < 0.05$) was noted on the one hand between the duration of incubation and cell abundance, and the second hand between cell abundance and temperature or the extract concentration. In the absence of light (0 lux), enteropathogenic *E. coli* and *E. faecalis* inhibition's coefficient per hour are very low (0.102 and 0.211 CFU/h respectively). These coefficient of inhibition increase significantly ($P < 0.05$) in the presence of light (0.662 CFU/h at 3000 lux). Thus, in addition to the effect of *E. microcorys* extract, the light plays a synergistic inhibitory effect on bacteria cells. It was observed that the *E. microcorys* extract results in a release of cells initially adhered to the polyethylene fragment. The importance of this detachment of cells varies not only according to the concentration of the extract, but also according to the incubation duration of the adhered cells into the extract solution. The percentage of cell detachment sometimes reached 11.2 %, 68.8 %, 48.5 % and 55.6 % when the cells are respectively derived from latency, exponential, stationary and decline growth phases. A hierarchical ranking of the various factors which could influence the effect of the aqueous extract of *E. microcorys* on the growth of planktonic cells showed that extract's concentration is the most influencing parameter, follows by experimental temperature, incubation duration and light intensity.

Data obtained from this exploratory research make it possible to consider the use of *E. microcorys* aqueous extract as an alternative method in water disinfection.

Keywords: *Eucalyptus microcorys* extract, water, bacteria, cultivability, inhibition.

INTRODUCTION

Les eaux douces les plus exploitées pour l'alimentation humaine, représentent environ 0,6 % de l'eau de la planète (Banton et Bangoy, 1997). Elles peuvent être superficielles ou souterraines. Les eaux de surface sont exposées à toute sorte de pollution et contiennent des matières en suspension, des microorganismes provenant du sol, des déchets domestiques et industriels. L'insuffisance quantitative de l'eau potable est un facteur de risque important pour la mortalité et la morbidité, notamment celles liées aux maladies diarrhéiques (OMS, 2009). Bien que le nombre de personnes ayant accès à l'eau de bonne qualité ait progressé dans le monde depuis 2000, la croissance démographique rapide a fait obstacle à ces améliorations dans de nombreux pays (OMS, 2014).

Près d'un milliard de personnes sont encore privées d'un accès à l'eau potable, dont la moitié vit dans les régions d'Afrique et du Pacifique (OMS, 2009). Au Cameroun particulièrement, l'insuffisance des moyens des municipalités locales ne permet pas d'assurer une distribution optimale de l'eau potable. Les populations sont de ce fait résignées à consommer des eaux de puits et de sources, ceci dans l'ignorance totale de leurs qualités (Nola *et al.*, 1998). Ces eaux souterraines constituent dans plusieurs localités, tant en zone rurale qu'en milieu urbain, l'une des principales sources d'approvisionnement en eau (Banton et Bangoy, 1997). Cette eau peut véhiculer des virus et plusieurs microorganismes tels les bactéries, protozoaires, les champignons parasites, les helminthes (Holt *et al.*, 2000). Les maladies d'origine hydrique sont la cause d'un taux de mortalité relativement élevé dans les populations des pays en voies de développement (Madigan et Martinko, 2007 ; OMS, 2014). Les études antérieures menées sur la qualité microbiologique des eaux souterraines de la ville de Yaoundé ont révélé qu'elles hébergent une microflore bactérienne diversifiée appartenant aux familles des *Pseudomonadaceae*, *Micrococcaceae*, *Vibrionaceae* et des *Enterobacteriaceae* (Nola *et al.*, 1998). Cette qualité médiocre des eaux prédispose les utilisateurs aux risques sanitaires à court terme d'où l'importance de la désinfecter avant consommation.

Depuis des décennies, des méthodes simples de désinfection sont souvent utilisées. Il s'agit de l'usage des produits chlorés. L'inconvénient de cette méthode réside dans la non maîtrise du dosage du chlore. De plus, les agents organochlorés laissent parfois des résidus qui ont des effets sur la santé à court ou à moyen terme (Wei *et al.*, 1994 ; Gamage et Zhang, 2010). Une autre méthode consiste à faire bouillir de l'eau. Cette technique détériore les propriétés organoleptiques de l'eau. La technique du traitement par irradiation solaire ou Solar water Disinfection (SODIS), simple, naturelle et accessible à moindre coût a été également proposée pour détruire les germes présents dans l'eau (Meierhofer et Landolt, 2008). Seulement, l'eau ainsi traitée ne doit pas être stockée en vue d'une consommation ultérieure, la réactivation des cellules bactériennes endormies pouvant survenir après 24 heures de stockage (Nestor *et al.*, 2006). De plus, cette eau doit être dépourvue de matières organiques biodégradables (Bouteleux *et al.*, 2005 ; Maiga, 2010).

L'adhésion des bactério-contaminants aux supports solides immergés a été proposée par certains auteurs comme contribuant à la réduction de l'abondance des bactéries planctoniques (Noah Ewoti *et al.*, 2011). Toutefois, cette technique ne permet qu'une relative épuration de l'eau naturelle.

Les bactéries indicatrices de contamination fécale de l'eau, bien qu'étant généralement à l'état planctonique, peuvent adhérer aux matières en suspension ou aux substrats se trouvant dans le milieu. Elles peuvent ensuite se multiplier sur la surface de ces substrats, formant ainsi des biofilms. Ces microcolonies hautement hydratées peuvent avoir des conséquences néfastes. En effet, à l'intérieur des canalisations véhiculant l'eau, les densités microbiennes sur les parois des matériaux utilisés dans la distribution de l'eau destinée à la consommation humaine peuvent atteindre 10^8 UFC/cm² (Tang, 2002). De plus, l'adhésion des microorganismes aux surfaces, facteur non négligeable dans la résistance microbienne aux désinfectants, dépend de l'espèce bactérienne considérée, mais également de l'origine de la souche et des conditions de sa croissance (Noah Ewoti, 2012 ; Lontsi Djimeli *et al.*, 2016).

Les bactéries adsorbées et/ou en biofilms constituent une source récurrente de contamination et leur élimination est relativement difficile (Allion, 2004 ; Boutaleb, 2007). De plus, ces biofilms sont des voies échappatoires des microorganismes face aux désinfectants. Certains auteurs ont révélé que les biofilms à bactéries et levures ont été fréquemment observés sur les parois internes des canalisations d'eau potable (Doggett, 2000). Ces microorganismes largués dans les conduits d'eau peuvent provoquer une détérioration de la qualité bactériologique et même des propriétés organoleptiques de l'eau, constituant ainsi des sources de contamination et des risques sanitaires pour les consommateurs (Orgogozo *et al.*, 2010 ; ANSES, 2015).

Les techniques actuellement disponibles pour tester le pouvoir bactéricide de produits antimicrobiens sont relativement longues et lourdes à mettre en œuvre. Le chlore est un désinfectant très efficace pour l'inactivation des bactéries. Cependant, il présente une pénétration limitée dans le biofilm et le maintien d'un résiduel de chlore approprié à un effet limité sur la croissance bactérienne. En effet, un résiduel de chlore total de 2,3 à 3,4 mg/L, en continu pendant 14 jours, sur un biofilm âgé de deux mois (10^6 cellules/cm²), ne permet l'élimination que d'une unité logarithmique des cellules totales, la proportion de cellules cultivables fixées n'étant pas significativement modifiée (Gauthier, 2002).

Depuis quelques années, des méthodes de désinfection de l'eau par les extraits de plantes sont proposées comme méthode alternative de traitement de l'eau au niveau des ménages. L'utilisation des plantes à des fins thérapeutiques est une pratique courante depuis des millénaires. Au Cameroun comme ailleurs, plusieurs plantes utilisées en médecine traditionnelle contre les maladies infectieuses ont fait l'objet de nombreux travaux (Amvam Zollo *et al.*, 1998 ; Biyiti *et al.*, 2004 ; Djoukeng, 2005 ; Mobili *et al.*, 2015). Ces travaux, réalisant un screening microbiologique et

chimique, revêtent une grande importance. Ils contribuent à l'orientation des populations vers les plantes ayant un réel pouvoir de guérison, leur offrant ainsi des médicaments à faible coût. Cependant, bien qu'ayant des activités antibactériennes (bactéricides ou bactériostatiques), les extraits de plantes restent encore sous exploités dans le traitement de l'eau destinée à la consommation humaine. Les études antérieures ont montré que certains extraits aqueux de *Lantana camara*, *Cymbopogon citratus* et *Hibiscus rosa-sinensis* présentent un effet bactéricide en milieu aquatique (Sunda *et al.*, 2008). Il a été indiqué que l'infusion de la plante *Artemisia annua* détruit certaines bactéries et ne provoque que des altérations subléthales réversibles chez d'autres (Allahdin *et al.*, 2008). L'effet bactéricide ou bactériostatique d'*Artemisia annua* est lié aux groupements peroxydes de l'artémisinine (Lutgen et Michels, 2008). Tout comme *Artemisia annua*, les extraits *Eucalyptus* sont largement utilisés pour contrôler les infections bactériennes.

Les plantes du genre *Eucalyptus* sont d'origine Australienne et sont cultivées sur la majeure partie du territoire Camerounais. Leurs feuilles sont utilisées en médecine et thérapie traditionnelle pour le traitement de nombreuses infections, et même en prophylaxie. L'on s'est posé alors la question de savoir quel est l'effet de l'extrait aqueux d'*Eucalyptus microcorys* sur les cellules planctoniques et adhérees en milieu aquatique ? Cette question s'appuie sur l'hypothèse que les extraits de plante du genre *Eucalyptus* ont un effet antibactérien sur de nombreuses espèces bactériennes. Le genre *Eucalyptus* a fait l'objet de nombreux travaux phytochimiques (Moore *et al.*, 2004 ; Macheix *et al.*, 2005 ; Chebil, 2006 ; Bruneton, 2009 ; Daroui-Mokaddem, 2012). Les *Eucalyptus* (Myrtaceae) sont utilisés pour contrôler les infections microbiennes. Les groupes fonctionnels de certains composés présents dans la plupart des matières végétales tels que les alcools, les phénols, les terpènes et les cétones sont associés pour leurs caractéristiques antimicrobiennes (Braca *et al.*, 2008).

Cependant, on sait peu de choses sur la sensibilité des bactéries vis-à-vis de ses extraits aqueux en milieu aquatique. L'on dispose encore de peu d'informations sur l'effet synergique de l'extrait aqueux d'*Eucalyptus microcorys* et de la lumière sur les cellules planctoniques en milieu aquatique, ainsi que de la durée de leurs incubations. Peu d'informations à propos de l'extrait de cette plante sur les cellules bactériennes *Escherichia coli* entéropathogène adhérees sont disponibles. Cette souche bactérienne, comme bien d'autres, est pourtant souvent à l'origine de nombreux problèmes de santé publique dans les communautés et peut se trouver à l'état adhéree ou de biofilm dans les systèmes de canalisation d'eau.

La présente étude vise de façon générale à évaluer l'effet d'un extrait aqueux de plante médicinale *Eucalyptus microcorys* sur la cultivabilité de quelques bactéries d'importance sanitaire et hygiénique, à l'état planctonique et adhéree en microcosme aquatique. Il s'agit plus spécifiquement :

- d'évaluer la croissance d'*Escherichia coli* entéropathogène et commensale, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* et *Enterococcus faecalis* dans une solution aqueuse d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* sous diverses températures d'incubation ;
- d'évaluer l'influence de l'intensité lumineuse sur la cultivabilité d'*Escherichia coli* entéropathogène et d'*Enterococcus faecalis* en présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* en microcosme aquatique ;
- de déterminer l'effet de cet extrait de plante sur les cellules *Escherichia coli* entéropathogène adhérees au fragment de polyéthylène en fonction de l'état physiologique des cellules;
- de déterminer qualitativement les composés chimiques de la plante *Eucalyptus microcorys* susceptibles d'avoir des effets antibactériens.

Le présent document comporte 3 parties présentées sous-formes de chapitre. Le premier chapitre est consacré à la revue de la littérature. Dans le second chapitre, seront exposées le matériel utilisé, les principales méthodes et techniques utilisées pendant l'étude. La présentation des résultats obtenus, leur interprétation et leur discussion font l'objet du troisième et dernier chapitre. Une conclusion, des recommandations, perspectives, références bibliographiques et annexes terminent le document.

CHAPITRE I
REVUE DE LA LITTÉRATURE

I.1- Généralités sur les écosystèmes aquatiques

L'eau est l'élément essentiel de toute forme de vie sur la terre ; mais elle est inégalement répartie à travers la planète. Les mers et les océans renferment environ 97,4 % du volume total de cette ressource, les eaux douces représentent 2 %, et enfin les glaciers et les icebergs polaires (calottes polaires) renferment environ 0,6 %. Bien que les océans occupent la majeure partie du globe, les eaux continentales malgré leur faible pourcentage présentent une importance écologique car reflètent directement le fonctionnement des bassins versants et la vie des populations humaines riveraines (Cebren, 2004). Les eaux continentales sont réparties dans les milieux souterrains, lenticques et lotiques. Les eaux souterraines sont celles que l'on retrouve sous la surface du sol. Elles représentent environ 99 % des ressources mondiales en eaux douces (Stern, 1998). Ces eaux circulent ou stagnent dans les fissures et les pores rocheux, et sont retenues sur les couches imperméables. Les milieux lenticques regroupent les lacs, les étangs, les mares et les marais où les eaux se renouvellent très lentement ou presque pas. Les milieux lotiques sont caractérisés par l'écoulement de leurs eaux, écoulement qui assure le brassage permanent des eaux et une distribution relativement homogène des gaz et des sels dissous (Hubert, 1998).

I.2- Problématique de l'accès à l'eau potable

L'accès à l'eau potable demeure un problème préoccupant dans plusieurs régions du monde. Constituant fondamental de la vie, l'eau demeure au centre de toute activité humaine : agriculture, production industrielle, pêche, tourisme, production d'énergie (hydro-électricité). En effet, sur 13.600 millions de Km³ d'eau qui couvre notre planète, l'eau douce représente seulement 0,014% disponible sous forme d'eau de surface (Moudallal, 1997). Cette faible disponibilité met aujourd'hui, un tiers de l'humanité dans une situation dite de « stress hydrique », avec moins de 1700 m³ d'eau douce disponibles par habitant et par an. L'eau douce est donc une denrée rare. En plus de cette rareté, l'eau fait face à de nombreux problèmes parmi lesquels la pollution due à l'explosion démographique, rendant la question de l'approvisionnement en eau de plus en plus préoccupante chaque jour (UN-Water, 2006). C'est à cet effet qu'au cours du premier Forum Mondial de l'eau qui s'est tenu à Marrakech au Maroc en 1997, les pays ayant participé ont exprimé leur crainte sur la rareté et la qualité de l'eau de consommation. Cette mauvaise qualité de l'eau, responsable de nombreuses maladies hydriques, est due à la présence des protozoaires, des virus ou des bactéries et à la détérioration de certains de ses paramètres physico-chimiques (OMS, 2004).

I.3- Quelques bactéries d'importance sanitaire et hygiénique couramment retrouvées dans l'eau

Le contrôle de la qualité bactériologique de l'eau de boisson est fondé sur la recherche, l'isolement et la numération des germes témoins de contamination que sont les bactéries hétérotrophes aérobies mésophiles, les coliformes et les streptocoques fécaux (OMS, 2004).

I.3.1- Coliformes totaux et fécaux

Les coliformes sont des indicateurs bactériens convenables de la qualité de l'eau de boisson, surtout parce qu'ils sont faciles à déceler et à dénombrer dans l'eau. Les coliformes totaux se caractérisent par leur aptitude à fermenter le lactose à 35-37°C. Leur présence dans l'eau traduit une détérioration de la qualité de l'eau (Payment *et al*, 2003).

Les coliformes thermo tolérants sont des coliformes capables de fermenter le lactose à 44 ou 44,5 ° C. Les coliformes thermo tolérants sont aussi parfois appelés coliformes fécaux. La présence de *E. coli* dans de l'eau indique non seulement une contamination récente par les matières fécales, mais aussi la présence possible des bactéries, virus et protozoaires pathogènes (Hasley et Leclerc, 1993). La norme indique qu'une eau potable ne doit pas contenir de coliformes fécaux dans 100 mL (GSE, 2002).

I.3.2- Streptocoques fécaux

Les Streptocoques fécaux sont susceptibles de contaminer les eaux à travers des déjections animales. Ce sont par exemple *Streptococcus bovis*, *S. equinus* et *S. gallolytiens*. Leur présence dans les eaux souterraines traduit soit une contamination fécale, soit une infiltration d'eau de surface et leur étude est d'autant plus importante qu'ils sont relativement plus résistants au stress et à la dessiccation que *Escherichia coli* et autres coliformes (Payment *et al*, 2003). Leur étude est très importante pour le contrôle de la qualité de l'eau potable. Une eau potable ne doit pas contenir de Streptocoque fécal dans un volume de 100 mL (GSE, 2002).

I.3.3- *Salmonella typhi*

Le genre *Salmonella* regroupe les bactéries dont les caractères essentiels sont de ne pas fermenter le lactose et de ne pas produire d'uréase. Les *Salmonella* sont des pathogènes de l'homme, des mammifères (rongeurs), des oiseaux (volailles) et des animaux à sang froid (reptiles). Elles sont responsables, après pénétration par voie orale, de nombreuses infections (salmonelloses), notamment des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes, des gastro-entérites et des toxi-infections alimentaires collectives (CHU-PS, 2003). Le principal mode de contamination chez l'homme est l'ingestion à partir de l'eau, des aliments (ex. : produits laitiers, œufs, viande) ou d'animaux

familiers porteurs. Une eau potable ne doit pas contenir de *Salmonella* dans un volume de 100 mL (GSE, 2002).

I.3.4- *Vibrio cholerae*

Les bactéries Vibrionaceae constituent une famille de γ protéobactéries Gram⁻, halophiles, et sont considérées autochtones des écosystèmes aquatiques notamment marins (Boukef *et al.* ; 2010). Ces germes constituent environ 10% de la charge totale en bactéries marines cultivables (Eilers *et al.*, 2000) et leur distribution dans l'eau côtière dépendrait des fluctuations des facteurs abiotiques du milieu notamment la température et la salinité (Thompson *et al.*, 2004 ; Castaneda Chavez *et al.*, 2005; Boukef *et al.*, 2008). Les vibrions sont hétérogènes sur le plan phylogénique. Liés aux inondations, aux mauvaises conditions d'hygiène, aux famines et aux guerres, le choléra est une maladie diarrhéique aigüe, mortelle dans 70 % des cas en l'absence d'un traitement approprié (N'Guessan *et al.*, 2006). La diarrhée et les vomissements, principaux symptômes de la maladie, sont à l'origine d'une importante déperdition d'eau et de sels indispensables à la vie. La norme indique qu'une eau potable ne doit pas contenir de *Vibrio* dans 100 mL (GSE, 2002).

I. 4- Physiopathologie dues à quelques espèces bactériennes d'importance sanitaire et hygiénique

I. 4.1- Physiopathologie due à *Escherichia coli*

Escherichia coli est la bactérie la plus fréquemment mise en cause dans les infections de l'arbre urinaire et, dans les cas les plus rares, de la vésicule biliaire (Manges *et al.*, 2001). Les infections à colibacille sont dues à la migration des germes de cette espèce du tube digestif vers l'arbre urinaire par voie ascendante et externe. *Escherichia coli* est parfois responsable de 50 % des septicémies (bactériémies) dues à des bactéries Gram⁻ et de 4 % des méningites bactériennes touchant principalement les nouveaux nés (CNR, 2005). Les souches de *E. coli* agents d'entérites forment un groupe hétérogène au regard des mécanismes de pathogénicité impliqués. Ces souches représentent une cause importante de diarrhées, particulièrement chez le jeune enfant dans les régions pauvres et les régions en développement (Germani et Le Bouguéneq, 2008). Les souches *E. coli* entérotoxigènes sont responsables de diarrhées infantiles dans les pays en développement à bas niveau d'hygiène. Ils représentent environ 25 % des étiologies des diarrhées de l'enfant de moins de 3 ans et de la « diarrhée des voyageurs » (ou « turista ») (Clarke, 2001 ; Berche, 2003). Les souches EPEC sont responsables de diarrhées aqueuses et de gastro-entérites infantiles (GEI). Elles provoquent des diarrhées aiguës accompagnées de fièvres, de malaises et de vomissements (Levine, 1987). De nos jours, les diarrhées à EPEC sévissent principalement dans les pays en voie de développement et ces pathogènes posent un véritable problème de santé publique car le taux de mortalité chez les jeunes enfants peut s'élever jusqu'à 30% (GSE, 2003).

I.4.2- Physiopathologie due à *Salmonella typhi*

Les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes sont provoquées par quatre sérovars de *Salmonella*, strictement humains, antigénétiquement distincts mais de pouvoir pathogène similaire : *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B* et *S. paratyphi C*. Les *Salmonella* sont dites majeures en raison de la gravité de la pathologie qu'elles provoquent. Elles peuvent être à l'origine des hémorragies intestinales et des perforations. Les *Salmonella* dites « mineures » (*Salmonella typhi murium*, *enteritidis*, *dublin* etc.), ubiquitaires, sont généralement ingérées avec une boisson ou un aliment contaminé (cas sporadiques) ou après une contamination fécale-orale. Il peut s'ensuivre des infections purement digestives, les gastro-entérites. Celles-ci se traduisent par de la diarrhée, des vomissements et de la fièvre chez le nouveau-né, le jeune enfant, le sujet âgé, l'immuno-déprimé (ex-SIDA).

I.4.3- Physiopathologie due à *Vibrio cholerae*

Le début du choléra est marqué par des nausées, des vomissements, une diarrhée profuse et des crampes abdominales. Les selles ressemblent à de l'eau de riz et contiennent du mucus, des cellules épithéliales et beaucoup de vibrions. (CHU-PS, 2003). Les pertes en eau (plusieurs litres d'eau par jour) et en électrolytes entraînent déshydratation, collapsus circulatoire et anurie. En l'absence de traitement, la mort survient en 2 à 5 jours dans 50 % des cas environ. Le choléra évolue souvent sous une forme mineure (simple entérite) et il y a de nombreux porteurs sains de vibrions cholériques en zone endémique.

I.4.4- Physiopathologie due à *Enterococcus faecalis*

Les entérocoques sont l'une des premières causes des infections nosocomiales. *Enterococcus faecalis* est responsable à lui seul, de 80 à 90 % de ces contaminations (Moellering, 1992). Durant ces dernières années, *Enterococcus faecalis* est devenue une bactérie pathogène opportuniste redoutable. Ces infections atteignent principalement les nourrissons et les sujets immuno-déprimés. Cette bactérie est responsable chez l'adulte, d'endocardites, de méningites, de pneumonies, de péritonites, d'abcès viscéraux et de septicémies (Stevens *et al.*, 1992).

I.5- Méthodes de remédiation à la contamination microbiologique des eaux

I.5.1- Méthodes classiques de désinfection des eaux à domicile

La **Norme Française T 72.101** définit la désinfection comme une opération au résultat momentané, permettant d'éliminer ou de tuer les microorganismes et/ou d'inactiver les virus indésirables portés par des milieux inertes contaminés, en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux microorganismes présents au moment de l'opération (Boutaleb, 2007). Le traitement de l'eau par un désinfectant a pour but de la rendre potable du point de vue

bactériologique. Il n'a jamais pour but de détruire tous les organismes vivants dans l'eau, mais plutôt de garantir l'absence de tout germe infectieux et de mettre hors risque de contamination un point d'eau ou un système de distribution ayant subi une pollution. Théoriquement, la gamme des moyens techniques pour réaliser cette opération est relativement étendue. Elle va des techniques chimiques utilisant des réactifs oxydants (chlore, brome, ozone) ou la floculation à pH élevé (eaux usées) aux moyens physiques (rayonnement UV-B et C). En général, on distingue:

- ❖ la désinfection de l'eau par ébullition qui consiste à porter l'eau à l'ébullition pendant quelques minutes. Pendant cette opération, les pathogènes viraux, parasitaires et bactériens sont inhibés (Sunda, 2012). Le plus grand inconvénient de cette méthode réside dans son coût énergétique important qui la rend insoutenable du point de vue économique et environnemental. Cette pratique peut conduire à la déforestation en milieu rural ;

- ❖ la filtration, bien que efficace, ne permet pas d'éliminer tous les microorganismes. En plus, ces filtres nécessitent une maintenance attentive. Les filtres doivent être régulièrement inspectés et remplacés (Cas des filtres en céramique) (Howard, 2004) ;

- ❖ la chloration est une méthode utilisant des produits chimiques comme le chlore, l'hypochlorite de sodium, le dioxyde de chlore, les chloramines. Ce type de traitement est très efficace. Cependant, au contact de la matière organique, le chlore génère des sous-produits, notamment les trihalométhanes qui sont cancérigènes (Wei *et al.*, 1994 ; Gamage et Zhang, 2010) ;

- ❖ la désinfection solaire de l'eau (SODIS) est une méthode alternative de traitement de l'eau au niveau des ménages : de l'eau contaminée est remplie dans des bouteilles transparentes en polytéréphtalate d'éthylène (PET) et exposée en plein soleil pendant 6 heures. Durant l'exposition au soleil, le rayonnement UV-A et la température élevée conduisent à l'élimination de 99,99% des virus et bactéries générateurs de maladies diarrhéiques (Meierhofer et Landolt, 2008). La variation de l'intensité de l'UVA dues aux conditions climatiques et journalières remet en cause l'efficacité de cette méthode (Meierhofer et Landolt, 2008).

I.5.2- Mode d'action des désinfectants

Contrairement aux antibiotiques, le mode d'action des désinfectants se caractérise par une absence de spécificité, et demeure partiellement compris (**Tableau I**). Trois phases d'actions possibles sont connues (Bourion, 1995 ; Russel *et al.*, 2004) :

- ❖ la fixation sur la paroi bactérienne, conditionnée par une concentration en désinfectant et le mouvement brownien des bactéries. Le phénomène est de nature chimique ou électrique ;

❖ la pénétration à travers la paroi puis la membrane, conditionnée par la solubilité, l'ionisation et l'encombrement stérique ;

❖ l'action proprement dite, qui peut toucher différentes cibles et notamment :

- la membrane cytoplasmique, dont l'altération provoque la perturbation des échanges membranaires spécifiques et donc la désorganisation du métabolisme ;
- les constituants cytoplasmiques, c'est-à-dire les acides nucléiques, les ribosomes, les protéines structurales, mais surtout les protéines enzymatiques dont l'oxydation et la dénaturation perturbent gravement le métabolisme cellulaire.

Tableau I : Sites d'action des désinfectants (Bourion, 1995 ; Russel *et al.*, 2004)

Désinfectants	Cible microbienne et type d'interaction	Effet sur la cellule
Aldéhydes	Alkylation des groupes NH ₂ des protéines et acides nucléiques	Inhibition fonctions enzymatique et nucléique
Dérivés phénoliques, alcools	Dénaturation des protéines cytoplasmiques et membranaires	Inhibition enzymatique, altération membrane, coagulation cytoplasmique
Chlore, iode, peroxyde d'hydrogène	Oxydation des groupes –SH des protéines	Inhibition enzymatique, modification de protéines structurelles
Chlore, iode	Halogénéation des acides aminés aromatiques des protéines	Inhibition enzymatique, modification de protéines structurelles
Chlorhexidine, ammoniums quaternaires	Liaison aux groupes phosphates et chaînes d'acides gras des lipides de la membrane cellulaire	Altération membranaire, fuite de constituants cellulaires, coagulation cytoplasmique

En plus des méthodes classiques de traitements de l'eau par les désinfectants, l'utilisation des plantes à des fins thérapeutiques est une pratique courante depuis des millénaires.

I.5.3- Désinfection de l'eau par les extraits de plante

La méthode de désinfection de l'eau par les extraits de plante est également une nouvelle alternative de traitement de l'eau au niveau des ménages. Ce phénomène a eu un regain d'intérêt avec les premières recherches sur les propriétés antibactériennes des plantes pour tenter de donner une base scientifique à ces pratiques empiriques (Mela, 1950 ; Atinkson, 1996). En présence de la lumière solaire, les photosensibilisateurs absorbent par exemple de l'énergie qu'ils transfèrent à

l'oxygène moléculaire stable (état triplet) pour générer l'oxygène singulet dans le milieu. L'oxygène singulet généré attaque et endommage la plupart des biomolécules, et entraîne ainsi la mort cellulaire ou tissulaire (Sunda, 2012). Certaines plantes utilisées dans la pharmacopée traditionnelle africaine pour soigner les infections microbiennes sont capables de générer l'oxygène singulet en présence de la lumière solaire. L'application de ce principe de photosensibilisation à la désinfection de l'eau avec des extraits de ces plantes montre un effet bactéricide (Sunda, 2012).

L'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec les extraits de plantes a révélé que les extraits aqueux de *Cassia occidentalis*, *Cassia alata*, *Carica papaya* et de *Coleus kilimandschari* présentent un effet photosensibilisateur. Quant aux extraits aqueux de *Lantana camara*, *Cymbopogon citratus*, *Hibiscus rosa simentis* et *Phyllanthus niruri*, un effet bactéricide a pu être mis en évidence (Sunda, 2012). On a également noté que l'infusion d'*Artemisia annua* détruit certaines bactéries et ne provoque que des altérations subléthales réversibles chez d'autres (Allahdin *et al.*, 2008). Lutgen et Michels (2008) ont noté que l'effet bactéricide ou bactériostatique d'*Artemisia annua* est lié aux groupements peroxydes de l'artémisinine. Les extraits généralement utilisés sont ceux des plantes médicinales. Si, l'utilisation des extraits de plante du genre *Eucalyptus* est largement répandue dans la pharmacopée traditionnelle, il existe à ce jour peu d'études réalisées dans le cadre de traitement des eaux par les extraits d'*Eucalyptus*.

I.6- Généralités sur les plantes du genre *Eucalyptus*

En Australie, le genre *Eucalyptus* est riche en espèces et est dominant dans la plupart des types de forêts (Williams et Brooker, 1997). Les *Eucalyptus* sont des arbres de la famille des *Myrtaceae*. Les *Eucalyptus* sont originaires d'Australie où ils dominent d'ailleurs 95% des forêts avec plus de sept cents espèces (Chaix, 2002). L'*Eucalyptus* est une plante médicinale qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (Farnsworth *et al.*, 1986). Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (Elqaj *et al.*, 2007).

I.6.1- Classification taxonomique

Les *Eucalyptus* sont des angiospermes dicotylédones. Le terme *Eucalyptus* fait généralement référence aux genres *Eucalyptus*, *Corymbia* et *Angophora*. La principale classification est celle de Pryor et Johnson (1971) qui définit 7 sous-genres sur la base de caractères morphologiques et l'absence d'infertilité. C'est depuis 1995 que *Corymbia* n'a plus été considéré comme un sous-genre du genre *Eucalyptus* mais comme un genre à part entière. D'un point de vue taxonomique, les études phylogénétiques basées sur l'utilisation des marqueurs moléculaires du génome cytoplasmique sont maintenant associés aux marqueurs botaniques classiques (Davidson, 1995 ;

Vigner, 2000). *Eucalyptus microcorys* appartient au règne des *Plantae* Sous-règne des *Tracheobionta*, Division des *Magnoliophyta*, Classe des *Magnoliopsida*, Sous-classe des *Rosidae*, Ordre des *Myrtales*, Famille des *Myrtaceae*, Genre *Eucalyptus* (Müller, 1860).

I.6.2- Description botanique du genre *Eucalyptus*

J.H. de la Billardièrre découvre le gommier bleu, *E. globulus*, en 1792 au sud de la Tasmanie. Ce nom fait allusion à la gomme résineuse que l'arbre exsude quand il est blessé. C'est un botaniste français, Charles Louis L'héritier de Brutelle, qui décrit et nomme le genre *Eucalyptus*. *Eucalyptus* vient du grec *eu* : bien et *kaluptos* : couvert, car les étamines sont enfermées dans un étui formé par des pétales modifiés qui tombent à l'ouverture de la fleur. La plante *Eucalyptus microcorys* est un grand arbre à feuilles persistantes d'environ 40 m de haut, parfois 70 m, avec une écorce rugueuse, fibreuse, orange brun et une couronne dense. Les feuilles lancéolées font de 8 à 12 cm de long et 1,5 à 2,5 cm de large. Les fleurs blanches sont groupées en ombelles de 7 à 11 fleurs. Son bois coupé laisse une sensation de gras. C'est l'une des espèces dont les feuilles sont consommées par les koalas. La **Figure 1** montre la photographie des feuilles d'*Eucalyptus microcorys*.



Figure 1 : Branche, feuilles, fleurs et fruits d'*Eucalyptus microcorys* (Müller, 1860).

Un *Eucalyptus* adulte peut, selon l'espèce, se présenter comme un petit buisson ou comme un arbre de très haute stature.

On a l'habitude de dire des *Eucalyptus* qu'ils sont :

- de petite taille s'ils mesurent moins de dix mètres de haut,
- de taille moyenne s'ils font entre dix et trente mètres,
- de grande taille s'ils mesurent entre trente et soixante mètres,
- de très grande taille s'ils atteignent plus de soixante mètres (certaines espèces atteignant 90 m de hauteur).

Les arbres à tronc unique avec un faite foliaire occupant la partie terminale du tronc sont des *Eucalyptus* de forêt, et les arbres à tronc unique, mais dont les branches commencent à apparaître à une faible distance au-dessus du sol sont les *Eucalyptus* de bois (Pryor et Johnson, 1971)

La plupart des *Eucalyptus* ont des feuilles persistantes. Comme les autres membres de la famille des Myrtaceae, les feuilles d'*Eucalyptus* sont couvertes de glandes à huile. Les feuilles, bleutées, ont une curieuse caractéristique : sur les jeunes arbres, elles sont opposées, sessiles, ovales et glauques, et quand l'arbre grandit, elles deviennent alternes, pétiolées, très allongées, parfois un peu courbées comme des lames de faux, et d'un vert luisant (Daroui-Mokaddem, 2012).

Les fleurs forment une petite boîte s'ouvrant par un couvercle : les étamines sont enfermées dans un étui fermé par un opercule (d'où le nom d'*Eucalyptus* du grec *eu* = bien et *kaluptos* = couvert) formé par la fusion des pétales et/ou des sépales. Les fleurs sont très variées. Elles ont de très nombreuses étamines qui peuvent être de couleur blanche, crème, jaune, rose ou rouge.

Les fruits à maturité ont la forme d'un cône, sont secs, et de couleur brune. Ils ont également des valves qui se soulèvent pour laisser échapper les graines lors de leur chute sur le sol (Bruneton, 1999 ; Daroui-Mokaddem, 2012).

I.6.3- Quelques composés phénoliques retrouvés dans la plante du genre *Eucalyptus*

Les plantes du genre *Eucalyptus* produisent des métabolites secondaires comme tous les autres végétaux. Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Ils ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (Urquiaga et Leighton, 2000). La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) (Macheix *et al.*, 2005).

I.6.3.1- Tannins galliques et cathéchiques

Les tannins sont des polyphénols polaires d'origine végétale (Bengag, 2009), existant dans presque chaque partie de la plante : écorce, bois, feuilles, fruits et racines. Il est difficile de les séparer dans un extrait végétal, parce que de nombreux isomères avec une base moléculaire très semblable coexistent (Bengag, 2009).

La structure chimique des tannins est très variable mais comporte toujours une partie polyphénolique. On peut les classer en tannins hydrolysables qui donnent après hydrolyse, soit de

l'acide gallique, soit de l'acide ellagique, et en tannins condensés (ou cathéchique) non hydrolysables. La **Figure 2** présente la structure générale de tannins condensé et hydrolysable.

La **Figure 2** présente les structures de tannin hydrosoluble et tannin condensé.

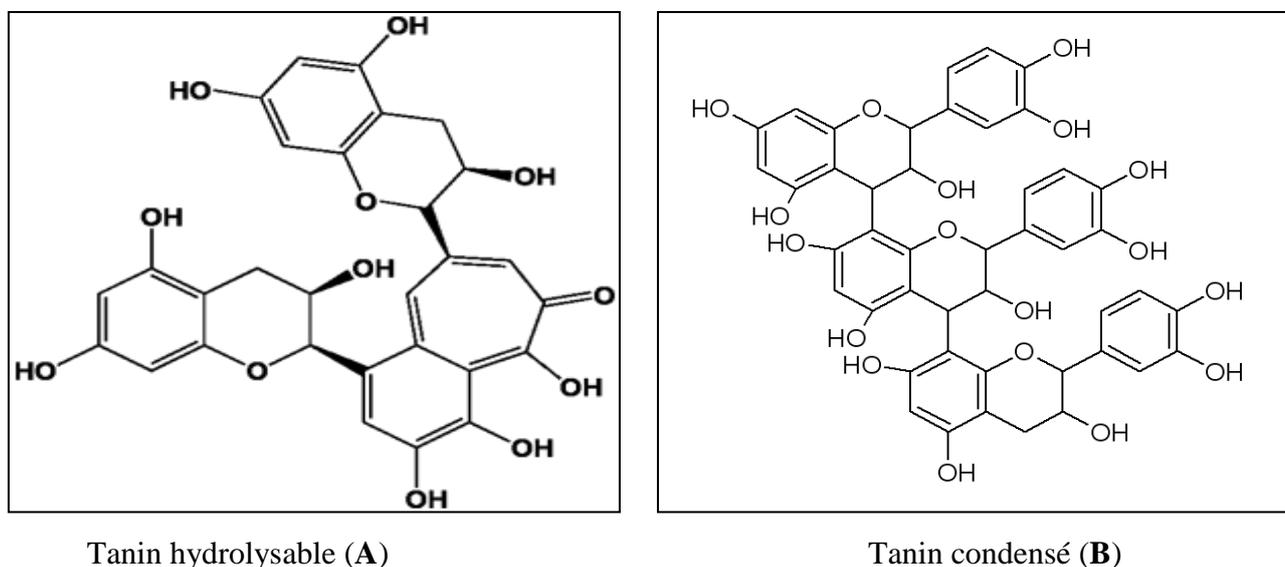


Figure 2: Structure de tanins hydrolysables (A) et condensés (B) (Canon, 2010)

I.6.3.2- Terpènes

Toutes les espèces d'*Eucalyptus* présentent majoritairement des mélanges de mono terpènes, constitués principalement de 1,8-cinéole (Lawler *et al.*, 1999), avec des quantités significatives de α -pinène, limonène, et p-cymène (Ngo *et al.*, 2003 ; Pass *et al.*, 1999 ; Stupans *et al.*, 2001). On rencontre également le globulol, un sesquiterpène (Moore *et al.*, 2004), ainsi que le α -terpinéol, le γ -terpinène, et le spathuléol (Moore *et al.*, 2004). La **Figure 3** présente la structure de quelques terpènes.

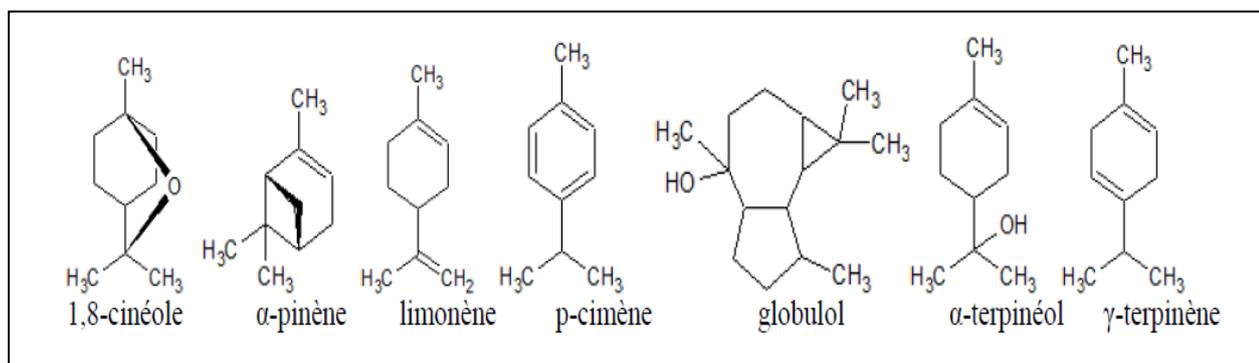


Figure 3: Terpènes (Stupans *et al.*, 2001 ; Ngo *et al.* 2003 ; Moore *et al.*, 2004)

I.6.3.3- Alcaloïdes

Les alcaloïdes forment une grande famille hétérogène de métabolites secondaires, qui présentent un intérêt par leurs propriétés pharmacologiques et leurs applications en médecine. Les alcaloïdes constituent une classe de produits naturels présentant une grande diversité structurale. Leurs propriétés biologiques, aussi variées que leurs structures chimiques, continuent à être bénéfiques dans les traitements de différentes maladies. Aussi, comme alcaloïdes naturelles, la berbérine par exemple, isolée de *Berberis vulgaris*, a des propriétés anti-inflammatoires et antimicrobiennes (Mohammedi, 2013). Les alcaloïdes dérivent de différents acides aminés ou de l'acide mévalonique en passant par différentes voies biosynthétiques. Selon leur structure chimique et surtout structure moléculaire, on peut diviser les alcaloïdes en plusieurs groupes : les phénylalanines, les alcaloïdes iso-quinoléiques, les alcaloïdes quinoléiques, les alcaloïdes pyrrolizidiniques, les alcaloïdes dérivés du tropane et les alcaloïdes stéroïdes (Stockigt *et al.*, 2002). La **Figure 4** montre les différentes structures chimiques des alcaloïdes.

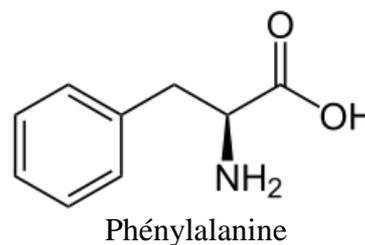
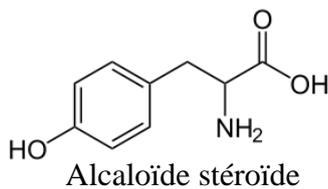
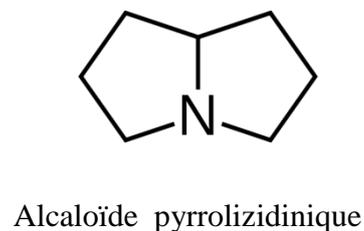
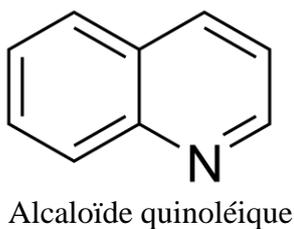
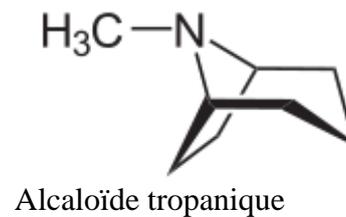
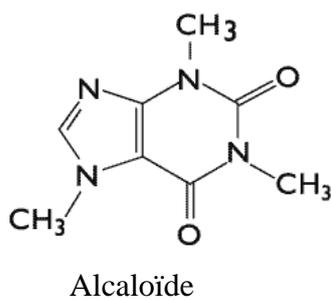


Figure 4: Structure générale de quelques alcaloïdes (Stockigt *et al.*, 2002)

I.6.3.4- Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des molécules très répandues dans le règne végétal. Ils font partie de la classe des polyphénols, principaux métabolites secondaires des plantes. Les flavonoïdes ont une

origine biosynthétique commune et, de ce fait, présentent le même élément structural de base (sauf exceptions : chalcones, aurones, isoflavones), à savoir quinze atomes de carbone constitués de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3 (noyau 2-phényl-1-benzopyrane) (Chebil, 2006) (**Figure 5**).

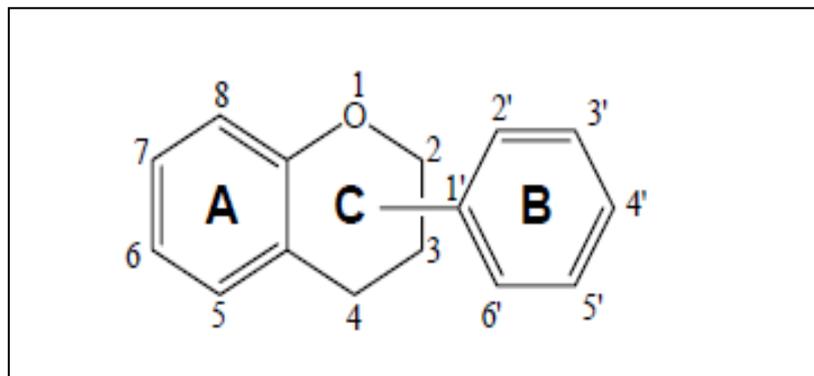


Figure 5 : Squelette de base des flavonoïdes

I.6.3.5- Saponines

Comme les flavonoïdes et les alcaloïdes, les saponines font partie des métabolites secondaires. Ce sont des composés qui servent de défense à la plante. Les saponines sont généralement connues comme des composés non-volatils, tensio-actifs qui sont principalement distribués dans le règne végétal (Vincken *et al.*, 2007). Les propriétés biologiques de ce métabolite secondaire ne sont pas limitées qu'à la protection des plantes, car de nombreuses espèces végétales à forte teneur en saponines sont utilisées en médecine traditionnelle, comme notamment les racines de *Bupleurum falcatum L.* (Fujioka *et al.*, 2003) et de *Panax ginseng C. A. Meyer* (Park *et al.*, 2005), pour ne citer que quelques exemples.

Les saponines retiennent l'attention aussi bien pour leur exploitation industrielle en lien avec leurs propriétés pharmacologiques. Plusieurs plantes à saponines sont utilisées par l'industrie pharmaceutique pour l'obtention de formes galéniques, d'autres ont des applications en phytothérapie. Structuralement, les saponines peuvent être classées en deux groupes selon la nature de la génine, saponine stéroïdique et saponine triterpénique (Bruneton, 2009). La **Figure 6** montre la formule chimique générale des génines stéroïdiques des saponosides et des saponines à génines triterpéniques.

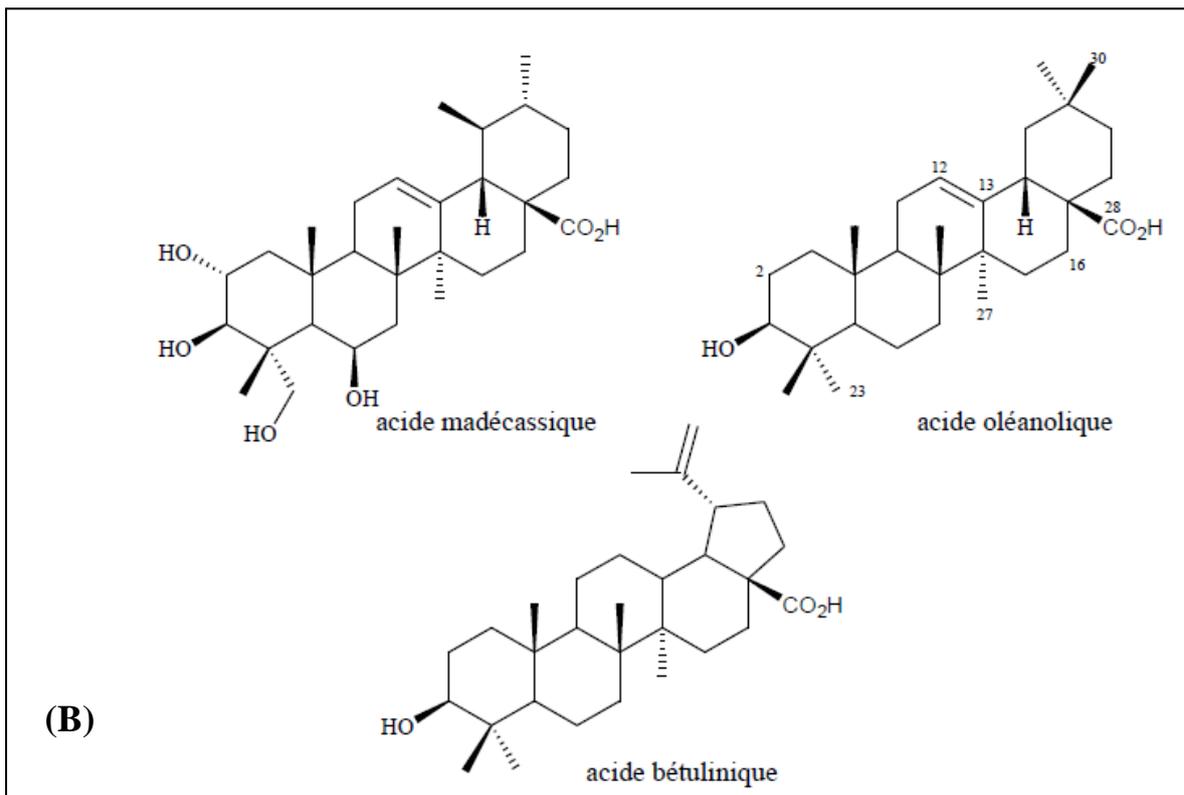
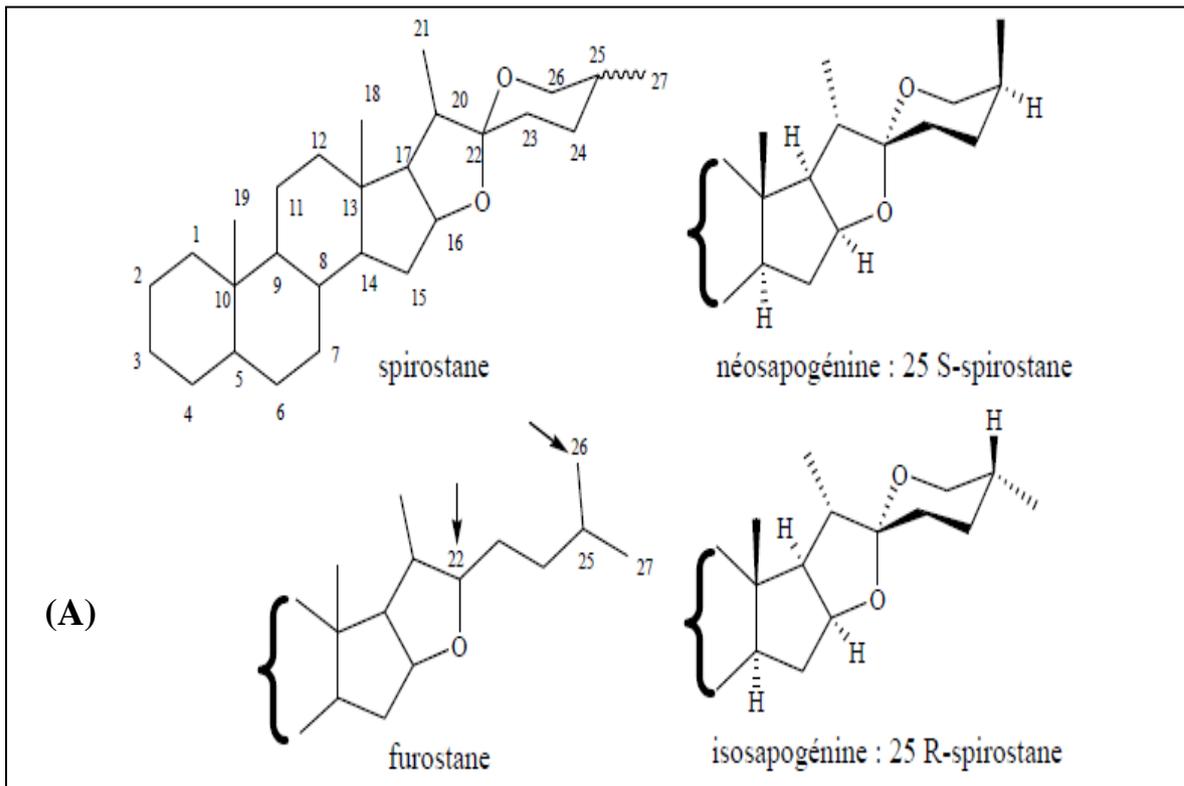


Figure 6: Squelettes et configurations des génines stéroïdiques des saponosides (A) et exemples de génines triterpéniques (B) (Bruneton, 2009)

I.6.3.6- Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges de composés aromatiques des plantes, qui sont extraites par distillation par la vapeur d'eau ou des solvants non aqueux volatils (Smallfield, 2001). Beaucoup de plantes produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante est inconnu (Rai *et al.*, 2003). Les essences dans les plantes peuvent être stockées dans divers organes : fleurs (origan), feuilles (citronnelle, *Eucalyptus*,) écorces (cannelier), bois (bois de rose, santal), racines (vetiver), rhizomes (acorce, gingembre), sève (encens, myrthe), bourgeons (pin), fruit (badiane) ou graine (carvi). Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une espèce, voire dans un même organe (Bruneton, 1999). Sur le plan chimique, les huiles essentielles sont des mélanges complexes de composés de structure diverses, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Ces substances sont des molécules très volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes comme les monoterpènes et les sesquiterpènes (Croteau *et al.*, 2000). De nombreux auteurs ont rapporté que les extraits d'herbes ont des composés chimiques capables d'avoir une activité antimicrobienne (Kuda *et al.*, 2004 ; Bousbia, 2011). Les constituants des huiles essentielles sont actifs contre une large gamme de bactéries, levures et champignons. Les eucalyptus produisent de l'huile essentielle riche en 1,8-cineole ou eucalyptol (86,7%) dont la structure chimique est présentée en **Figure 7** (Foudil-Cherif *et al.*, 2000).

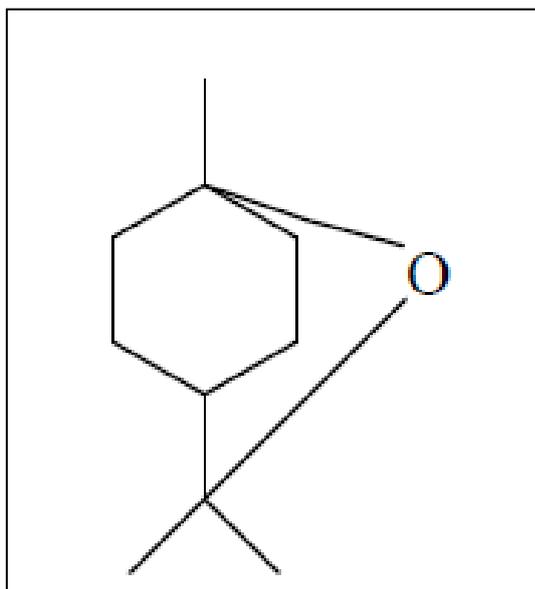


Figure 7 : Structure chimique du 1,8-cineole ou eucalyptol (Foudil-Cherif *et al.*, 2000).

I.6.4- Propriétés pharmacologiques des *Eucalyptus*

Les aborigènes Australiens (indigènes) ont traditionnellement utilisé les *Eucalyptus* pour guérir des blessures et les infections fongiques (Takahashi *et al.*, 2004). En médecine traditionnelle, les feuilles d'*Eucalyptus* sont recommandées en cas de rhume, sinusite, maux de gorge, angine, toux, bronchite, infection urinaire ou fièvre sous la forme d'une décoction de 10 à 20 g de feuilles par litre d'eau à boire dans la journée, ou en inhalation (Nicolas, 2012).

Les *Eucalyptus* sont donc des antiseptiques des voies respiratoires et urinaires. Ils sont utilisés comme expectorants et fluidifiants des bronchiques. Ils ont également un pouvoir antibactériens et antipyrétiques (De Billerbeck *et al.*, 2002). Il est également utilisé par voie topique (application locale) pour traiter les douleurs musculaires et les rhumatismes (Armando *et al.*, 2009). De nombreuses études ont montré que *Eucalyptus cinerea* a une activité antimicrobienne (Franco *et al.*, 2005).

L'activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *E. globulus* et *E. camaldulensis* indique son utilité potentielle comme un antiseptique ou un désinfectant contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (Ghalem et Mohamed, 2008). Elles présentent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre. En outre, l'activité antibactérienne d'extrait aqueux d'*Eucalyptus gomphocephala* mise en évidence dans l'étude de Bouharb *et al.* (2014) pourrait aussi justifier l'usage thérapeutique des *Eucalyptus* en médecine traditionnelle dans le traitement d'un grand nombre d'infections microbiennes.

I.7- Généralités de la paroi cellulaire et croissance des bactéries

I.7.1- Généralités de la paroi cellulaire

Il est nécessaire d'étudier la structure des membranes et de la paroi des cellules bactériennes pour comprendre les mécanismes d'inhibition des composés présents dans les extraits de plante.

I.7.1.1- Structure de la membrane cytoplasmique

La membrane cytoplasmique est une structure fine qui entoure la cellule. Avec 8 nm d'épaisseur, cette structure vitale constitue une barrière séparant l'intérieur de la cellule (cytoplasme) avec son environnement (Madigan *et al.*, 2000). Si la membrane est cassée, l'intégrité cellulaire est atteinte, le cytoplasme se vide dans l'environnement et la cellule meurt. La membrane cytoplasmique est aussi une barrière de haute perméabilité sélective, permettant à la cellule de concentrer certains métabolites spécifiques et d'excréter ses déchets métabolites (Madigan *et al.*, 2000 ; Madigan et Martinko, 2007).

I.7.1.2- Structure de la paroi bactérienne

La paroi cellulaire constitue la structure vitale de la bactérie. Elle peut contenir des constituants qui contribuent au pouvoir pathogène. Elle assure la rigidité et donc détermine la forme bactérienne (excepté les mycoplasmes et quelques archaebactéries) et joue un rôle protecteur contre les attaques. Dans le milieu aquatique, pour une même souche bactérienne, ces caractères sont modifiés en fonction des propriétés physico-chimiques du milieu (Madigan *et al.*, 2000 ; Rubio, 2002 ; Hamadi *et al.*, 2005). La structure de la paroi et son organisation diffèrent selon le type de GRAM mis en évidence par le médecin Danois en 1884 (Bosgiraud-AEMIP, 2003) (**Figure 8**).

→ GRAM positif (GRAM⁺)

La paroi des bactéries à GRAM⁺ est constituée seulement d'une couche homogène de peptidoglycane (muréine ou mucopeptide) de 20 à 80 nm d'épaisseur, située à l'extérieur de la membrane cytoplasmique (**Figure 8**). Différentes structures se greffent sur le peptidoglycane (30 à 50%) telles que les acides techoïques, les polyosides ou des protéines. Les acides techoïques étant chargés négativement, ils sont en partie responsables de la charge négative de la surface cellulaire. Ces acides fonctionnent aussi en liant des cations bivalents comme Ca²⁺ ou Mg²⁺, dont certains sont transportés dans la bactérie. Certains acides techoïques sont reliés par des liaisons covalentes aux lipides membranaires et sont donc appelés acides lipotechoïques (Madigan et Martinko, 2007).

→ GRAM négatif (GRAM⁻)

La paroi des bactéries à GRAM⁻ est plus complexe et constituée d'une couche de faible épaisseur de peptidoglycane (3 nm d'épaisseur), entourée d'une membrane externe de 7 à 8 nm d'épaisseur (**Figure 8**). Cette dernière structure est généralement asymétrique et a un rôle important pour limiter l'entrée et la sortie des constituants. Comme toute membrane, elle est formée d'une double couche de phospholipides dans laquelle sont enchâssées des protéines. Le feuillet externe contient un lipide caractéristique, le lipopolysaccharide ou LPS (Madigan et Martinko, 2007).

La coloration de Gram est donc une des premières étapes dans la classification des microorganismes et repose sur une différence structurale entre ces deux types de paroi : existence ou non d'un espace, appelé espace périplasmique, entre la membrane externe et le peptidoglycane.

La **Figure 8** présente la structure d'une paroi des bactéries à Gram⁻ et à Gram⁺.

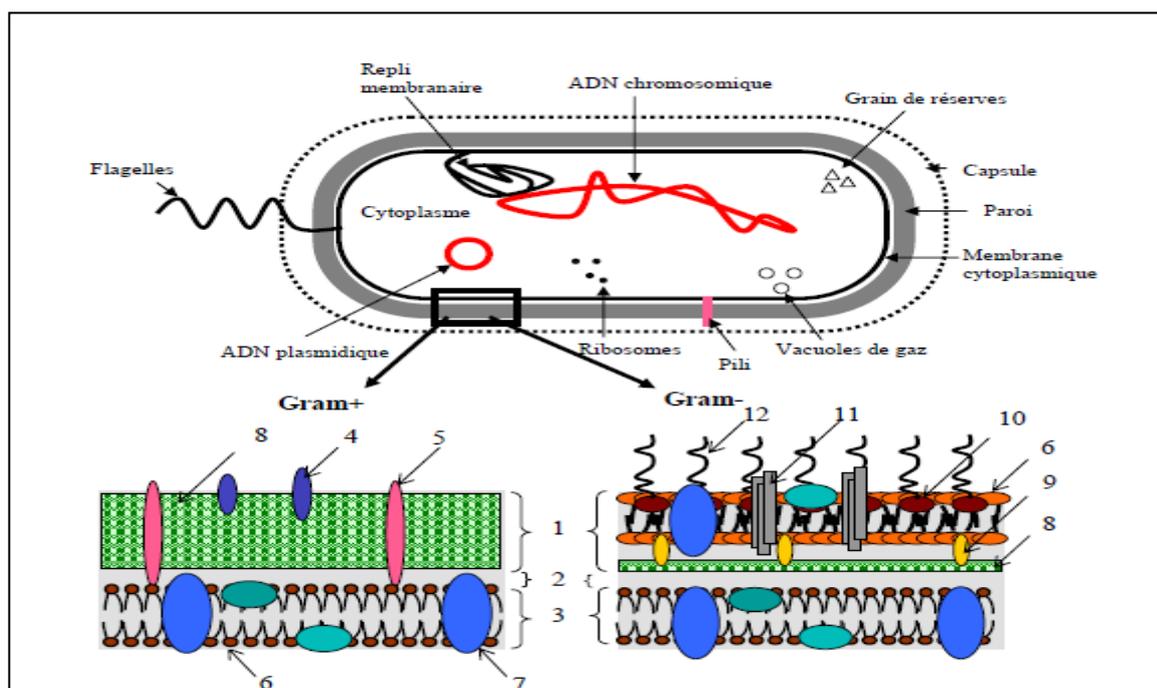


Figure 8 : Représentation schématique d'une paroi des bactéries gram négatif et positif. **1.** paroi **2.** espace périplasmique **3.** membrane plasmique **4.** acide teichoïque **5.** acide lipoteichoïque **6.** phospholipide **7.** protéine intrinsèque **8.** peptidoglycane **9.** lipoprotéines de Braun **10.** lipopolysaccharides **11.** porine **12.** chaînes latérales antigéniques (Boutaleb, 2007).

Le **Tableau II** montre la composition chimique des parois des bactéries Gram+ et Gram-.

Tableau II : Composition chimique des parois des bactéries Gram⁺ et Gram⁻ (+ : présence, - : absence) (Rubio, 2002)

Composition chimique	Gram ⁺	Gram ⁻
Mucopeptide	+	+
Polypeptide	+	+
Acide teichoïque	+	-
Acides aminés	24-35%	(sauf <i>E. coli</i>) 50%
Protéines	-	+
Lipides	(sauf <i>S. faecalis</i>) 1%	20%
Lipopolysaccharides	-	+
lipoprotéines	-	+

(+) : présence (-) : absence

I.7.2- Croissance bactérienne

I.7.2.1- Définition

En microbiologie, la croissance est définie comme une augmentation du nombre de cellules (Madigan et Martinko, 2007). Elle constitue une étape essentielle de la vie. Les cellules ont une période de vie limitée et le maintien d'une espèce est lié à une croissance continue de sa population. L'étude de la croissance microbienne a des implications pratiques dans de nombreux domaines. La croissance et le métabolisme des bactéries sont propres à chaque genre bactérien, permettant ainsi de les différencier (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1985 ; Madigan *et al.*, 2000). Le processus de la croissance bactérienne fait intervenir plus de deux mille réactions chimiques très variées. Certaines de ces réactions sont d'ordre énergétique, d'autres impliquent la biosynthèse de petites molécules (monomères de macromolécules) ou sont responsables de l'approvisionnement en cofacteurs et coenzymes nécessaires pour les réactions enzymatiques (Madigan et Martinko, 2007).

L'augmentation du nombre de cellules dans une culture bactérienne en croissance exponentielle constitue une progression géométrique d'ordre 2. Une cellule se divise pour en donner deux, puis ces deux cellules se divisent pour en donner quatre, et ainsi de suite. Ceci peut s'exprimer de la façon suivante : $2^0 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2$. La relation mathématique entre le nombre de cellules initiales et le nombre de cellules après une période de croissance exponentielle est la suivante : $N = N_0 2^n$ avec N le nombre de cellules finales, N_0 le nombre de cellules initiales, n le nombre de générations au cours de la croissance exponentielle (Madigan et Martinko, 2007).

I.7.2.2- Etapes de la croissance bactérienne

Lors de la réalisation d'une culture dans un tube ou un flacon, condition appelée *batch* ou *culture en milieu clos*, la croissance exponentielle ne peut se poursuivre indéfiniment. La concentration en cellules en fonction du temps suit une courbe de croissance typique, qui comprend une phase de latence, une phase exponentielle, une phase stationnaire et une phase de mort cellulaire ou de déclin (Madigan et Martinko, 2007).

❖ La phase de latence

Lorsqu'une population microbienne estensemencée dans un milieu de culture neuf, la croissance commence le plus souvent après une période appelée phase de latence. La durée de cette période peut être plus ou moins longue selon la culture d'origine et les conditions de culture (Madigan et Martinko, 2007).

❖ La phase exponentielle

Au cours de cette phase, chaque cellule se divise pour former deux cellules qui vont à leur tour se diviser pour produire plus de cellules, et ainsi de suite, et ce pendant une période plus ou

moins longue selon les ressources du milieu et d'autres facteurs. Les cellules en phase exponentielle de croissance sont dans l'ensemble dans le meilleur état physiologique possible. C'est pourquoi il est souhaitable d'utiliser des cellules en milieu de phase exponentielle pour l'étude de leurs enzymes ou tout autre composant cellulaire (Madigan et Martinko, 2007 ; Delhalle *et al.*, 2012).

❖ La phase stationnaire

Pendant la phase stationnaire, il n'y a ni augmentation, ni diminution de la concentration en cellules. Bien qu'il n'y ait pas de croissance, de nombreuses fonctions cellulaires, dont le métabolisme énergétique et les biosynthèses, se poursuivent. Chez certains organismes, une faible croissance peut en fait survenir au cours de cette phase stationnaire, mais il n'y a pas d'augmentation de la concentration nette de cellules. La production de cellules est compensée par la mort d'autres cellules. Ce phénomène est appelé croissance cryptique (Madigan et Martinko, 2007).

❖ La mort cellulaire

Si l'incubation se poursuit après la phase stationnaire, il se peut que les cellules se maintiennent en vie et continuent leur métabolisme, mais elles peuvent également mourir. Dans ce dernier cas, les cellules entrent dans la phase de déclin, avec selon les cas la lyse cellulaire (Cunin, 1993 ; Madigan et Martinko, 2007). La **Figure 9** montre une courbe de croissance bactérienne, avec les différentes phases de croissance.

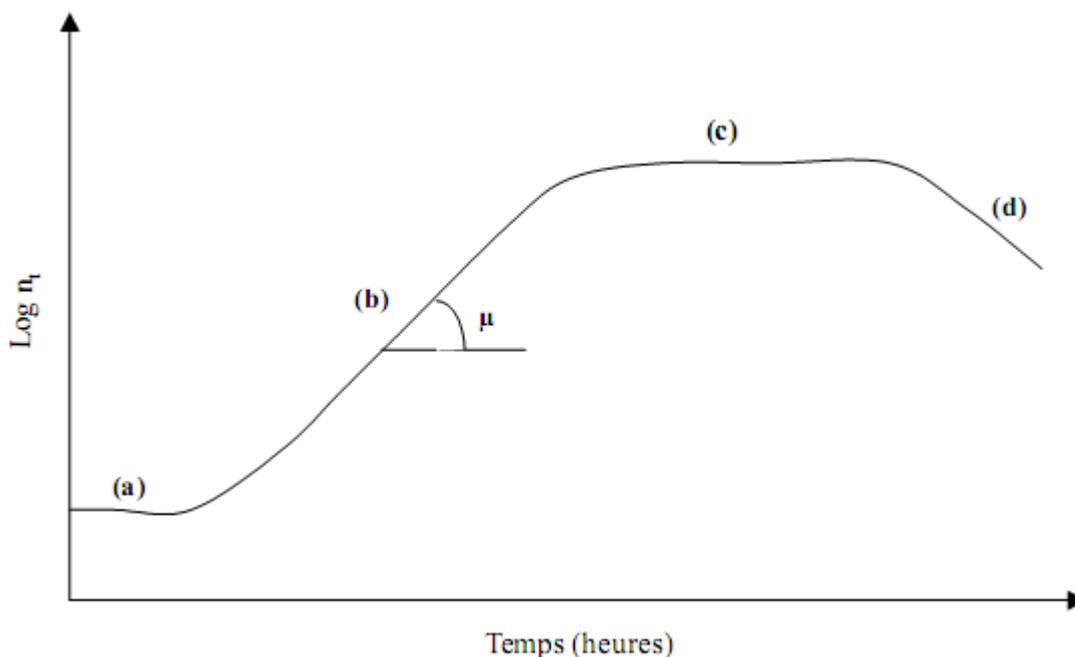


Figure 9 : Courbe de croissance bactérienne, (a) phase de latence, (b): phase de croissance exponentielle, (c) : phase stationnaire, (d) : phase de déclin, μ : taux de croissance cellulaire (Cunin, 1993 ; Delhalle *et al.*, 2012).

I.7.2.3- Impact de l'environnement sur la croissance bactérienne

I.7.2.3.1- Facteurs nutritionnels

Certains éléments sont nécessaires à la croissance des microorganismes. On peut citer :

- le carbone : il peut être d'origine organique (bactéries hétérotrophes) ou provenir du CO₂ (bactéries autotrophes). Une bactérie est constituée en moyenne de 50% de carbone (Madigan *et al.*, 2000).
- l'azote peut être d'origine variée : certaines bactéries sont capables d'assimiler l'ammoniac, les nitrates, l'azote atmosphérique et d'autres vont assimiler des acides aminés. Une bactérie est constituée en moyenne de 12% d'azote (Madigan *et al.*, 2000).
- le phosphate et le soufre : ces éléments sont nécessaires aux bactéries pour synthétiser respectivement les acides nucléiques et les acides aminés soufrés ; ils sont principalement d'origine inorganique (Madigan *et al.*, 2000).
- les facteurs de croissance : ce sont des composés organiques que les bactéries ne sont pas capables de synthétiser, mais qui sont indispensables pour leur survie. Il s'agit très souvent des acides-aminés et des vitamines.

I.7.2.3.2- Facteurs physico-chimiques

L'activité des microorganismes et donc leur croissance varie selon les conditions physiques et chimiques du milieu. La connaissance de l'impact de cet environnement permet à la fois de mieux comprendre leur distribution dans la nature, et de concevoir des méthodes pour contrôler ou favoriser les activités microbiennes. Certains facteurs clés remplissent une fonction majeure dans le contrôle de la croissance de l'ensemble des microorganismes. On peut citer par exemple la température et les radiations lumineuses (Madigan et Martinko, 2007 ; Nola *et al.*, 2010a)

I.7.2.3.2.1- Température

La température est l'un des paramètres de l'environnement le plus important, si ce n'est le plus important, vis-à-vis de l'impact sur la croissance et la survie des microorganismes. Pour chaque organisme, il existe une température minimale au-dessous de laquelle il n'y a pas de croissance, une température optimale où la croissance est plus rapide, et une température maximale au-dessus de laquelle la croissance n'est plus possible. L'optimum de température est toujours plus proche du maximum que du minimum. Ces trois gammes de température, appelées températures cardinales, sont caractéristiques de chaque organisme et peuvent être légèrement modifiées en fonction d'autres paramètres de l'environnement, notamment la composition du milieu de culture. On distingue quatre grands groupes de micro-organismes par rapport à leur relation à la température optimale de croissance. Il s'agit des psychrophiles (température optimale basse), des mésophiles

(température optimale moyenne), des thermophiles (température optimale élevée), des hyperthermophiles (température optimale très élevée) (Madigan et Martinko, 2007).

I.7.2.3.2.2- Lumière blanche

La lumière est constituée de radiations électromagnétiques pouvant être groupées en deux catégories : les radiations visibles et les radiations non visibles. Les rayonnements ultraviolets font partie du rayonnement non visible tout comme les rayons X, les micro-ondes ou encore les infrarouges. La gamme des ultra-violets est encore subdivisée en trois portions d'énergies décroissantes : UV-C (120-280 nm), UV-B (280-315 nm) et UV-A (315-380 nm) (**Figure 10**). Chaque rayonnement est caractérisé par sa longueur d'onde et son énergie. En effet, plus la longueur d'onde est faible, plus le rayonnement aura une forte énergie et inversement.

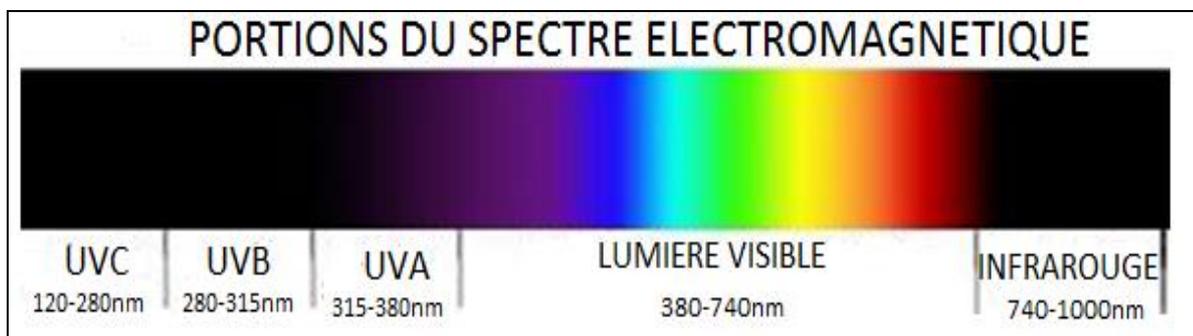


Figure 10 : Différentes portions du spectre électromagnétique (Downes et Blunt, 1877)

Les effets de la lumière sur les bactéries peuvent être observés à deux niveaux : sur la survie des bactéries et sur le phénomène d'adhésion. De tous les rayonnements du spectre électromagnétique, les UV représentent la portion la plus absorbée par les membranes vivantes, causant ainsi des dommages irréversibles. Les principaux dommages constatés après irradiation des bactéries concernent l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique). Selon Lester *et al.* (2001), la portion des UV-B du spectre de la lumière blanche est la plus bactéricide car induisant des lésions de l'ADN.

I.8- Adsorption bactérienne aux surfaces et Biofilm

I.8.1- Définition et propriétés de l'adsorption bactérienne

L'adsorption des bactéries aux surfaces est un aspect important de leur survie dans l'environnement (Boutaleb, 2007). En milieu aquatique, superficiel ou souterrain, ce phénomène se produit sur des surfaces biologiques ou non (Enriki, 2003). Lors de l'écoulement des eaux souterraines, l'adhésion des bactériopolluants aux surfaces telles que celles des roches est très souvent contrôlée par plusieurs facteurs dont l'état physiologique de la bactérie, l'environnement physico-chimique général du milieu, les interactions entre les cellules adhérentes d'une part, et entre

cellules et surfaces de la roche d'autre part (Fletcher, 1996). Elle est également une étape cruciale à la formation des biofilms (Barbara *et al.*, 1998).

L'adhésion bactérienne sur le support solide met en jeu différents types d'interactions selon la nature du substrat à coloniser. En effet, si le support est abiotique, la fixation sera médiée par des interactions non spécifiques de types hydrophobes. Au contraire lorsque l'adhésion se fait sur un tissu vivant (ou dévitalisé), elle met en œuvre des mécanismes moléculaires spécifiques type lectine ou adhésine (Dunne, 2002). Ce phénomène peu énergie-dépendant voire passif au début devient plus dépendant de l'énergie au fur et à mesure que le temps de contact s'allonge, probablement à cause du nombre de sites de fixation qui diminue (Simoni *et al.*, 1998).

I.8.2- Définition et description des biofilms

Un biofilm est un ensemble de microcolonies entourées d'une matrice hautement hydratée, anionique et constituée d'exopolysaccharides (Costerton *et al.*, 1995). Les bactéries fixées présentent des caractères physiologiques différents de celles vivant à l'état planctonique du fait de la diversité. Costerton *et al.* (1995) ont noté que l'adhésion des bactéries entraîne une modification de l'expression phénotypique d'au moins 30% des protéines cellulaires par rapport aux bactéries planctoniques. Un biofilm est aussi caractérisé par sa structuration spatiale qui repose sur des mécanismes de communication cellulaire complexes (Donlan, 2002). La formation d'un biofilm sur une surface, résultat d'un ensemble de processus physiques, chimiques et biologiques, comprend quatre étapes successives (Busscher *et al.*, 1995) que sont : le transport des microorganismes, l'adhésion initiale, la consolidation et la colonisation. La **Figure 11** illustre les différentes étapes de formation d'un biofilm.

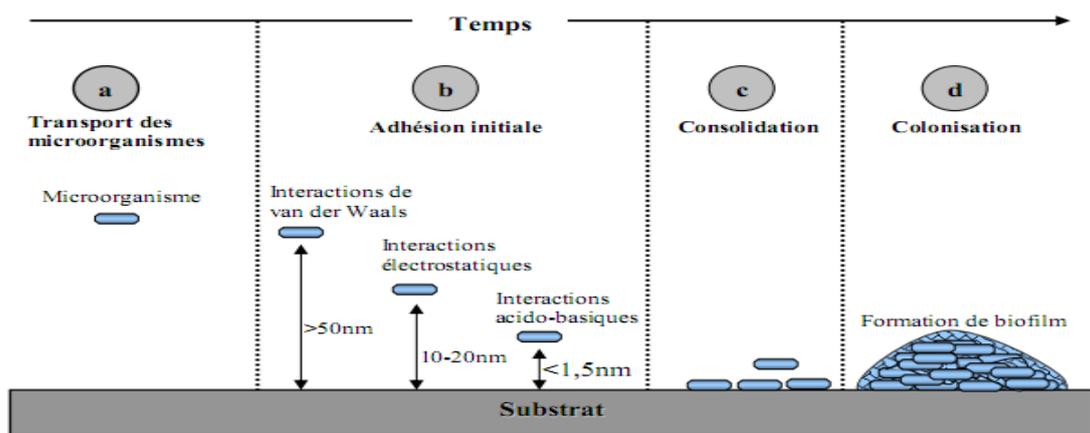


Figure 11: Grandes étapes de la formation d'un biofilm (a : transport des microorganismes, b : attachement des microorganismes à la surface des conduits du réseau, c : consolidation, d : colonisation du support) (Boutaleb, 2007)

I.8.3- Facteur influençant l'adhésion des bactéries

Les paramètres influençant l'adhésion cellulaire peuvent se résumer en facteurs liés aux microorganismes, d'autres liés aux propriétés physico-chimiques (pH, température...) de l'eau, d'autres structuraux (nature du matériau) et d'autres qui se traduisent par la disponibilité en nutriments, et finalement, des facteurs liés à la présence de certains produits toxiques pour les bactéries, tels que les désinfectants. Le **Tableau III** présente les facteurs influençant l'adhésion initiale d'un microorganisme sur une surface solide.

I.8.3.1- Facteurs liés aux microorganismes

Selon qu'ils sont dotés ou non d'une mobilité (grâce à des flagelles par exemple), l'adhésion des microorganismes aux supports inertes est favorisée ou non. L'adaptabilité et la capacité des microorganismes à produire des exopolysaccharides (EPS) est également un facteur qui favorise leur adhésion aux supports, surtout durant les phases post-adhésion initiales gérées essentiellement par les interactions spécifiques (biologiques). Les propriétés physico-chimiques de la paroi cellulaire (charge, caractère hydrophobe/hydrophile, acide ou basique) dépendent de sa composition (Latrache *et al.*, 1993), et de leur métabolisme, celles-ci changeant en fonction des conditions de culture (température, composition du milieu nutritif...), du type de Gram de l'espèce bactérienne, et donc influencent l'adhésion bactérienne aux supports (Bellon-Fontaine et Cerf, 1991). L'âge de la culture joue également un rôle important puisque Stanley (1983) a montré, en effet, que l'attachement de *P. aeruginosa* est meilleur en phase exponentielle de croissance par rapport à la phase stationnaire. Little *et al.* (1986) ont montré que *Pseudomonas marina* est plus hydrophobe en phase stationnaire et adhère mieux durant cette phase par rapport à la phase exponentielle, le même résultat ayant été observé par Van Loosdrecht *et al.* (1987, 1990) sur de nombreuses espèces bactériennes.

I.8.3.2- Facteurs liés aux propriétés et structure du substrat

Plusieurs facteurs caractérisent le support adsorbant. On peut citer entre autres sa nature, sa rugosité, sa stabilité, son caractère hydrophobe ou hydrophile.

I.8.3.2.1- Nature du substrat

L'adhésion bactérienne aux supports est fonction des propriétés physico-chimiques de ce dernier. Kuhn *et al.* (2002) ont montré que l'adhésion de *Candida albicans* était souvent importante sur des supports plastiques à caractère hydrophobe. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Gallardo Moreno *et al.* (2002) pour *Enterococcus faecalis* avec une adhésion plus importante sur du silicone comparée au verre. Reynolds et Fink (2001), ont observé pour des supports hydrophobes, que les levures de boulangerie sont capables d'adhérer au polystyrène, au polypropylène et dans une

Tableau III : Facteurs influençant l'adhésion initiale d'un microorganisme sur une surface solide (Guillemot 2006).

Caractéristiques	Influence sur l'adhésion	
Facteurs liés au microorganisme	Hydrophobicité	Augmente sur supports hydrophobes
	Concentration	Augmente
	Espèce	Espèce dépendante
	Phase de croissance	Généralement plus marquée en phase stationnaire
Facteurs liés au support	Rugosité	Variable
	Hydrophobicité	Augmente le microorganisme est hydrophobe
	Nature et charge du support	Microorganisme dépendante
Facteurs environnementaux	Temps de contact	Augmente
	Température du fluide	Espèce dépendante
	Force ionique du fluide	Espèce dépendante (une force ionique élevée diminue les répulsions électrostatiques)
	pH du fluide	Espèce dépendante
	Contamination par l'atmosphère	Variable (présence de carbone à la surface du support)
	Présence de macromolécule dans le fluide	Variable (adsorption des macromolécules sur le support et changement de ses propriétés de surface (chimie, hydrophobicité, rugosité))

moindre mesure au PVC. Lethola *et al.* (2004, 2005) ont noté que le biofilm formé sur des conduites de polyéthylène est plus important que le biofilm formé sur des conduites de cuivre.

I.8.3.2.2- Rugosité et stabilité du matériau

La rugosité est un paramètre qui traduit l'importance de la surface de contact avec l'eau. Une forte rugosité augmente donc significativement les sites de fixation (microcrevasses) pour les microorganismes, favorisant ainsi leur adhésion aux parois de conduites et les protégeant des phénomènes de cisaillement hydrodynamiques (Van Loostrecht *et al.*, 1990 ; Bellon-Fontaine et Cerf, 1991).

I.8.3.2.3- Caractère hydrophobe du substrat (mesure d'angle de contact)

La mesure d'angle de contact est une technique permettant d'évaluer la mouillabilité d'une surface (la capacité d'une goutte à s'étaler sur la surface) (Modaressi et Garnier, 2002). Elle consiste à y déposer une goutte d'un liquide de propriétés connues et à mesurer l'angle formé par la tangente du profil de celle-ci avec la surface réceptrice au point triple. La mesure d'angle de contact θ permet d'avoir accès au caractère hydrophobe/hydrophile du support lorsque le liquide de référence est de l'eau. Pour ce faire, on dépose une goutte d'eau sur la surface et l'angle θ est mesuré:

- Si $\theta > 90^\circ$, la goutte ne s'étale pas (le support est hydrophobe) ;
- Si $30 < \theta < 90^\circ$, le support est moyennement hydrophobe/hydrophile ;
- Si $\theta < 30^\circ$, la goutte d'eau s'étale sur le support (le support est hydrophile).

Le suivi cinétique de l'étalement ou de l'évaporation de la goutte déposée sur le support permet également d'obtenir des informations sur l'homogénéité chimique ou physique et la rugosité de la surface (Bulard, 2012).

La **Figure 12** montre la variation de l'angle de contact d'une goutte déposée sur une surface en fonction de leurs affinités.

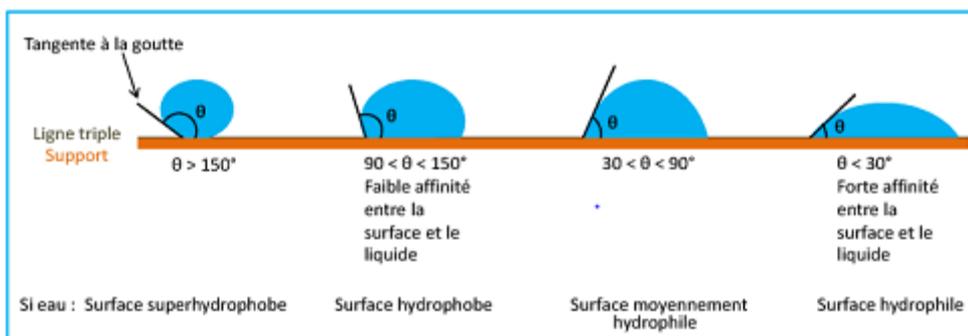


Figure 12: Angle de contact d'une goutte déposée sur une surface en fonction de leurs affinités (Bulard, 2012)

I.9- Adhésion et résistance aux agents antimicrobiens

Les microorganismes à l'état adhérent ou en biofilm peuvent être 10 à 1000 fois plus résistants aux agents antimicrobiens que leurs homologues planctoniques (Allion, 2004). Cette résistance aux agents antimicrobiens est multifactorielle. Elle dépend notamment de la présence et de la composition du glycocalyx, de l'état physiologique des bactéries ou encore de la localisation des cellules au sein du biofilm.

Le glycocalyx peut avoir un rôle protecteur en limitant l'accès des antimicrobiens aux microorganismes ou en "consommant" les agents désinfectants avant qu'ils n'atteignent les cellules microbiennes (De Beer *et al.*, 1994). Ainsi, il a été observé que l'efficacité bactéricide du chlore variait en fonction du contenu extracellulaire des polysaccharides de biofilms d'*Escherichia coli* (Samrakandi *et al.*, 1997). Cette efficacité moindre peut s'expliquer par une diffusion limitée des désinfectants au sein des biofilms.

I.9.1- Etat physiologique des cellules adhérentes

Des études ont montré que l'adhésion des microorganismes aux surfaces peut s'accompagner d'importantes modifications phénotypiques des cellules microbiennes. L'état fixé des bactéries aux surfaces entraînerait une modulation de l'expression des gènes bactériens (Stantley *et al.*, 2003), et par conséquent une variation de la synthèse de nombreux constituants cellulaires. Ainsi, des protéines de surface, des exopolysaccharides peuvent être surexprimées chez les cellules adhérentes (Davies *et al.*, 1993 ; Lee *et al.*, 1993 ; Takeo *et al.*, 1994). Les appendices cellulaires tels que les flagelles, nécessaires à leur mobilité, seraient également synthétisés par les cellules fixées.

I.9.2- Localisation au sein du biofilm

Le taux de croissance cellulaire dépend de la localisation des microorganismes dans le biofilm. Ceux situés au centre des biofilms auront une croissance ralentie comparativement aux cellules en périphérie, pouvant être moins sensibles aux agents bactéricides (Walters III *et al.*, 2003). La résistance des biomasses fixées aux oxydants s'explique par : la consommation de l'oxydant par le biofilm lui-même, une pénétration limitée du chlore jusqu'aux couches basales du biofilm, à l'origine d'un gradient de concentration en désinfectant depuis les couches superficielles vers les couches plus profondes et la densité cellulaire du biofilm (Gauthier, 2002).

La **Figure 13** illustre le gradient de résistance aux biocides des variantes phénotypiques au sein des biofilms, ainsi que la fraction résistante, suivie de la reprise de croissance.

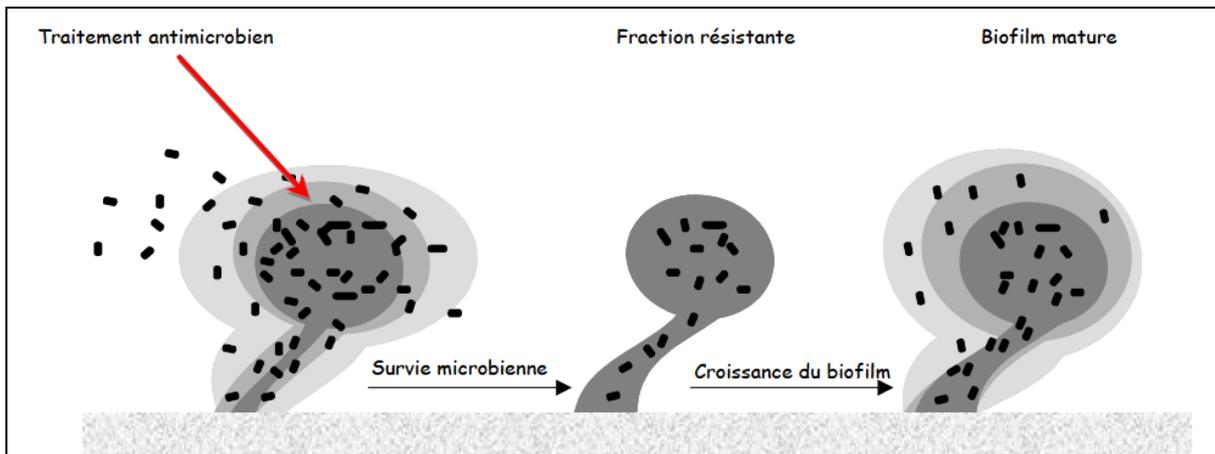


Figure 13: Schématisation de la résistance aux biocides des variantes phénotypiques au sein des biofilms (Drenkard, 2003)

I.10- Destruction du biofilm dans l'environnement aquatique

Le réseau de distribution d'eau potable est souvent le théâtre de nombreuses réactions physicochimique et biologique résultant des interactions entre les désinfectants, les parois des canalisations et les biomasses libres et fixées. La microbiologie des réseaux de distribution d'eau potable est d'une importance capitale en raison des risques sanitaires à court terme et des dégradations générales de la qualité de l'eau ou des ouvrages (Dukam *et al.*, 1995).

Ce réseau est colonisé par des bactéries hétérotrophes, saprophytes, dont un grand nombre n'est pas identifié. Une grande variété de ces bactéries, allant des germes potentiellement pathogènes, aux coliformes et différents autres types, a été isolée à partir des biofilms (Boutaleb, 2007). Ces types bactériens trouvent des conditions favorables et prolifèrent dans ces systèmes. Pour remédier à cette situation, le recours à l'usage des désinfectants est courant. L'efficacité de ces désinfectants dans un réseau de distribution d'eau potable est variable d'une application à une autre (Allion, 2004). Le chlore est un désinfectant très efficace pour l'inactivation des bactéries et notamment des bactéries pathogènes telles que *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* et *Shigella dysenteriae*. Cependant, il présente une pénétration limitée dans le biofilm et le maintien d'un résiduel de chlore approprié a un effet limité sur la croissance bactérienne. La destruction du biofilm est ainsi relativement difficile.

I.11- Méthodes d'analyse bactériologique de l'eau

Il existe plusieurs méthodes d'analyses bactériologiques capable de fournir des informations qualitatives ou quantitatives sur la présence des bactéries dans un milieu (Rodier, 1996 ; Holt *et al*, 2000).

I.11.1- Méthodes classiques de détection et de dénombrement des germes

I.11.1.1- Détection et dénombrement par microscopie

L'utilisation d'un ou plusieurs colorants spécifiques est indispensable pour la détection et la numération des bactéries au microscope. Ces colorants permettent de les rendre plus visibles. Les méthodes utilisées permettent d'observer les formes propres des cellules.

I.11.1.2- Techniques de Gram

Une double coloration au violet de gentiane et à la fuchsine basique permet à ces colorants de se fixer électivement sur la paroi bactérienne en fonction de la composition chimique de celle-ci (Larpent et Larpent-Gourgard, 1985). L'utilisation du mélange alcool-acétone sépare ou non les deux colorants. La liaison établie entre deux colorants reste intacte et la paroi prend une coloration violette lorsqu'il s'agit d'une bactérie à Gram⁺. Par contre, si la bactérie est à Gram⁻, la liaison se rompt alors, le premier colorant (violet de gentiane) est éliminé par le mélange alcool-acétone et la paroi prend une teinte rouge-rose caractéristique.

Les bactéries peuvent être dénombrées au microscope et leur nombre par millilitre calculé. Cette méthode est cependant imprécise du fait de la perte éventuelle des bactéries au cours des lavages successifs qu'impose la technique.

I.11.1.3- Techniques de dénombrement direct par microscope à épifluorescence

Dans les dénombrements directs au microscope à épifluorescence, le colorant est un fluorochrome ; l'acridine orange et le DAPI (4,6-diamino-2-phénylindole) sont couramment utilisés. Les bactéries présentes dans un volume donné d'eau à analyser (ou dans une dilution de celle-ci), sont retenues par filtration sur une membrane nucléopore dont le diamètre est de 0,20 µm. Après coloration par un fluorochrome spécifique des acides nucléiques, la membrane est examinée au microscope sous éclairage UV et le dénombrement est ensuite effectué.

Connaissant le volume d'eau filtrée V, le diamètre du champ microscopique et celui de la surface filtrante de la membrane, la concentration N des bactéries dans l'eau analysée est déterminée par la formule : $N = S/S' \times n (V \times M)$ (Lindstrom, 2000; Canosa et Pinilla, 2001) où

S = Surface filtrante de la membrane

S' = Surface du champ microscopique

n = Nombre de cellules comptées

M = Nombre de champs microscopique

V = Volume d'eau filtré

Cette méthode a l'avantage de permettre le dénombrement de tous les germes présents, viables ou non. Cependant, elle ne donne aucune indication sur l'identification des espèces.

I.11.2- Détection et dénombrement des germes viables

La numération des germes viables peut être réalisée par culture sur milieu solide ou liquide.

I.11.2.1- Culture sur milieu solide

Selon Marchal *et al.* (1991), la cinétique de croissance des germes intègre trois paramètres : la composition du milieu, la durée et la température d'incubation.

Sur un milieu solide (milieu gélosé), la culture peut se faire soit :

- par étalement en surface (technique de platage). Dans ce cas, l'étaleur emporte très souvent des cellules qui lui sont adhérentes, ce qui conduit à la sous-estimation des résultats (Larpen et Larpen-Gourgaud, 1985) ;
- par inclusion en une ou deux couches. Cette approche ne permet pas un ré-isolément de la cellule pour une culture pure (Larpen et Larpen-Gourgaud, 1985) ;
- par filtration sur membrane. Cette méthode utilise des milieux de culture spécifiques et semble être la plus fiable (Ford, 1994 ; Rompre *et al.*, 2002).

I.11.2.2- Culture sur milieu liquide

La méthode du nombre le plus probable (NPP) et celle des tubes multiples sont les plus utilisées (Rodier, 1996).

➤ Méthode du nombre le plus probable (NPP)

Son principe qui repose sur l'hypothèse d'une distribution statistiquement normale des bactéries dans un milieu liquide ne fournit qu'une valeur approchée de la quantité de bactéries (Rodier, 1996).

➤ Technique des tubes multiples

Ce procédé implique que la croissance des germes est appréciée soit par le trouble du milieu après incubation, soit par le virage d'un indicateur coloré traduisant une acidification du milieu, soit encore par la production de gaz (Rodier, 1996 ; Rompré *et al.*, 2002). Le résultat fourni est ainsi plus qualitatif que quantitatif.

I.11.3- Méthodes rapides de dénombrement des germes

I.11.3.1- Dénombrement des germes par la méthode turbidimétrique

Ce procédé est utilisé pour évaluer la cinétique de croissance des microorganismes (Rodier, 1996). Son principe consiste à faire traverser un faisceau lumineux à travers une suspension microbienne. Une partie de la lumière incidente est diffusée par les cellules ; à la sortie on distingue un pinceau central affaibli et un cône de diffusion. L'intensité du pinceau central est mesurée au spectrophotomètre et est proportionnelle à la concentration microbienne de l'échantillon. Grâce à une courbe d'étalonnage, on peut donc évaluer la concentration cellulaire.

I.11.3.2- Réaction de bioluminescence du système ATP luciférine-luciférase

Selon George *et al.* (2000) la réaction de bioluminescence du verre luisant, qui met en œuvre un pigment, la luciférine, et une enzyme, la luciférase, permet de doser l'ATP avec une haute sensibilité.

Le principe est simple, il consiste à recueillir les cellules sur un filtre et à en extraire l'ATP par un agent approprié. Le procédé est utilisable pour évaluer la contamination microbiologique d'un échantillon d'eau. Cette préparation devient plus complexe quand il faut distinguer l'ATP microbien recherchée de l'ATP étranger (Rodier, 1996 et George *et al.*, 2000).

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

II.1- Description de la région de récolte du matériel végétal et biologique

Les feuilles d'*Eucalyptus microcorys* ont été récoltées à Yaoundé, capitale politique du Cameroun (Afrique Centrale). Les espèces bactériennes choisies ont été isolées des eaux de surface de la ville de Yaoundé (Cameroun) à l'exception des souches de *Vibrio cholerae* et *Salmonella typhi* qui ont été fournies par le Laboratoire de Microbiologie et Environnement du Centre Pasteur du Cameroun.

II.1.1- Relief

Yaoundé est une ville très accidentée, pratiquement entourée d'une chaîne de montagnes dont sept des plus élevées d'où le nom : « ville aux sept collines » entre autres le mont Mbankolo, le mont Fébé, le mont Mvolyé et le plus haut le mont Eloundem (2 200 m) d'altitude (Kanga, 2014).

II.1.2- Climat et réseau hydrographique

La ville de Yaoundé est située de 3°52' de latitude Nord à 11°32' de longitude Est, à une altitude moyenne de 759 m (Kengne Fodouop, 1993). Elle couvre aujourd'hui une superficie d'environ 256 km².

Le réseau hydrographique de la ville de Yaoundé est très diversifié et constitué essentiellement de ruisseaux qui sont pour la plupart permanents, de rivières, de lacs et d'étangs. Les ruisseaux sont nombreux et se jettent dans les quatre principales rivières qui sont la Mefou (à l'Ouest et Sud-Ouest), l'Anga'a (à l'Est et Sud-Est), le Mfoulou (au Nord-Est) et le Mfoundi (au Centre). Les cours d'eau Anga'a et Mfoundi sont des affluents de la Mefou qui appartient au bassin du Nyong tandis que le Mfoulou appartient au bassin de la Sanaga.

Le Mfoundi, affluent de la Mefou, prend sa source au pied du Mont Fébé, à 950 m d'altitude. Il traverse la ville du Nord au sud et son bassin très étendu, draine les eaux du Ntongolo, du Ntem, de l'Ebogo, de l'Ewoué, de l'Aké, de l'Abiergué-Est grossi de l'Ekozoa, du Mingo, de l'Olézoa et de la Biyemé. Le régime de ce réseau hydrographique est surtout fonction des précipitations.

La région de Yaoundé est soumise à un climat particulier que Suchel (1972) a appelé « climat Yaoundéen ». C'est un climat de type équatorial chaud et humide. La température moyenne est de l'ordre de 23°C, avec une amplitude thermique d'environ 2,5°C. La moyenne des précipitations annuelles se situe entre 1300 et 1500 mm de pluies.

Le climat de Yaoundé est caractérisé par quatre saisons qui sont :

- une petite saison des pluies qui s'étend de la mi-mars à la mi-juin ;
- une petite saison sèche qui va de la mi-juin à la mi-août ;

- une grande saison des pluies qui va de la mi-août à la mi-novembre, avec son paroxysme en septembre et octobre,

- une grande saison sèche de mi-novembre à mi-mars de l'année suivante.

La durée d'une saison peut cependant varier d'une année à l'autre (Kueté, 1977; Sighomnou, 2004).

II.1.3- Végétation

La végétation est du type intertropical avec prédominance de la forêt humide méridionale (Wéthé, 2003). Elle est composée des grands arbres de la forêt dense tropicale humide aux fûts élancés, droits pour ne se ramifier qu'à leur sommet et la base large avec les accotements ailés ou contreforts tels que *Milicia excelsa*, *Entandophragmacylindricum*, *Guibourtiatessmannii*, le *Nauclea diderrichii* (Kanga, 2014).

II.1.4- Sol : pédologie, pétrographie, pétrologie, minéralogie

Les formations géologiques de la ville de Yaoundé appartiennent toutes au socle ancien (Pelletier, 1969). Son relief est caractérisé par de nombreux talwegs et interfluves (Eno-Belinga, 1982). La ville repose sur un socle granito-gneissique très tectonisé (Yongue-Fouateu, 1986). Ce sont des roches hétérogènes plus ou moins quartzieuses ou feldspathiques, avec des lits minéraux qui comprennent de la biotite, du grenat, de l'amphibole et du disthène. Les formations superficielles se constituent de sols ferrallitiques rouges lessivés qui ennoient le socle. La nature et la consistance de ces sols varient en fonction des unités de relief : des sols jeunes du massif montagneux, on passe aux sols ferrallitiques évolués du plateau, et aux formations colluviales/alluviales des fonds de vallées. Il est insaturé et a un pH acide qui en général est inférieur à 5 (Bachelier, 1959 ; Pelletier, 1969 ; Yongue-Fouateu, 1986). Le pourcentage de sable est plus élevé en surface (73%) et diminue au fur et à mesure que la profondeur du sol augmente (Humbel et Pellier, 1969). La granulométrie subit une fluctuation spatiale et varie de 17 à 80%. La porosité et la densité réelle du sol fluctuent respectivement de 5 à 71%, et de 2,7 à 3,1 (Bachelier, 1959; Humbel et Pellier, 1969).

II.2- Matériel

II.2.1- Matériel végétal utilisé et période de collecte

Le matériel végétal utilisé est constitué des feuilles d'*Eucalyptus microcorys*, plante appartenant à la famille des Myrtacées. L'*Eucalyptus microcorys* a été choisi en raison de la présence dans son extrait des molécules bactéricides tels que les tannins, les anthocyanines, les anthraquinones, les terpènes et les composés formylés du phloroglucinol (FPC) (Marsh, 2003 ; Ngo *et al.*, 2003 ; Moore *et al.*, 2005 ; Donadieu, 2008). La disponibilité dans la région, la récolte aisée et le séchage rapide des feuilles sont aussi des critères ayant justifiés le choix de cette plante.

Les feuilles fraîches d'*Eucalyptus microcorys* ont été récoltées dans un jardin du quartier Simbock dans la ville de Yaoundé (Cameroun, Afrique Centrale). Ces feuilles ont été récoltées durant la période de septembre 2011 à décembre 2012. Elles ont été identifiées à l'Herbier National du Cameroun (HNC), par comparaison à un échantillon disponible à l'herbier nationale du Cameroun, suivant le numéro d'identification 4080/SRFK, et par identification de leurs propriétés. La **Figure 14** est une photographie des feuilles fraîches et sèches d'*Eucalyptus microcorys* au laboratoire.

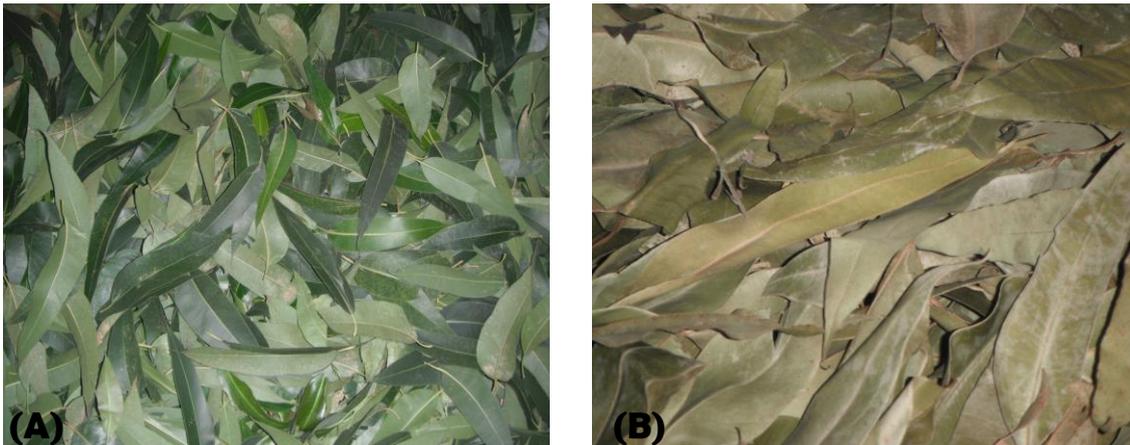


Figure 14 : *Eucalyptus microcorys* (A) : Feuille fraîches, (B) : Feuille sèche

II.2.2- Bactéries utilisées

Au total 5 souches bactériennes regroupées en bactéries commensales et pathogènes strictes ont été utilisées dans cette étude. Il s'agit :

- **des bactéries commensales** : *Escherichia coli* commensale, *Enterococcus faecalis* ;
- **des bactéries pathogènes strictes** : *Escherichia coli* entéro-pathogène, *Salmonella typhi* et *Vibrio cholerae*.

Ces bactéries ont été choisies en raison de leur importance en hygiène, en santé publique, et de leur rôle dans la caractérisation de la qualité de l'eau de consommation (Le Minor et Veron, 1989 ; OMS, 2004, 2009). *E. coli* et *E. faecalis* par exemple, sont des indicateurs de pollution fécale de l'eau.

Les bactéries *Vibrio cholerae* et *Salmonella typhi* ont été obtenues au Centre Pasteur de Yaoundé et *Enterococcus faecalis*, *E. coli* commensale et entéro-pathogène, ont été isolées et identifiées au Laboratoire d'Hydrobiologie de l'Université de Yaoundé I (**Tableau IV**).

Tableau IV: Caractéristiques et origine des espèces bactériennes

Espèce bactérienne	Origine	Coloration de Gram
<i>E. coli</i> commensale	Laboratoire d'Hydrobiologie et environnement	-
<i>E. coli</i> entéropathogène		-
<i>Enterococcus faecalis</i>		+
<i>Salmonella typhi</i>	Centre Pasteur du Cameroun (CPC)	-
<i>Vibrio cholerae</i>		-

II.2.3- Choix du support solide pour les tests d'adsorption cellulaire

Le polyéthylène haute densité (PEHD) a été choisi comme support d'adhésion. Ce choix a été motivé par plusieurs raisons, notamment sa résistance relativement élevée aux chocs, aux hautes températures et aux ultra-violets (Coeyrehourcq, 2003 ; Boutaleb, 2007), sa forte utilisation dans la construction des réseaux de distribution d'eau potable, ainsi que dans la fabrication d'ustensiles ménagers (tonneaux, seaux, bidons) pour les réserves d'eau. De plus, le caractère hydrophobe de ce matériau fait de lui un matériau favorable à l'adhésion des bactéries (Boutaleb, 2007). Le polyéthylène utilisé dans cette étude est commercialisé par Goodfellow SARL (France).

Trente fragments de polyéthylène de surface totale 13,28 cm² chacun ont été confectionnés à partir d'un segment de tuyau en polyéthylène. Ces fragments ont été taillés sous la forme d'un parallélépipède rectangle (Longueur = 4,094 cm, largeur = 1 cm, épaisseur = 0,5 cm) à l'aide d'une lame de scie (**Figure 15**). Ces dimensions ont été retenues pour faciliter l'entrée des supports dans les tubes à essai (pour le décrochage des cellules adhérees) (Noah Ewoti *et al.*, 2011; MOUNGANG *et al.*, 2013).

Soit **A** la surface totale de ce support, **S1**, **S2** et **S3** étant les surfaces des faces 1, 2 et 3 respectivement

$$A = 2(S1 + S2 + S3) = 13,28 \text{ cm}^2$$

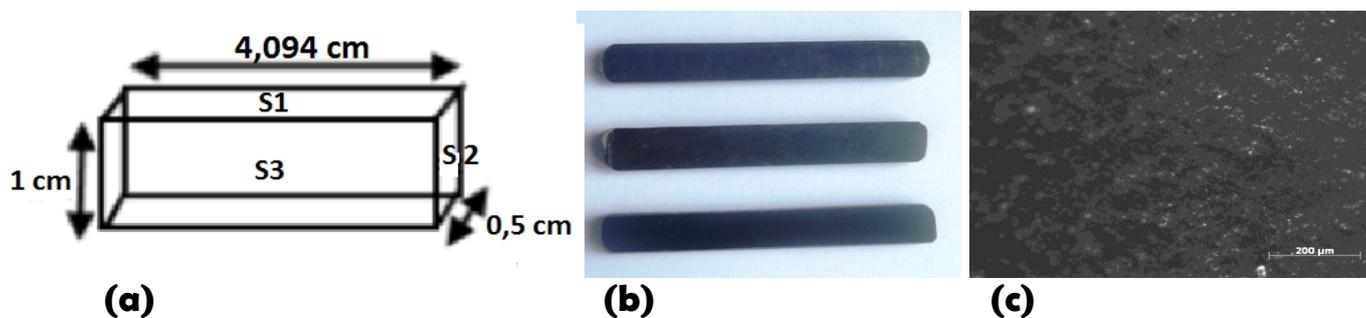


Figure 15 : Représentation graphique (a), photographie (b) et microscopie électronique à balayage (c) du polyéthylène.

II.3- Méthodes

II.3.1- Préparation des extraits, solutions d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* et screening phytochimique

II.3.1.1- Préparation de l'extrait aqueux d' *Eucalyptus microcorys*

Les feuilles d'*Eucalyptus microcorys* ont été séchées pendant 2 mois au laboratoire à température ambiante (23 ± 2 °C). Elles ont ensuite été moulues. Une suspension de 50 g de cette poudre est mélangée à 200 ml d'eau distillée stérile bouillante puis portées à ébullition pendant 30 mn. Le mélange est ensuite décanté et le surnageant est filtré sur du papier filtre N°4. Ce filtrat obtenu constitue le décocté. Ce filtrat est séché à l'étuve à la température 45 ± 2 °C jusqu'à évaporation totale. Cette procédure a été préférée à la lyophilisation pour être le plus proche possible des conditions d'utilisation de la plante par les naturopathes. La poudre ainsi obtenue a été ensuite utilisée pour la préparation des solutions aqueuses d'extrait à partir d'eau physiologique stérile.

Le rendement moyen des extractions a été calculé. Le rendement de l'extraction est le rapport de la masse de poudre sur la masse de la poudre végétale (50 g) utilisée. Ce rendement a été de 22,43 %.

II.3.1.2- Préparation des solutions d'extrait à différentes concentrations

Une gamme de six concentrations d'extrait à savoir 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; et 2 % a été préparée en utilisant de l'eau physiologique stérile. Chaque concentration a ensuite été filtrée d'abord à l'aide du coton stérile, puis sur membrane Whatman, et enfin sur membrane en nitrate de cellulose de porosité 0,45 μm (De Souza *et al.*, 1995) (**Figure 16**).



Figure 16: Solution d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* : en (A), filtration avec du coton ; en (B) : filtration sous vide avec une membrane en nitrate de cellulose de porosité 0.45 μm .

II.3.1.3- Criblage phytochimique des extraits de plantes

Dans le but de déterminer les différentes classes de composés potentiellement bioactifs présentes dans ces extraits, un criblage phytochimique a été réalisé selon les méthodes de Trease et Evans (1983) ; Odebeyi et Sofowara (1978), Rizk (1982), Pareck *et al.* (2007). Ce criblage phytochimique a été réalisé au Laboratoire de phytobiochimie et des plantes médicinales de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé 1.

II.3.1.3.1- Caractérisation des polyphénols

Deux cent cinquante milligrammes d'extrait d'*E. microcorys* dissous dans 5 ml de méthanol sont chauffés pendant 5 minutes. Ensuite, 3 gouttes d'une solution de cyanure ferrique fraîchement préparée sont ajoutées. La formation de la coloration bleu-vert marque la présence des polyphénols.

II.3.1.3.2- Caractérisation des triterpènes et des stérols

Cent milligrammes d'extrait d'*E. microcorys* sont dissouts dans du chloroforme. A cette solution, sont ajoutés successivement de l'anhydride acétique et de l'acide sulfurique. La présence des triterpènes se manifeste par l'apparition de la couleur rouge violacée alors que la couleur bleu-verdâtre indique celle des stérols.

II.3.1.3.3- Caractérisation des alcaloïdes

Cent milligrammes d'extrait d'*E. microcorys* sont chauffés dans 10 ml d' H_2SO_4 2 % pendant 2 minutes, puis filtré. Dans 1 ml du filtrat, on ajoute 3 à 4 gouttes de réactif de Meyer. L'obtention d'un précipité blanc ou turbidité indique la présence d'alcaloïdes.

II.3.1.3.4- Caractérisation des saponines

Deux cent milligrammes d'extrait d'*E. microcorys* sont ajoutés à 5 ml d'eau distillée. Après homogénéisation, le mélange est vigoureusement chauffé jusqu'à ébullition. L'apparition et la persistance d'une mousse après 20 minutes, révèle la présence des saponines.

II.3.1.3.5- Caractérisation des tannins gallique et cathéchique

Dans une solution alcoolique ou aqueuse d'extrait d'*E. microcorys*, on ajoute 3 à 4 gouttes de chlorure ferrique. La présence des tannins se manifeste par un changement de coloration de la solution : la coloration bleue foncée traduit la présence des tanins galliques alors que la coloration vert-noirâtre traduit la présence des tannins cathéchiques.

II.3.1.3.6- Caractérisation des flavonoïdes

Deux cent cinquante milligrammes d'extrait d'*E. microcorys* sont dissous dans 2 ml de soude normale. La décoloration la couleur jaune obtenue après addition d'HCl confirme la présence des flavonoïdes.

II.3.1.3.7- Caractérisation des lipides

Quelques gouttes de l'extrait d'*E. microcorys* sont déposées sur du papier filtre. Le papier est séché à température ambiante pendant 30 minutes et l'apparition des tâches translucides indique la présence des lipides.

II.3.1.3.8- Caractérisation des Anthraquinones

Cinquante milligrammes d'extrait d'*E. microcorys* sont dilués dans 2 ml de chloroforme et 2 ml d'éther de pétrole. Le mélange obtenu est homogénéisé et filtré. A 1 ml du filtrat, est ajouté 1 ml de NaOH 10%. L'apparition de la coloration rouge indique la présence des anthraquinones.

II.3.1.3.9- Caractérisation des Anthocyanines

Cinquante milligrammes d'extrait d'*E. microcorys* sont dissouts dans 15 ml de HCl 1 %. Le mélange est ensuite chauffé au bain marie. Le changement de coloration de rouge orangé au bleu-orangé indique la présence des anthocyanines.

II.3.2- Isolement, caractérisation culturelle et biochimique des microorganismes utilisés

II.3.2.1- Isolement, caractérisation culturelle et biochimique d'*Escherichia coli*

L'isolement d'*Escherichia coli* a été fait sur milieu gélosé Endo (Bio-Rad), incubé à la température de 44 °C pendant 24 à 48 heures. Les tests d'agglutination ou d'hémolyse ont été réalisés selon la méthode décrite par Nougang *et al.* (2011). Le principe est basé sur la propriété que les organismes portant des antigènes donnés sont agglutinés en présence d'un sérum contenant les anticorps spécifiques. Les tests de sérotypage ont été réalisés sur la souche de *E. coli* isolée dans un point d'eau en utilisant le sérum agglutinant anti *E. coli*. Ce sérum permet le diagnostic des antigènes somatiques des colibacilles entéropathogènes (EPEC). Les sérums qui sont utilisés pour agglutination sur lame, correspondent aux 12 sérogroupes d'EPEC pour lesquels il a été démontré une bonne corrélation entre le sérotype et le pouvoir pathogène. Ils sont constitués des sérums Trivalent I (O111, O55, O26) ; Trivalent II (O86, O119, O127) ; Trivalent III (O125, O126, O128) ; Trivalent IV (O114, O124, O142) et un mélange de sérum Nonavalent (mélange Trivalent I + Trivalent II + Trivalent III) et Trivalent IV (Nougang *et al.*, 2011).

II.3.2.2- Isolement, caractérisation culturelle et biochimique de *Salmonella typhi*

L'isolement de *Salmonella typhi* a été effectué sur la gélose de Wilson Blair à 37°C pendant 24 à 48 heures (Marchal *et al.*, 1991; APHA, 1998). Les cellules ont ensuite été identifiées par des critères biochimiques habituels (Holt *et al.*, 2000).

II.3.2.3- Isolement, caractérisation culturelle et biochimique de *Vibrio cholerae*

L'isolement de *Vibrio cholerae* a été effectué sur le milieu Thiosulfate Citrate Bile Saccharose (TCBS) (Merck) contenu dans une boîte de Pétri. Les tests biochimiques réalisés ont été la recherche des enzymes Oxydase, Gélatinase, Uréase et Ortho-nitro-phénol B-D-galactosidase (ONPG), la dégradation du mannitol, du glucose et du lactose, la production de l'indole et la recherche de la mobilité (Noah Ewoti, 2012).

II.3.2.4- Isolement, caractérisation culturelle et biochimique d'*Enterococcus faecalis*

L'isolement d'*Enterococcus faecalis* a été effectué sur le milieu Bile Esculine Azide. Après culture des échantillons d'eau, les milieux sont incubés à 37 °C pendant 24 à 48 heures. Les tests effectués ont été la recherche des enzymes catalases, oxydases et nitrates réductases, la fermentation du glucose et du lactose, la production des gaz et du sulfure d'hydrogène par exemple.

II.3.3- Activité des extraits d'*Eucalyptus microcorys* sur les microorganismes

II.3.3.1- Effet de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* sur la survie des microorganismes planctoniques sous différentes températures d'incubation

Pour chaque espèce bactérienne utilisée, 140 flacons ont été utilisés pour cette étude. Ces flacons ont été répartis en sept séries A, B, C, D, E, F et G de 20 flacons de 250 ml chacun. Chaque série de flacons est répartie en 4 sous-groupes de 5 flacons chacun. Ainsi, les flacons sont répartis en sous-groupes A₁, A₂, A₃ et A₄, B₁, B₂, B₃ et B₄, C₁, C₂, C₃ et C₄, D₁, D₂, D₃, D₄, E₁, E₂, E₃ et E₄, F₁, F₂, F₃, F₄, G₁, G₂, G₃ et G₄. Chacun des 20 flacons de la série A contiennent 200 ml d'eau physiologique (NaCl : 8,5 g/l) et ont été utilisés comme témoins. Les 20 autres flacons de chacune des séries B, C, D, E et F contiennent chacun 200 ml d'extrait, mais de concentrations différentes d'une série à l'autre.

Les flacons de la série B contiennent des solutions d'extrait de concentration 0,05 %, ceux de la série C les solutions d'extrait de concentration 0,1 %, ceux de la série D les solutions d'extrait de concentration 0,5 %, ceux de la série E les solutions d'extrait de concentration 1 %, ceux de la série F les solutions d'extrait de concentration 1,5 %, ceux de la série G les solutions d'extrait de concentration 2 %. La **Figure 17** présente les solutions d'extraits d'*Eucalyptus microcorys* à différentes concentrations (0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2 %) disposés sur la paillasse au laboratoire.

Dans chaque flacon est introduite 1 ml de suspension de chaque bactérie, et cet instant constitue l'instant initial t_0 . La concentration cellulaire dans chaque flacon à l'instant t_0 a été de 27×10^8 UFC/ml. Les flacons des sous-groupes A₁, B₁, C₁, D₁, E₁, F₁ et G₁ sont incubés à la température de $7 \pm 0,5$ °C, ceux des sous-groupes A₂, B₂, C₂, D₂, E₂, F₂ et G₂ à la température $23 \pm 0,5$ °C, ceux des sous-groupes A₃, B₃, C₃, D₃, E₃, F₃ et G₃ à la température $37 \pm 0,5$ °C, et ceux des sous-groupes A₄, B₄, C₄, D₄, E₄, F₄ et G₄ à la température $44 \pm 0,5$ °C. Les durées d'incubations ont été de 3, 6, 9, 12 et 24 heures.

Le dénombrement des bactéries cultivables dans chaque flacon a été effectué à la fin de chaque période d'incubation, par la méthode d'étalement en surface sur les milieux de culture gélosés sélectifs.

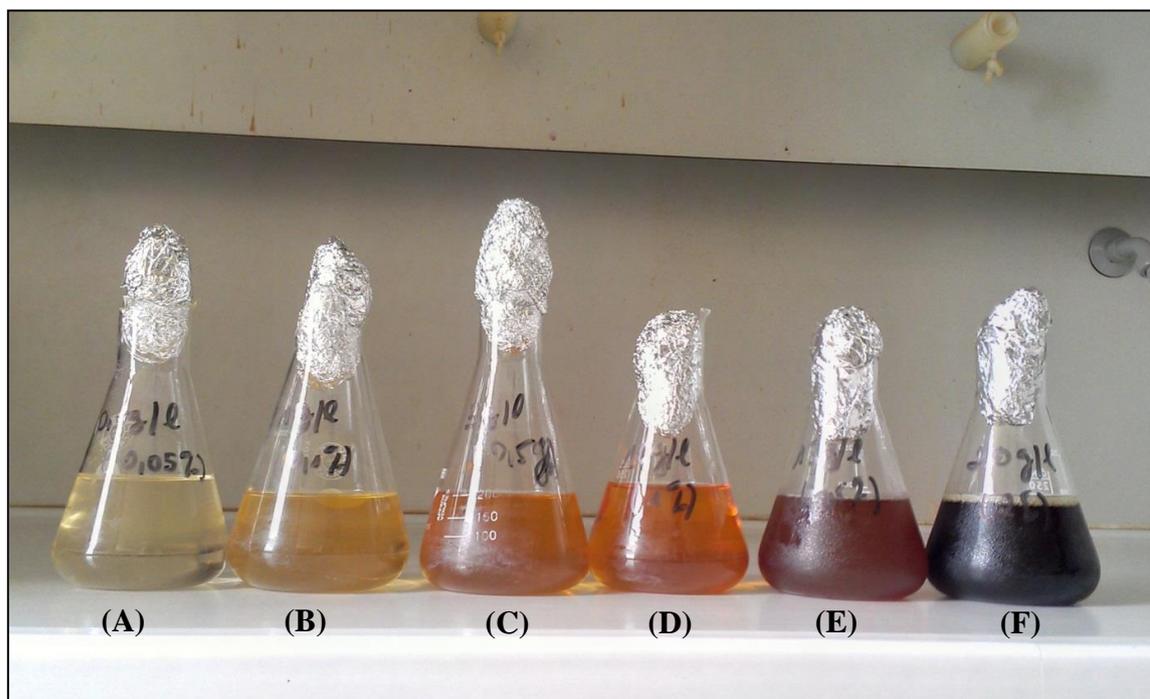


Figure 17: Solution d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* à différentes concentrations (A : 0,05 % ; B : 0,1 % ; C : 0,5 % ; D : 1 % ; E : 1,5 % et F : 2 %).

II.3.3.2- Effet de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* sur la survie d'*Escherichia coli* entéropathogène et *Enterococcus faecalis* planctoniques exposées à la lumière

Les expérimentations ont été faites en conditions de cellules monospécifiques, c'est-à-dire en présence d'une seule espèce bactérienne. Deux espèces bactériennes ont été utilisées dans cette expérimentation : *Escherichia coli* entéropathogène et *Enterococcus faecalis*.

Ces bactéries ont été retenues parce qu'elles constituent les meilleurs indicateurs biologiques de la qualité de l'eau potable (Edberg *et al.*, 2000).

La paroi étant un élément essentiel dans la sensibilité des bactéries aux conditions extrêmes de l'environnement, les 2 bactéries choisies ont des propriétés pariétales différentes. *Escherichia coli* entéropathogène est à Gram⁻ et *Enterococcus faecalis* est à Gram⁺.

Pour chaque espèce bactérienne, 35 flacons en verre, stériles, de 350 ml ont été utilisés. Ils ont été organisés en sept séries étiquetées A, B, C, D, E, F et G; chaque série est constituée de 5 flacons dans lesquels 200 ml de solution contenant l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* ont été introduits. La série A est prise comme référence (NaCl : 0,85 %), c'est-à-dire la solution témoin.

Dans les autres séries, les différentes concentrations de la solution d'extrait (0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1% ; 1,5 et 2 %) ont été réparties suivant un ordre croissant : le groupe B à 0,05 % ; C à 0,1 % ; D à 0,5 % ; E à 1 % ; F à 1,5 % et F à 2 % d'extrait.

Une quantité de 1 ml de la suspension bactérienne de concentration cellulaire 27×10^8 UFC/ml a été alors inoculée dans chacun des flacons. Les flacons ont ensuite été exposés sous diverses intensités lumineuses. L'intensité lumineuse a été obtenue à partir de trois lampes à incandescence de 100 watts connectées en série et placées à 25 cm au-dessus de chaque solution (Nola *et al.*, 2010a). Les intensités lumineuses ont été de 0 lux (obscurité), 1000 lux, 2000 lux et 3000 lux. Les durées d'exposition ont été de 3, 6, 9, 12 et 24 heures. La **Figure 18** présente le dispositif expérimental d'exposition sous différentes conditions lumineuses. L'analyse bactériologique a été effectuée au bout de chaque temps d'incubation.

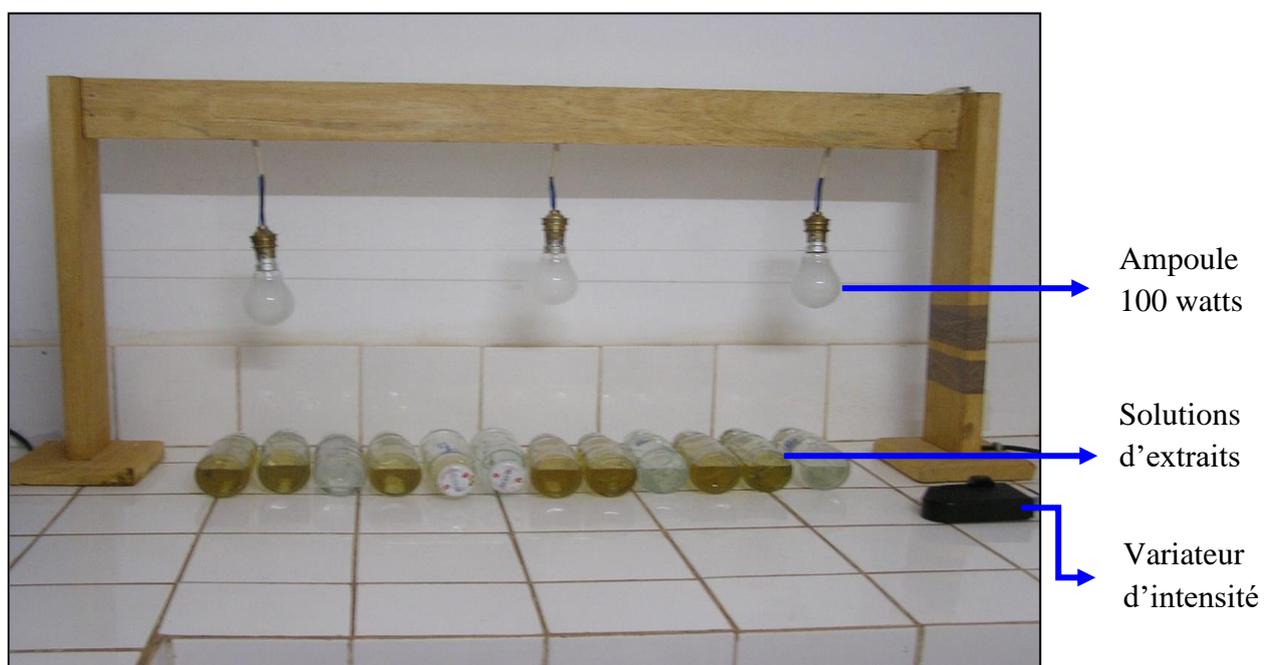


Figure 18 : Dispositif d'exposition sous différentes conditions lumineuses

II.3.3.3- Effet de l'extrait aqueux d'*Eucalyptus microcorys* sur les cellules *E. coli* entéropathogène adhérentes au support solide en fonction de l'état physiologique des cellules

Pour cette expérimentation, seule *Escherichia coli* entéropathogène a été utilisée. En plus du fait qu'elle constitue le meilleur indicateur biologique de la qualité de l'eau potable, elle possède une grande capacité à sécréter les adhésines qui contribuent soit à la colonisation des supports ou de la maturation du biofilm (Edberg *et al.*, 2000 ; Beloin *et al.*, 2008).

II.3.3.3.1- Détermination de l'hydrophobicité du support solide utilisé

La mesure d'angle de contact est une technique permettant d'évaluer la mouillabilité d'une surface c'est-à-dire la capacité d'une goutte à s'étaler sur une surface (Woodward, 1999 ; Modaressi et Garnier, 2002 ; Farris *et al.*, 2011). Elle consiste à déposer sur cette surface une goutte de liquide de propriétés connues et à mesurer l'angle formé par la tangente du profil de celle-ci avec la surface réceptrice au point triple. Pour la mesure d'angle de contact, on a utilisé un goniomètre de marque «**Krüss**», modèle «**Easy Drop**» dans des conditions de température contrôlée (22 °C). La **Figure 19** montre la photographie du dispositif de mesure, et le dessin illustrant son fonctionnement.

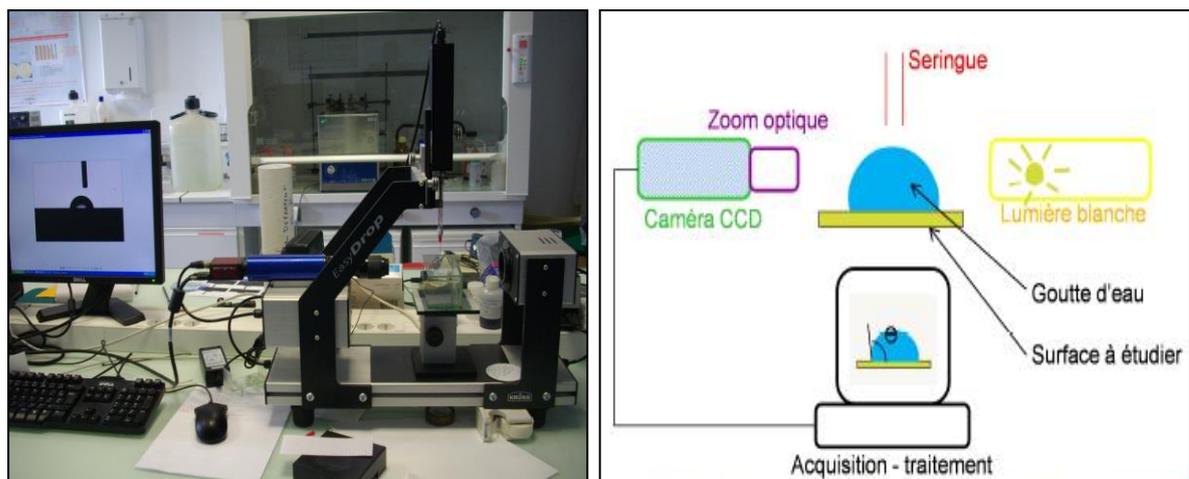


Figure 19 : Appareil de mesure des angles de contact : Goniomètre de marque « **Krüss** », modèle « **Easy Drop** ».

La Détermination de l'hydrophobicité du support solide utilisé a été réalisée au Laboratoire de Physique Corpusculaire d'Auvergne (France).

❖ Principe de fonctionnement du goniomètre

Un volume donné d'une goutte de liquide est déposé sur la surface solide à analyser par réglage à l'ordinateur, l'ensemble étant déposé sur la platine. Dans le cas de cette étude, le volume d'eau distillée était de 3 μ l. A l'aide d'une caméra, l'image de cette goutte est envoyée sur l'écran

de l'ordinateur. Ce dernier muni du logiciel « **Drop Shape Analysis** » fournit l'angle de contact sur cette surface, de la goutte à gauche et à droite, et calcule la moyenne.

Pour des valeurs des angles trop faibles (inférieures à 25°), l'image de la goutte a été grossie à l'ordinateur, puis photographiée. Les angles Thêta (Θ) ont ensuite été mesurés manuellement à l'aide d'un rapporteur.

Il en ressort que les valeurs de Thêta (Θ) mesurées et sur trois fragments ont fluctué entre $83,5$ et $85,6^\circ$ à gauche et entre $82,7$ et $86,3^\circ$ à droite de la goutte d'eau. Les valeurs moyennes ont varié de $83,1 \pm 0,6$ à $85,8 \pm 0,8^\circ$. La goutte d'eau a donc tendance à ne pas bien s'étaler sur le fragment de polyéthylène. Le polyéthylène utilisé dans le cadre de notre étude est moyennement hydrophobe et hydrophile ($30^\circ < \Theta < 90^\circ$). La **Figure 20** montre la photographie de la goutte d'eau sur le fragment de polyéthylène.

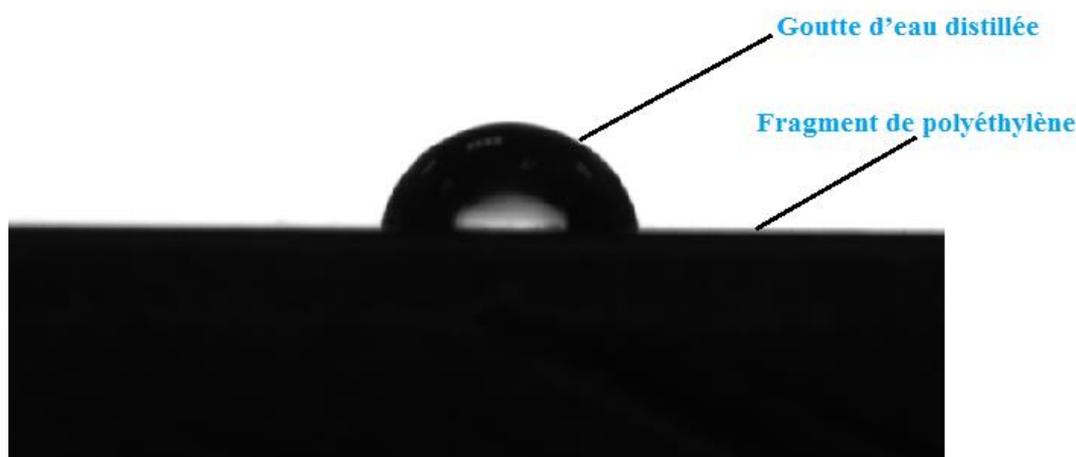


Figure 20 : Image de la goutte d'eau distillée sur le fragment de polyéthylène

II.3.3.3.2- Evaluation des périodes de la cinétique du métabolisme (phases de croissance) des cellules *E. coli* entéropathogène

L'état physiologique d'*E. coli* entéropathogène a été évalué à l'aide de la courbe de croissance des microorganismes (Rubio, 2002). La **Figure 21** illustre le protocole expérimental de détermination des phases de croissance cellulaire. Trois séries de 15 tubes à essais contenant chacun 10 ml d'eau peptonée stérile ont été utilisés. Les tubes de chaque série ont été étiquetés t_0 , t_2 , t_4 , t_6 , t_8 , t_{10} , t_{12} , t_{14} , t_{16} , t_{18} , t_{20} , t_{22} , t_{24} , t_{26} et t_{28} . Les souches cellulaires préalablement cryoconservées dans du glycérol au congélateur dans des fioles, ont été dégivrées à la température ambiante au laboratoire. Puis 300 μ l de la culture ont été transférés dans 10 ml de bouillon nutritif (Oxford) et l'ensemble est incubé à 37°C pendant 24 heures. Par la suite, les cellules ont été récoltées par centrifugation à 8000 tr/mn pendant 10 minutes à 10°C , et lavées deux fois avec une solution stérile de NaCl (8,5 g/l). Le surnageant a été remis en suspension dans 10 ml de solution stérile de

NaCl (8,5 g/l). Après dilution, 100 µl de la suspension obtenue a été ajouté à 100 ml de la solution stérile de NaCl (8,5 g/l). Puis 100 µl de la nouvelle suspension a été introduit dans chacun des 15 tubes contenant la solution stérilisée de peptone. Les suspensions bactériennes contenues dans les 3 tubes codés t_0 ont été immédiatement analysées. Celles contenues dans les tubes codés $t_2, t_4, t_6 \dots t_{28}$ ont été incubés à 37 °C pendant 2, 4, 6... 28 heures respectivement.

Les Unités Formant Colonies (UFC) ont été dénombrées après chaque période d'incubation. L'expérience étant effectuée en triplicat, la moyenne des UFC a été calculée après chaque période d'incubation ainsi que le log (UFC). La courbe de log (UFC) en fonction de la durée d'incubation a été tracée, et puis a été assimilée comme courbe de croissance des cellules bactériennes utilisées. Les durées des phases de croissance cellulaires ont alors été évaluées.

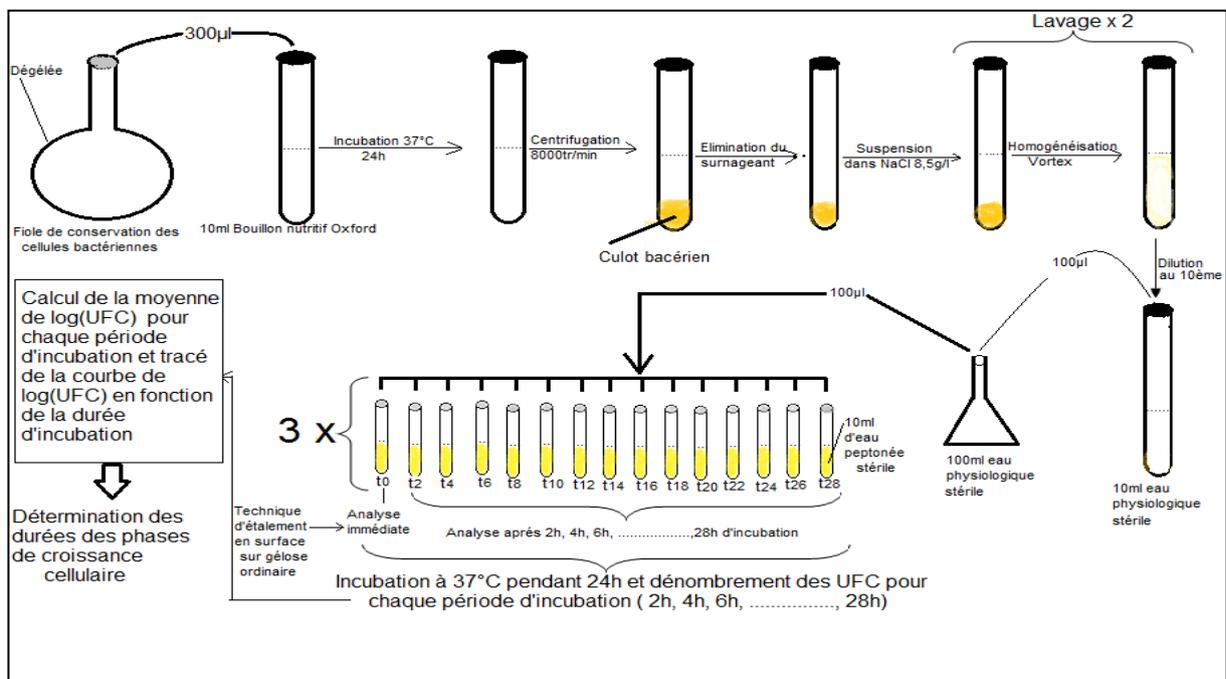


Figure 21: Protocole expérimental de détermination de la durée des phases de croissance cellulaire

II.3.3.3- Evaluation des propriétés de surface des bactéries (Hydrophobicité)

L'hydrophobicité de la surface des cellules *E. coli* entéropathogène a été mesurée par le test d'adhésion au polyéthylène en utilisant la méthode de MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbons) (Rosenberg *et al.*, 1980) comme décrit récemment par Jain *et al* (2007). Après croissance sur milieu Endo (Bio-Rad, France), des suspensions bactériennes sont préparées et sont centrifugées à 8000 tours/mn pendant 10 mn à 10°C, lavées et remises en suspension à la concentration 10^8 UFC/ml dans l'eau distillée (pH 4,9) en utilisant un spectrophotomètre DR 2800.

La densité optique (DO) de la solution est mesurée à 400 nm (A₀). Un volume de 1ml de cette solution est introduit dans 3 Erlenmeyers en verre Duran A₁, A₁' et A₁'' de 250 ml contenant chacun 99 ml d'eau physiologique et un fragment immergé de polyéthylène (fragment de forme parallélépipédique et de 13,28 cm² de surface à l'aide d'un fil de 0,1 mm de diamètre). L'ensemble est incubé à la température ambiante du laboratoire (23°C±2) en régime stationnaire pendant 3, 6 et 9 heures. Après chaque période d'incubation, le fragment de polyéthylène est retiré et la DO de la phase aqueuse est mesurée (A₁, A₁' et A₁'' pour les périodes d'incubation correspondantes).

Le pourcentage des cellules ayant adhéré au polyéthylène est calculé à partir de la formule suivante :

$$\text{Hydrophobicité (\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

Dans cette formule, A₀ est la densité optique de la solution mesurée à 400 nm avant l'immersion du substrat, et A₁ celle de la phase aqueuse mesurée après processus d'adhésion cellulaire. La valeur obtenue est d'autant plus proche de 100 % que le microorganisme est plus hydrophobe.

Les concentrations des cellules des inocula sont évaluées par turbidité et sont exprimées par la mesure de la Densité Optique (DO à 600 nm) sur un spectrophotomètre. Une DO de près de 0,09 correspond à près de 10⁸ UFC/ml pour les bactéries (Haddouchi *et al.*, 2009).

II.3.3.3.4- Tests d'adhésion des cellules d'*E. coli* au polyéthylène (support solide)

II.3.3.3.4.1- Préparation des flacons

Les fragments de polyéthylène ont été immergés et maintenues en suspension à l'aide d'un fil inoxydable dans 30 Erlenmeyers subdivisés en 3 séries A, B et C de 9 Erlenmeyers en verre Duran de 250 ml. Ces Erlenmeyers sont notés A₁, A₂.....A₉ pour la première série, B₁, B₂.....B₉ pour la deuxième série, et C₁, C₂.....C₉ pour la troisième série. Chaque Erlenmeyer contient 99 ml d'eau physiologique. Parallèlement, les témoins ont été confectionnés et ont été codés A₀, B₀ et C₀ respectivement. L'expérience a été réalisée en triplicat et en condition statique, dans le but de favoriser l'adhésion cellulaire (Noah Ewoti *et al.*, 2011). L'ensemble a ensuite été stérilisé à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes. La **Figure 22** montre quelques Erlenmeyers contenant la suspension et les fragments de polyéthylène.

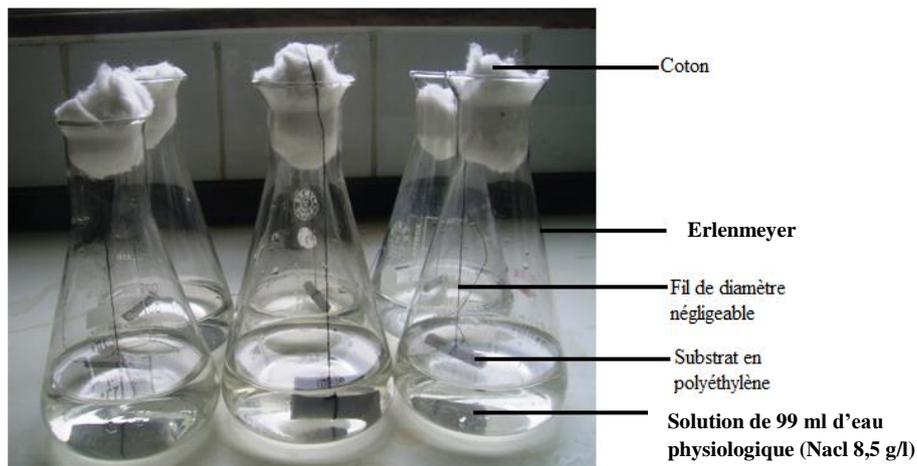


Figure 22 : Photographie du dispositif expérimental

II.3.3.3.4.2- Préparation des suspensions bactériennes et inoculations

Les cellules bactériennes préalablement cryoconservées dans du glycérol au congélateur dans des tubes, ont été dégivrées à la température ambiante. Après une subculture dans du bouillon peptonné pendant 24 heures à 37 °C, la suspension bactérienne homogène obtenue après agitation au vortex est ensuite centrifugée à 8000 tr/mn pendant 10 minutes à 10 °C. Par la suite, 100 µl de la suspension du culot de l'eau physiologique stérile est introduite dans 10 ml d'eau peptonée et incubée à 37 °C pendant des périodes correspondant aux temps d'obtention des phases de croissance cellulaire. Après incubation, 1 ml de cette suspension est prélevé et introduit dans 10 ml d'eau physiologique puis, agité au vortex. La suspension bactérienne ainsi obtenue constitue la solution mère. Une fois la suspension bactérienne homogénéisée, la concentration dans la solution mère est ajustée à 6×10^8 UFC/ml par lecture de la densité optique à 600 nm à l'aide du spectrophotomètre DR 2800 (Noah Ewoti *et al.*, 2011). Un volume de 1 ml de la suspension bactérienne est ajouté dans les erlenmeyers notés A₁, A₂.....A₉ de la première série, B₁, B₂.....B₉ de la deuxième série, C₁, C₂.....C₉ pour la troisième série et ainsi qu'aux erlenmeyers témoins notés A₀, B₀ et C₀. Ces erlenmeyers sont agités pour homogénéiser la solution bactérienne dans la colonne d'eau puis incubés à la température de laboratoire (23 ±2°C). La **Figure 23** montre les étapes de la préparation de la suspension à partir d'une culture bactérienne.

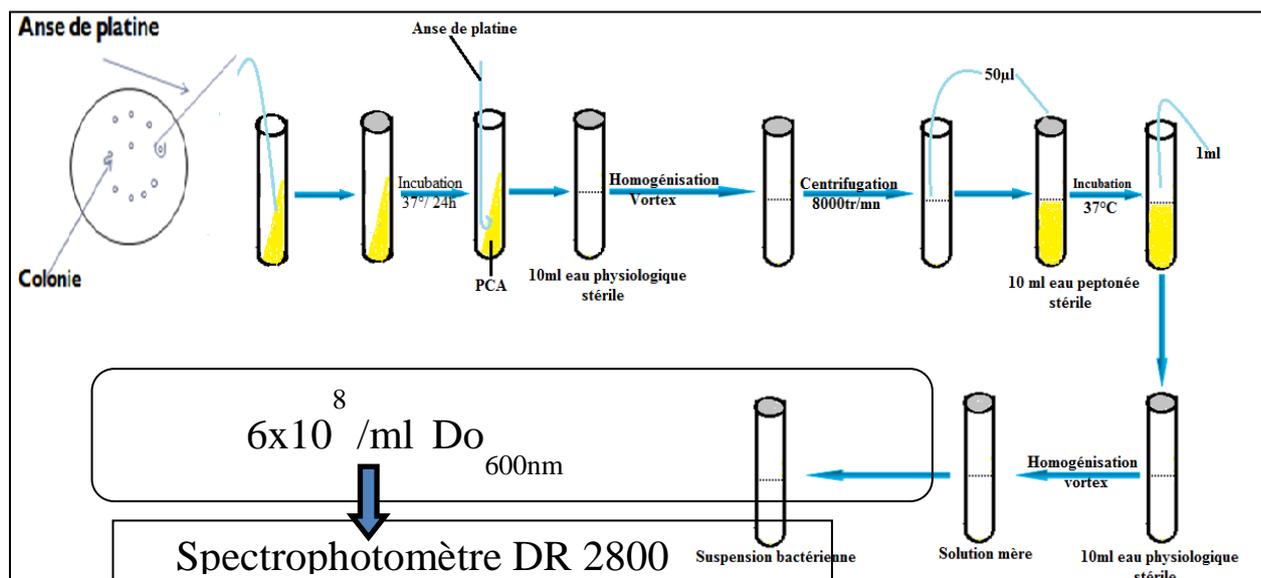
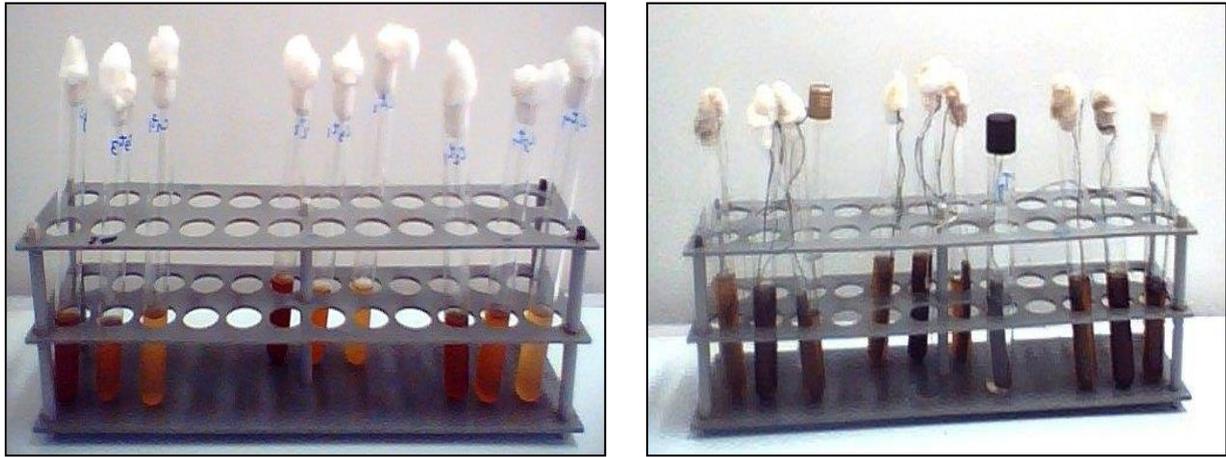


Figure 23 : Etapes de la préparation de la suspension à partir d'une culture bactérienne

II.3.3.3.5- Effet de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* sur les cellules bactériennes adhérentes au polyéthylène

Après chaque temps d'incubation du processus d'adhésion cellulaire, les fragments de polyéthylène sont égouttés pendant 10 secondes dans un environnement stérile créé par la flamme du bec bunsen, puis introduits dans des tubes à essai contenant 10 ml d'eau physiologique stérile comme substrats témoins A₀, B₀ et C₀. Les fragments dans les erlenmeyers A₁, B₁ et C₁ sont introduits dans des tubes à essai contenant 10 ml de la solution d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* aux concentrations respectives 1, 1,5 et 2 %, pour un temps de contact de 1 heure. Les fragments contenus dans les erlenmeyers A₂, B₂ et C₂ sont introduits dans des tubes à essai contenant 10 ml de la solution d'extrait pour une durée de 2 heures, et ceux des erlenmeyers A₃, B₃ et C₃ sont aussi introduits dans des tubes à essai contenant 10 ml de la solution d'extrait aux concentrations respectives 1, 1,5 et 2 % et incubés pendant 3 heures. La **Figure 24** montre les solutions de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* dans les tubes à essai, dépourvus de substrats (**A**), et contenant les substrats (**B**).



(A)

(B)

Figure 24 : Photographie de l'extrait *Eucalyptus microcorys* à diverses concentrations en (A) dépourvu de substrats et en (B) contenant les substrats.

II.3.3.3.6- Décrochage des cellules bactériennes adhérentes sur les supports après séjour dans l'extrait d'*Eucalyptus microcorys*

Les supports immergés dans l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* à différentes concentrations sont retirés après 1, 2 et 3 heures d'exposition (à raison de 3 tubes après chaque durée de contact). Les 3 tubes retirés après chaque temps d'incubation correspondent aux différentes concentrations de l'extrait à savoir 1, 1,5, et 2 %.

Le décrochage des cellules bactériennes adhérentes aux supports est effectué par agitation dans 10 ml d'eau physiologique stérile à l'aide d'un agitateur de tube AGT-9 de marque BUNSEN, actionné à des vitesses croissantes pendant 20 secondes environ. Les variations de la vitesse de décrochage conduisent en effet à l'obtention du maximum de cellules décrochées (Dukam *et al.*, 1995).

Pour chaque substrat, le décrochage a été effectué 3 fois dans 10 ml d'eau physiologique stérile afin de maximiser le détachement des cellules adhérentes. Le volume total de la suspension contenant les bactéries décrochées a ainsi été de 30 ml. L'analyse bactériologique a ensuite été effectuée sur les suspensions bactériennes mères, les solutions issues du décrochage des cellules bactériennes adhérentes sur les supports et sur les solutions des extraits de plante après retrait des supports.

Pour chaque analyse, un volume de 0,1 ml des suspensions à analyser estensemencé sur des milieux gélosés sélectifs contenus en boîte de Pétri, par la technique d'étalement en surface. Puis les boîtes sont incubées aux températures appropriées pendant 24 heures. Le dénombrement des colonies de germes (UFC) a été effectué par comptage direct sur boîte de Pétri. Les résultats sont exprimés en unité formant colonie par centimètre carré de surface de substrat (UFC/cm²).

II.4- Analyse des données

II.4.1-Variations temporelles des densités cellulaires et pourcentage d'inhibition

Les variations temporelles des concentrations bactériennes, exprimées en unité logarithmique népérienne (UFC/100 ml), sont illustrées sous forme d'histogramme pour les tests sur les cellules planctoniques. L'abondance des cellules bactériennes décrochées des supports et des cellules bactériennes dénombrées dans les solutions des extraits d'*Eucalyptus microcorys* après retrait des supports a été représentée par des courbes en coordonnées semi-logarithmiques par unité de surface ($\text{Ln (UFC/cm}^2\text{)}$), à l'aide du tableur Microsoft Excel version 2010.

Les pourcentages d'inhibition (PI) des extraits d'*Eucalyptus microcorys* sur les cellules planctoniques à chaque condition d'expérimentation ont été évalués en utilisant la formule décrite par Garcia-Ripoll *et al.* (2009).

$$PI = \left(\frac{N_0 - N_n}{N_0} \right) \cdot 100$$

Où : N_0 = abondance des cellules bactériennes dans la solution d'eau physiologique (témoin),

N_n = abondance bactérienne après action de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys*.

Pour les cellules à l'état adhérent, les pourcentages des cellules adhérentes (%A) et détachées (%D) ont été calculés à partir des formules suivantes :

$$\% A = \frac{N_a}{N_0} \times 100$$

$$\% D = \frac{N_d}{N_0} \times 100$$

où :

%A = pourcentage de cellules restées adhérentes après contact avec les extraits,

%D = pourcentage des cellules détachées après contact avec les extraits,

N_a = abondance des cellules adhérentes après contact avec les extraits,

N_d = abondance des cellules détachées après contact avec les extraits,

N_0 = abondance des cellules bactériennes décrochée sur le support témoin.

Les pourcentages des cellules inhibées ont ensuite été calculés par la formule suivante déduite de la formule décrite plus haut par Garcia-Ripoll *et al.* (2009) :

$$PI_a = \frac{N_0 - (N_a + N_d)}{N_0} \times 100$$

Où : PI_a = Pourcentage d'inhibition des cellules bactériennes après contact avec les extraits

N_a = abondance des cellules adhérentes après contact avec les extraits,

N_d = abondance des cellules détachées après contact avec les extraits,

N_0 = abondance des cellules bactériennes décrochée sur le support témoin.

II.4.2- Détermination de la vitesse d'inhibition cellulaire

Les vitesses d'inhibition cellulaire en présence de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* ont été évaluées à l'aide du programme Microsoft-Excel. La droite de régression a été construite en évaluant en unité logarithmique népérien (UFC/100 ml), les variations temporelles d'abondances des cellules bactériennes, à chaque période d'incubation de trois heures pour les 12 premières heures et en fonction de chaque concentration d'extrait. La droite a pour équation générale $y = a.x + b$ ont été obtenues. Le paramètre x est la variable explicative ; y est la variable dépendante ; a est la pente de la droite de régression, et b est le point d'interception de la droite de régression avec l'axe y (c'est-à-dire lorsque $x = 0$). Le ratio pente de la droite sur trois heures donne la vitesse d'inhibition cellulaire par heure (Tofallis, 2009).

II.4.3- Analyses multivariées et hiérarchisation des facteurs prépondérants intervenant dans les processus étudiés

II.4.3.1- Test de MANOVA à plusieurs facteurs (Analyses des variances à plusieurs facteurs)

Les facteurs abiotiques considérés dans la présente étude ont été les concentrations de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys*, l'intensité lumineuse, la température et la durée d'incubation pour les expérimentations avec les cellules bactériennes planctoniques. Pour les expérimentations sur les cellules adsorbées, l'état physiologique de la cellule, les angles de contact, la durée d'adhésion cellulaire et le temps de séjour des cellules adsorbées dans la solution d'extrait de plante ont été considérés lors de l'analyse. La hiérarchisation de ces facteurs a été faite en exprimant en pourcentage et en classant dans l'ordre hiérarchique décroissant, la somme des carrés de chaque facteur, du test de MANOVA à plusieurs facteurs.

II.4.3.2- Analyse Factorielle Discriminante (test unidimensionnel d'égalité des moyennes des classes)

Pour expliquer d'une part l'influence des différentes concentrations de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* et celles des différents facteurs abiotiques considérés sur la survie des bactéries planctoniques utilisées, et d'autre part l'influence des différentes concentrations de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* et des phases de croissance cellulaire sur l'adhésion cellulaire, une Analyse Factorielle Discriminante (AFD) a été réalisée. Ce test a été fait en considérant l'ensemble des durées d'incubation (temps de séjour des cellules bactériennes dans la solution d'extrait de plante). Cette analyse factorielle discriminante est un test unidimensionnel d'égalité des moyennes des classes qui permet de ressortir les différences d'abondances observées et classer dans l'ordre hiérarchique décroissant les niveaux d'influence des facteurs considérés. Le Lambda de Wilks et l'approximation asymptotique du F de Fisher ont été utilisées pour cette hiérarchisation. La valeur

de l'approximation asymptotique du F de Fisher est proportionnelle au niveau d'influence des facteurs impliqués dans l'expérimentation. Le Lambda de Wilks varie entre 0 et 1. Lorsque sa valeur est faible, cela traduit une faible variation des abondances cellulaires obtenues en présence de chaque concentration d'*Eucalyptus microcorys* et donc une forte variation entre les concentrations d'extrait. La valeur de l'approximation asymptotique du F de Fisher est proportionnelle au niveau d'influence des facteurs abiotiques considérés lors des tests sur les cellules bactériennes planctoniques, et des phases de croissance sur l'adhésion cellulaire. Ce test a été effectué à l'aide du logiciel XLSTAT 2007.

II.4.4- Relations entre variables analysées

Pour les expérimentations réalisées avec les bactéries planctoniques, les relations entre les abondances cellulaires et les différentes concentrations d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* d'une part, et entre abondances cellulaires et différentes gammes de température et d'intensité lumineuses d'autre part, ont été évaluées par les tests de corrélation de Spearman à chaque période d'incubation.

Les comparaisons des moyennes des données ont ensuite été réalisées à l'aide du test H de Kruskal-Wallis. Ces analyses ont été réalisées grâce au logiciel SPSS 18.0.

CHAPITRE III
RESULTATS ET DISCUSSION

III.1- Présentation et analyse des résultats

III.1.1- Screening phytochimique

Sur la base de l'intensité de coloration, on a noté que les constituants chimiques majoritaires identifiés, de l'extrait aqueux d'*Eucalyptus microcorys* sont les alcaloïdes, les anthraquinones, les flavonoïdes et les saponines. Les anthocyanines, les tannins galliques, les polyphénols, les triterpènes quant-à eux s'y trouvent en quantité infime.

Les différents constituants chimiques des feuilles d'*Eucalyptus microcorys* et leurs abondances relatives sont résumés dans le **Tableau V**.

Tableau V: Screening des constituants chimiques des feuilles d'*Eucalyptus microcorys*

Composés chimiques recherchés	Appréciation de l'abondance relative	
Stérols et triterpènes	+	
Polyphénols	+	
Flavonoïdes	++	
Tannins	Catéchiques	-
	Galliques	+
Anthraquinones	+++	
Anthocyanines	+	
Alcaloïdes	+++	
Saponines	++	
Lipides	-	

+++ : Abondant ; ++ : assez abondant ; + : peu abondant ; - : absent ou traces

III.1.2- Évolution temporelle des abondances des cellules planctoniques en présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*

III.1.2.1- Évolution temporelle des abondances des cellules en présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* et sous diverses températures d'incubation

Les **figures 25 à 29** illustrent les variations temporelles des abondances cellulaires des espèces bactériennes étudiées. Elles sont exprimées en unité logarithmique népérien (UFC/100 ml). Dans l'eau physiologique (NaCl : 0,85 %), c'est-à-dire dans les tubes témoins, les densités bactériennes varient peu d'une période d'incubation à l'autre. En présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*, on note une diminution des abondances bactériennes. Ces abondances fluctuent en fonction de la concentration de l'extrait de plante, de la température d'incubation et de la durée d'incubation.

III.1.2.1.1- Variation temporelle des abondances d'*Escherichia coli* entéropathogène planctonique

La **Figure 25** montre la variation temporelle des abondances des cellules *E. coli* entéropathogène planctoniques dans l'eau physiologique (NaCl : 0,85 %) et dans des solutions contenant l'extrait aqueux d'*Eucalyptus microcorys* à différentes concentrations. Dans l'eau physiologique, les abondances d'*E. coli* entéropathogène ont varié entre 21,19 et 21,40 [Ln (UFC/100 ml)], entre 20,76 et 21,71 [Ln (UFC/100 ml)], entre 21,32 et 21,68 [Ln (UFC/100 ml)], et entre 20,84 et 21,71 [Ln (UFC/100 ml)] respectivement aux températures d'incubation 7, 23, 37 et 44 °C.

Les abondances de ces cellules planctoniques subissent une réduction dans l'ensemble en présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* (**Figure 25**). À une concentration d'extrait de 0,05 %, les abondances cellulaires ont varié entre 20,71 et 21,26 [Ln (UFC/100 ml)], entre 20,03 et 20,95 [Ln (UFC/100 ml)] respectivement aux températures 7 et 23 °C. À 37 °C, les densités cellulaires ont varié entre 20,13 et 21,40 [Ln (UFC/100 ml)]. À une température de 44 °C, on a noté une valeur minimale de 19,84 [Ln (UFC/100 ml)] et une valeur maximale de 20,33 [Ln (UFC/100 ml)].

Les résultats obtenus à une concentration de 0,1 % montrent une fluctuation des densités cellulaires de 20,46 à 21,11 [Ln (UFC/100 ml)] à 7 °C. Cette densité cellulaire diminue de 20,95 à 19,70 [Ln (UFC/100 ml)] à 23 °C ; de 20,97 à 19,00 [Ln (UFC/100 ml)] à 37 °C ; et de 19,75 à 17,58 [Ln (UFC/100 ml)] à 44 °C.

De même, à la concentration 0,5% de l'extrait, l'on a noté que l'abondance cellulaire diminue de 20,91 à 20,08 [Ln (UFC/100 ml)] à une température d'incubation de 7 °C ; de 20,57 à 19,38 [Ln (UFC/100 ml)] à 23 °C ; de 19,53 à 15,79 [Ln (UFC/100 ml)] à 37 °C et de 17,27 à 12,44 [Ln (UFC/100 ml)] à 44 °C. Une variation temporelle des abondances cellulaires est aussi observée aux concentrations 1, 1,5 et 2 % d'extrait dans la solution (**Figure 25**).

Les plus faibles abondances aux concentrations d'extrait 1, 1,5 et 2% sont notées à la température d'incubation de 44 °C. La plupart des fortes abondances ont été enregistrées à 7 °C. La valeur la plus faible, 6,91 [Ln (UFC/100 ml)], a été notée à 44 °C après 12 heures d'incubation pour une concentration d'extrait de 2 %. Et à cette même température d'incubation et concentration d'extrait, la densité cellulaire la plus élevée a été 12,06 [Ln (UFC/100 ml)].

De ces observations, il ressort que les abondances cellulaires diminuent avec l'augmentation de la température, de la durée d'incubation et celle de la concentration de l'extrait, les cellules étant moins affectées en condition psychrophile (**Figure 25**).

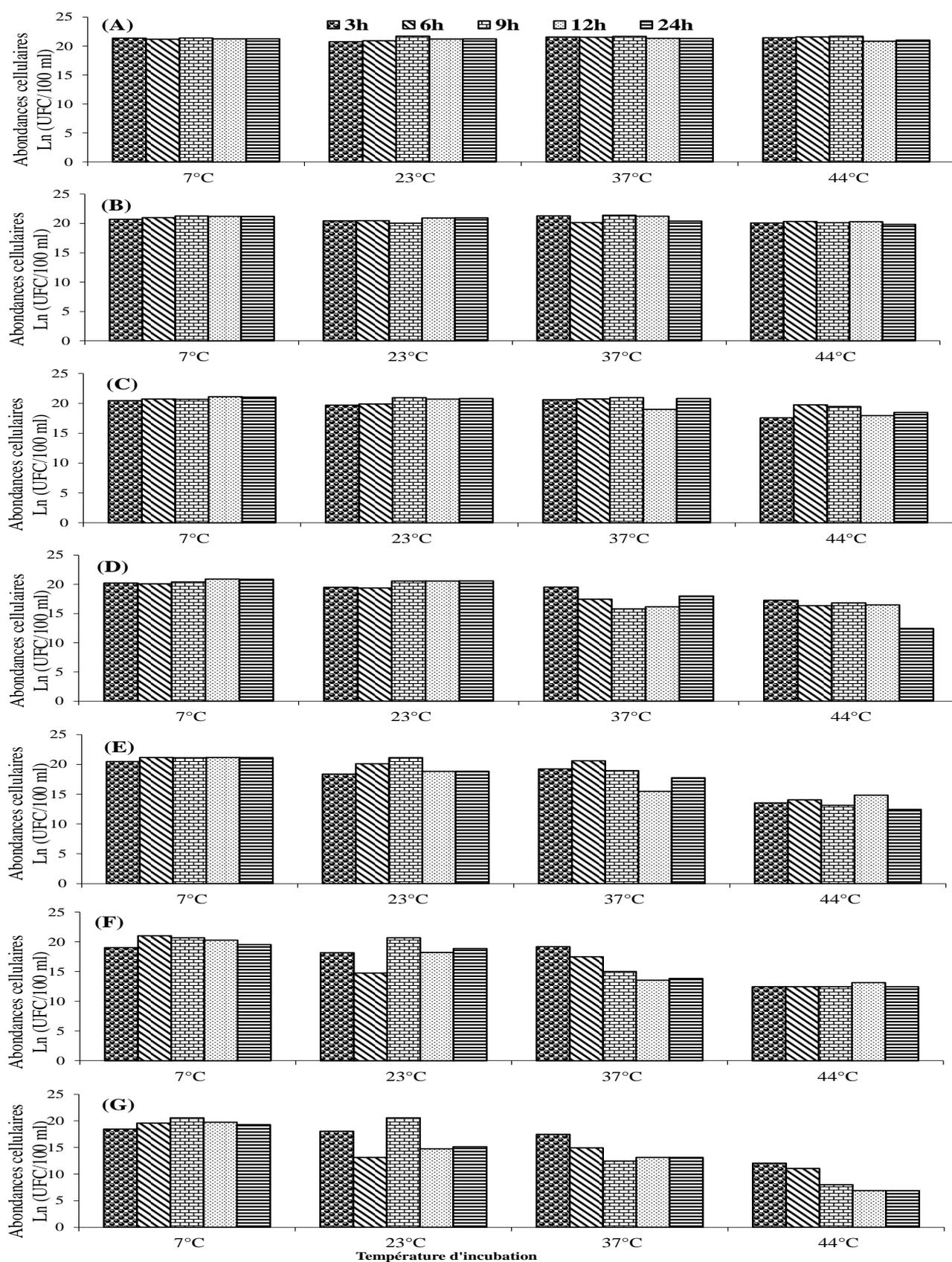


Figure 25: Variation temporelle des abondances des cellules *Escherichia coli* entéropathogène en présence des extraits d'*Eucalyptus microcorys* à différentes températures d'incubation (A: Témoin; Concentration d'extrait (B : 0,05 % ; C : 0,1 % ; D : 0,5 % ; E : 1 % ; F : 1,5 % et G : 2 %)).

III.1.2.1.2- Variation temporelle des abondances d'*Escherichia coli* commensale planctonique

La **Figure 26** montre la variation temporelle des abondances des cellules planctoniques *E. coli* commensale dans la solution physiologique (NaCl : 0,85 %) qui constitue le témoin, et dans les solutions contenant différentes concentrations d'extraits d'*Eucalyptus microcorys*. Dans les tubes témoins, les densités des cellules *E. coli* commensale sont comprises entre 22,20 et 23,24 [Ln (UFC/100 ml)] à une température de 7 °C, entre 20,14 et 21,93 [Ln (UFC/100 ml)] à 23 °C, entre 22,35 et 23,32 [Ln (UFC/100 ml)] à 37 °C et entre 22,17 et 22,93 [Ln (UFC/100 ml)] à 44 °C.

Aux mêmes températures d'incubation, on note une réduction des abondances cellulaires en présence d'extrait de plante. À la température de 7 °C, les concentrations d'extraits d'*Eucalyptus microcorys* de 0,05, 0,1%, 0,5% entraînent respectivement une variation d'abondances cellulaires de 21,30 à 22,96 [Ln (UFC/100 ml)], de 19,56 à 22,45 [Ln (UFC/100 ml)] et de 19,14 à 21,75 [Ln (UFC/100 ml)]. À la température d'incubation de 23 °C, les abondances cellulaires ont fluctué de 19,12 à 20,79 [Ln (UFC/100 ml)], de 16,21 à 21,80 [Ln (UFC/100 ml)] et de 19,14 à 21,75 [Ln (UFC/100 ml)] aux concentrations d'extrait de 0,05, 0,1 et 0,5 % respectives. À la température d'incubation de 37 °C, les densités cellulaires ont varié de 21,87 à 23,16 [Ln (UFC/100 ml)], de 20,26 à 23,14 [Ln (UFC/100 ml)] et de 19,42 à 21,56 [Ln (UFC/100 ml)] aux mêmes concentrations d'extrait respectivement. Lorsque la température d'incubation est de 44 °C, les valeurs minimales enregistrées ont été de l'ordre de 21,04 [Ln (UFC/100 ml)], de 20,80 [Ln (UFC/100 ml)] et de 19,74 [Ln (UFC/100 ml)] aux concentrations d'extrait de 0,05 ; 0,1 et 0,5 % respectivement (**Figure 26**).

En présence d'extrait de concentrations 1 ; 1,5 et 2 %, les variations d'abondances cellulaires ont fluctué respectivement de 19,20 à 21,46 [Ln (UFC/100 ml)], de 18,88 à 21,37 [Ln (UFC/100 ml)] et de 18,24 à 21,36 [Ln (UFC/100 ml)] pour une température d'incubation de 7 °C. Pour ces mêmes concentrations respectives, on a noté une variation des densités cellulaires de 16,81 à 21,06 [Ln (UFC/100 ml)] ; de 15,92 à 19,86 [Ln (UFC/100 ml)] et de 14,60 à 19,50 [Ln (UFC/100 ml)] à la température d'incubation de 23 °C. Ces densités cellulaires ont diminué respectivement de 21,23 à 18,38 [Ln (UFC/100 ml)] ; de 21,16 à 15,92 [Ln (UFC/100 ml)] et de 17,83 à 14,60 [Ln (UFC/100 ml)] lorsque la température d'incubation est de 37 °C. Pour une température de 44 °C, les abondances cellulaires ont varié de 18,23 à 20,17 [Ln (UFC/100 ml)] ; de 15,52 à 19,26 [Ln (UFC/100 ml)] et de 13,91 à 18,70 [Ln (UFC/100 ml)] aux concentrations d'extrait 1 ; 1,5 et 2 % respectivement (**Figure 26**). La valeur la plus faible, 13,91 [Ln (UFC/100 ml)], a été notée à une température de 44 °C après 24 heures d'incubation pour une concentration d'extrait de 2 %.

Dans la majorité de cas, on a observé une diminution du nombre de cellules planctoniques en présence d'extrait de plante d'*Eucalyptus microcorys*. Les effectifs les plus élevés des cellules bactériennes semblent diminuer avec l'augmentation de la concentration de l'extrait (**Figure 26**).

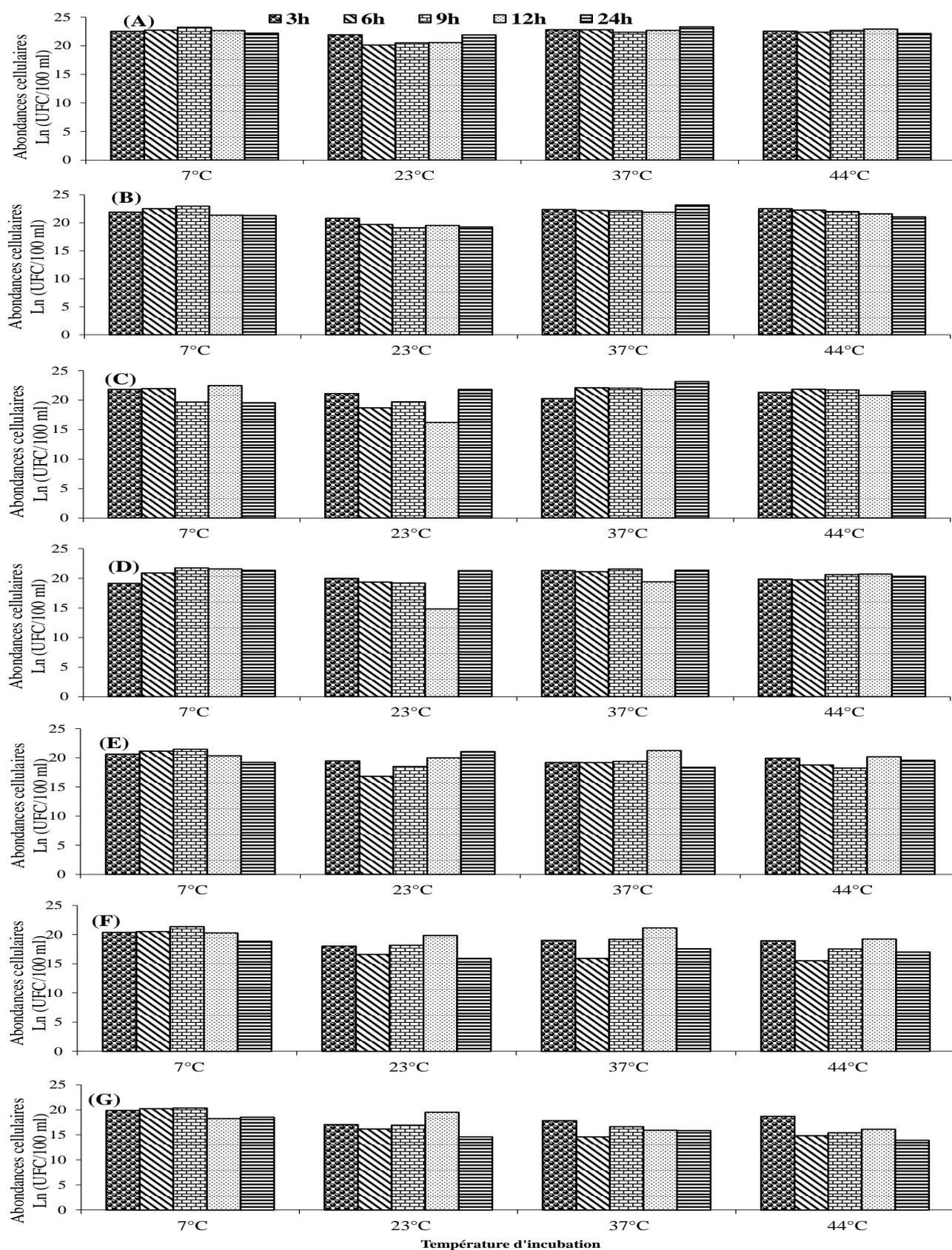


Figure 26: Variation temporelle des abondances des cellules *Escherichia coli* commensale en présence des extraits d'*Eucalyptus microcorys* à différentes températures d'incubation et à chaque concentration d'extrait (A : 0 % (témoin) ; B : 0,05 % ; C : 0,1 % ; D : 0,5% ; E : 1 % ; F : 1,5 % ; et G : 2 %).

III.1.2.1.3- Variation temporelle des abondances de *Salmonella typhi* planctonique

La **Figure 27** montre la variation temporelle des abondances des cellules *Salmonella typhi* planctoniques dans l'eau physiologique (NaCl : 0,85 %), et dans des solutions d'extraits aqueux d'*Eucalyptus microcorys* à différentes concentrations. On note dans l'ensemble que les abondances les plus élevées ont été obtenues dans les solutions témoins (eau physiologique). Ainsi dans les témoins, les concentrations cellulaires ont fluctué entre 19,84 et 20,98 [Ln (CFU/100 ml)] à 7 °C, entre 18,63 et 20,26 [Ln (UFC/100 ml)] à 23°C, entre 19,39 et 20,37 [Ln (UFC/100 ml)] à 37 °C, et entre 19,77 et 20,70 [Ln (UFC/100 ml)] à 44 °C.

En présence d'extrait aqueux d'*Eucalyptus microcorys*, la cultivabilité de *Salmonella typhi* est influencée. Une diminution relative des abondances cellulaires est notée. Aux concentrations d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* de 0,05, 0,1 et 0,5 %, les abondances cellulaires ont varié respectivement de 19,57 à 20,74 [Ln (UFC/100 ml)], de 18,97 à 20,17 [Ln (UFC/100 ml)] et de 17,25 à 20,06 [Ln (UFC/100 ml)] à la température d'incubation de 7 °C. A la température de 23 °C, ces concentrations cellulaires ont varié de 18,47 à 19,68 [Ln (UFC/100 ml)], de 17,80 à 19,66 [Ln (UFC/100 ml)] et de 16,20 à 19,46 [Ln (UFC/100 ml)] pour les mêmes concentrations d'extrait respectivement. À la température de 37 °C, les valeurs des abondances cellulaires ont varié de 18,53 à 19,68 [Ln (UFC/100 ml)], de 17,09 à 19,19 [Ln (UFC/100 ml)] et de 17,08 à 18,19 [Ln (UFC/100 ml)]. À 44 °C, elles ont varié de 19,10 à 19,92 [Ln (UFC/100 ml)], de 17,03 à 19,14 [Ln (UFC/100 ml)] et de 0 à 17,40 [Ln (UFC/100 ml)] aux concentrations d'extrait de 0,05, 0,1 et 0,5 % respectives.

Aux concentrations d'extrait de 1 et 1,5 %, la variation d'abondances cellulaires a été comprise entre 16,19 et 18,12 [Ln (UFC/100 ml)] et entre 14,23 et 16,42 [Ln (UFC/100 ml)] à la température d'incubation de 7 °C. A 23 °C, ces abondances cellulaires ont fluctué entre 16,75 et 18,42 [Ln (UFC/100 ml)] et entre 16,01 et 17,23 [Ln (UFC/100 ml)]. Les densités cellulaires minimales ont été de l'ordre de 13,70 [Ln (UFC/100 ml)] aux concentrations d'extrait de 1 % et 1,5 % pour une température d'incubation de 37 °C. Elles ont été également de l'ordre de 13,89 [Ln (UFC/100 ml)] et 13,48 [Ln (UFC/100 ml)] aux mêmes concentrations d'extrait respectives pour une température d'incubation de 44°C. À la concentration d'extrait de 2 %, les effectifs cellulaires ont varié de 12,79 à 16,49 [Ln (UFC/100 ml)] à 7°C, de 14,17 à 16,27 [Ln (UFC/100 ml)] à une température d'incubation 23°C, de 12,79 à 14,40 [Ln (UFC/100 ml)] à 37 °C, et de 11,40 à 15,31 [Ln (UFC/100 ml)] à 44 °C. Les plus faibles abondances ont été observées dans la plupart des cas à une température de 44 °C, et les abondances les plus élevées ont été notées en condition psychrophile d'expérimentation (**Figure 27**).

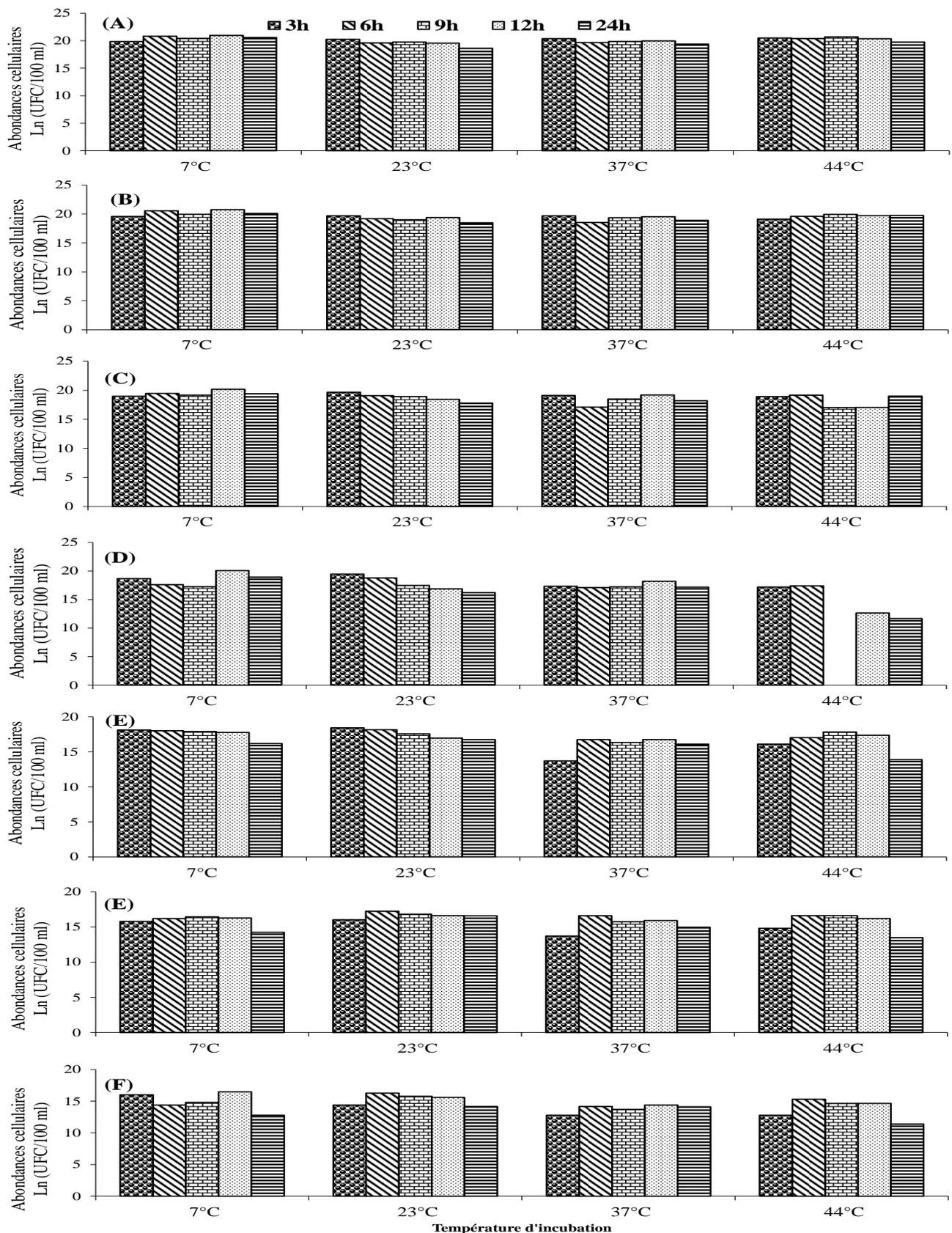


Figure 27: Variation temporelle des abondances des cellules *Salmonella typhi* en présence des extraits d'*Eucalyptus microcorys* à différentes conditions de température d'incubation et à chaque concentration d'extrait (A : 0 % (témoin) ; B : 0,05 % ; C : 0,1 % ; D : 0,5 % ; E : 1 % ; F : 1,5 % ; et G : 2 %).

III.1.2.1.4- Variation temporelle des abondances de *Vibrio cholerae* planctonique

La **Figure 28** montre la variation temporelle des abondances des cellules planctoniques de *Vibrio cholerae* dans l'eau physiologique (NaCl : 0,85 %) et dans des solutions d'extraits aqueux d'*Eucalyptus microcorys* à différentes concentrations. Les abondances de *V. cholerae* observées dans l'eau physiologique (Témoin), exprimées en unité logarithmique népérien [Ln (UFC/100 ml)], ont varié de 24,54 à 24,78 à 7 °C ; de 22,38 à 24,76 à 23 °C ; de 24,60 à 25,08 à 37 °C ; et de 22,49 à 23,39 à 44 °C.

En considérant les concentrations cellulaires les plus faibles enregistrées pour l'ensemble des durées d'incubation, à la température de 7 °C, une baisse des abondances cellulaires de 24,54 à 20,85 [Ln (UFC/100 ml)] est enregistrée pour une concentration d'extrait de 0,05%, de 24,54 à 20,16 [Ln (UFC/100 ml)] pour une concentration d'extrait de 0,1 %, et de 24,54 à 19,84 [Ln (UFC/100 ml)] pour une concentration d'extrait de 0,5 %. Pour les concentrations d'extrait de 1%, 1,5% et 2%, les valeurs minimales observées ont été de 19,94 [Ln (UFC/100 ml)], de 19,65 [Ln (UFC/100 ml)] et de 18,92 [Ln (UFC/100 ml)] respectivement.

A la température de 23 °C, une baisse d'abondances cellulaires de 22,38 à 20,69 [Ln (UFC/100 ml)] a été notée pour une concentration d'extrait de 0,05 %. Ces densités cellulaires ont diminué de 22,38 à 20,64 [Ln (UFC/100 ml)] à la concentration d'extrait de 0,1 %, et de 22,38 à 20,58 [Ln (UFC/100 ml)] à la concentration d'extrait 0,5 %. Aux concentrations d'extrait 1% ; 1,5% et 2 %, on a noté une baisse des densités cellulaires de 22,38 à 20,02 [Ln (UFC/100 ml)] ; de 22,38 à 19,48 [Ln (UFC/100 ml)] et de 22,38 à 18,92 [Ln (UFC/100 ml)] respectivement. A la température de 37 °C, les densités cellulaires ont diminué de 24,60 à 22 [Ln (UFC/100 ml)] ; de 24,60 à 20,41 [Ln (UFC/100 ml)] ; de 24,60 à 19,92 [Ln (UFC/100 ml)] ; de 24,60 à 19,39 [Ln (UFC/100 ml)] ; de 24,60 à 18,81 [Ln (UFC/100 ml)] et de 24,60 à 13,75 [Ln (UFC/100 ml)] aux concentrations d'extrait de 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2 % respectivement (**Figure 28**).

A la température de 44 °C, les titres cellulaires les plus faibles ont été de 21,95 [Ln (UFC/100 ml)], de 20,88 [Ln (UFC/100 ml)] et de 20,15 [Ln (UFC/100 ml)] aux concentrations d'extrait 0,05 ; 0,1 et 0,5 % respectivement. Ces densités cellulaires minimales ont été de 16,36 [Ln (UFC/100 ml)] ; de 13,75 [Ln (UFC/100 ml)] et de 13,06 [Ln (UFC/100 ml)] aux concentrations d'extrait 1 ; 1,5 et 2 % respectivement. Dans la majorité des cas, les plus basses densités cellulaires ont été observées après 24 heures de séjour des cellules bactériennes planctoniques dans la solution d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* (**Figure 28**).

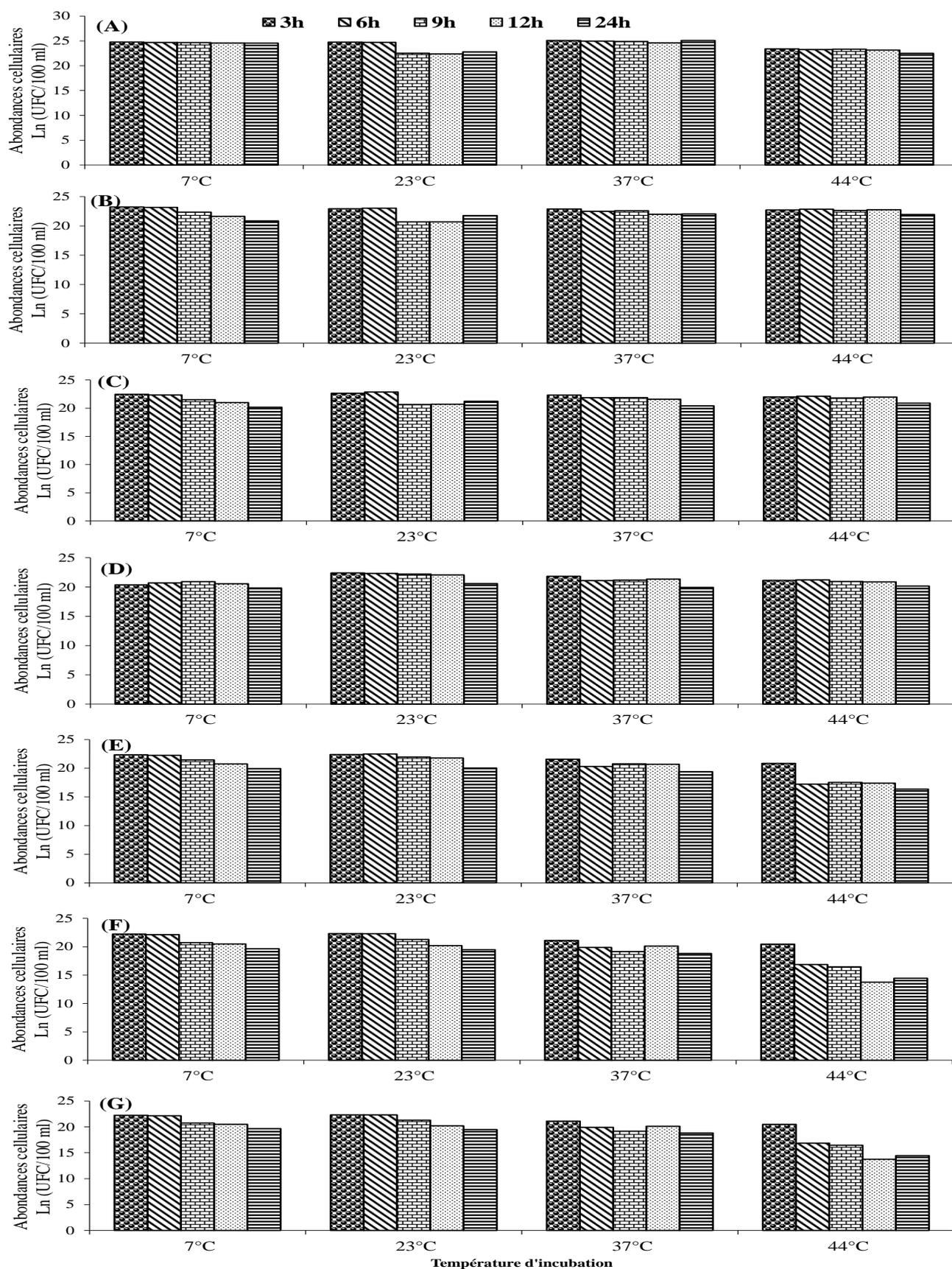


Figure 28: Variation temporelle des abondances des cellules *Vibrio cholerae* en présence des extraits d'*Eucalyptus microcorys* à différentes températures d'incubation (A: Témoin; Concentration d'extrait (B : 0,05 % ; C : 0,1 % ; D : 0,5 % ; E : 1 % ; F : 1,5 % et G : 2 %)).

III.1.2.1.5- Variation temporelle des abondances d'*Enterococcus faecalis* planctonique

La **Figure 29** montre la variation temporelle des abondances des cellules planctoniques d'*Enterococcus faecalis* dans l'eau physiologique (NaCl : 0,85 %) et dans une solution d'extrait aqueux d'*Eucalyptus microcorys* à différentes concentrations. Dans l'eau physiologique (Témoin), les abondances de *E. faecalis* ont varié de 19,99 à 20,68 [Ln (UFC/100 ml)] à la température d'incubation de 7 °C. Elles ont fluctué entre 18,65 et 20,66 [Ln (UFC/100 ml)] à 23 °C, et entre 20,37 et 20,55 [Ln (UFC/100 ml)] à 37 °C. A 44 °C, les densités de *E. faecalis* ont varié entre 19,59 et 20,49 [Ln (UFC/100 ml)].

Contrairement aux autres espèces bactériennes, *Enterococcus faecalis* est celle qui présente les plus faibles abondances cellulaires en présence d'extrait. Ainsi, dans la solution contenant l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* et pour une température d'incubation de 7 °C, on a enregistré une baisse des abondances cellulaires de 19,99 à 15,42 [Ln (UFC/100 ml)] à la concentration d'extrait de 0,05 %, de 19,99 à 13,02 [Ln (UFC/100 ml)] à la concentration d'extrait de 0,1 %, et de 19,99 à 14,15 [Ln (UFC/100 ml)] à la concentration d'extrait de 0,5 %. Aux concentrations d'extrait 1, 1,5 et 2 %, les densités cellulaires les plus faibles ont été de 11,78 [Ln (UFC/100 ml)], de 11,51 [Ln (UFC/100 ml)] et de 9,90 [Ln (UFC/100 ml)] respectivement.

À la température d'incubation de 23°C, les densités cellulaires ont diminué de 18,65 à 15,90 [Ln (UFC/100 ml)], de 18,65 à 15,15 [Ln (UFC/100 ml)] et de 18,65 à 12,23 [Ln (UFC/100 ml)] aux concentrations d'extrait 0,05, 0,1 et 0,5 % respectivement. Elles ont également baissé de 18,65 à 11,61 [Ln (UFC/100 ml)], de 18,65 à 11,29 [Ln (UFC/100 ml)] et de 18,65 à 10,31 [Ln (UFC/100 ml)] aux concentrations d'extrait 1, 1,5 et 2 % respectivement. Une baisse relative des concentrations cellulaires a également été enregistrée à la température d'incubation de 37 °C (**Figure 29**).

A 44 °C, des baisses des densités cellulaires de 19,59 à 14,73 [Ln (UFC/100 ml)] à la concentration d'extrait de 0,05 %, de 19,59 à 14,22 [Ln (UFC/100 ml)] à la concentration d'extrait de 0,1 %, et de 19,59 à 13,48 [Ln (UFC/100 ml)] à la concentration d'extrait de 0,5 % ont été notées. Aux concentrations d'extrait 1 %, 1,5 % et 2 %, les valeurs minimales des abondances cellulaires ont été 11,16 [Ln (UFC/100 ml)], 10,65 [Ln (UFC/100 ml)] et 9,90 [Ln (UFC/100 ml)] respectivement (**Figure 29**).

Dans l'ensemble, on constate que l'extrait aqueux d'*Eucalyptus microcorys* a un impact sur la cultivabilité des cellules bactériennes testées en milieu aquatique. Ces abondances cellulaires diminuent dans la majorité de cas en fonction de la concentration de l'extrait et de la température d'incubation.

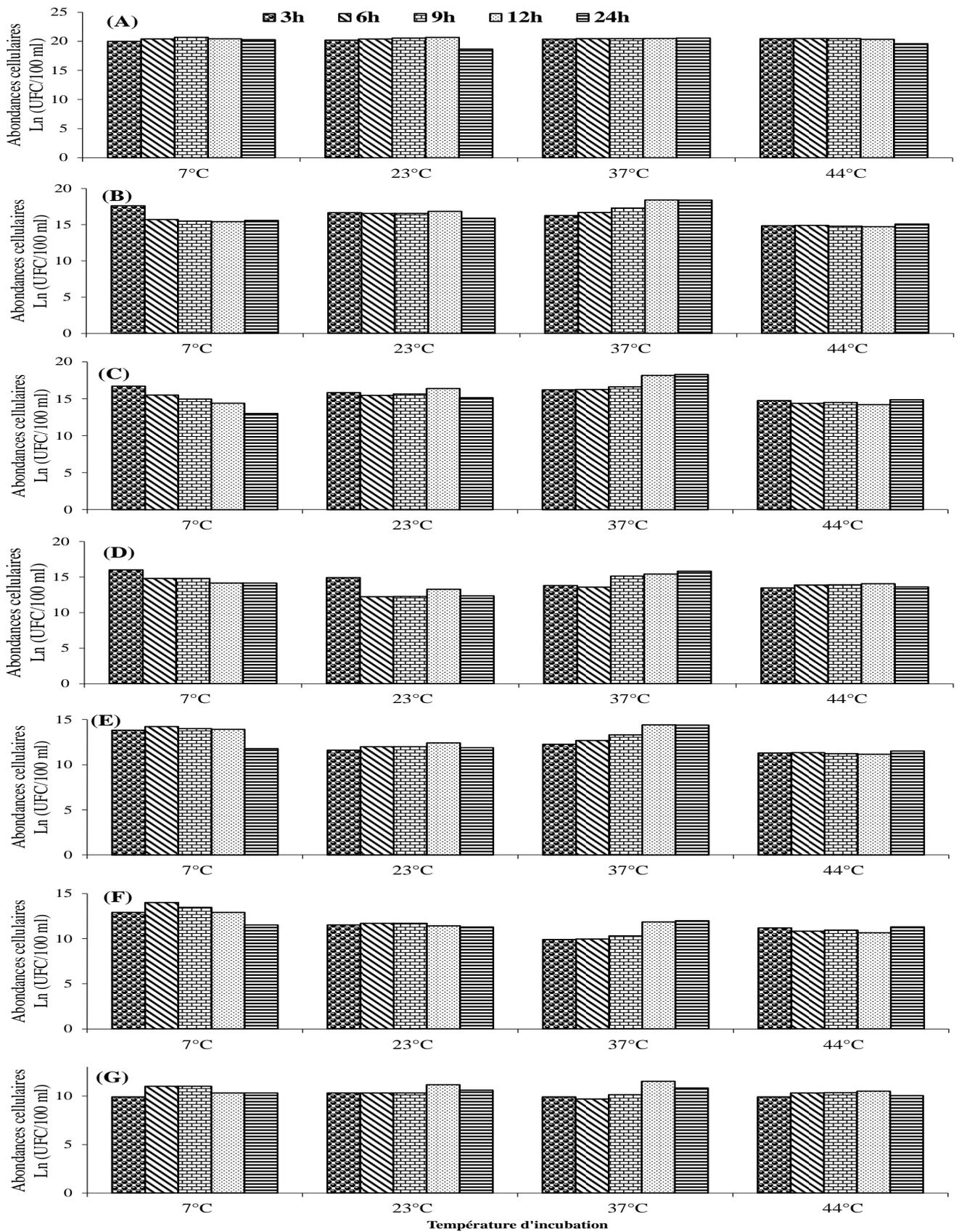


Figure 29: Variation temporelle des abondances des cellules *Enterococcus faecalis* en présence des extraits d'*Eucalyptus microcorys* à différentes températures d'incubation (A: Témoin; Concentration d'extrait (B: 0,05 % ; C: 0,1 % ; D: 0,5 % ; E: 1 % ; F: 1,5 % et G: 2 %)).

III.1.2.2- Évolution temporelle des abondances des cellules planctoniques en présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* et sous diverses intensités lumineuses

Les **Figures 30 et 31** illustrent les variations temporelles des abondances cellulaires des espèces bactériennes étudiées. Ces abondances bactériennes sont exprimées en unité logarithmique népérien (UFC/100 ml). La concentration initiale d'*Escherichia coli* entéropathogène et d'*Enterococcus faecalis* était de 27×10^8 UFC/ml.

En l'absence de lumière c'est-à-dire à d'obscurité (condition expérimentale 0 lux), les abondances cellulaires dans l'eau physiologique (témoin) ont varié de 22,56 à 22,96 [Ln (UFC/100 ml)] et de 19,59 à 20,27 [Ln (UFC/100 ml)] respectivement pour *E. coli* entéropathogène et *Enterococcus faecalis*.

III.1.2.2.1- Variation temporelle d'*Escherichia coli* entéropathogène planctonique

Aux différentes concentrations d'extrait aqueux d'*Eucalyptus microcorys*, on a noté une relative diminution du nombre de cellules cultivables. Cette baisse de densité cellulaire semble s'accroître avec la concentration de l'extrait de la plante. Les densités d'*E. coli* entéropathogène ont ainsi varié de 19,10 à 22,52 [Ln (UFC/100 ml)] ; de 18,88 à 22,33 [Ln (UFC/100 ml)] et de 19,22 à 21,69 [Ln (UFC/100 ml)] aux concentrations d'extrait 0,05 ; 0,1 et 0,5 % respectivement. Ces abondances cellulaires ont fluctué de 18,12 à 20,98 [Ln (UFC/100 ml)] ; de 17,90 à 20,15 [Ln (UFC/100 ml)] et de 16,25 à 18,83 [Ln (UFC/100 ml)] aux concentrations d'extrait 1 ; 1,5 et 2 % respectivement (**Figure 30**).

En présence de la lumière, la baisse du nombre de cellules cultivables semble accentuée. Les abondances d'*E. coli* entéropathogène ont ainsi varié de 22,61 à 22,99 [Ln (UFC/100 ml)] pour une intensité de 1000 lux ; de 16,04 à 17,05 [Ln (UFC/100 ml)] pour une intensité de 2000 lux ; et de 15,80 à 22,78 [Ln (UFC/100 ml)] pour une intensité de 3000 lux lorsque les cellules sont dans la solution dépourvues d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* (NaCl:0,85 %). En présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* et sous une intensité lumineuse de 1000 lux, les concentrations d'*E. coli* entéropathogène ont fluctué de 19,14 à 22,57 [Ln (UFC/100 ml)] ; de 18,92 à 22,37 [Ln (UFC/100 ml)], de 14,10 à 21,59 [Ln (UFC/100 ml)] aux concentrations d'extrait 0,05 ; 0,1 et 0,5 % respectivement. Ces titres cellulaires ont fluctué de 2,30 à 20,98 [Ln (UFC/100 ml)], de 0 à 19,56 [Ln (UFC/100 ml)] et de 10,49 à 16,72 [Ln (UFC/100 ml)] aux concentrations d'extrait 1 %, 1,5 % et 2 % respectives.

Sous une intensité lumineuse de 2000 lux, les titres d'*E. coli* entéropathogène ont été comprises entre 14,25 et 16,56 [Ln (UFC/100 ml)], entre 13,98 et 16,07 [Ln (UFC/100 ml)], et entre 11,33 et 16,03 [Ln (UFC/100 ml)] aux concentrations d'extrait 0,05 %, 0,1 % et 0,5% respectivement.

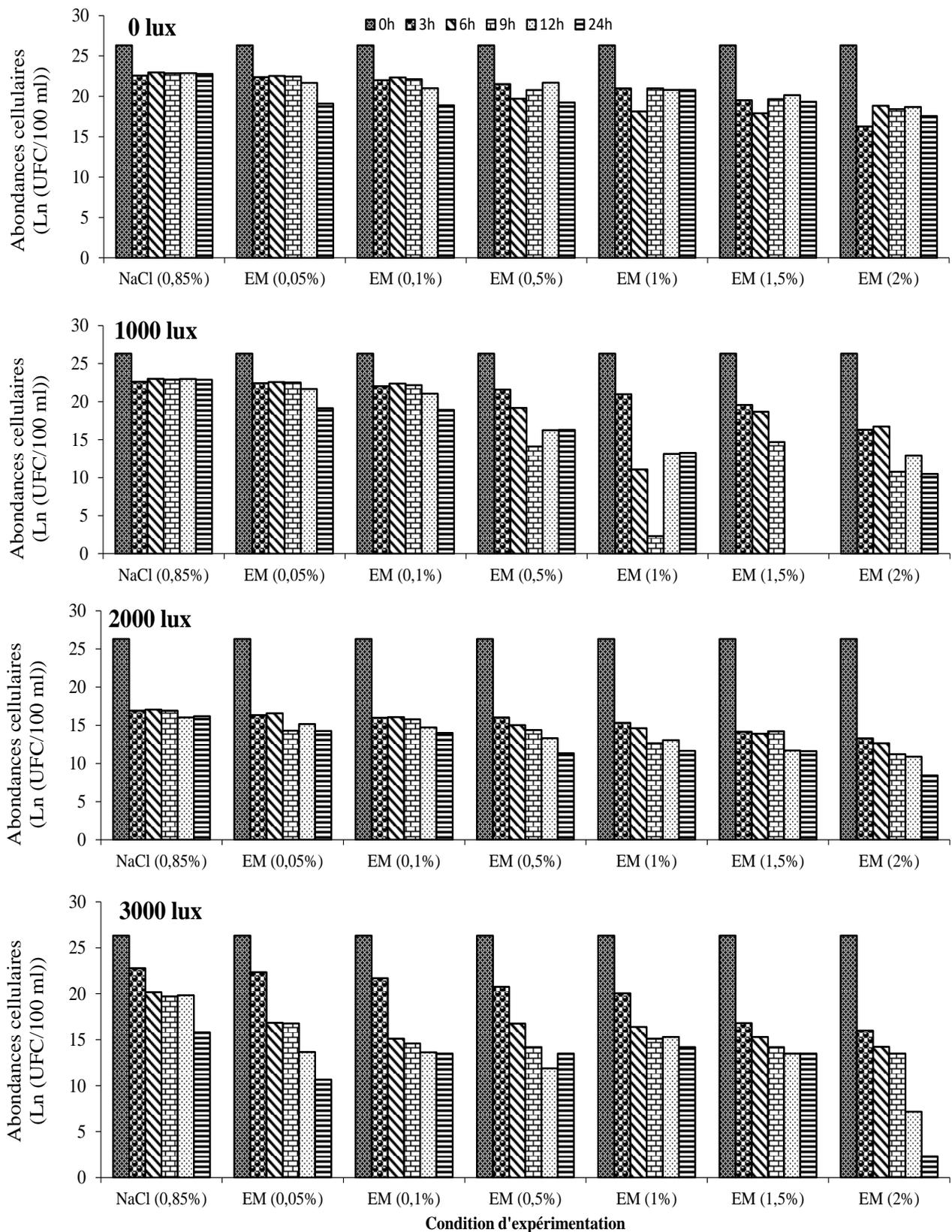


Figure 30: Variation temporelle des abondances cellulaires d'*Escherichia coli* entéropathogène en présence de différentes concentrations d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* (EM), sous différentes intensités lumineuses.

Aux concentrations d'extrait 1 % ; 1,5 % et 2 %, ces abondances cellulaires ont fluctué respectivement entre 11,66 et 15,33 [Ln (UFC/100 ml)], entre 11,61 et 14,21 [Ln (UFC/100 ml)] et entre 8,44 et 13,28 [Ln (UFC/100 ml)].

Sous une intensité de 3000 lux, les concentrations des cellules cultivables *E. coli* entéropathogène ont fluctué entre 10,66 et 22,35 [Ln (UFC/100 ml)], entre 13,50 et 21,68 [Ln (UFC/100 ml)], et entre 11,88 et 20,76 [Ln (UFC/100 ml)] aux concentrations d'extrait 0,05 ; 0,1 et 0,5 % respectivement. Ces titres cellulaires ont fluctué entre 14,19 et 20,06 [Ln (UFC/100 ml)], entre 13,50 et 16,80 [Ln (UFC/100 ml)], et entre 2,30 et 15,99 [Ln (UFC/100 ml)] aux concentrations 1 ; 1,5 et 2 % respectivement. Les densités cellulaires les plus basses ont été enregistrées après 24 heures d'incubation aux concentrations 1 ; 1,5 et 2 % sous une intensité de 3000 lux (**Figure 30**).

III.1.2.2.2- Variation temporelle des abondances d'*Enterococcus faecalis* planctonique

En l'absence de lumière c'est-à-dire à d'obscurité (condition expérimentale : 0 lux), les abondances d'*Enterococcus faecalis* ont aussi varié en présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*. Elles ont ainsi fluctué entre 17,32 et 19,32 [Ln (UFC/100 ml)], entre 14,91 et 16,86 [Ln (UFC/100 ml)], et entre 13,75 et 16,05 [Ln (UFC/100 ml)] aux concentrations d'extrait 0,05%, 0,1%, 0,5% respectivement. Aux concentrations d'extrait 1 %, 1,5 % et 2 %, les titres cellulaires d'*Enterococcus faecalis* ont fluctué entre 11,37 et 15,70 [Ln (UFC/100 ml)], entre 11,11 et 13,59 [Ln (UFC/100 ml)], et entre 9,90 et 11,78 [Ln (UFC/100 ml)] respectivement (**Figure 31**).

En présence de la lumière, la cultivabilité d'*Enterococcus faecalis* est également influencée par les extraits aqueux d'*Eucalyptus microcorys*. Les différentes concentrations d'extrait 0,05 ; 0,1 et 0,5 % ont induit respectivement une variation des abondances cellulaires de 16,92 à 18,42 [Ln (UFC/100 ml)], de 14,40 à 17,34 [Ln (UFC/100 ml)], et de 13,34 à 15,64 [Ln (UFC/100 ml)] sous une intensité de 1000 lux. Pour la même intensité lumineuse, les densités cellulaires ont varié de 0,96 à 13,41 [Ln (UFC/100 ml)], de 10,70 à 13,19 [Ln (UFC/100 ml)] et de 9,09 à 10,19 [Ln (UFC/100 ml)] aux concentrations d'extrait 1 %, 1,5 % et 2 % respectivement. Sous une intensité lumineuse de 2000 lux, les concentrations d'extrait de 0,05 ; 0,1 et 0,5 % ont induit respectivement une variation d'abondances cellulaires de 17,01 à 18,23 [Ln (UFC/100 ml)], de 14,83 à 16,91 [Ln (UFC/100 ml)] et de 12,21 à 14,44 [Ln (UFC/100 ml)]. Ces titres cellulaires ont fluctué de 10,87 à 13,02 [Ln (UFC/100 ml)], 8,52 à 10,60 [Ln (UFC/100 ml)] et de 8,29 à 10,13 [Ln (UFC/100 ml)] aux concentrations d'extrait 1 %, 1,5 % et 2 % respectives. Les plus faibles abondances ont été enregistrées aux concentrations 1, 1,5 et 2 % après 24 h d'incubation sous 3000 lux (**Figure 31**).

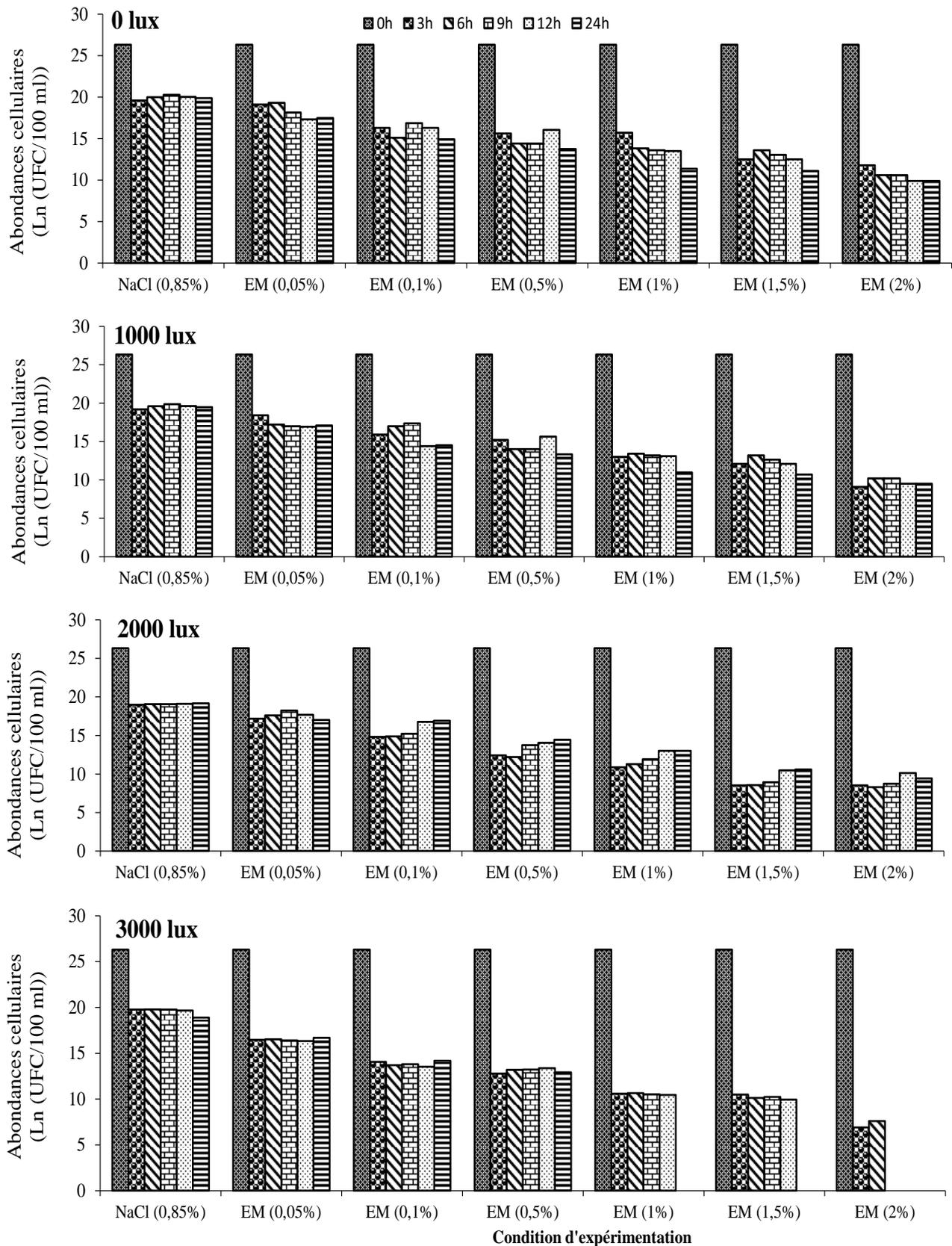


Figure 31: Variation temporelle des abondances cellulaires d'*Enterococcus faecalis* en présence de différentes concentrations d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* (EM) sous différentes intensités lumineuses.

III.1.3- Pourcentage d'inhibition des cellules planctoniques en présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*

Le pourcentage d'inhibition ou pourcentage des cellules métaboliquement non cultivables a été calculé afin d'évaluer l'impact direct de l'extrait aqueux d'*Eucalyptus microcorys*, à différentes concentrations, sur la survie des espèces bactériennes utilisées, sous l'influence de la température d'incubation, de l'intensité lumineuse et de la durée d'incubation.

III.1.3.1- Pourcentage d'inhibition des cellules planctoniques en présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* et sous diverses températures d'incubation

Dans la solution d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*, la cultivabilité de la souche d'*Escherichia coli* entéropathogène est relativement inhibée. Les pourcentages d'inhibition d'*Escherichia coli* entéropathogène sous diverses températures d'incubation sont présentés dans le **Tableau VI**. Dans la majorité de cas, le pourcentage d'inhibition augmente avec la température d'incubation et la concentration d'extrait de plante dans la solution. En considérant l'ensemble des concentrations d'extrait, le pourcentage des cellules métaboliquement non cultivable a varié de 4 à 95 % à la température d'incubation de 7 °C, de 26 à 100 % à 23 °C, de 10 à 100 % à 37 °C, et de 43 à 100 % à 44 °C. Le plus faible pourcentage d'inhibition a été noté à la température de 7 °C et à la plus faible concentration d'extrait (0,05 %). Le plus faible pourcentage d'inhibition est ainsi enregistré en condition psychrophile. Les pourcentages d'inhibition de 100 % ont été notés pour la plupart à 37 °C et 44 °C.

Pour la souche d'*Escherichia coli* commensale, le pourcentage des cellules métaboliquement non cultivable a varié de 19 à 99 % à 7 °C, de 10 à 100 % à 23 °C, de 15 à 100 % à 37 °C, et de 5 à 100 % à 44°C. Les températures 37 °C et 44 °C apparaissent comme celles où les plus forts taux d'inhibition ont été enregistrés. Ces pourcentages d'inhibition sont présentés dans le **Tableau VI**.

Pour *Salmonella typhi*, le pourcentage d'inhibition a varié de 21 à 100 % à 7 °C, de 15 à 100 % à 23°C, de 36 à 100 % à 37°C, et de 3 à 100 % à 44 °C. Les températures 37 °C et 44 °C sont celles où on a enregistré les plus forts taux d'inhibition. Les pourcentages d'inhibition de *Salmonella typhi* sous diverses températures d'incubation sont présentés dans le **Tableau VI**.

La bactérie *Vibrio cholerae* a des pourcentages d'inhibition qui fluctuent entre 26 et 100 %. Dans la majorité des cas, ce pourcentage d'inhibition est supérieur à 80 %. Les pourcentages d'inhibition de *Vibrio cholerae* sous diverses températures d'incubation sont présentés dans le **Tableau VI**.

Tableau VI: Pourcentage d'inhibition (PI) d'*Escherichia coli* entéropathogène, commensale, *Salmonella typhi* et *Vibrio cholerae* après contact avec l'extrait de plante, à chaque température d'incubation et après chaque période incubation

Température d'incubation et concentration d'extrait	Valeurs des PI (%) après chaque période d'incubation										
	<i>Escherichia coli</i> entéropathogène					<i>Escherichia coli</i> commensale					
	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h	
7 °C	0,05 %	48	19	13	4	8	47	20	25	73	59
	0,1 %	60	37	52	13	20	51	54	97	19	93
	0,5 %	68	67	63	29	34	97	84	78	66	57
	1 %	59	5	24	9	13	85	80	83	90	95
	1,5 %	91	17	51	63	82	88	89	85	91	96
	2 %	95	80	56	78	86	93	92	94	99	98
23 °C	0,05 %	28	38	81	26	26	68	36	75	64	93
	0,1 %	65	65	53	39	34	56	77	55	99	10
	0,5 %	72	79	68	48	49	86	54	73	100	45
	1 %	91	56	44	91	91	92	96	87	43	57
	1,5 %	93	100	64	95	91	98	97	90	50	50
	2 %	93	100	68	100	100	99	98	97	65	100
37 °C	0,05 %	26	75	25	10	60	37	46	19	56	15
	0,1 %	62	55	51	90	39	92	52	29	58	17
	0,5 %	87	98	100	99	96	78	81	55	96	86
	1 %	91	98	100	100	100	97	97	95	77	99
	1,5 %	91	98	100	100	100	98	100	96	79	100
	2 %	98	100	100	100	100	99	100	100	100	100
44 °C	0,05 %	74	72	80	43	70	5	12	51	74	68
	0,1 %	98	84	89	94	92	71	41	62	88	50
	0,5 %	98	99	99	99	100	93	93	87	89	84
	1 %	100	100	100	100	100	93	97	99	94	93
	1,5 %	100	100	100	100	100	97	100	99	97	99
	2 %	100	100	100	100	100	98	100	100	100	100
Température et concentration d'extrait	<i>Salmonella typhi</i>					<i>Vibrio cholerae</i>					
	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h	
7 °C	0,05 %	24	24	38	21	41	79	78	90	95	97
	0,1 %	58	74	72	55	70	90	90	96	97	99
	0,5 %	69	96	96	60	81	99	98	98	98	99
	1 %	82	94	92	96	99	91	91	96	98	99
	1,5 %	98	99	98	99	100	92	92	98	98	99
	2 %	98	100	100	99	100	100	99	99	99	100
23 °C	0,05 %	44	35	54	17	15	84	81	84	82	63
	0,1 %	45	41	57	67	56	88	84	84	81	79
	0,5 %	55	56	90	93	91	91	91	26	27	89
	1 %	84	76	89	93	85	91	89	43	46	94
	1,5 %	99	91	95	95	87	91	91	70	89	96
	2 %	100	96	98	98	99	95	95	83	94	98
37 °C	0,05 %	50	68	40	36	39	89	91	90	93	95
	0,1 %	72	92	75	54	70	94	95	95	95	99
	0,5 %	95	93	93	83	89	96	98	98	96	99
	1 %	100	95	97	96	96	97	99	98	98	100
	1,5 %	100	95	98	98	99	98	99	100	99	100
	2 %	100	100	100	100	99	100	100	100	100	100
44 °C	0,05 %	75	56	54	48	3	49	33	49	33	42
	0,1 %	80	71	97	96	54	75	68	78	70	80
	0,5 %	96	95	100	100	100	90	87	91	90	90
	1 %	99	97	94	95	100	92	100	100	100	100
	1,5 %	100	98	98	98	100	95	100	100	100	100
	2 %	100	99	100	100	100	97	100	100	100	100

Enterococcus faecalis est l'espèce bactérienne qui semble enregistrer les plus forts taux d'inhibition cellulaire quelle que soit la température d'expérimentation et la concentration d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*. Ces pourcentages d'inhibition ont varié de 91 à 100 % à la température d'incubation de 7 °C, de 94 à 100 % à 23 °C, de 88 à 100 % à 37 °C, et de 99 à 100 % à 44°C. Ces pourcentages d'inhibition sont présentés dans le **Tableau VII**.

Tableau VII: Pourcentage d'inhibition (PI) d' *Enterococcus* après contact avec l'extrait de plante, à chaque température d'incubation et après chaque période incubation

Température d'incubation et concentration d'extrait		Valeurs des PI (%) après chaque période d'incubation				
		<i>Enterococcus faecalis</i>				
		3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
7 °C	0,05 %	91	99	99	99	99
	0,1 %	96	99	100	100	100
	0,5 %	98	100	100	100	100
	1 %	100	100	100	100	100
	1,5 %	100	100	100	100	100
	2 %	100	100	100	100	100
23 °C	0,05 %	97	98	98	98	94
	0,1 %	99	99	99	99	97
	0,5 %	99	100	100	100	100
	1 %	100	100	100	100	100
	1,5 %	100	100	100	100	100
	2 %	100	100	100	100	100
37 °C	0,05 %	98	98	96	88	88
	0,1 %	98	98	98	90	90
	0,5 %	100	100	100	99	99
	1 %	100	100	100	100	100
	1,5 %	100	100	100	100	100
	2 %	100	100	100	100	100
44 °C	0,05 %	100	100	100	100	99
	0,1 %	100	100	100	100	99
	0,5 %	100	100	100	100	100
	1 %	100	100	100	100	100
	1,5 %	100	100	100	100	100
	2 %	100	100	100	100	100

III.1.3.2- Pourcentage d'inhibition des cellules planctoniques en présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* et sous diverses intensités lumineuses

En condition d'obscurité, le pourcentage des cellules métaboliquement non cultivable a varié de 17 à 99 % et de 38 à 100 % pour *Escherichia coli* entéropathogène et *Enterococcus faecalis* respectivement. Ces taux d'inhibition augmentent en condition lumineuse après chaque période d'incubation. Sous une intensité de 1000 lux, les pourcentages d'inhibition ont fluctué de 16 à

100% pour la souche *Escherichia coli* entéropathogène et de 53 à 100 % pour *Enterococcus faecalis* lorsqu'on considère l'ensemble des concentrations d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*.

Sous une intensité de 2000 lux, ces taux d'inhibition ont fluctué entre 38 et 100 % pour *Escherichia coli* entéropathogène et entre 57 et 100 % pour *Enterococcus faecalis*. Sous 3000 lux, les pics de 100 % d'inhibition ont été obtenus après 12 heures d'incubation à une concentration d'extrait de 0,05 % pour *Escherichia coli* entéropathogène, et après 3 heures d'incubation dans une solution d'extrait de concentration 0,1 % pour *Enterococcus faecalis*.

Dans l'ensemble, l'intensité lumineuse 3000 lux semble être celle qui entraîne le maximum d'inhibition cellulaire pour *Escherichia coli* entéropathogène et *Enterococcus faecalis*. Ces pourcentages d'inhibition sont présentés dans le **Tableau VIII**.

Tableau VIII: Pourcentage d'inhibition (PI) d'*Escherichia coli* entéropathogène et d'*Enterococcus faecalis*, après contact avec l'extrait de plante, à chaque condition de luminosité et après chaque période incubation

Condition de luminosité et différentes concentrations d'extrait de plantes d' <i>Eucalyptus microcorys</i>		Valeurs des PI (%) après chaque période d'incubation									
		<i>Escherichia coli</i> entéropathogène					<i>Enterococcus faecalis</i>				
		3 h	6 h	9 h	12 h	24 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
Obscurité (0 lux)	0,05 %	17	36	32	70	97	38	49	88	93	91
	0,1 %	44	47	52	84	98	96	99	97	98	99
	0,5 %	65	96	88	69	97	98	100	100	98	100
	1 %	79	99	84	87	86	98	100	100	100	100
	1,5 %	95	99	96	93	97	100	100	100	100	100
	2 %	100	98	99	98	99	100	100	100	100	100
1000 lux	0,05 %	16	35	33	73	98	53	91	94	93	91
	0,1 %	44	47	52	85	98	96	93	92	99	99
	0,5 %	64	98	100	100	100	98	100	100	98	100
	1 %	80	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	1,5 %	95	99	100	100	100	100	100	100	100	100
	2 %	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2000 lux	0,05 %	43	38	93	59	86	84	77	57	76	88
	0,1 %	61	62	68	73	89	98	98	98	90	90
	0,5 %	59	87	92	94	99	100	100	100	99	99
	1 %	79	91	99	95	99	100	100	100	100	100
	1,5 %	94	96	93	99	99	100	100	100	100	100
	2 %	97	99	100	99	100	100	100	100	100	100
3000 lux	0,05 %	35	96	95	100	99	96	96	97	96	89
	0,1 %	67	99	99	100	90	100	100	100	100	99
	0,5 %	87	97	100	100	90	100	100	100	100	100
	1 %	93	98	99	99	80	100	100	100	100	100
	1,5 %	100	99	100	100	90	100	100	100	100	100
	2 %	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

III.1.4- Vitesses d'inhibition des cellules planctoniques en présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* sous diverses températures d'incubation et intensités lumineuses

III.1.4.1- Vitesses d'inhibition des cellules planctoniques en présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* sous diverses températures d'incubation

Les vitesses d'inhibition cellulaire ont été évaluées en déterminant l'équation de la droite de régression de l'évolution des abondances des cellules bactériennes en unité logarithmique népérien (UFC/100 ml) en fonction des périodes d'incubation. Les valeurs de ces vitesses sont présentées dans les **Annexes 1 à 3**.

III.1.4.1.1- Vitesses d'inhibition des cellules *Escherichia coli* planctoniques

Que l'on considère la souche *Escherichia coli* entéropathogène ou la souche commensale, la vitesse d'inhibition cellulaire pour chaque température d'incubation augmente avec la concentration de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys*. La **Figure 32** présente les variations des vitesses d'inhibition cellulaire des cellules *E. coli* en fonction de la concentration d'extrait aqueux.

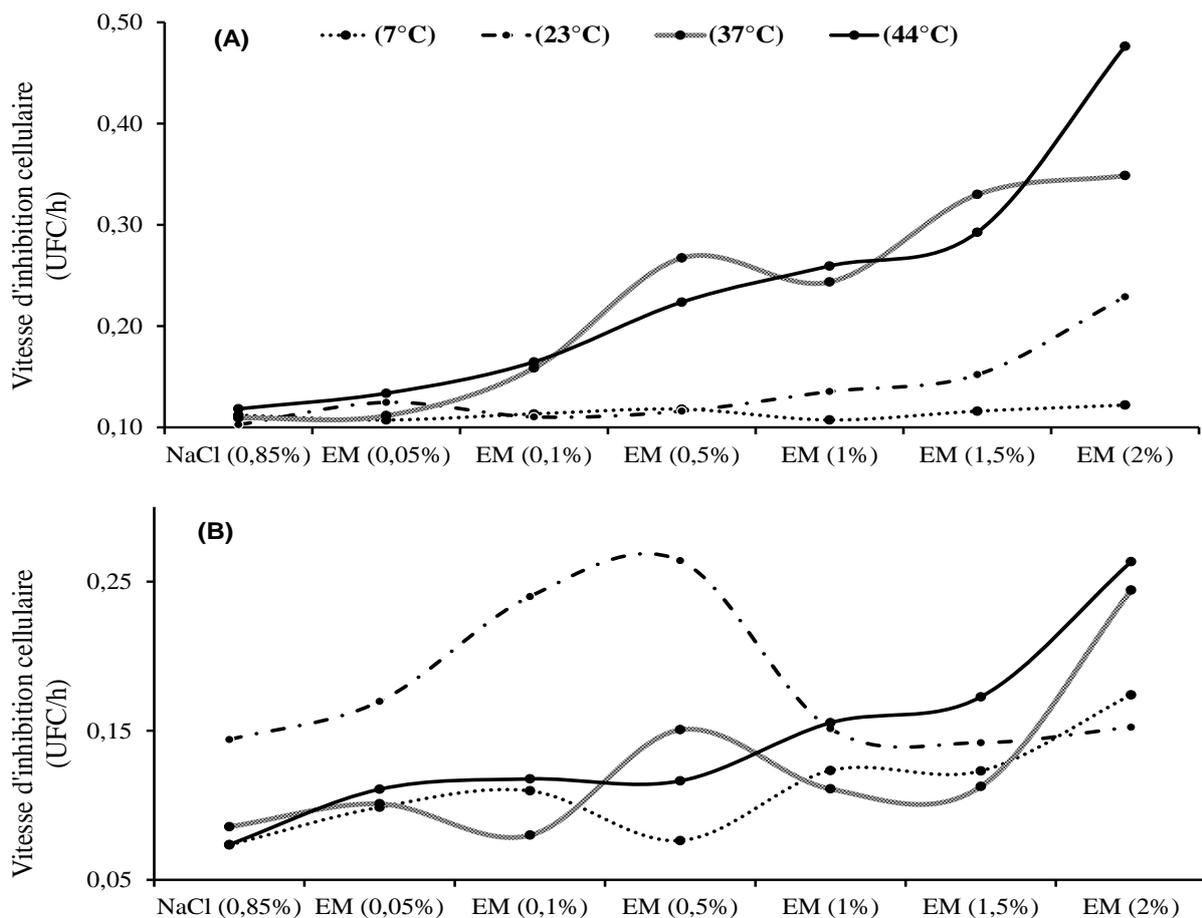


Figure 32: Evolution de la vitesse d'inhibition cellulaire d'*E. coli* entéropathogène (A) et d'*E. coli* commensale (B) en fonction des concentrations de l'extrait aqueux d'*Eucalyptus microcorys* à différentes températures d'incubation.

En condition psychrophile (température d'incubation de 7 °C), les vitesses d'inhibition enregistrées pour *E. coli* entéropathogène ont été de 0,107 h⁻¹; 0,113 h⁻¹; 0,118 h⁻¹; 0,107 h⁻¹; 0,116 h⁻¹ et 0,122 h⁻¹ en présence des extraits d'*Eucalyptus microcorys* de concentrations 0,05 % ; 0,1 % ; 0,5 % ; 1% ; 1,5 % et 2 % respectivement. Aux mêmes concentrations d'extraits, elles ont été respectivement de 0,125 h⁻¹; 0,110 h⁻¹; 0,116 h⁻¹; 0,135 h⁻¹; 0,152 h⁻¹ et 0,229 h⁻¹ à la température d'incubation de 23 °C. Les vitesses d'inhibition de 0,112 h⁻¹; 0,159 h⁻¹; 0,267 h⁻¹; 0,244 h⁻¹; 0,330 h⁻¹ et 0,349 h⁻¹ ont été notées à la température de 37 °C. Ces vitesses d'inhibition ont varié entre 0,134 h⁻¹ et 0,476 h⁻¹ pour une température d'incubation de 44 °C pour l'ensemble des concentrations d'extrait. A chaque concentration d'extrait, les vitesses d'inhibition les plus élevées ont été enregistrées aux températures d'incubation 37 °C et 44 °C (**Figure 32A**).

Pour *Escherichia coli* commensale, les vitesses d'inhibition ont été de 0,099 h⁻¹; 0,110 h⁻¹; 0,076 h⁻¹; 0,123 h⁻¹; 0,123 h⁻¹ et 0,174 h⁻¹ à 7 °C en présence des extraits d'*Eucalyptus microcorys* de concentrations 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2 % respectivement. Elles ont varié de 0,142 h⁻¹ à 0,264 h⁻¹ à la température 23 °C ; et de 0,080 h⁻¹ à 0,244 h⁻¹ à 37 °C. A 44 °C, les vitesses d'inhibition enregistrées ont été de 0,111 h⁻¹; 0,118 h⁻¹; 0,116 h⁻¹; 0,155 h⁻¹; 0,173 h⁻¹ et 0,263 h⁻¹ aux concentrations d'extrait 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2 % respectivement (**Figure 32B**).

III.1.4.1.2- Vitesses d'inhibition des cellules *Salmonella typhi* planctoniques

Pour l'ensemble des concentrations d'extrait, les cinétiques d'inhibition des cellules *Salmonella typhi* ont fluctué entre 0,119 h⁻¹ et 0,232 h⁻¹ à une température de 7°C, entre 0,162 h⁻¹ et 0,232 h⁻¹ à 23 °C, entre 0,155 h⁻¹ et 0,255 h⁻¹ à 37 °C, et entre 0,138 h⁻¹ et 0,238 h⁻¹ à 44 °C. La vitesse d'inhibition la plus faible a été enregistrée à une température 7 °C lorsque la concentration d'extrait était de 0,05 % ; la plus élevée a été enregistrée à la température de 37 °C lorsque la concentration d'extrait était de 2 % (**Figure 33A**).

Dans l'ensemble, on constate qu'à partir d'une concentration d'extrait de 0,5 %, toutes les valeurs des vitesses d'inhibitions sont comprises entre 0,207 h⁻¹ et 0,232 h⁻¹ à une température d'incubation de 23 °C.

III.1.4.1.3- Vitesses d'inhibition des cellules *Vibrio cholerae* planctoniques

Les vitesses d'inhibition pour les cellules *Vibrio cholerae* à 7 °C ont été respectivement de 0,113 h⁻¹; 0,129 h⁻¹; 0,122 h⁻¹; 0,134 h⁻¹; 0,146 h⁻¹ et 0,142 h⁻¹ aux concentrations d'extrait 0,05 % ; 0,1 % ; 0,5 % ; 1 % ; 1,5 % et 2 %. Ces vitesses d'inhibition ont fluctué entre 0,077 h⁻¹ et 0,161 h⁻¹ à 23 °C, et entre 0,099 h⁻¹ et 0,287 h⁻¹ à 37 °C. Sous une incubation de 44 °C, ces vitesses d'inhibition ont été de 0,080 h⁻¹; 0,099 h⁻¹; 0,123 h⁻¹; 0,235 h⁻¹; 0,324 h⁻¹ et 0,364 h⁻¹ aux concentrations d'extrait 0,05 % ; 0,1 % ; 0,5 % ; 1 % ; 1,5 % et 2 % respectivement (**Figure 33B**).

Dans l'ensemble, les vitesses d'inhibition semblent faibles en condition psychrophile et légèrement élevées aux températures d'incubation 37 °C et 44 °C.

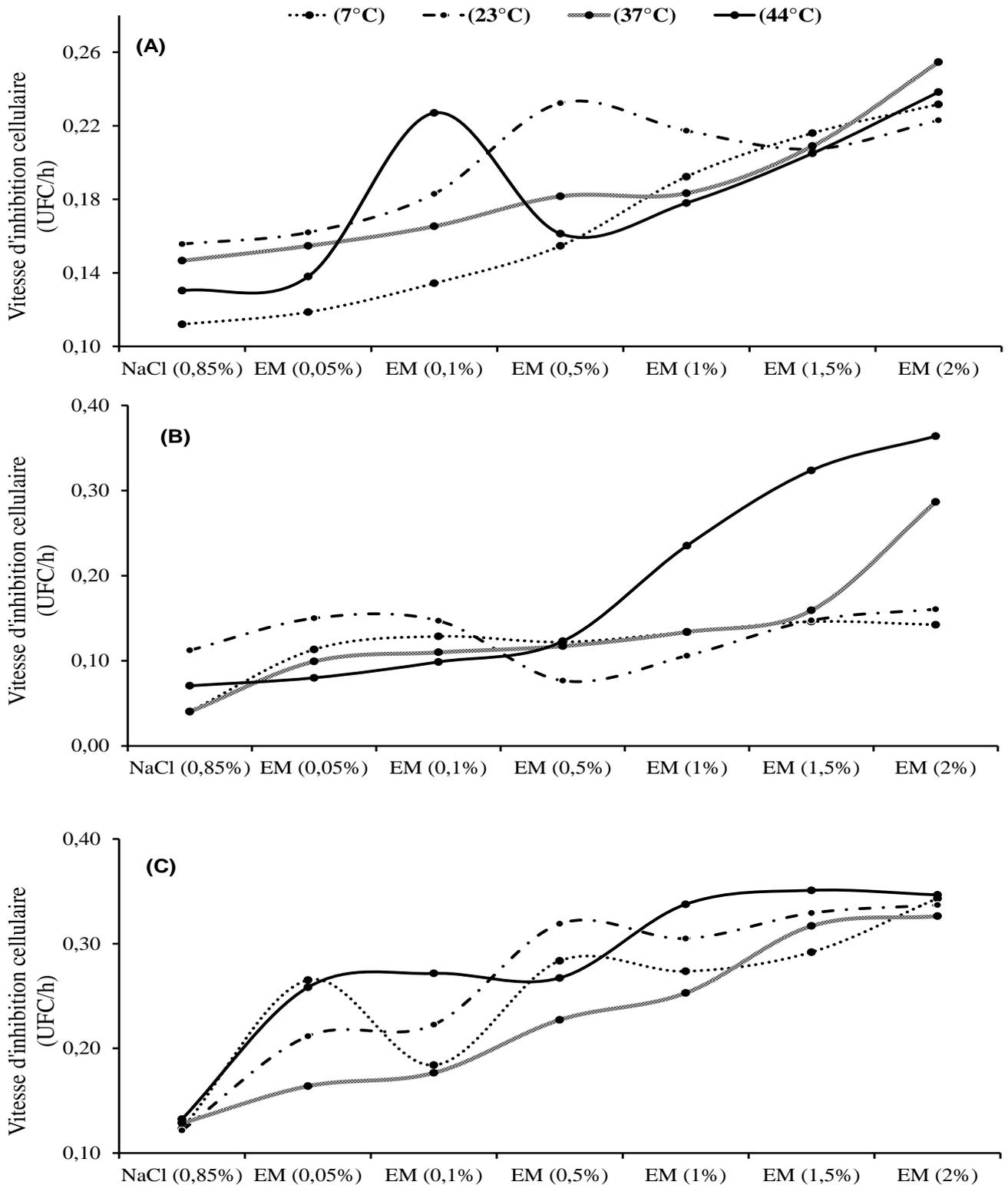


Figure 33: Variation des vitesses d'inhibition des cellules de *Salmonella typhi* (A), de *Vibrio cholerae* (B) et d'*Enterococcus faecalis* (C) en fonction des concentrations d'extrait aqueux d'*Eucalyptus microcorys* à différentes températures d'incubation.

III.1.4.1.4- Vitesses d'inhibition des cellules *Enterococcus faecalis* planctoniques

Les vitesses d'inhibition des cellules *Enterococcus faecalis* ont varié de 0,184 h⁻¹ à 0,343 h⁻¹ à la température d'incubation de 7 °C. Aux concentrations d'extrait 0,05 % ; 0,1 % ; 0,5 % ; 1 % ; 1,5 % et 2 %, elles ont été respectivement de 0,212 h⁻¹ ; 0,223 h⁻¹ ; 0,319 h⁻¹ ; 0,305 h⁻¹ ; 0,329 h⁻¹ et 0,337 h⁻¹ sous une incubation de 23 °C. Ces vitesses ont été respectivement de 0,164 h⁻¹ ; 0,177 h⁻¹ ; 0,227 h⁻¹ ; 0,253 h⁻¹ ; 0,317 h⁻¹ et 0,326 h⁻¹ sous une incubation de 37 °C. A une température de 44 °C, la cinétique a varié entre 0,258 h⁻¹ et 0,351 h⁻¹. Dans l'ensemble, les vitesses d'inhibition semblent faibles en condition psychrophile et légèrement élevées aux températures d'incubation 37 °C et 44 °C (**Figure 33C**). Il est aussi à noter que les valeurs des vitesses d'inhibition d'*Enterococcus faecalis* semblent relativement plus élevées que celles des autres espèces bactériennes testées au cours des expériences.

III.1.4.2- Vitesses d'inhibition des cellules planctoniques en présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* sous diverses intensités lumineuses

Une inactivation relativement lente mais apparente des espèces bactériennes étudiées a été constatée au cours des expériences réalisées dans l'obscurité. Dans ces conditions expérimentales, les valeurs des vitesses d'inhibition des cellules *E. coli* entéropathogène ont été de 0,102 h⁻¹ ; 0,116 h⁻¹ ; 0,111 h⁻¹ ; 0,123 h⁻¹ ; 0,136 h⁻¹ et 0,146 h⁻¹ aux concentrations d'extrait 0,05 % ; 0,1 % ; 0,5 % ; 1 % ; 1,5 % et 2 % respectives. Ces vitesses d'inhibition ont été respectivement de 0,211 h⁻¹ ; 0,216 h⁻¹ ; 0,242 h⁻¹ ; 0,308 h⁻¹ ; 0,301 h⁻¹ et 0,378 h⁻¹ pour les cellules *Enterococcus faecalis* (**Figure 34**).

En présence de la lumière, on note de façon générale une relative augmentation de ces vitesses d'inhibition cellulaire. Sous une intensité de 1000 lux, les valeurs des vitesses d'inhibition de *E. coli* entéropathogène ont été de 0,103 h⁻¹ ; 0,115 h⁻¹ ; 0,307 h⁻¹ ; 0,501 h⁻¹ ; 0,639 h⁻¹ et 0,359 h⁻¹ aux concentrations d'extrait 0,05 % ; 0,1 % ; 0,5 % ; 1 % ; 1,5 % et 2 % respectives. Dans les mêmes conditions d'expérimentation, ces vitesses d'inhibition ont été de l'ordre de 0,225 h⁻¹ ; 0,249 h⁻¹ ; 0,251 h⁻¹ ; 0,292 h⁻¹ ; 0,310 h⁻¹ et 0,362 h⁻¹ pour les cellules *Enterococcus faecalis*. Sous une intensité lumineuse de 2000 lux, les cellules de *E. coli* entéropathogène ont présenté des vitesses d'inhibition de 0,271 h⁻¹ ; 0,260 h⁻¹ ; 0,308 h⁻¹ ; 0,327 h⁻¹ ; 0,324 h⁻¹ et 0,366 h⁻¹ aux mêmes concentrations d'extrait respectives. Ces vitesses d'inhibition ont été de 0,180 h⁻¹ ; 0,208 h⁻¹ ; 0,258 h⁻¹ ; 0,284 h⁻¹ ; 0,348 h⁻¹ et 0,357 h⁻¹ pour les cellules *Enterococcus faecalis*. Sous une intensité lumineuse de 3000 lux, ces vitesses d'inactivation cellulaire ont été de 0,343 h⁻¹ ; 0,361 h⁻¹ ; 0,394 h⁻¹ ; 0,300 h⁻¹ ; 0,314 h⁻¹ et 0,453 h⁻¹ pour *E. coli* entéropathogène aux concentrations d'extrait 0,05 % ; 0,1 % ; 0,5 % ; 1 % ; 1,5 % et 2 % respectives, et de l'ordre de 0,223 h⁻¹ ; 0,287 h⁻¹ ; 0,283 h⁻¹ ; 0,353 h⁻¹ ; 0,366 h⁻¹ et 0,662 h⁻¹ pour *Enterococcus faecalis*.

Les valeurs de vitesse les plus élevées ont généralement été enregistrées à la concentration d'extrait 2 %. Ces valeurs semblent augmenter avec l'augmentation de l'intensité lumineuse (Figure 34).

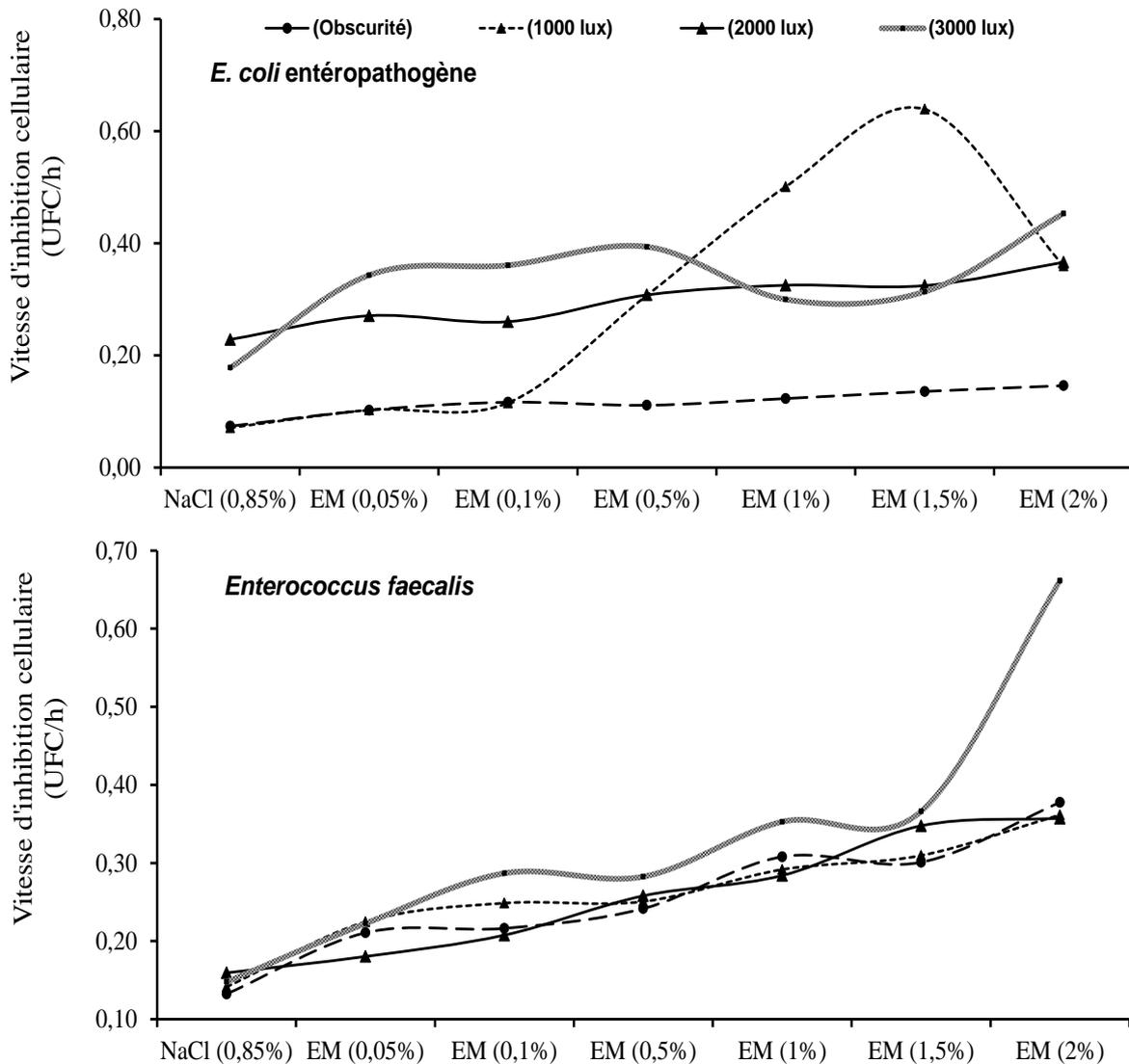


Figure 34: Variation des vitesses d'inhibition des cellules *Escherichia coli* entéropathogène et d'*Enterococcus faecalis* en fonction des concentrations de l'extrait aqueux d'*Eucalyptus Microcorys* à différentes intensités lumineuses

Durant l'étude, une variation de la température de la solution a été notée. Cette température a augmenté progressivement avec l'intensité lumineuse. En condition d'obscurité, la température de l'eau a fluctué entre 22 et 24 °C. Sous une intensité de 1000 lux, elle a varié de 38 à 42 °C. Sous une intensité de 2000 lux et 3000 lux, elle a varié respectivement de 39 à 50 °C et de 40 à 50 °C (Figure 35). Cette augmentation pourrait influencer la vitesse d'inactivation cellulaire.

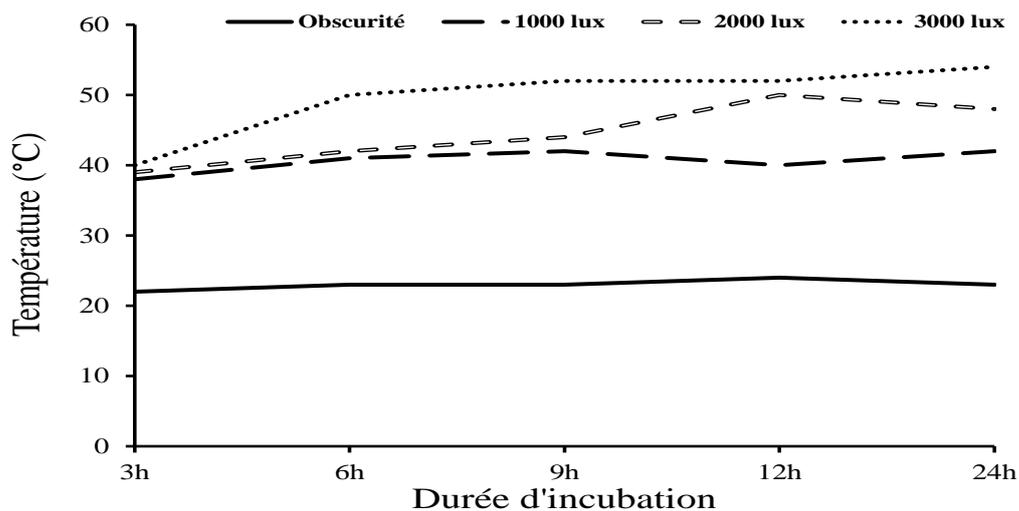


Figure 35: Variation temporelle de la température des solutions durant l'expérience

III.1.5- Effet de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* sur l'adhésion bactérienne aux différentes phases de croissance cellulaire

III.1.5.1- Phases de croissance des cellules utilisées

Afin d'obtenir des cellules bactériennes à un état physiologique particulier, les différentes phases de croissance cellulaire d'*Escherichia coli* entéropathogène ont été recherchées. Il en ressort que la croissance d'*E. coli* entéropathogène en milieu liquide peptoné non renouvelé décrit une courbe hyperbolique à 4 phases qui se succèdent en fonction du temps. Une phase de latence ou d'adaptation de croissance, une phase de croissance exponentielle, une phase stationnaire de croissance et une phase de déclin. En considérant t_{0h} comme le moment initial, les différentes phases de croissance sont divisées comme suit : phase de latence de t_{0h} à t_{5h} , phase exponentielle de croissance de t_{5h} à t_{11h} , phase stationnaire de croissance de t_{11h} à t_{23h} , et phase de déclin de croissance de t_{23h} à t_{28h} (**Figure 36**). Les durées des 4 phases sont donc respectivement 5, 6, 12 et 24 heures.

III.1.5.2- Hydrophobicité de surface de cellules de *E. coli* entéropathogène utilisées

L'hydrophobicité de surface des cellules de *E. coli* entéropathogène utilisées en l'absence d'extrait de *Eucalyptus microcorys*, a varié de 67,78 à 72,89 % pour les cellules issues de la phase de latence, de 80,11 à 83,24 % pour celles issues de la phase exponentielle, de 79,49 à 82,62 % pour celles issues de la phase stationnaire et de 47,12 à 50,92 % pour celles issues de la phase de déclin. Les valeurs de ce paramètre augmentent relativement avec la durée d'incubation. Pour l'ensemble des expériences, les valeurs les plus élevées ont été enregistrées lorsque les cellules bactériennes

étaient issues de la phase exponentielle de croissance et les valeurs les plus faibles ont été observées avec des cellules issues de la phase de déclin (**Figure 37**).

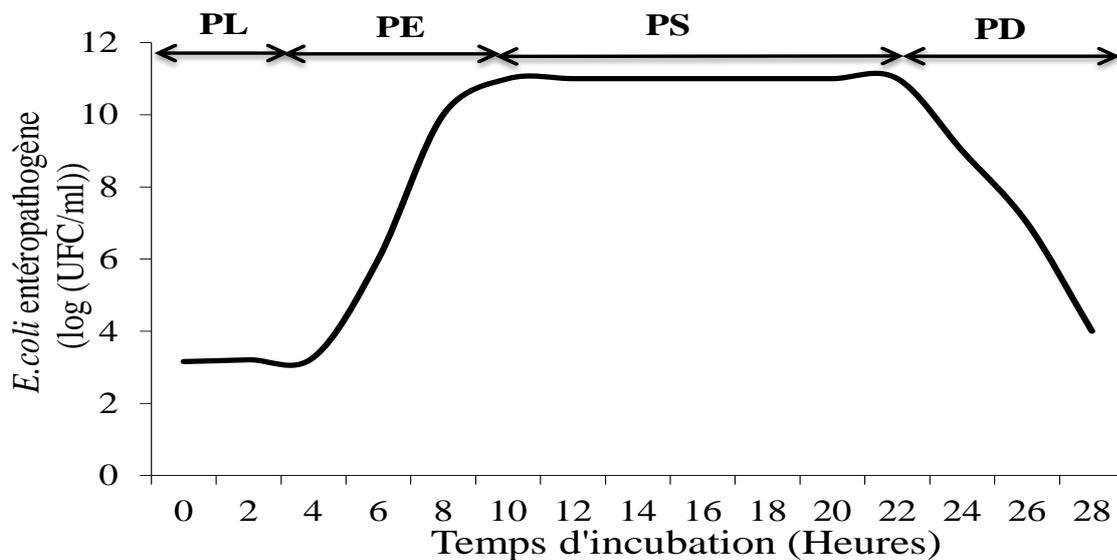


Figure 36: Courbe de croissance cellulaire *E. coli* entéropathogène (**PL**: Phase de Latence; **PE**: Phase Exponentielle de croissance; **PS** : Phase Stationnaire de croissance; **PD** : Phase de Déclin de croissance).

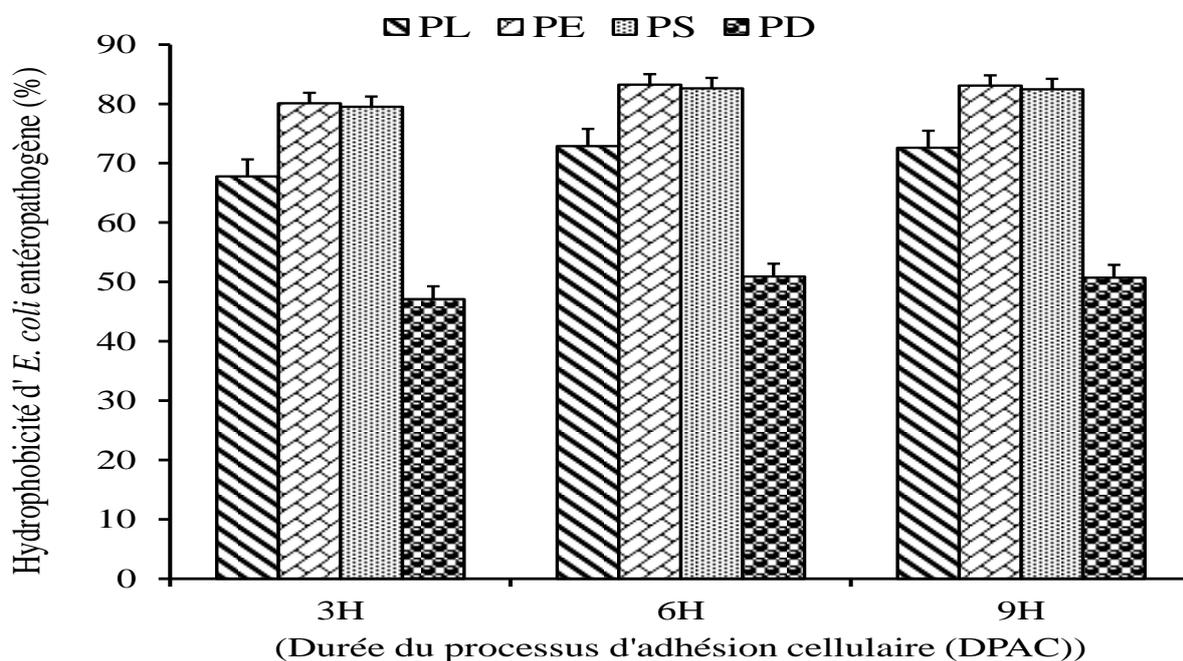


Figure 37: Propriétés physico-chimiques de surface des cellules adhérentes d'*E. coli* entéropathogène, les cellules étant prises à différentes phases de croissance cellulaire (**PL** : Phase de latence; **PE** : Phase de croissance exponentielle; **PS** : Phase stationnaire; **PD** : Phase de déclin).

III.1.5.3- Evolution temporelle des abondances de cellules adhérees au fragment de polyéthylène en l'absence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*

La **Figure 38** illustre les variations temporelles des abondances des cellules de *E. coli* entéropathogène, issues des différentes phases de croissance, adhérees sur le polyéthylène immergé dans la solution d'eau physiologique (NaCl : 0,85 %) considéré comme solution témoin. Les densités cellulaires adhérees, exprimées en unité logarithmique népérien (UFC/cm²), varient de 11,83 à 12,81 ; de 12,60 à 12,70 ; de 14,69 à 15,15 et de 12,15 à 12,71 respectivement pour les cellules issues des phases de latence, exponentielle de croissance, stationnaire et de déclin. L'adhésion cellulaire semble plus marquée en phase stationnaire (**Figure 38**). On note également que les abondances de *E. coli* entéropathogène adhérees au fragment dans la solution témoin (en l'absence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*) fluctuent en fonction de la durée du processus d'adhésion cellulaire.

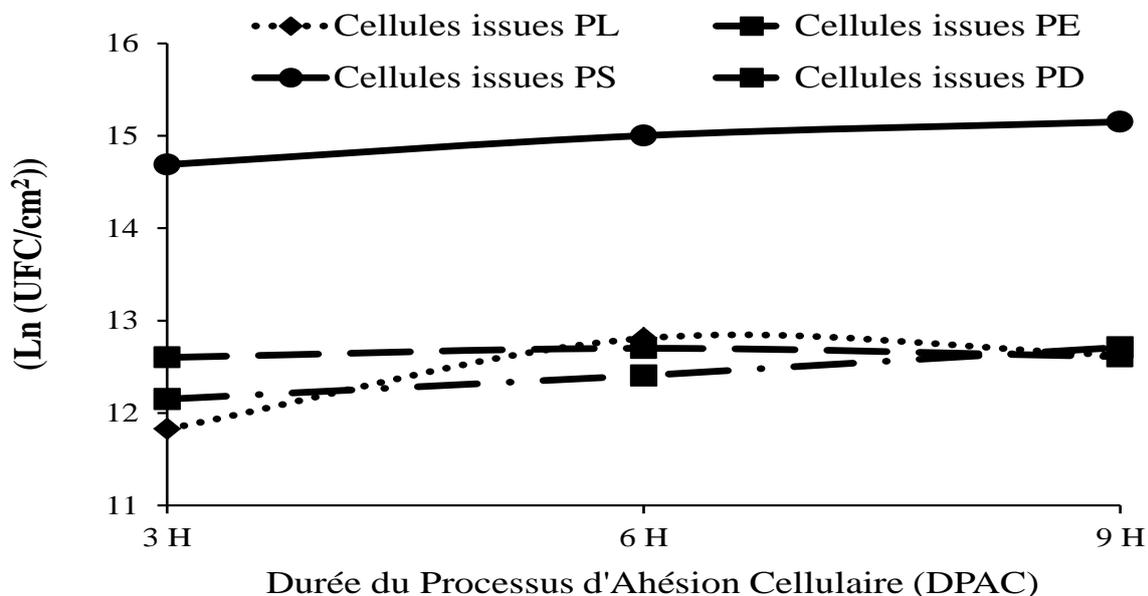


Figure 38: Nombre de cellules *E. coli* entéropathogène adhérees lors du processus d'adhésion cellulaire (3H, 6H et 9H) dans la solution de NaCl (0,85 %), les cellules étant prises à différentes phases de croissance cellulaire (PL : Phase de Latence; PE : Phase de croissance Exponentielle; PS : Phase Stationnaire; PD : Phase de Déclin).

III.1.5.4- Vitesse d'adhésion apparente d'*Escherichia coli* entéropathogène au polyéthylène

La vitesse d'adhésion d'*Escherichia coli* entéropathogène au polyéthylène a varié dans l'ensemble en fonction des phases de croissance. On a enregistré une cinétique de 0,133 cellules adhérees/cm²/h pour les cellules récoltées à partir de la phase de latence, de 0,001 cellules

adhérées/cm²/h pour les cellules issues de la phase de croissance exponentielle, 0,077 cellules adhérées/cm²/h pour cellules issues de la phase stationnaire de croissance et de 0,093 cellules adhérées/cm²/h pour les cellules issues de la phase de latence. Le **Tableau VI** présente les valeurs de la vitesse d'adhésion cellulaire par heure lorsque les cellules pour les tests d'adsorption sont issues de différentes phases de croissance cellulaire.

Tableau IX: Vitesse d'adhésion cellulaire (cm⁻².h⁻¹) (et coefficients de régression) des cellules *E. coli* entéropathogène issues de différentes phases de croissance cellulaire.

Phase de croissance cellulaire	Vitesse d'adhésion (cm ⁻² .h ⁻¹)
Latence	0,133 (0,586)
Exponentielle	0,001 (0,006)
Stationnaire	0,077 (0,960)
Déclin	0,093 (0,997)

III.1.5.5- Evolution temporelle des abondances des cellules détachées et des cellules restées adhérées au support en présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*

Afin d'évaluer l'effet de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* sur les cellules adhérées, les substrats contenant les bactéries ont séjourné pendant un certain temps (1, 2 et 3 heures) dans la solution d'extrait avant le processus de décrochage des cellules. Au cours de ce séjour, certaines cellules se sont détachées du support et se sont retrouvées sous forme planctonique dans la solution d'extrait. Cette fraction de cellules a constitué ce qu'on a appelé « *cellules détachées* ». Celles qui ne se sont pas détachées du support ont constitué ce qu'on a appelé « *cellules restées adhérées au support* ». La **Figure 39** illustre les variations temporelles des abondances des cellules de *E. coli* entéropathogène restées adhérées au substrat. La **Figure 40** illustre celles des cellules détachées, en fonction des différentes concentrations d'extrait (1, 1,5 et 2 %) utilisées au cours de l'expérimentation.

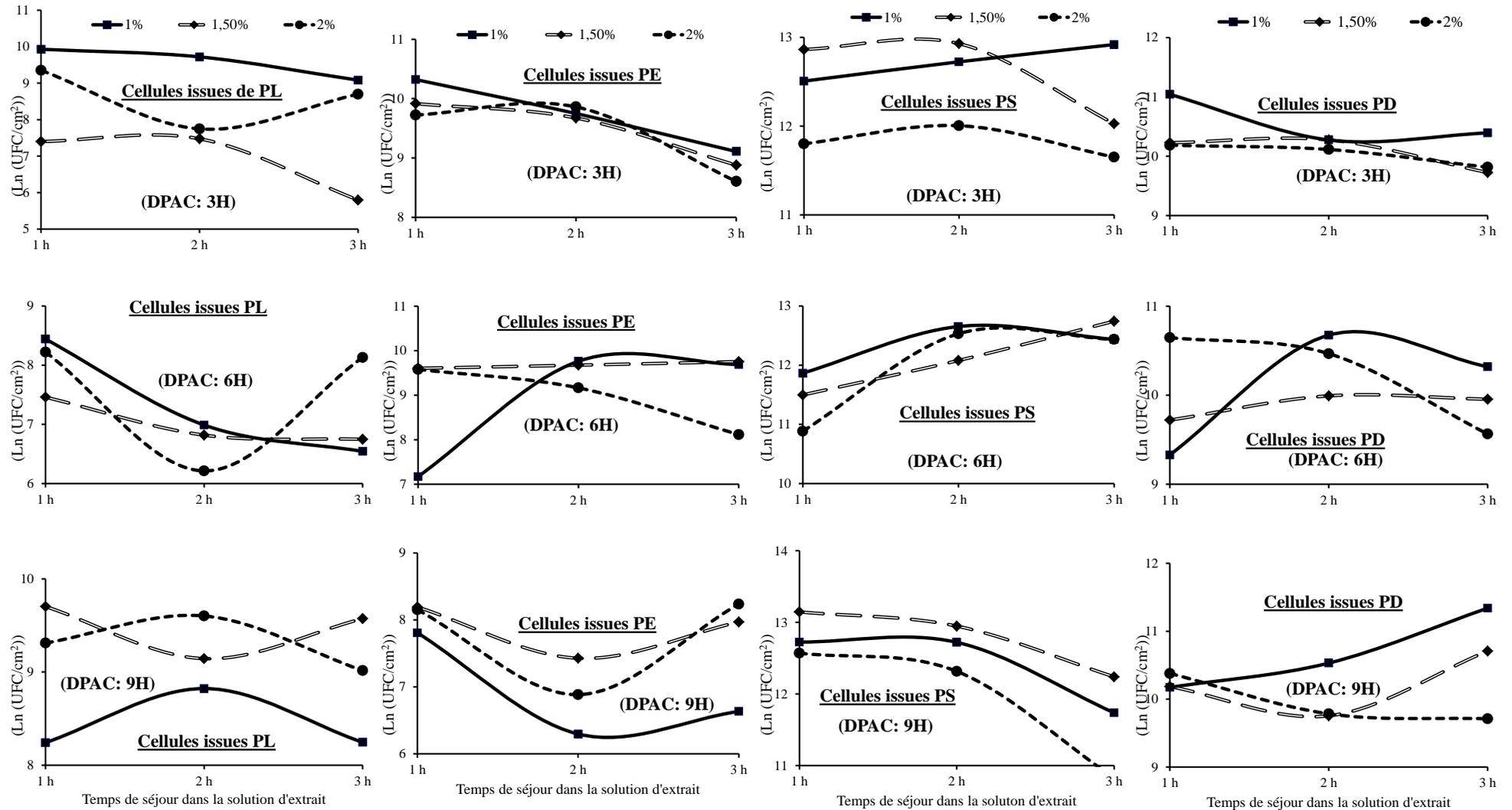


Figure 39 : Variation temporelle après les test d'adsorption, des abondances des cellules de *E. coli* entéropathogène restées adhérentes au polyéthylène après un séjour dans les solutions d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* de différentes concentrations (1 %, 1,5 % and 2 %), les cellules utilisées dans le processus d'adsorption étant issues de la Phase Latence (PL), Phase Exponentielle (PE), Phase Stationnaire (PS), et de la Phase de Déclin (PD).

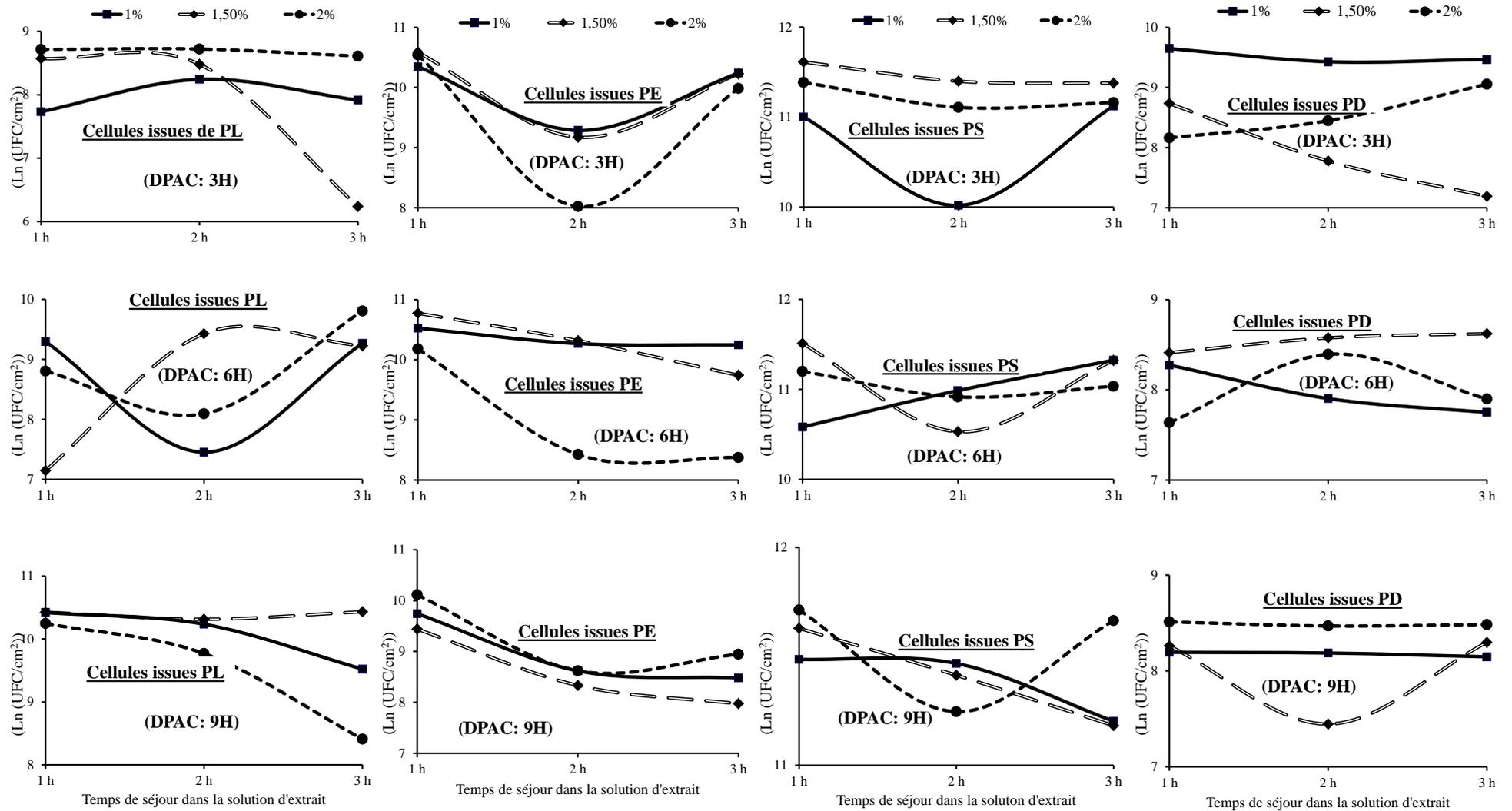


Figure 40: Variation temporelle après les test d'adsorption, des abondances des cellules d' *E. coli* entéropathogène détachées du polyéthylène après un séjour dans les solutions d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* de différentes concentrations (1 %, 1,5 % and 2 %), les cellules utilisées dans le processus d'adsorption étant issues de la Phase Latence (PL), Phase Exponentielle (PE), Phase Stationnaire (PS), et de la Phase de Déclin (PD).

Après un séjour dans une solution d'extrait de concentration 1,5 %, les densités cellulaires restées adhérees ont diminué de 12,81 à 7,40 (Ln (UFC/cm²)) après 1 heure de contact, à 7,40 (Ln (UFC/cm²)) après 2 heures de contact, et à 5,80 (Ln (UFC/cm²)) après 3 heures de contact. Des baisses de 12,81 à 8,22 (Ln (UFC/cm²)) après 1 heure de séjour, de 12,81 à 6,21 (Ln (UFC/cm²)) après 2 heures de séjour, et de 12,81 à 8,13 (Ln (UFC/cm²)) après 3 heures de séjour dans une solution d'extrait de concentration 2 % ont été enregistrées (**Figure 39**). Parallèlement, on observe au retrait du support, que les abondances des bactéries détachées ont varié de 7,45 à 10,42 ((Ln (UFC/cm²)), de 6,24 à 10,43 (Ln (UFC/cm²)), de 8,09 à 10,25 (Ln (UFC/cm²)) respectivement aux concentrations 1, 1,5 et 2 % (**Figure 40**).

III.1.5.5.2- Cellules issues de la phase de croissance exponentielle

Lorsque les cellules sont issues de la phase exponentielle de croissance, les abondances de cellules restées adhérees ont décru de 12,70 à 7,17 (Ln (UFC/cm²)) après 1 heure de séjour, à 6,30 (Ln (UFC/cm²)) après 2 heures de séjour, et à 6,63 (Ln (UFC/cm²)) après 3 heures de séjour dans la solution contenant l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* de concentration 1 %. Après séjour dans la solution d'extrait de concentration 1,5 %, les titres cellulaires restés adhérees ont diminué de 12,70 à 8,19 (Ln (UFC/cm²)) après 1 heure d'incubation, à 7,43 (Ln (UFC/cm²)) après 2 heures d'incubation, et à 7,97 (Ln (UFC/cm²)) après 3 heures de d'incubation. Des baisses de 12,70 à 8,15 (Ln (UFC/cm²)) après 1 heure de contact, à 6,88 (Ln (UFC/cm²)) après 2 heure, à 8,11 (Ln (UFC/cm²)) après 3 heures de contact avec une solution d'extrait de concentration 2 % ont été notées (**Figure 39**). Quant aux bactéries détachées, elles oscillent entre 8,48 et 10,53 (Ln (UFC/cm²)), entre 7,97 et 10,77 (Ln (UFC/cm²)), et entre 8,02 et 10,54 (Ln (UFC/cm²)) pour les mêmes concentrations respectivement (**Figure 40**).

III.1.5.5.3- Cellules issues de la phase de croissance stationnaire

Pour les cellules issues de la phase stationnaire de croissance, les densités cellulaires restées adhérees ont décru de 15,15 à 11,87 (Ln (UFC/cm²)) après 1 heure d'incubation, à 12,65 (Ln (UFC/cm²)) après 2 heures d'incubation, et à 11,74 (Ln (UFC/cm²)) après 3 heures d'incubation dans la solution contenant l'extrait de concentration 1 %. Elles ont varié de 15,15 à 11,50 (Ln (UFC/cm²)) après 1 heure d'incubation, à 12,08 (Ln (UFC/cm²)) après 2 heures d'incubation, et à 12,03 (Ln (UFC/cm²)) après 3 heures d'incubation dans la solution d'extrait de concentration 1,5 %. Dans une solution d'extrait de 2 %, les abondances des cellules restées adhérees ont varié de 15,15 à 10,88 (Ln (UFC/cm²)) après 1 heure de séjour, à 12,00 (Ln (UFC/cm²)) après 2 heures de séjour, et à 10,83 (Ln (UFC/cm²)) après 3 heures de séjour (**Figure 39**).

Quant aux bactéries détachées, leurs abondances ont varié entre 10,58 et 11,49 (Ln (UFC/cm²)) après 1 heure d'incubation, entre 10,02 et 11,47 (Ln (UFC/cm²)) après 2 heures d'incubation, et entre 11,12 et 11,32 (Ln (UFC/cm²)) après 3 heures d'incubation dans la solution d'extrait de concentration 1 %. Ces abondances de cellules détachées ont fluctué entre 11,51 et 11,63 (Ln (UFC/cm²)) après 1 heure, entre 10,53 et 11,41 (Ln (UFC/cm²)) après 2 heures, et entre 11,18 et 11,38 (Ln (UFC/cm²)) après 3 heures d'incubation dans la solution d'extrait de concentration 1,5 %. A une concentration de 2 %, les densités des cellules détachées ont fluctué entre 11,20 et 11,59 (Ln (UFC/cm²)) après 1 heure de séjour, entre 10,78 et 11,11 (Ln (UFC/cm²)) après 2 heures, et entre 11,03 et 11,16 (Ln (UFC/cm²)) après 3 heures de séjour dans une solution d'extrait de concentration 2 % (**Figure 40**).

III.1.5.5.4- Cellules issues de la phase de déclin

Pour les cellules issues de la phase de déclin, les concentrations des cellules restées adhérentes ont diminué de 12,71 à 9,33 (Ln (UFC/cm²)) après 1 heure d'incubation, à 10,27 (Ln (UFC/cm²)) après 2 heures, et à 10,32 (Ln (UFC/cm²)) après 3 heures d'incubation dans une solution d'extrait de concentration 1 % d'*Eucalyptus microcorys*. A une concentration d'extrait de 1,5 %, les densités des cellules restées adhérentes ont décliné de 12,71 à 9,72 (Ln (UFC/cm²)) après 1 heure, à 9,75 (Ln (UFC/cm²)) après 2 heures, et à 9,73 (Ln (UFC/cm²)) après 3 heures de contact avec une solution d'extrait de concentration 1,5 %. A une concentration d'extrait de 2 %, elles ont diminué de 12,71 à 10,19 (Ln (UFC/cm²)) après 1 heure, à 9,78 (Ln (UFC/cm²)) après 2 heures, et à 9,56 (Ln (UFC/cm²)) après 3 heures de contact avec une solution d'extrait de concentration 2 % (**Figure 39**).

Quant aux bactéries détachées, elles ont varié pour une concentration d'extrait de 1 %, de 8,19 et 9,65 (Ln (UFC/cm²)) après 1 heure de contact, entre 7,90 et 9,43 (Ln (UFC/cm²)) après 2 heures, et entre 7,75 et 9,47 (Ln (UFC/cm²)) après 3 heures de contact avec la solution d'extrait. A la concentration d'extrait de 1,5 %, elles ont fluctué entre 8,26 et 8,73 (Ln (UFC/cm²)) après 1 heure d'incubation, entre 7,45 et 8,58 (Ln (UFC/cm²)) après 2 heures d'incubation, et entre 7,19 et 8,62 (Ln (UFC/cm²)) après 3 heures d'incubation. A la concentration de 2 %, les densités cellulaires ont fluctué entre 7,64 et 8,51 (Ln (UFC/cm²)) après 1 heure, entre 8,39 et 8,47 (Ln (UFC/cm²)) après 2 heures, et entre 7,90 et 9,05 (Ln (UFC/cm²)) après 3 heures d'incubation dans la solution d'extrait (**Figure 40**).

III.1.5.6- Pourcentage de cellules détachées et de cellules restées adhérentes au support en présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*

Les différents pourcentages des cellules d'*Escherichia coli* entéropathogène restées adhérentes et celles détachées après contact avec la solution d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* aux différentes

concentrations choisies, ont été évalués pour les cellules issues de chaque phase de croissance. Ils sont présentés dans le **Tableau X**.

III.1.5.6.1- Cellules issues de la phase de latence

Lorsque les cellules sont issues de la phase de latence, les pourcentages de cellules restées adhérentes après séjour dans la solution d'extrait, ont fluctué respectivement entre 1,2 et 15 %, entre 0,3 et 12,2 %, et entre 0,2 et 6,4 % après respectivement 1 heure, 2 heures et 3 heures lorsque la concentration de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* est de 1 %. Ces pourcentages ont varié entre 0,5 et 5,4 %, entre 0,3 % et 3,1 %, et entre 0,2 % et 4,7 % après 1h, 2h et 3h respectivement dans la solution d'extrait de concentration 1,5 %. Dans la solution d'extrait de concentration 2 %, ces pourcentages ont fluctué entre 1% et 8,4%, entre 0,1 % et 4,9 %, et entre 0,9 % et 4,4 % après 1h, 2h et 3h de séjour respectivement. Au même moment, on note que les pourcentages de cellules détachées ont varié respectivement de 1,7 à 11,0 %, de 0,5 à 9,2 % et de 2,0 à 4,5 % aux concentrations d'extrait de 1 ; 1,5 et 2% respectivement (**Tableau X**).

III.1.5.6.2- Cellules issues des phases de croissance exponentielle et stationnaire

Pour les cellules issues de la phase exponentielle de croissance, les pourcentages de cellules restées adhérentes ont fluctué entre 0,4 et 10,2 %, entre 0,2 et 5,8 %, et entre 0,3 et 4,9 % après 1 heure, 2 heures et 3 heures de contact avec la solution d'extrait de concentration 1 %. Ils ont varié entre 1,2 et 6,8 %, entre 0,6 et 5,4 %, et entre 1,0 et 5,2 % après 1 heure, 2 heures et 3 heures de contact avec la solution d'extrait de concentration 1,5 %. A la concentration d'extrait de 2 %, ces pourcentages ont fluctué entre 1,2 et 5,6 %, entre 0,3 et 6,5 %, et entre 1,0 et 1,8 % après 1 heure, 2 heures et 3 heures de contact respectivement. Dans les conditions similaires d'expérimentation, on note que les pourcentages de cellules détachées ont varié respectivement de 1,6 à 11,4 %, de 0,9 à 68,8 % et de 1,0 à 12,7 % aux concentrations d'extrait de 1 ; 1,5 et 2 % (**Tableau X**).

Lorsque les cellules ont été issues de la phase stationnaire de croissance, les pourcentages de cellules restées adhérentes ont varié de 4,3 à 11,3 %, de 8,8 à 14,0 %, et de 3,3 à 17,1 % aux mêmes temps de contact respectivement, dans l'extrait de concentration 1%. Ils ont fluctué de 3,0 à 16,1 %, de 5,4 à 17,2 %, et de 5,4 à 10,5 % aux mêmes temps de contact respectivement avec la solution d'extrait de concentration 1,5%. Dans la solution d'extrait de concentration 2 %, les pourcentages de cellules restées adhérentes ont varié de 1,6 à 7,6 %, de 6,8 à 8,5 %, et de 1,3 à 7,7% aux temps de séjour 1h, 2h et 3h respectivement. Dans les conditions similaires d'expérimentation, on a noté que les cellules détachées ont varié respectivement de 12,4% à 37,60%, de 1,9% à 48,5% et de 1,3% à 3,7% aux concentrations d'extrait de 1, 1,5 et 2%.

Tableau X : Pourcentage des cellules détachées (%D) et celles restées adhérentes (%A) d'*Escherichia coli* entéropathogène, après 1, 2 ou 3 heures de contact avec la solution d'extrait de plante aux concentrations 1 %, 1,5 % and 2 %, ceci après chaque heure d'incubation de l'adhésion cellulaire dans la solution d'eau physiologique (NaCl 0,85 %) avec des cellules issues de chaque phase de croissance.

Phase de croissance cellulaire et durée d'incubation		Pourcentage des cellules détachées (%D) et celles restées adhérentes (%A) d' <i>Escherichia coli</i> entéropathogène, après 1, 2 ou 3 heures de contact avec la solution d'extrait de plante aux concentrations 1 %, 1,5 % and 2 %																	
Phase de croissance	Durée de l'adhésion cellulaire	1 %						1,5 %						2 %					
		%A			%D			%A			%D			%A			%D		
		1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h
Latence	3H	15,0	12,2	6,4	1,7	2,8	2,0	1,2	1,3	0,2	3,9	3,5	0,4	8,4	1,7	4,4	4,4	4,5	4,0
	6H	1,3	0,3	0,2	2,9	0,5	2,9	0,5	0,3	0,2	0,4	3,4	2,8	1,0	0,1	0,9	1,8	0,9	4,9
	9H	1,2	2,2	1,3	11,0	9,2	4,5	5,4	3,1	4,7	11,1	9,9	11,2	3,6	4,9	2,7	9,3	5,7	1,5
Exponentielle	3H	10,2	5,8	3,0	10,5	3,6	9,4	6,8	5,4	2,4	13,3	9,3	62,8	5,6	6,5	1,8	12,7	1,0	7,3
	6H	0,4	5,3	4,9	11,4	8,8	8,6	4,5	4,9	5,2	14,6	5,2	68,8	4,4	2,9	1,0	8,1	1,4	1,3
	9H	0,8	0,2	0,3	5,7	1,9	1,6	1,2	0,6	1,0	4,2	0,9	12,9	1,2	0,3	1,3	8,3	1,9	2,6
Stationnaire	3H	11,3	14,0	17,1	33,3	12,4	37,6	16,1	17,2	7,0	4,6	3,7	48,5	5,6	6,8	4,8	3,7	2,8	2,9
	6H	4,3	9,6	7,7	16,0	24,0	33,6	3,0	5,4	10,5	3,1	2,5	33,5	1,6	8,5	7,7	2,2	1,7	1,9
	9H	8,8	8,8	3,3	34,0	33,4	25,6	13,5	11,1	5,4	3,0	1,9	25,1	7,6	5,9	1,3	2,9	1,3	1,8
Déclin	3H	33,0	15,3	17,2	55,6	44,9	48,3	14,6	15,3	8,8	3,3	0,7	9,7	14,0	13,0	9,7	1,9	2,5	4,5
	6H	4,6	17,7	12,4	21,3	14,7	12,6	6,8	8,9	8,6	1,8	2,3	30,2	17,2	14,4	5,8	0,9	1,8	1,1
	9H	7,9	11,3	25,4	14,5	14,4	13,8	8,0	5,2	13,5	1,2	1,2	16,0	9,7	5,4	5,0	1,5	1,8	4,8

III.1.5.6.3- Cellules issues de la phase de déclin

Lorsque les cellules sont issues de la phase de déclin, les pourcentages de cellules restées adhérentes ont fluctué respectivement entre 4,6 et 33 %, entre 11,3 et 17,7 %, et entre 12,4 et 25,4 % après 1, 2 et 3 heures de contact avec la solution d'extrait de concentration 1 %. Ils ont varié entre 6,8 et 14,6 %, entre 5,2 et 15,3 %, et entre 8,6 et 13,5 % après 1, 2 et 3 heures de contact avec la solution d'extrait de concentration 1,5 %. On a également noté une variation dans la solution d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* de concentration 2 %, avec des abondances qui ont fluctué entre 9,7 et 17,2 %, entre 5,4 et 14,4 %, et entre 5,0 et 9,7 % après 1, 2 et 3 heures de contact. Dans les conditions similaires d'expérimentation, les pourcentages des cellules détachées ont varié respectivement de 12,6 % à 55,6 %, de 1,2 % à 30,2 % et de 0,9 % à 4,8 % aux concentrations d'extrait de 1 ; 1,5 et 2 % (**Tableau X**).

Dans l'ensemble, les pourcentages des cellules restées adhérentes après action de la solution d'extrait semblent diminuer avec l'augmentation de la concentration de l'extrait. Cette baisse semble s'accroître lorsqu'on passe progressivement des cellules issues de la phase de latence aux cellules issues de la phase de déclin de croissance. Les pourcentages des cellules restées adhérentes sont dans l'ensemble relativement plus élevés en phase de déclin. Quant aux pourcentages des cellules détachées, le constat général est qu'elles sont plus élevées aux phases exponentielle, stationnaire et déclin particulièrement aux concentrations d'extrait 1 et 1,5 %.

III.1.5.7- Pourcentages des cellules métaboliquement non cultivables après adsorption aux supports et séjour dans la solution d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*

Après adsorption des cellules aux surfaces des fragments et séjour desdits fragments dans les solutions d'extrait, une fraction de cellules s'est détachée pendant qu'une autre fraction est restée adhérente. Dans les 2 fractions, certaines cellules ont perdu leur cultivabilité, probablement par suite d'une inhibition. Les pourcentages de cette inhibition, obtenues après chaque période de séjour des cellules adhérentes dans les solutions d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* sont présentés dans le **Tableau XI**.

III.1.5.7.1- Cellules issues de la phase de latence

Pour des cellules issues de la phase de latence, les pourcentages d'inhibition ou pourcentages de cellules non cultivables ont varié respectivement de 83,4 % à 95,8 %, de 85,1 % à 99,2 % et de 91,6 % à 96,9 % après 1, 2 et 3 heures d'incubation dans la solution d'extrait de concentration 1 %. Ces pourcentages ont fluctué de 83,6 à 99,2 %, de 87,0 à 96,4 %, de 87,1 à 99,4 % après 1, 2 et 3 heures de séjour dans la solution d'extrait de concentration 1,5 %. Dans

l'extrait de concentration de 2 %, les pourcentages d'inhibition ont varié entre 87,1 et 97,2 %, entre 89,4 et 99,0 %, et entre 91,6 et 95,8% après 1, 2 et 3 heures de contact respectivement.

III.1.5.7.2- Cellules issues de la phase de croissance exponentielle

Pour des cellules issues de la phase exponentielle de croissance, les pourcentages de cellules non cultivables après test d'adsorption et séjour dans les solutions d'extrait ont varié de 79,3 à 93,5 %, de 85,9 à 98,0 %, et de 87,5 à 98,1% après respectivement 1, 2 et 3 heures lorsque la concentration de l'extrait était de 1 %. A la concentration de 1,5 %, ces pourcentages d'inhibition ont fluctué de 79,9 à 94,6 %, de 85,9 à 98,1 % et de 88,3 à 98,1 % respectivement. Dans l'extrait de concentration 2 %, on a noté une fluctuation de l'inhibition cellulaire de 81,6 à 90,6 %, de 92,5 à 97,8 %, et de 90,9 à 97,7 % respectivement (**Tableau XI**).

Tableau XI : Pourcentage d'inhibition d' *Escherichia coli* entéropathogène, après 1, 2 ou 3 heures d'incubation dans la solution d'extrait de plante de concentration 1 %, 1,5 % et 2 %

Phase de croissance cellulaire et durée d'incubation		Pourcentage d'inhibition d' <i>Escherichia coli</i> entéropathogène après 1, 2 et 3 heures contact avec la solution d'extrait de plante aux concentrations 1 %, 1,5 % et 2 %								
Phase de croissance	Durée du processus d'adhésion cellulaire	1%			1,5 %			2 %		
		1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h	1 h	2 h	3 h
Latence	3 H	83,4	85,1	91,6	95,0	95,2	99,4	87,2	93,8	91,6
	6 H	95,8	99,2	96,9	99,2	96,4	97,0	97,2	99,0	94,1
	9 H	87,7	88,6	94,3	83,6	87,0	87,1	87,1	89,4	95,8
Exponentielle	3 H	79,3	90,6	87,5	79,9	91,4	88,3	81,6	92,5	90,9
	6 H	88,3	85,9	86,9	80,9	85,9	89,6	87,5	95,7	97,7
	9 H	93,5	98,0	98,1	94,6	98,1	98,1	90,6	97,8	96,2
Stationnaire	3 H	86,2	85,0	80,1	79,3	79,0	89,4	90,7	90,4	92,3
	6 H	94,5	88,6	89,8	94,0	93,5	87,0	96,1	89,9	90,4
	9 H	88,6	88,6	94,9	83,6	86,6	92,7	89,6	92,9	96,9
Déclin	3 H	58,9	78,1	76,0	82,1	83,4	90,5	84,2	84,5	85,8
	6 H	93,8	81,2	86,6	91,3	88,9	89,1	81,9	83,8	93,1
	9 H	91,0	87,6	73,6	90,8	94,3	85,3	88,8	93,2	93,6

III.1.5.7.3- Cellules issues des phases de croissance stationnaire et de déclin

En ce qui concerne les cellules provenant de la phase stationnaire, les pourcentages d'inhibition ont fluctué globalement entre 79,0 % et 96,9 % avec des valeurs relativement élevées à la concentration de 2 %. Pour celles issues de la phase de déclin, les pourcentages de cellules non cultivables ont varié respectivement de 58,9 % à 93,8 %, de 78,1 % à 87,6 % et de 73,6 % à 86,6 % après 1, 2 et 3 heures de séjour dans la solution d'extrait de concentration 1 %. Ces pourcentages d'inhibition ont fluctué de 82,1 % à 91,3 %, de 83,4 % à 94,3 %, de 85,3 % à 90,5 % après 1, 2 et 3 heures de séjour dans la solution d'extrait de concentration 1,5 %. Une variation de 81,9 % à 88,8 %, de 83,8 % à 93,2 %, et de 85,8 % à 93,6 % après les mêmes temps de séjour a été respectivement enregistrée avec l'extrait de concentration 2 % (**Tableau XI**).

III.1.6- Hiérarchisation des facteurs considérés dans les processus étudiés

Les facteurs abiotiques considérés dans la présente étude ont été la concentration de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys*, la température et la durée d'incubation pour les expérimentations avec les cellules bactériennes planctoniques sous diverses températures d'incubation. Pour les expériences conduites en présence de la lumière, les paramètres considérés ont été la concentration de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys*, l'intensité lumineuse, la température de la solution (température induite par l'intensité lumineuse) et la durée d'incubation.

Pour les expérimentations sur les cellules adsorbées, l'état physiologique de la cellule, les angles de contact, la durée du test d'adhésion cellulaire et le temps de séjour des cellules adsorbées dans la solution d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* ont été considérés lors de l'analyse. La hiérarchisation de ces facteurs a été faite en classant dans l'ordre hiérarchique décroissant, le pourcentage de la somme des carrés de chaque facteur, obtenu à l'aide du test MANOVA à plusieurs variables.

III.1.6.1- Hiérarchisation des facteurs impliqués dans l'inhibition des bactéries planctoniques en présence de l'extrait aqueux d'*Eucalyptus microcorys*

En considérant les différentes concentrations d'extrait, les températures d'incubation, les durées d'incubation ainsi que les différentes intensités lumineuses, un classement dans l'ordre hiérarchique décroissant de l'influence de ces facteurs dans l'inhibition cellulaire a été effectué pour chaque microorganisme.

Le **Tableau XII** présente les pourcentages des sommes des carrés des facteurs considérés lors des expérimentations sur les cellules planctoniques sous diverses températures d'incubation (les sommes des carrés des facteurs considérés sont présentées en **Annexe 4**).

Tableau XII: Pourcentages des sommes des carrés des facteurs considérés lors des expériences sur les cellules planctoniques sous diverses températures d'incubation

Souches bactériennes considérées	Facteurs considérés et pourcentage des sommes des carrés obtenu		
	Concentration extrait	Température d'incubation	Durée d'incubation
<i>E. coli</i> entéropathogène	50,40	48,18	1,42
<i>E. coli</i> commensale	94,19	5,04	0,77
<i>Salmonella typhi</i>	84,12	12,23	3,65
<i>Vibrio cholerae</i>	65,13	16,61	18,26
<i>Enterococcus faecalis</i>	98,53	1,47	0,00

Il en ressort que sous diverses températures d'incubation, l'inhibition de *E. coli* entéropathogène est contrôlée de façon prépondérante par la concentration de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* (50,40 %), suivie de la température d'incubation (48,18 %) et elle-même suivie de la durée d'incubation (1,42 %). L'inhibition cellulaire de *E. coli* commensale est d'abord fortement due à la concentration de l'extrait (94,19 %), suivie de la température d'incubation (5,04 %), elle-même suivie de la durée d'incubation (0,77 %). La cultivabilité de *Salmonella typhi* et d'*Enterococcus faecalis* dans la solution d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* est prioritairement contrôlée par la concentration de l'extrait (84,12 % et 98,53 %), suivie de la température d'incubation (12,23 % et 1,47 %) et suivie de la durée d'incubation (3,65 % et 0,00 %). L'inhibition de *Vibrio cholerae* est influencée par la concentration de l'extrait (65,13 %), suivie de la durée d'incubation (18,26 %) et elle-même suivie de la température d'incubation (16,61 %).

Le **Tableau XIII** présente les pourcentages des sommes des carrés des facteurs considérés lors des expériences sur les cellules planctoniques sous diverses intensités lumineuses (les sommes des carrés des facteurs considérés sont présentées en **Annexe 5**).

Tableau XIII: Pourcentages des sommes des carrés des facteurs considérés lors des expériences sur les cellules planctoniques en présence de la lumière

Souches bactériennes considérées	Facteur considéré et pourcentage des sommes des carrés obtenu			
	Concentration de l'extrait	Intensité lumineuse	Durée incubation	Température de la solution
<i>E. coli</i> entérotoxigène	28,98	0,21	18,79	52,03
<i>Enterococcus faecalis</i>	86,82	5,25	0,90	7,03

En condition d'éclairage, l'inhibition cellulaire de *E. coli* entérotoxigène est contrôlée par la température de la solution (52,03 %), suivie de la concentration de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* (18,79 %), suivie de la durée d'incubation (18,79 %), et elle-même suivie de l'intensité lumineuse (0,21 %). La cultivabilité d'*Enterococcus faecalis* est influencée par la concentration de l'extrait (86,82 %), suivie de la température de la solution (7,03 %), suivie de l'intensité lumineuse (5,25 %), elle-même suivie de la durée d'incubation (0,90 %).

III.1.6.2- Hiérarchisation des facteurs impliqués dans l'adhésion cellulaire en présence de l'extrait aqueux d'*Eucalyptus microcorys*

En considérant les phases de croissance, l'hydrophobicité de surface cellulaire, les angles de contact, les durées de séjour dans la solution d'extrait, la durée de l'adhésion cellulaire ainsi que les différentes concentrations de l'extrait, un classement dans l'ordre hiérarchique décroissant de l'influence de chaque paramètre dans le contrôle du détachement de cellules a été effectué pour l'espèce *Escherichia coli* entérotoxigène. Les sommes des carrés des facteurs considérés sont présentées en **Annexe 6**. Le **Tableau XIV** présente les pourcentages des sommes des carrés desdits facteurs lors des expériences.

Tableau XIV: Pourcentages des sommes des carrés des facteurs considérés lors des expériences avec les cellules *E. coli* entéropathogène détachées et avec les cellules *E. coli* entéropathogène restées adhérees

Etat de cellules	Facteur considéré et pourcentage des sommes des carrés obtenu					
	DPAC	Dur. Sej.	Conc. extrait	Phase croiss.	Hydro	Angle contact
<i>E. coli</i> entéropathogène restées adhérees	0,52	0,43	11,78	85,59	0,02	1,66
<i>E. coli</i> entéropathogène détachées	0,41	1,56	0,19	92,28	0,33	5,23

DPAC : durée de l'adhésion cellulaire ; Dur. Séj. : durées de séjour dans la solution d'extrait ; Conc. Extrait : concentrations de l'extrait ; Phase croiss. : phases de croissance ; Hydro : l'hydrophobicité de surface cellulaire

Il en ressort que la présence des cellules restées adhérees sur la surface des fragments de polyéthylène après séjour dans la solution d'extrait de plante est contrôlée majoritairement par les phases de croissance (85,59 %), suivies de la concentration de l'extrait (11,78 %), suivie de l'angle de contact du substrat solide (1,66 %), suivi de la durée du test d'adhésion cellulaire (0,52 %), suivie de la durée de séjour des cellules adhérees dans la solution d'extrait (0,43 %), et elle-même suivie de l'hydrophobicité de surface (0,02 %). Le relargage des cellules dans le milieu est aussi contrôlée majoritairement par les phases de croissance (92,28 %), suivies des angles de contact (5,23 %), suivie de la durée de séjour des cellules adhérees dans la solution d'extrait (1,56 %), suivie de la durée du test d'adhésion cellulaire (0,41 %), elle-même suivie de l'hydrophobicité de surface (0,33 %) et enfin suivie des concentrations de l'extrait (0,19 %).

III.1.6.3- Détermination de l'efficacité de facteurs considérés sur la cultivabilité des germes testés sous diverses conditions expérimentales

Une Analyse Factorielle Discriminante (AFD) a été réalisée pour évaluer l'efficacité de chaque concentration de l'extrait de plante (*Eucalyptus microcorys*), l'efficacité de chaque température d'incubation et l'efficacité de chaque intensité lumineuse sur la cultivabilité de chaque souche de bactérie considérée. L'importance de la phase de croissance cellulaire sur l'adhésion au polyéthylène des cellules *E. coli* entéropathogène en présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* a également été évaluée. L'AFD permet d'expliquer une variable principale à l'aide de variables explicatives. Les variables explicatives sont l'ensemble des variables caractérisant les abondances cellulaires. La dispersion des abondances cellulaires en fonction des paramètres considérés dans cette analyse AFD est illustrée à travers des graphes présentés aux **Annexes 7 à 12**.

III.1.6.3.1- Efficacité de chaque concentration d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* et de la température d'incubation sur la cultivabilité des cellules planctoniques

Les **Tableaux XV et XVI** présentent pour chaque souche bactérienne considérée dans les expérimentations, la valeur du coefficient Lambda de Wilks (λ), du ratio de Fisher (F) ainsi que la valeur du seuil de significativité (*p-value*) pour chaque concentration de l'extrait utilisée et chaque température d'incubation, respectivement. Il en ressort que pour les cellules de *E. coli* entéropathogène, en présence d'extrait de *Eucalyptus microcorys*, les différences d'abondance cellulaire enregistrées sont principalement influencées par la concentration d'extrait 0,5 % ($\lambda = 0,257$; F = 15,439), suivies de la concentration 1 % ($\lambda = 0,310$; F = 11,862), ensuite suivie de la concentration d'extrait 0,1 % ($\lambda = 0,427$; F = 7,167) (**Tableau XV**).

Il apparait également en considérant le facteur température, que les abondances d'*E. coli* entéropathogène après séjour dans la solution d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* sont d'abord dues à la température d'incubation 44 °C ($\lambda = 0,095$; F = 45,462), suivie de la température 37 °C ($\lambda = 0,287$; F = 11,953), de la température 7 °C ($\lambda = 0,393$; F = 7,425) et enfin à la température d'incubation 23 °C ($\lambda = 0,659$; F = 2,483) (**Tableau XVI**).

La concentration d'extrait 0,5 % et la température d'incubation 44 °C semblent être les variables qui discriminent le plus les abondances cellulaires (valeurs de Lambda de Wilks les plus faibles).

Pour les cellules de *E. coli* commensale, la concentration d'extrait 2 % ($\lambda = 0,463$; F = 6,175) est la variable qui discrimine le plus les abondances cellulaires (**Tableau XV**). Les températures d'incubation 44 °C ($\lambda = 0,238$; F = 15,381) et 37°C ($\lambda = 0,443$; F = 6,031) constituent les facteurs prépondérants qui ont été à l'origine des différences d'abondances observées et classés dans l'ordre hiérarchique décroissant (**Tableau XVI**).

La concentration d'extrait 0,05 % ($\lambda = 0,449$; F = 6,552) semble celle qui influence principalement la cultivabilité de *Salmonella typhi* (**Tableau XV**).

Les températures à l'origine des différences observées sont la température d'incubation 44 °C ($\lambda = 0,135$; F = 30,877), suivie de 37 °C ($\lambda = 0,235$; F = 15,657), suivie de 7 °C ($\lambda = 0,289$; F = 11,783), et suivie de la température d'incubation 23 °C ($\lambda = 0,430$; F = 6,359) (**Tableau XVI**).

Pour les cellules de *Vibrio cholerae*, la concentration d'extrait 0,5 % ($\lambda = 0,380$; F = 8,711) est la variable qui semble discriminer le plus les abondances cellulaires (**Tableau XV**). Les différences d'abondance sont d'abord influencées par la température d'incubation 44 °C ($\lambda = 0,116$; F = 36,731), ensuite de 37 °C ($\lambda = 0,244$; F = 14,864), puis de 7 °C ($\lambda = 0,570$; F = 3,617) et enfin de la température d'incubation 23 °C ($\lambda = 0,847$; F = 8,64) (**Tableau XVI**).

Tableau XV: Valeur du coefficient Lambda de Wilks (λ), du ratio de Fisher (F) et du seuil de significativité (p -value) obtenue pour chaque souche bactérienne et pour chaque concentration d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* utilisée

Concentration d'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i>	Souche bactérienne et valeur de λ , de F et de p -value														
	<i>E. coli</i> entéropathogène			<i>E. coli</i> commensale			<i>Salmonella typhi</i>			<i>Vibrio cholerae</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>		
	λ de Wilks	F	p -value	λ de Wilks	F	p -value	λ de Wilks	F	p -value	λ de Wilks	F	p -value	λ de Wilks	F	p -value
0,05 %	0,501	5,320	0,010	0,570	4,017	0,026	0,449	6,552	0,004	0,950	0,280	0,839	0,564	4,122	0,024
0,1 %	0,427	7,167	0,003	0,744	1,838	0,181	0,658	2,767	0,076	0,971	0,161	0,921	0,557	4,239	0,022
0,5 %	0,257	15,439	< 0,0001	0,631	3,116	0,056	0,729	1,987	0,157	0,380	8,711	0,001	0,699	2,301	0,116
1 %	0,310	11,862	0,000	0,755	1,728	0,201	0,605	3,476	0,041	0,532	4,701	0,015	0,498	5,369	0,009
1,5 %	0,519	4,942	0,013	0,653	2,837	0,071	0,645	2,930	0,065	0,657	2,782	0,075	0,450	6,522	0,004
2 %	0,650	2,875	0,069	0,463	6,175	0,005	0,727	2,003	0,154	0,532	4,689	0,016	0,925	0,436	0,731

ddl₁=3, ddl₂=16

Tableau XVI : Valeur du coefficient Lambda de Wilks (λ), du ratio de Fisher (F) et du seuil de significativité (p -value) obtenue pour chaque souche bactérienne et pour chaque température d'incubation en présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*

Température d'incubation	Souche bactérienne et valeur de λ , de F et de p -value														
	<i>E. coli</i> entéropathogène			<i>E. coli</i> commensale			<i>Salmonella typhi</i>			<i>Vibrio cholerae</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>		
	λ de Wilks	F	p -value	λ de Wilks	F	p -value	λ de Wilks	F	p -value	λ de Wilks	F	p -value	λ de Wilks	F	p -value
7 °C	0,393	7,425	0,000	0,563	3,730	0,012	0,289	11,783	< 0,0001	0,570	3,617	0,014	0,691	2,148	0,094
23 °C	0,659	2,483	0,060	0,788	1,293	0,300	0,430	6,359	0,001	0,847	0,864	0,519	0,127	32,853	< 0,0001
37 °C	0,287	11,953	< 0,0001	0,443	6,031	0,001	0,235	15,657	< 0,0001	0,244	14,864	< 0,0001	0,490	4,994	0,003
44 °C	0,095	45,462	< 0,0001	0,238	15,381	< 0,0001	0,135	30,877	< 0,0001	0,116	36,731	< 0,0001	0,054	84,109	< 0,0001

ddl₁=5, ddl₂=24

Pour les cellules d'*Enterococcus faecalis*, les différences d'abondances sont d'abord influencées par la concentration d'extrait 1,5 % ($\lambda = 0,450$; $F = 6,522$) suivie de la concentration 1 % ($\lambda = 0,498$; $F = 5,369$) (**Tableau XV**). La température d'incubation 44 °C ($\lambda = 0,054$; $F = 84,109$), suivie de la température 23 °C ($\lambda = 0,127$; $F = 32,853$) et enfin de 37 °C ($\lambda = 0,847$; $F = 8,64$) sont les variables qui discriminent le plus les abondances cellulaires d'*Enterococcus faecalis* obtenues à différentes concentration d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* (**Tableau XVI**).

III.1.6.3.2- Efficacité de chaque concentration d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* et de l'intensité lumineuse sur la cultivabilité des cellules planctoniques

Le **Tableau XVII** présente pour chaque souche bactérienne considérée dans les expérimentations, la valeur du coefficient Lambda de Wilks (λ), du ratio de Fisher (F) ainsi que la valeur du seuil de significativité (*p-value*) obtenue pour chaque intensité lumineuse et chaque concentration de l'extrait de *Eucalyptus microcorys* utilisée.

Pour les cellules de *E. coli* entéropathogène, lorsqu'on considère le facteur « concentration d'extrait », il apparait dans l'ordre hiérarchique décroissant que les différences d'abondance sont d'abord influencées par la concentration d'extrait 2 % ($\lambda = 0,348$; $F = 9,982$), suivie de la concentration 1,5 % ($\lambda = 0,410$; $F = 7,679$), et enfin de la concentration d'extrait 1 % ($\lambda = 0,479$; $F = 5,810$). En considérant le facteur « intensité lumineuse », 1000 lux ($\lambda = 0,399$ et $F = 7,224$) est celle qui discrimine le mieux les abondances cellulaires obtenues après influence de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* (**Tableau XVII**).

Pour les cellules d'*Enterococcus faecalis*, la concentration d'extrait 1,5 % ($\lambda = 0,491$ et $F = 5,518$) est celle qui discrimine le mieux les abondances cellulaires obtenues à différentes intensités lumineuses (**Tableau XVII**). Dans l'ensemble, l'éclairement discrimine le mieux les abondances cellulaires obtenues par rapport à l'obscurité avec en premier l'intensité lumineuse 3000 lux ($\lambda = 0,020$ et $F = 235,425$), en deuxième l'intensité lumineuse 2000 lux ($\lambda = 0,232$ et $F = 15,865$) et en troisième l'intensité lumineuse 1000 lux ($\lambda = 0,454$ et $F = 5,783$) (**Tableau XVII**).

III.1.6.3.3- Importance des phases de croissance cellulaire sur l'adhésion au polyéthylène des cellules *E. coli* entéropathogène en présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*

Le **Tableau XVIII** présente pour chaque souche bactérienne considérée dans les expérimentations, la valeur du coefficient Lambda de Wilks (λ), du ratio de Fisher (F) ainsi que la valeur du seuil de significativité (*p-value*) obtenue lorsqu'on considère chaque durée de l'adhésion cellulaire et chaque phase de croissance cellulaire.

Tableau XVII: Valeur du coefficient Lambda de Wilks (λ), du ratio de Fisher (F) et du seuil de significativité (*p-value*) obtenue pour *E. coli* entéropathogène et *Enterococcus faecalis* à chaque intensité lumineuse et chaque concentration d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*

Conditions expérimentales		Souche bactérienne et valeur de λ , de F et de <i>p-value</i>					
		<i>E. coli</i> entéropathogène			<i>Enterococcus faecalis</i>		
		λ de Wilks	F	<i>p-value</i>	λ de Wilks	F	<i>p-value</i>
Condition d'éclairement	Obscurité	0,451	5,836	0,001	0,408	6,971	0,000
	1000 lux	0,399	7,224	0,000	0,454	5,783	0,001
	2000 lux	0,608	3,089	0,027	0,232	15,865	<0,0001
	3000 lux	0,872	0,704	0,626	0,020	235,425	<0,0001
Concentration de l'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i>	C ₁ (0,05%)	0,534	4,663	0,016	0,598	3,584	0,037
	C ₂ (0,1%)	0,529	4,755	0,015	0,757	1,708	0,206
	C ₃ (0,5%)	0,672	2,597	0,088	0,663	2,714	0,079
	C ₄ (1%)	0,479	5,810	0,007	0,742	1,854	0,178
	C ₅ (1,5%)	0,410	7,679	0,002	0,491	5,518	0,009
	C ₆ (2%)	0,348	9,982	0,001	0,568	4,055	0,025

L'analyse factorielle discriminante effectuée révèle que les différences observées dans les abondances des cellules détachées sont d'abord dues aux cellules issues de la phase de déclin ($\lambda=0,156$; F=16,187), ensuite à celles issues de la phase stationnaire ($\lambda=0,361$; F=5,300), puis celles issues de la phase de latence ($\lambda=0,509$; F=2,894), et enfin à celles issues de la phase exponentielle ($\lambda=0,520$; F=2,768) (**Tableau XVIII**). Les cellules issues des phases de déclin, stationnaire et de latence se singularisent au cours des 3 premières heures d'adsorption, alors que celles issues de la phase exponentielle se singularisent au bout des 6 premières heures d'adsorption (**Tableau XVIII**).

Pour les cellules restées adhérentes après séjour du substrat dans la solution d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*, les variations d'abondances sont d'abord attribuées aux cellules issues de la phase de latence ($\lambda=0,276$; F=7,852), puis à celles issues de la phase stationnaire ($\lambda=0,386$; F=4,775), à celles issues de la phase de déclin ($\lambda=0,565$; F=2,314), et enfin à celles issues de la phase exponentielle ($\lambda=0,668$; F=1,492). Les cellules issues des phases de déclin, stationnaire et de latence se singularisent au cours des 3 premières heures d'adsorption, alors que celles issues de la phase exponentielle se singularisent au bout de 9 heures d'incubation (**Tableau XVIII**).

Tableau XVIII: Valeur du coefficient Lambda de Wilks (λ), du ratio de Fisher (F) et du seuil de significativité (p -value) obtenue en présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*, pour chaque période d'adsorption, pour les cellules d'*E. coli* entéropathogène détachées et celles restées adhérentes lorsque ces cellules sont issues de chaque phase de croissance

Etat cellulaire et période d'adsorption		Phase de croissance et valeur de λ , de F et de p -value											
Etat cellulaire	période d'adsorption	Phase de latence			Phase exponentielle			Phase stationnaire			Phase de déclin		
		λ de Wilks	F	p -value	λ de Wilks	F	p -value	λ de Wilks	F	p -value	λ de Wilks	F	p -value
Restées adhérentes	3h	0,276	7,852	0,021	0,904	0,320	0,738	0,386	4,775	0,057	0,565	2,314	0,180
	6h	0,844	0,552	0,602	0,756	0,968	0,432	0,965	0,109	0,898	0,835	0,595	0,581
	9h	0,308	6,727	0,029	0,668	1,492	0,298	0,659	1,554	0,286	0,673	1,457	0,305
Détachées	3h	0,509	2,894	0,132	0,975	0,078	0,926	0,361	5,300	0,047	0,156	16,187	0,004
	6h	0,981	0,058	0,945	0,520	2,768	0,141	0,922	0,255	0,783	0,360	5,326	0,047
	9h	0,569	2,269	0,185	0,868	0,454	0,655	0,867	0,462	0,651	0,424	4,084	0,076

ddl₁= 2, ddl₂= 6

III.1.7- Corrélation « r » de Spearman entre les variables considérées

III.1.7.1- Corrélation entre les abondances bactériennes et la concentration de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* à chaque température d'incubation, et à chaque durée d'incubation

Les coefficients de corrélation « r » de Spearman entre les abondances bactériennes et la concentration de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* d'une part à chaque température d'incubation, et d'autre part à chaque durée d'incubation ont été calculés et sont présentés dans le **Tableau XIX**. Il en ressort que dans la majorité des cas, l'augmentation de la concentration de l'extrait sous toutes les températures d'incubation expérimentées favorise significativement ($P < 0,01$), la diminution des abondances de cellules cultivables de toutes les souches bactériennes considérées. L'exception n'est faite que pour les cellules *Vibrio cholerae* lorsque l'incubation est faite à la température 23°C (**Tableau XIX**).

De même, pour la majorité des périodes de séjour des cellules bactériennes dans la solution d'extrait de plante, on relève que l'augmentation de la concentration de l'extrait sous toutes les températures d'incubation expérimentées favorise significativement ($P < 0,01$) la diminution des abondances de cellules cultivables de toutes les souches bactériennes considérées. L'exception ici est faite pour les cellules *E. coli* entéropathogène lorsque la durée d'incubation est de 9 heures (**Tableau XIX**).

Tableau XIX : Coefficients de corrélation « r » de Spearman entre les abondances bactériennes et la concentration de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* à chaque température d'incubation, et à chaque durée d'incubation

Conditions expérimentales	Espèces bactériennes testées sous diverses concentrations d'extrait					
	<i>E. coli</i> entéropathogène	<i>E. coli</i> commensale	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	
Température d'incubation (N=30)	7°C	-0,599**	-0,635**	-0,913**	-0,639**	-0,884**
	23°C	-0,622**	-0,468**	-0,860**	-0,337 ^{ns}	-0,974**
	37°C	-0,831**	-0,915**	-0,931**	-0,908**	-0,942**
	44°C	-0,959**	-0,41**	-0,718**	-0,921**	-0,969**
Durée d'incubation (N=24)	3h	-0,701**	-0,846**	-0,904**	-0,772**	-0,919**
	6h	-0,560**	-0,754**	-0,892**	-0,740**	-0,906**
	9h	-0,397 ^{ns}	-0,698**	-0,821**	-0,684**	-0,897**
	12h	-0,700**	-0,560**	-0,821**	-0,797**	-0,892**
	24h	-0,628**	-0,804**	-0,828**	-0,913**	-0,911**

**= corrélation significative à $P < 0,01$

ns = corrélation non significative

III.1.7.2- Corrélation entre les abondances bactériennes et la température d'incubation à chaque concentration de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys*

Les degrés de liaison entre les abondances de cellules de chaque souche bactérienne considérée et la température d'incubation à chaque concentration d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* ont été évalués. Les coefficients de corrélation sont présentés dans le **Tableau XX**. Il en ressort que l'augmentation de la température d'incubation entraîne dans certains cas, une diminution significative des abondances de cellules cultivables ($P < 0,01$). Cependant, les cellules *E. coli* commensale dans les solutions d'extrait de concentration 0,05 % ; 0,1 % ; 0,5 % et 1 % semblent insensibles aux variations des températures d'incubation. Il en est de même des cellules *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* et *Enterococcus faecalis*, respectivement aux concentrations 0,05 %, 1,5 % et 2 % ; 0,05 %, 0,1 % et 0,5 % ; 0,05 %, 0,1 %, 0,5 % et 2 % (**Tableau XX**).

Tableau XX: Corrélation 'r' de Spearman entre les abondances bactériennes et la température d'incubation à chaque concentration de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys*

Concentration de l'extrait de plante	Espèces bactériennes testées sous diverses températures d'incubation				
	<i>E. coli</i> entéro-pathogène	<i>E. coli</i> commensale	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
0,05%	-0,527*	0,178 ^{ns}	-0,256 ^{ns}	0,093 ^{ns}	-0,318 ^{ns}
0,1%	-0,620**	0,147 ^{ns}	-0,535*	0,070 ^{ns}	-0,124 ^{ns}
0,5%	-0,822**	-0,155 ^{ns}	-0,644**	0,155 ^{ns}	-0,210 ^{ns}
1%	-0,853**	-0,388 ^{ns}	-0,478*	-0,605**	-0,551*
1,5%	-0,884**	-0,454*	-0,120 ^{ns}	-0,667**	-0,710**
2%	-0,890**	-0,656**	-0,393 ^{ns}	-0,633**	-0,213 ^{ns}

*= corrélation significative à $P < 0,05$ N = 20

**= corrélation significative à $P < 0,01$

ns = corrélation non significative

III.1.7.3- Corrélation entre les abondances bactériennes et la durée d'incubation à chaque concentration d'extrait pour l'ensemble des conditions d'éclairage

Les degrés de liaison entre les abondances de *E. coli* entéro-pathogène d'une part et d'*Enterococcus faecalis* d'autre part et la durée d'incubation à chaque concentration d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* ont été évalués. Les coefficients de corrélation sont présentés dans le **Tableau XXI**. Il en ressort qu'excepté la solution d'extrait de concentration 1%, l'augmentation de la durée d'incubation entraîne une diminution significative des abondances cellulaires d'*E. coli*

entéropathogène ($P < 0,01$). Les cellules *Enterococcus faecalis* semblent insensibles aux variations des durées d'incubation (**Tableau XXI**).

Tableau XXI: Corrélation ‘r’ Spearman entre les abondances bactériennes testées et la durée d'incubation à chaque concentration d'extrait pour l'ensemble des conditions d'éclairement

Souches bactériennes considérées	Concentration de l'extrait aqueux d' <i>Eucalyptus microcorys</i>					
	0,05 %	0,1 %	0,5 %	1 %	1,5 %	2 %
<i>E. coli</i> entéropathogène	-0,460*	-0,478*	-0,472*	-0,371 ^{ns}	-0,472*	-0,454*
<i>Enterococcus faecalis</i>	-0,276 ^{ns}	-0,015 ^{ns}	-0,123 ^{ns}	-0,184 ^{ns}	-0,114 ^{ns}	-0,058 ^{ns}

*= corrélation significative à $P < 0,05$ N = 20 ns = corrélation non significative
 **= corrélation significative à $P < 0,01$

III.1.7.4- Corrélation entre les abondances bactériennes et la concentration d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* à chaque durée d'incubation en présence de la lumière

Les coefficients de corrélation « r » de Spearman entre les abondances bactériennes et la concentration de l'extrait de plante à chaque durée d'incubation ont été évalués pour l'ensemble des conditions d'éclairement et sont présentés dans le **Tableau XXII**. Il en ressort que les abondances cellulaires de *E. coli* entéropathogène et d'*Enterococcus faecalis* diminuent significativement avec les hausses des concentrations de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* à chaque durée d'incubation.

Tableau XXII: Corrélation ‘r’ Spearman entre les abondances bactériennes testées et la concentration d'extrait à chaque durée d'incubation

Espèces bactériennes testées	Durée d'incubation dans la solution d'extrait d' <i>Eucalyptus microcorys</i>				
	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
<i>E. coli</i> entéropathogène	-0,670**	-0,448*	-0,532**	-0,557**	-0,411*
<i>Enterococcus faecalis</i>	-0,890**	-0,902**	-0,934**	-0,950**	-0,924**

*= corrélation significative pour $P < 0,05$ N=24
 **= corrélation significative pour $P < 0,01$

III.1.7.5- Corrélation entre les abondances bactériennes et la concentration d'extrait à chaque intensité d'éclairement pour l'ensemble des durées d'incubation

Les coefficients de corrélation « r » de Spearman entre les abondances bactériennes et les concentrations de l'extrait de plante à chaque intensité d'éclairement ont été évalués et sont présentés dans le **Tableau XXIII**. Il en ressort que les hausses de concentrations d'extrait de plante inhibent significativement ($P < 0,01$) la cultivabilité d'*E. coli* entéropathogène et d'*Enterococcus*

faecalis. Exception faite à l'intensité d'éclairement 3000 lux sous laquelle les cellules *E. coli* entéropathogène semblent insensibles aux variations de la concentration d'extrait (**Tableau XXIII**).

Tableau XXIII: Corrélation ‘r’ Spearman entre les abondances bactériennes testées et la concentration d'extrait à condition d'éclairement pour l'ensemble des durées d'incubation.

Espèces bactériennes considérées	Intensité d'éclairement			
	0 lux	1000 lux	2000 lux	3000 lux
<i>E. coli</i> entéropathogène	-0,741**	-0,734**	-0,730**	-0,271 ^{ns}
<i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i>	-0,939**	-0,949**	-0,958**	-0,953**

*= corrélation significative à $P < 0,05$ N = 30

ns = corrélation non significative

**= corrélation significative à $P < 0,01$

III.1.8- Comparaison entre les abondances moyennes des bactéries analysées en présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* à chaque condition expérimentale

III.1.8.1- Comparaison entre les abondances moyennes des bactéries planctoniques cultivables enregistrées à chaque température d'incubation, dans différentes concentrations d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*

Les abondances moyennes des bactéries planctoniques cultivables enregistrées dans différentes concentrations d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* et à chaque température d'incubation ont été comparées entre elles en utilisant le test H de Kruskal-Wallis. Les valeurs des coefficients de significativité sont présentées dans le **Tableau XXIV**. Il en ressort que dans la majorité des cas, les abondances de cellules planctoniques d'*E. coli* entéropathogène, d'*E. coli* commensale, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* et *Enterococcus faecalis* cultivables dénombrées diffèrent significativement ($P < 0,05$) d'une concentration d'extrait à l'autre sous la plupart des températures d'incubation, excepté *E. coli* commensale et *Vibrio cholerae* lorsque la température d'incubation est de 23 °C (**Tableau XXIV**).

Tableau XXIV: Valeurs des coefficients de significativité résultant de la comparaison entre les abondances moyennes des bactéries planctoniques cultivables enregistrées dans différentes concentrations d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* à chaque température d'incubation

Température d'incubation	Souches bactériennes testées				
	<i>E. coli</i> entéropathogène	<i>E. coli</i> commensale	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
7 °C	0,003*	0,033*	0,000*	0,005*	0,000*
23 °C	0,039*	0,178 ^{ns}	0,001*	0,466 ^{ns}	0,000*
37 °C	0,001*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
44 °C	0,000*	0,000*	0,001*	0,000*	0,000*

*= différence significative pour $P < 0,05$

ddl = 5

ns = difference non significative

III.1.8.2- Comparaison entre les abondances bactériennes moyennes planctoniques enregistrées aux différentes températures d'incubation pour chaque concentration d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*

Les abondances moyennes des bactéries planctoniques cultivables enregistrées aux différentes températures pour chaque concentration d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* ont été comparées entre elles en utilisant le test H de Kruskal-Wallis. Les valeurs des coefficients de significativité sont présentées dans le **Tableau XXV**. Il en ressort qu'excepté les cellules *E. coli* commensale dans les solutions d'extrait de concentrations 0,1 % à 1,5 %, *Salmonella typhi* dans la solution d'extrait de concentration 0,1 %, *Vibrio cholerae* dans les solutions d'extrait de concentrations 0,05 % à 0,1 %, et les cellules *Enterococcus faecalis* dans la solution d'extrait de concentration 2 %, les abondances de cellules cultivables dénombrées diffèrent significativement ($P < 0,05$) d'une température d'incubation à l'autre pour chaque concentration d'extrait de plante.

III.1.8.3- Comparaison des abondances bactériennes moyennes planctoniques enregistrées dans différentes concentrations d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* pour chaque durée d'incubation

Les abondances moyennes des bactéries planctoniques cultivables enregistrées aux différentes concentrations d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* pour chaque durée d'incubation, ont été comparées entre elles en utilisant le test H de Kruskal-Wallis. Les valeurs des coefficients de significativité sont présentées dans le **Tableau XXVI**. Il en ressort qu'à l'exception des cellules *E. coli* entéropathogène après 9 et 24 heures d'incubation, et des cellules *E. coli* commensale après 12

heures d'incubation, les abondances des cellules cultivables dénombrées diffèrent significativement ($P < 0,05$) d'une concentration d'extrait à l'autre pour chaque période d'incubation.

Tableau XXV : Valeurs des coefficients de significativité résultant de la comparaison entre les abondances moyennes des bactéries planctoniques cultivables enregistrées dans différentes températures d'incubation pour chaque concentration d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*

Concentration d'extrait de plante	Souches bactériennes considérées				
	<i>E. coli</i> entéro-pathogène	<i>E. coli</i> commensale	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
0,05 %	0,018*	0,010*	0,014*	0,832 ^{ns}	0,003*
0,1 %	0,022*	0,095 ^{ns}	0,097 ^{ns}	0,979 ^{ns}	0,008*
0,5 %	0,003*	0,096 ^{ns}	0,046*	0,035*	0,034*
1 %	0,002*	0,206 ^{ns}	0,049*	0,022*	0,003*
1,5 %	0,002*	0,067 ^{ns}	0,115*	0,020*	0,016*
2 %	0,002*	0,023*	0,138*	0,011*	0,721 ^{ns}

*= différence significative pour $P < 0,05$

ddl = 3

ns = difference non significative

Tableau XXVI: Valeurs des coefficients de significativité résultant de la comparaison entre les abondances moyennes des bactéries planctoniques cultivables enregistrées dans différentes concentrations d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* après chaque période d'incubation

Temps de séjour	Souches bactériennes considérées				
	<i>E. coli</i> entéro-pathogène	<i>E. coli</i> commensale	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
3h	0,041*	0,005*	0,002*	0,007*	0,001*
6h	0,074*	0,022*	0,002*	0,016*	0,002*
9h	0,384 ^{ns}	0,041*	0,003*	0,045*	0,002*
12h	0,041*	0,099 ^{ns}	0,007*	0,009*	0,002*
24h	0,096 ^{ns}	0,004*	0,006*	0,002*	0,002*

*= différence significative ($P < 0,05$)

ddl = 5

ns = difference non significative

III.1.8.4- Comparaison entre les abondances bactériennes moyennes planctoniques enregistrées aux différentes concentrations d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* pour chaque intensité d'éclairage

Les abondances moyennes des bactéries planctoniques cultivables enregistrées aux différentes concentrations d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* pour chaque intensité lumineuse, ont été comparées entre elles en utilisant le test H de Kruskal-Wallis. Les valeurs des coefficients de significativité sont présentées dans le **Tableau XXVII**. Il en ressort qu'à l'exception de l'intensité 3000 lux sous laquelle les cellules d'*E. coli* entéropathogène paraissent insensibles aux variations de la concentration d'extrait, les abondances de ces cellules ainsi que celles d'*Enterococcus faecalis* cultivables diffèrent significativement ($P < 0,05$) d'une concentration d'extrait à l'autre sous chaque intensité lumineuse.

Tableau XXVII: Valeurs des coefficients de significativité résultant de la comparaison entre les abondances moyennes des bactéries planctoniques cultivables enregistrées dans différentes concentrations d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* sous chaque intensité d'éclairage

Souche bactériennes testées	Intensité d'éclairage			
	0 lux	1000 lux	2000 lux	3000 lux
<i>E. coli</i> entéropathogène	0,005*	0,003*	0,007*	0,466 ^{ns}
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*

*= différence significative pour $P < 0,05$ ddl = 5 ns = différence non significative

III.1.8.5- Comparaison entre les abondances bactériennes moyennes planctoniques enregistrées aux différentes intensités d'éclairage pour chaque concentration d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*

Les abondances moyennes des bactéries planctoniques cultivables enregistrées aux différentes intensités d'éclairage pour chaque concentration d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*, ont été comparées entre elles en utilisant le test H de Kruskal-Wallis. Les valeurs des coefficients de significativité sont présentées dans le **Tableau XXVIII**. Il en ressort que dans chaque concentration d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*, les abondances des cellules d'*E. coli* entéropathogène et *Enterococcus faecalis* cultivables diffèrent significativement ($P < 0,05$) d'une intensité d'éclairage à l'autre.

Tableau XXVIII: Valeurs des coefficients de significativité résultant de la comparaison entre les abondances moyennes des bactéries planctoniques cultivables enregistrées sous différentes intensités d'éclairement pour chaque concentration d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*

Souche bactériennes	Concentration d'extrait de la solution d' <i>Eucalyptus microcorys</i>					
	0,05 %	0,1 %	0,5 %	1 %	1,5 %	2 %
<i>E. coli</i> entéropathogène	0,006*	0,007*	0,017*	0,014*	0,025*	0,016*
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,004*	0,013*	0,031*	0,003*	0,002*	0,002*

*= différence significative pour $P < 0,05$ ddl = 3

III.1.8.6- Comparaison entre les phases de croissance, des abondances moyennes de *E. coli* entéropathogène enregistrées, des cellules restées adhérentes d'une part, et celles détachées d'autre part, après séjour dans chaque concentration d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*

Les abondances moyennes de cellules d'*E. coli* entéropathogène cultivables détachées ainsi que celles restées adhérentes, ont été comparées d'une phase de croissance cellulaire à l'autre après séjour dans chaque concentration d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*. Cette comparaison a été faite à l'aide du test H de Kruskal-Wallis. Les valeurs des coefficients de significativité sont présentées dans le **Tableau XXIX**. Il en ressort que ces abondances bactériennes diffèrent significativement ($P < 0,05$) d'une phase cellulaire à l'autre pour chaque concentration d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*.

Tableau XXIX: Valeurs des coefficients de significativité résultant de la comparaison entre les phases de croissance, des abondances moyennes de *E. coli* entéropathogène enregistrées, des cellules restées adhérentes d'une part, et celles détachées d'autre part, après séjour dans chaque concentration d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*

Etat des cellules	Concentration d'extrait de la solution d' <i>Eucalyptus microcorys</i>		
	1 %	1,5 %	2 %
Cellules restées adhérentes	0,000*	0,000*	0,000*
Cellules détachées	0,000*	0,000*	0,000*

*= différence significative pour $P < 0,05$ ddl = 3

III.2- DISCUSSION

III.2.1- Screening phytochimique

Le criblage phytochimique de l'extrait aqueux d'*Eucalyptus microcorys* a révélé la présence de certains métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les anthraquinones, les flavonoïdes, les saponines, les anthocyanidines et tannins galliques. Les flavonoïdes, anthraquinones, alcaloïdes et les saponines sont relativement plus abondants que les autres constituants chimiques. Pamplona-Roger (1999) rapportait déjà la présence de ces composés dans les plantes de la famille des Myrtacées à laquelle appartient *E. microcorys*. Les alcaloïdes des extraits aqueux de *Lantana camara*, *Cymbopogon stratus* et de *Hibiscus rosa simentis* sont cités par plusieurs auteurs comme ayant un effet bactéricide remarqué (Davenport, 2006). Les anthraquinones sont connus comme étant d'excellents générateurs d'oxygène singulet (Fufezan *et al.*, 2007). En présence de la lumière, ces composés sont capables de générer l'oxygène singulet qui attaque et endommage la plupart des microorganismes présents dans le milieu (Sabbahi *et al.*, 2000 ; Cavalcante *et al.*, 2002).

Moore *et al.* (2004) ont également signalé la présence de tannins hydrolysables dans les feuilles d'*E. microcorys*. Les espèces d'*Eucalyptus* produisent des substances volatiles tels que les terpènes qui sont accumulés dans les glandes abondamment distribuées dans tout le parenchyme foliaire et l'écorce (Moleyar et Narasimham, 1986 ; Rakotonirainy et Lavédrine, 2005).

Les *Eucalyptus* (Myrtaceae) sont utilisés pour contrôler les infections microbiennes. Les groupes fonctionnels de certains composés présents dans la plupart des matières végétales tels que les alcools, les phénols, les terpènes et les cétones sont associés pour leurs caractéristiques antimicrobiennes (Farah *et al.*, 2001; Alma *et al.*, 2004; Sartorelli *et al.*, 2006; Braca *et al.*, 2008). On retrouve une variété de composés phénoliques dans cette plante. Ces composés phénoliques sont généralement responsables de l'activité antimicrobienne de la plante (Ferreira *et al.*, 2010).

Les *Eucalyptus* présentent également un grand potentiel médicinal, du fait de la présence d'une huile essentielle riche en 1,8-cineole (86,7 %) (Foudil-Cherif *et al.*, 2000). De plus, les groupes chimiques tels alcaloïdes, quinones, flavonoïdes, saponines et terpènes présents dans les extraits de plante, peuvent contenir des chromophores capables d'absorber la lumière et d'initier une photosensibilisation (Sunda *et al.*, 2008).

III.2.2- Effet de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* sur les cellules planctoniques

Une variation temporelle des abondances des cellules planctoniques en présence de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* a été observée. Cette variation est dépendante non seulement de la

concentration de l'extrait de plante, mais aussi des facteurs associés tels que la température d'incubation et les conditions d'éclairement.

L'impact direct de l'extrait aqueux d'*Eucalyptus microcorys* sur la survie des espèces cellulaires considérées a été évalué par le calcul du pourcentage d'inhibition cellulaire à chaque condition expérimentale. Lorsqu'on considère la température d'incubation comme facteur associé au cours de l'étude, on note que les valeurs de pourcentage d'inhibition enregistrées varient de 3 à 100 % pour *E. coli* entéropathogène, de 5 à 100 % pour *E. coli* commensale, de 3 à 100 % pour *Salmonella typhi*, de 26 à 100 % pour *Vibrio cholerae* et de 94 à 100 % pour *Enterococcus faecalis*. A l'exception de *Vibrio cholerae* et *Enterococcus faecalis*, l'extrait de plante présente des taux d'inhibition cellulaire parfois inférieurs à 20 % pour les autres espèces bactériennes. Les trois souches bactériennes que sont *Salmonella typhi*, *E. coli* commensale et *E. coli* entéropathogène appartiennent toutes à la famille des Entérobactéries et partagent certaines propriétés biochimiques (Pilet *et al.*, 1983 ; Leclerc, 2003). De plus, ce sont des bactéries mésophiles dont la température de croissance est comprise entre 20 et 40 °C avec un optimum thermique de croissance compris entre 30 et 37 °C (Meyer *et al.*, 1994). Les pourcentages d'inhibition supérieurs à 90 % enregistrés chez *Enterococcus faecalis* pourraient être liés à la nature de sa paroi Gram+, son caractère mésophile avec une gamme de température allant de 10 à 45 °C et une température optimale de 35 °C (Aguilar-Galvez *et al.*, 2012). Sous diverses conditions d'éclairement, les pourcentages d'inhibition enregistrés ont varié de 16 à 100 % chez *E. coli* entéropathogène, et de 38 à 100 % pour *Enterococcus faecalis*, les intensités 2000 lux et 3000 lux étant celles où on a observé les taux d'inhibition les plus importants aux concentrations les plus élevées.

Les forts pourcentages d'inhibition enregistrés au cours de l'expérience seraient probablement dûs aux métabolites secondaires présents dans l'extrait de plante. En combinant les résultats de la cultivabilité cellulaire et du criblage phytochimique, on peut penser que les activités antimicrobiennes sont liées à la présence de phénols retrouvés dans les extraits de feuilles d'*Eucalyptus microcorys*. Les polyphénols incluant les flavonoïdes et les tannins sont reconnus pour leur toxicité sur les microorganismes, et les tannins et saponines possèdent des propriétés antibactériennes (Santos et Mello, 2003 ; Loguercio *et al.*, 2005 ; Voravuthikunchai, 2005 ; Raven *et al.*, 2007). Upadhyay *et al.* (2010) ont montré que des extraits aqueux et hydroalcooliques de feuilles riches en composés phénoliques inhibent la croissance de *B. cereus* et *S. aureus*. Bouharb *et al.* (2014) ont observé que l'extrait aqueux d'*Eucalyptus gomphocephala* était relativement très actif sur plusieurs souches de *P. aeruginosa*. Estanislau *et al.* (2001) ont noté que les extraits de feuilles broyées et séchées de *E. cloeziana*, *E. microcorys*, *C. citriodora*, *E. saligna* et *E. grandis* présentent

une activité inhibitrice contre les cellules *Escherichia coli*, *Streptococcus aureus* et *Salmonella typhi*.

Selon Masson et Wasserman (1987), les composés phénoliques exercent leur pouvoir antimicrobien *via* un mécanisme similaire à celui des aldéhydes avec une efficacité inhibitrice proportionnelle à leur degré d'hydrophobicité. L'inhibiteur aldéhyde est essentiellement dû à la réactivité de la fonction aldéhyde avec le groupement thiol des acides aminés impliqués dans la division cellulaire (Kurita *et al.*, 1979). Il a aussi été indiqué qu'il y a formation d'un complexe entre le donneur d'électron et l'aldéhyde, induisant un changement de l'état ionique de la membrane qui se traduit par un déséquilibre d'échange avec le milieu extérieur (Kurita *et al.*, 1979 ; Masson et Wasserman, 1987). Cet état entraîne une mort certaine de la cellule fongique et bactérienne. A faible concentration, les composés phénoliques produisent un effet réversible, alors qu'à forte dose, ils entraînent une coagulation générale avec une mort des cellules microbiennes (Mc Donnel et Russell, 1999).

Des molécules présentes dans les feuilles d'*Eucalyptus* qui fournissent des propriétés désinfectantes sont les monoterpènes, comme le 1,8-cinéole, alpha et bêta-terpinène, 4-terpinéol et certains tannins (Schuch, 2008). Concernant la composition des huiles essentielles de *E. citriodora* (*Corymbia citriodora*), il a été indiqué que la citronelal est plus abondant, suivi par le 1,8-cinéole et l'alpha-pinène (Schuch, 2008). L'huile de la citriodora est la plus utilisée comme désinfectant commercial au Brésil. Le 1,8-cinéole a un potentiel germicide vis-à-vis d'un grand nombre de bactéries à savoir *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, et *Bacillus subtilis* (Sivropoulou *et al.*, 1997).

Voss-Rech *et al.* (2011) ont observé que l'extrait d'*Eucalyptus* sp présente une inhibition contre 100% des sérotypes des cellules *Salmonella* (*S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. infantis*...) montrant l'effet bactéricide sur 42,1 % d'entre eux. Traore *et al.* (2013) ont montré que les huiles essentielles des *Eucalyptus* ont une activité non négligeable contre les bactéries et les champignons. Oyedeji *et al.* (1999) ont observé des activités antibactériennes considérables sur les bactéries à Gram⁺ et Gram⁻, et antifongiques sur *Candida albicans* des huiles essentielles de cinq variétés d'*Eucalyptus* du Nigéria. De même, Elaissi *et al.* (2011) ont montré que l'huile essentielle de *Eucalyptus odorata* est la plus active contre *Staphylococcus aureus*. Selon Bachir *et al.* (2012), l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* a un effet sur *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Eucalyptus staigeriana* a été mise en évidence par Gilles *et al.* (2010).

Les résultats de la présente étude montrent que l'augmentation de la concentration d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* a un impact sur la cinétique d'inhibition cellulaire. Pour toutes les bactéries considérées, lorsque la concentration d'extrait augmente, la vitesse d'inhibition augmente également. Pour *E. coli* entéropathogène par exemple en condition psychrophile (7 °C), les valeurs de vitesse d'inhibition sont faibles et varient entre 0,107 h⁻¹ et 0,122 h⁻¹, alors qu'à une température de 44°C, on a enregistré des valeurs de l'ordre de 0,476 h⁻¹ pour une concentration d'extrait de 2 %. L'inhibition apparente observée serait due à la présence de plusieurs classes de polyphénols tels que les flavonoïdes, les triterpènes, les alcaloïdes, les tannins, les saponosides présents dans notre extrait. Certains facteurs semblent influencer à des degrés divers l'effet de l'extrait de la plante sur les cellules bactériennes. Cette variation dans l'évolution des abondances cellulaires s'expliquerait par l'accumulation de certains produits chimiques lesquels deviennent temporairement toxique pour les cellules bactériennes et réduisent ou inhibent leur prolifération (Nola *et al.*, 2010b).

Le mécanisme d'action des polyphénols est sans doute très complexe et peut impliquer de multiples modes d'actions. Sur le plan enzymatique, ce mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (protéases et carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999). Ces composés entraînent également l'inhibition des enzymes extracellulaires, la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer (Milane, 2004). De plus les flavonoïdes dépourvus des groupements hydroxyles libres ont plus d'activité antimicrobienne par rapport à ceux qui en sont pourvus. Ce qui conduit à une augmentation de leur affinité chimique aux lipides membranaires, laissant penser que la cible microbienne de ces flavonoïdes testés est la membrane cytoplasmique (Cowan, 1999).

Les tannins possèdent également la capacité à complexer les protéines, entraînant ainsi l'inactivation des enzymes soit directement par fixation aux sites actifs, soit indirectement par l'encombrement stérique créé par la fixation des molécules de tannins sur l'enzyme (Zimmer et Coordesse, 1996). En tenant compte de la constitution structurale et moléculaire, les polyphénols jouent également un rôle dans la dégradation de la paroi cellulaire, la perturbation de la membrane cytoplasmique, ce qui cause une perte des composants cellulaires. Ils influencent aussi la synthèse de l'ADN et l'ARN (Zhang *et al.*, 2009), des protéines et des lipides (Balentine *et al.*, 2006), ainsi que la formation des complexes avec la paroi cellulaire (Gangoué Piéboji, 2007).

L'activité antibactérienne des flavonoïdes peut être expliquée par le mécanisme de toxicité vis-à-vis des microorganismes. Ce mécanisme implique des interactions non spécifiques telles que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires ou les enzymes, la

chélation des ions métalliques, l'inhibition du métabolisme bactérien, la séquestration de substances nécessaires à la croissance des bactéries (Karou *et al*, 2005). Le flavonoïde tel que la myricétine empêche la croissance de *Burkholderia cepacia* multi-résistante, *Enterococci* vancomycine-résistante, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus epidermidis* (Hodek *et al.*, 2002). Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés, plus ils sont inhibiteurs des microorganismes (Scalbert, 1991).

Les mécanismes responsables de la toxicité des polyphénols envers les microorganismes incluent l'inhibition enzymatique par les composés oxydés, probablement *via* la réaction avec les groupes sulfhydryle ou par les interactions non spécifiques avec les protéines (Mason et Wasserman, 1987). L'hydrophobicité des polyphénols tels que les flavonoles est aussi un critère de toxicité qui leur permet de s'insérer dans les phospholipides membranaires et exercer leurs effets antibactériens à l'intérieur de la cellule (Daglia, 2011). La déstabilisation de la membrane cytoplasmique, l'inhibition des enzymes bactériennes extracellulaires, l'action directe sur le métabolisme bactérien et la privation des substrats requis pour la croissance bactérienne, spécialement les minéraux essentiels comme le fer et le zinc (via la propriété de chélation des métaux) sont des mécanismes adaptés par les proanthocyanidines dans l'inhibition des bactéries (Daglia, 2011).

La présente étude montre également que les abondances de cellules cultivables moyennes diffèrent très significativement ($P < 0,01$) d'une concentration d'extrait à l'autre pour chacune des espèces de bactéries. La même observation a été faite pour chaque température d'incubation, excepté pour *Salmonella typhi* avec une valeur de risque de $P < 0,05$.

Ces résultats indiquent que l'extrait aqueux d'*Eucalyptus microcorys* a un effet antibactérien dans l'environnement aquatique. Des données similaires ont été rapportées par Sunda *et al.* (2008) qui ont montré que les extraits aqueux de *Lantana camara*, *Cymbogon citratus* et *Hibiscus rosasinensis* ont un effet bactéricide dans l'environnement aquatique. Lutgen et Michels (2008) ont montré qu'en ajoutant du thé d'*Artemisia annua* à l'eau contaminée par des cellules bactériennes, on observait une réduction considérable de la charge en bactério-contaminants à des niveaux inférieurs à ceux obtenus après ébullition d'eau. On note également une corrélation négative et significative ($P < 0,01$) entre la température d'incubation et les abondances cellulaires d'une part, et entre la concentration d'extrait et les abondances cellulaires d'autre part. De façon générale, une diminution progressive de l'abondance de cellules cultivables a été observée au cours de la période d'exposition, dans chaque condition expérimentale, ce qui indique une augmentation progressive de l'inhibition cellulaire. Cette inhibition semble d'autant plus marquée que lorsque la durée d'incubation ou

temps de séjour des bactéries dans la solution d'extrait de plante augmente. Des études ont par exemple montré que tout comme *Eucalyptus globulus*, l'action inhibitrice de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* est beaucoup plus remarquable en grande dose de concentration et à longue durée d'incubation 2 ou 24 heures environ (Ghalem et Mohamed, 2008).

III.2.3- Importance de la température d'incubation dans l'inhibition des bactéries planctoniques en présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*

Les résultats obtenus montrent que la solution d'*Eucalyptus microcorys* manifeste une certaine inhibition sur la croissance des germes bactériens étudiés. Aux durées d'incubation variant de 3 à 24 heures, les abondances de cellules cultivables semblent relativement moins élevées aux températures 37 °C et 44 °C qu'à 7 °C et 23 °C. Les cellules planctoniques *E. coli* entéropathogène, *S. typhi*, *V. cholerae*, *E. coli* commensale et *Enterococcus faecalis* semblent résister mieux aux effets antibactériens des extraits d'*Eucalyptus microcorys* en condition psychrophile. Les plus faibles pourcentages d'inhibition cellulaires ont été enregistrés dans la majorité des cas à la température 7°C en présence de la plus faible concentration d'extrait. Ces pourcentages d'inhibition semblent augmenter jusqu'à 100 % aux températures 37 °C et 44 °C. En considérant l'ensemble des concentrations d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*, les pourcentages d'inhibition sont généralement supérieurs à 90 % à 44 °C.

La température est un facteur d'importance capitale car elle agit directement sur la croissance microbienne. Les réactions biochimiques à la base du métabolisme cellulaire dépendent des activités des enzymes, elles-mêmes largement influencées par la température de l'environnement (Regnault, 2002). En condition psychrophile (température inférieure à 10 °C), et même à 23°C, la souche *E. coli* entéropathogène par exemple montre une résistance aux concentrations 1 % et 1,5 % d'extrait. Cette résistance serait liée au fait que dans ces conditions, le métabolisme des bactéries mésophiles est relativement ralenti et les produits toxiques ne sont que très lentement métabolisés (Lessard et Sieburth, 1983). Par contre, une augmentation de la température est généralement corrélée à un accroissement de la vitesse des réactions métaboliques et biochimiques, et les produits toxiques sont ainsi métabolisés, d'où de forts pourcentages d'inhibition observée à 44°C. La différence des sensibilités des souches bactériennes est probablement liée à des mécanismes de défense, car il est bien connu que les bactéries peuvent développer des mécanismes de protection tels les changements dans la perméabilité et de la structure de la paroi cellulaire, la production d'enzymes inhibitrices, et l'altération des molécules attaqués par les antibactériens, entre autres (Trabulsi et Altherthum, 2005). Cela pourrait expliquer

la différence observée entre le pourcentage d'inhibition des souches d'*E. coli* entéropathogène et des souches d'*E. coli* commensale.

Pour Davey (1989), la température est l'un des paramètres explicatifs des évolutions des abondances bactériennes. Elle influence indirectement sur la productivité bactérienne par modification des propriétés physiques et chimiques du milieu (Mauguin *et al.*, 2004). Son effet par exemple sur *E. coli* a été étudié expérimentalement par Mc Feters et Stuart (1972) dans l'eau de rivière. Ces auteurs ont noté une relation inverse entre l'abondance de cette bactérie et l'augmentation de la température, surtout dans la gamme comprise entre 5 et 30 °C. Vasconcelos et Swariz (1976) ont indiqué que la survie d'*E. coli* dans l'eau de mer est d'autant plus longue que la température est faible. Graham et Sieburt (1973) remarquent qu'une augmentation de la température de 15 à 25 °C, sans ajout de substances nutritives, permet une décroissance de *Salmonella typhimurium* et d'*E. coli*. Les fortes valeurs des pourcentages d'inhibition observées aux températures 37 °C et 44 °C dans la présente étude pourraient s'expliquer par le fait que ces températures accélèrent le métabolisme bactérien, les produits toxiques étant ainsi métabolisés. En effet, Lessard et Sieburth (1983) suggèrent que les basses températures peuvent entraîner une meilleure survie par le fait que le métabolisme des bactéries mésophiles étant très ralenti, les produits toxiques présents en même temps que les fortes concentrations de nutriments ne sont que très lentement métabolisés.

Le test H de Kruskal-Wallis a montré qu'il existe globalement une différence significative ($P < 0,05$) entre les abondances moyennes des espèces bactériennes testées pour chaque température d'expérimentation aux différentes concentrations d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*.

Les résultats obtenus lors du calcul des pourcentages d'inhibition indiquent une sensibilité significative à l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* des cellules d'*Enterococcus faecalis* par rapport autres espèces bactériennes. *Enterococcus faecalis* est une bactérie à Gram⁺ contrairement aux autres espèces bactériennes étudiées qui sont des bactéries à Gram⁻. La différence de sensibilité à l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* des microorganismes renseigne sur un éventuel effet membranaire de cet extrait. La paroi des bactéries à Gram⁻ serait moins perméable aux agents antimicrobiens en raison de sa structure complexe. La couche externe, formée de polysaccharides, de protéines et de lipides agirait comme une barrière à l'entrée de différents agents chimiques (Russel et Chopra, 1996).

III.2.4- Importance de l'intensité lumineuse sur l'inhibition des bactéries planctoniques en présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*

Une diminution progressive de l'abondance de cellules cultivables *Escherichia coli* entéropathogène et *Enterococcus faecalis* a été observée pendant la période d'exposition à la lumière, des solutions contenant des cellules bactériennes et l'extrait d'*Eucalyptus microcorys*. Ces deux espèces bactériennes ont été choisies non seulement parce qu'elles constituent le meilleur indicateur biologique de la qualité de l'eau potable (Edberg *et al.*, 2000), mais aussi à cause de la différence qu'elles présentent au niveau de leur paroi. La paroi est connue comme un élément essentiel dans la sensibilité des bactéries aux conditions extrêmes de l'environnement. *Escherichia coli* est à Gram⁻ et *Enterococcus faecalis* est à Gram⁺.

On note ainsi une augmentation progressive de la vitesse d'inhibition cellulaire chez les cellules testées en présence d'extrait après exposition à la lumière. La vitesse d'inhibition horaire pour les deux espèces étudiées est très faible en condition d'obscurité et augmentent avec l'augmentation de l'intensité lumineuse. Les travaux de Maiga (2010) ont montré que la radiation solaire a une forte influence sur la survie d'*E. coli* et des entérocoques dans les eaux usées, lorsqu'on compare les abattements obtenus en présence et en absence de lumière. De même, les travaux de Nola *et al.* (2010a) effectués sur la photoinactivation de *Staphylococcus aureus* et *Vibrio parahaemolyticus* en microcosme aquatique ont révélé un impact considérable de la lumière sur l'inhibition bactérienne, inhibition beaucoup plus marquée en présence de lumière qu'à l'obscurité. Au cours de notre étude, les vitesses d'inhibition cellulaires à l'obscurité sont comprises entre 0,102 h⁻¹ et 0,146 h⁻¹ pour *E. coli* entéropathogène et entre 0,211 h⁻¹ et 0,378 h⁻¹ pour *Enterococcus faecalis*. Ces vitesses d'inhibition augmentent considérablement en présence de la lumière avec des valeurs atteignant parfois 0,662 h⁻¹ à 3000 lux.

La présente étude montre également que plus l'intensité lumineuse augmente, plus le pourcentage d'inhibition cellulaire augmente quelque soit la concentration de l'extrait de la plante. Pour une intensité lumineuse de 3000 lux, les pourcentages d'inhibition sont supérieurs à 80 %. Chez *Enterococcus faecalis*, ils sont compris entre 30 et 100 %. Nola *et al.* (2010a) montraient dans leurs travaux que l'augmentation du taux d'inhibition cellulaires est due à l'augmentation de l'intensité lumineuse.

Le mécanisme mis en jeu pour expliquer cette inhibition cellulaire en présence de lumière serait la présence des sites photosensibles P présents chez les bactéries. Ces sites photosensibles P en présence de la lumière, sont convertis en formes réactives P*. Ces formes activées P* convertissent les molécules d'oxygène en oxygène à l'état singulet (¹O₂), qui est un puissant oxydant

et qui détruit les cellules bactériennes (Stanier *et al.*, 1990). La toxicité est due à des radicaux superoxyde et au peroxyde d'hydrogène qui sont produits au cours des réactions d'oxydation (Stanier *et al.*, 1990, Nola *et al.*, 2010a). La radiation UV-B du spectre ultraviolet de la lumière est la plus bactéricide, causant des dommages photobiologiques directs à l'ADN. De plus, les UV-B sont très fortement absorbés par l'ADN d'où leurs effets néfastes sur les microorganismes. Aux longueurs d'onde supérieures à 329 nm, les mécanismes photochimiques, en particulier la photooxydation, deviennent plus importants, par l'intermédiaire des sites photosensibles pour détruire les composants de la cellule et de préférence la membrane cellulaire (Sinton *et al.*, 2002).

La présence de l'oxygène lors de l'exposition à la lumière est nécessaire pour permettre la formation d'espèces réactives d'oxygène, toxiques pour les bactéries (Curtis et Mara, 1994). La dimérisation entre bases pyrimidiques adjacentes est la réaction la plus probable, résultant de l'action directe des UV sur l'ADN (Mitchell, 1997). Les deux photoproduits majeurs formés sont le dimère cyclobutyl pyrimidine et la pyrimidine (6-4) pyrimidinone. Ces deux photoproduits inhibent la synthèse de l'ADN et la transcription des gènes (Jeffrey and Mitchell, 1997). La photooxydation peut également être catalysée par des photosensibilisateurs exogènes (notamment les pigments photosynthétiques). Ces photosensibilisateurs absorbent dans une large gamme de longueur d'ondes (UV et visible) et produisent des espèces réactives d'oxygène qui réagissent sur certaines parties des microorganismes comme la membrane cellulaire des bactéries (Davies-Colley *et al.*, 1999).

L'effet combiné de la lumière et de l'extrait de plante d'*Eucalyptus microcorys* influence considérablement l'évolution du pourcentage d'inhibition cellulaire à l'égard de chaque concentration d'extrait et de chaque condition éclairément. Les variations des pourcentages d'inhibition par rapport à l'intensité lumineuse et la période d'incubation indiquée pourraient être dues à la variation des activités antibactériennes des composés bioactifs présents dans la solution de l'extrait aqueux d'*Eucalyptus microcorys*. Certaines plantes telles que *Cassia alata*, *Cassia occidentalis*, *Carica papaya*, *Phyllanthus niruri* et *Coleus kilimandschari*, notamment celles utilisées dans la pharmacopée traditionnelle pour soigner les infections microbiennes et parasitaires, sont aussi capables de produire l'oxygène singulet (Sunda, 2012). Ces plantes contiennent des chromophores, molécules responsables de leur coloration. Celles-ci, une fois dans l'eau et en présence d'une source d'énergie, sont capables d'absorber l'énergie et de passer de l'état fondamental à l'état excité. L'énergie emmagasinée est par la suite transférée à l'oxygène présent dans l'eau. Ce dernier passe dès lors de l'état fondamental à l'état excité, singulet, tout en endommageant les microorganismes présents dans l'eau (Taba et Luwenga, 1999). Au regard de l'inhibition des microorganismes en présence de lumière, les extraits de feuilles d'*Eucalyptus*

microcorys auraient donc un effet photosensibilisateur à travers certains de ces métabolites secondaires. Les composés comme les quinones et particulièrement les anthraquinones sont des molécules photosensibilisatrices (Sunda *et al.*, 2008). Dans certains travaux, les quinones sont cités comme d'excellents générateurs d'oxygène singulet (Taba et Luwenga, 1999; Fufezan *et al.*, 2007). Pour Taba et Luwenga (1999), l'activité photodynamique des extraits de plante serait liée à la présence des quinones et anthraquinones, qui sont cités par Masscheleir-Kleiner et Heylen (1968) comme étant des colorants naturels. Ces molécules sont capables d'emmagasiner l'énergie solaire. Celle-ci étant ensuite transférée à l'oxygène. Ce dernier passe dès lors de l'état fondamental, forme triplet, à l'état excité, forme singulet, tout en endommageant drastiquement les bactéries présents dans le milieu (Sabbahi *et al.*, 2000 ; Cavalcante *et al.*, 2002). Tout comme les extraits aqueux de *Lantana camara*, *Cymbopogon stratus* et d'*Hibiscus rosa simentis* étudiés, le criblage phytochimique de l'extrait aqueux d'*Eucalyptus microcorys* a révélé la présence d'anthraquinones qui sont des colorants naturels et de ce fait un puissant photosensibilisateur qui génère l'oxygène singulet en présence de la lumière.

Dans la présente étude, une variation de la température de l'eau avec l'intensité lumineuse a été notée. Cette température augmente progressivement avec l'intensité lumineuse. Des températures de l'ordre de 39 à 50 °C sous 2000 lux et de 40 à 50 °C sous 3000 lux ont été enregistrées. L'augmentation de la température observée due à l'intensité lumineuse a également un impact sur la survie de ces bactéries. Cette température semble être la cause de la variation des abondances bactériennes (Davey, 1989). Elle influence indirectement la productivité des bactéries en modifiant les propriétés physiques et chimiques du milieu (Mauguin *et al.*, 2004). Une augmentation de la température entraîne une augmentation de l'activité enzymatique, ce qui conduit à une augmentation de la vitesse métabolique et de réactions biochimiques et ainsi, l'impact sur la productivité des bactéries. L'augmentation de la vitesse de réaction s'accompagne d'une augmentation de déchets métaboliques, certains d'entre eux pouvant être relativement toxiques. Elle peut également entraîner la dénaturation des protéines.

La nature de la paroi bactérienne semble également avoir une influence sur le processus étudié. En condition d'éclairement, on a enregistré des coefficients d'inhibition plus élevés chez *Enterococcus faecalis* avec des valeurs de 0,662 h⁻¹ pour une intensité de 3000 lux à une concentration d'extrait de 2 %. Aux mêmes conditions expérimentales, on a des valeurs de l'ordre de 0,453 h⁻¹ pour les cellules d'*E. coli* entéropathogène. Cette différence de sensibilité observée entre *E. coli* entéropathogène et *Enterococcus faecalis* vis-à-vis de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* pourrait s'expliquer par la structure différente de leur paroi. *Enterococcus faecalis* est

une bactérie à Gram⁺ constituée seulement d'une couche homogène de peptidoglycane (muréine ou mucopeptide) de 20 à 80 nm d'épaisseur située à l'extérieur de la membrane cytoplasmique. *E. coli* entéropathogène est une bactérie Gram⁻ constituée d'une couche de faible épaisseur de peptidoglycane de 3 nm d'épaisseur entourée d'une membrane externe de 7 à 8 nm d'épaisseur (Madigan et Martinko, 2007). Cette dernière structure est généralement asymétrique et joue un rôle important pour limiter l'entrée et la sortie des constituants. La lumière visible, en présence d'oxygène et par l'intermédiaire de la formation d'espèces oxygénées réactives (ROS) peut attaquer les acides gras mono-insaturés membranaires et provoquer une accumulation de peroxydes lipidiques (Curtis et Mara, 1994).

La peroxydation lipidique conduit à une perméabilisation de la membrane et à une production de composés toxiques tels que des aldéhydes, des époxydes ou des 4-hydroxyalkénals. Une altération des systèmes de transport membranaire est aussi observée (Storz *et al.*, 1990). Beaucoup de protéines de *E. coli* sont sensibles au stress oxydatif (Davies et Lin, 1988). Les ROS provoquent une perte d'activité de certaines enzymes et de cytochromes en oxydant les groupements thiols (-SH) ou en attaquant certains acides aminés tels que la méthionine, la cystéine, l'arginine ou la proline. Cette inactivation pourrait être due à un effet bactéricide généré par les alcaloïdes présents dans le milieu. Le fait que l'inactivation soit indépendante de la durée de l'exposition à la lumière milite en faveur d'un effet bactéricide important.

III.2.5- Hiérarchisation des degrés d'implication des facteurs considérés dans l'inhibition des bactéries planctoniques en présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*

Les pourcentages des sommes des carrés des facteurs considérés lors des expériences avec des cellules planctoniques montrent que ces facteurs influencent à des degrés divers l'effet des extraits d'*Eucalyptus microcorys* sur les bactéries utilisées. Le premier paramètre qui se démarque est la concentration de l'extrait. Elle aurait un impact considérable sur la cultivabilité des cellules bactériennes. Les concentrations d'extrait variant de 10 à 20 % seraient celles donc l'efficacité entraîne un fort taux d'inhibition cellulaire. Une corrélation négative et significative ($P < 0,01$) entre les abondances cellulaires et la concentration d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* a été observée. Le test Lambda de Wilks (λ) au seuil de 5 % vient conforter ces résultats pour des concentrations d'extrait de 1,5 et 2 %. Pour certaines maladies dues aux bactéries (sinusite, maux de gorge, angine, toux, bronchite, infection urinaire), les feuilles d'*Eucalyptus* sont recommandées sous la forme d'une décoction de 10 à 20 grammes de feuilles par litre d'eau à boire dans la journée (Nicolas, 2012).

La température apparaît comme le deuxième facteur impliqué dans l'inhibition cellulaire observée. La température d'incubation augmenterait l'efficacité de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys*, l'inhibition étant considérable aux températures mésophiles et moindre aux températures psychrophiles. Le test Lambda de Wilks (λ) au seuil de 5 % vient conforter ces résultats pour des températures d'incubation de 37 °C et 44 °C. En condition de microcosme, une augmentation de la température est généralement corrélée à un accroissement de la vitesse des réactions métaboliques et biochimiques, l'accumulation de certains produits chimiques toxiques pouvant se dérouler inhibant ainsi la croissance bactérienne (Nola *et al.*, 2010b).

La durée d'incubation est le troisième facteur impliqué dans le processus d'inhibition observé. Rutala *et al.* (2000) ont montré que l'efficacité d'un désinfectant de faible degré sur les microorganismes est élevée si l'on ajuste considérablement la durée d'exposition.

L'intensité lumineuse apparaît comme le dernier facteur impliqué au cours de l'étude. Les travaux de Meierhofer et Wegelin (2002) montrent que le rayonnement UV-A et la température élevée conduisent à l'élimination de 99,99 % des virus et bactéries générateurs de maladies diarrhéiques. Une variation de la température de la solution entre 40 et 50 °C, sous une intensité de 2000 lux et 3000 lux, serait à l'origine de l'inactivation des cellules. McGuigan *et al.*, (1998), ont montré en utilisant des eaux fortement contaminées avec *E. coli*, que l'inactivation thermique intervient seulement à partir de 45 °C où il est possible de noter une synergie d'action entre les processus d'inactivation optique et thermique. Une température seuil de l'eau d'environ 50°C favorise l'inactivation des cellules bactériennes (Wegelin *et al.*, 1994).

III.2.6- Effet de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* sur les cellules *Escherichia coli* entéro-pathogène adhérentes

L'utilisation des cellules *E. coli* entéro-pathogène, issues de différentes phases de croissance, a permis de réaliser des tests d'adsorption sur des lames de polyéthylène. *Escherichia.coli* a été retenue parce qu'elle constitue non seulement le meilleur indicateur biologique de la qualité de l'eau potable (Edberg *et al.*, 2000), mais aussi un organisme modèle pertinent pour l'étude de la colonisation de la surface (Beloin *et al.*, 2008)

L'étude montre que les cellules *E. coli* entéro-pathogène adhèrent sur le polyéthylène et l'abondance des cellules adhérentes varie selon l'état physiologique de la bactérie. L'adhésion bactérienne sur un support solide met en jeu différents types d'interactions et varie selon la nature du substrat à coloniser. Cette variabilité serait liée à la réversibilité de l'étape initiale de l'adsorption des cellules aux substrats due aux phénomènes d'adsorption-désorption (Branger *et al.*, 2007).

L'adhésion des cellules bactériennes aux supports constituent la première étape de formation des biofilms (Donlan, 2002 ; Boutaleb, 2007). Selon Pouneh (2009), l'adhésion bactérienne sur les supports se déroule en deux principales étapes : l'adhésion réversible et l'adhésion irréversible. L'adhésion réversible est gouvernée par des interactions physico-chimiques de types van Der Waals et acides-bases de Lewis (Boutaleb, 2007). L'adhésion irréversible est une étape plus lente que la précédente, l'irréversibilité de l'adhésion faisant appel au métabolisme bactérien. De plus malgré les propriétés protectrices et de structures déterminantes de la conformation du biofilm notées par Sutherland (2001), les exopolysaccharides peuvent en outre présenter des variations temporelles en réponse à des stress environnementaux (Mao *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2004).

Les résultats obtenus dans la présente étude révèlent que la solution d'extrait d'*Eucalyptus microcorys* entraîne un détachement des cellules bactériennes initialement adhérees au fragment de polyéthylène. L'importance de ce détachement de cellules varie en fonction non seulement de la concentration de l'extrait mais aussi en fonction du temps de séjour des cellules adhérees dans la solution d'extrait. Le détachement des cellules bactériennes, initialement fixées sur les fragments de polyéthylène, serait causé par les métabolites secondaires présents dans l'extrait de plante, lesquels entraîneraient la rupture des liaisons hydrogènes au sein de l'exopolysaccharide sécrété par les cellules *E. coli* entéropathogène comme matrice protectrice. Bakkali *et al.* (2008) ont indiqué que chez les bactéries, la perméabilisation des membranes par ces composés est associée à une perte d'ions et une dégradation du potentiel ATP, les molécules aromatiques possédant l'activité antibactérienne la plus élevée étant les phénols.

Les polyphénols présents dans l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* constitueraient des facteurs de stress et privent probablement les bactéries de leur glycocalyx protecteur, provoquant ainsi une désorganisation du biofilm et le délogement des bactéries de la surface des lames de polyéthylène. Toutefois, les taux de cellules détachées restent inférieurs à 15%. Ce faible taux serait lié à l'exopolymère recouvrant les bactéries qui crée un gradient de concentration de sorte que la perméabilisation de la couche protectrice ne soit pas totale. Ainsi, seules les cellules bactériennes d'une certaine distance au support sont atteintes et délogées. Aussi Trabulsky *et al.* (2002) ont remarqué que certaines bactéries portent au niveau de leur plasmide des gènes spécifiques, gènes qui codent pour les facteurs de virulence (les pilis de type IV, les adhésines, les toxines) et qui jouent un rôle important dans le processus d'adhésion cellulaire. Ils permettent l'interconnexion des bactéries en micro-colonies, favorisant leur stabilisation, ce qui peut entraîner une résistance à l'effet du détachement de l'extrait.

On constate également que la phase de croissance de la cellule bactérienne influence les pourcentages d'inhibition et de détachement cellulaire. En effet, le test H de Kruskal wallis a montré que l'effet du détachement des cellules varie d'une phase de croissance à l'autre. Ceci pourrait être dû au taux d'adhésion qui varie en fonction de la phase de croissance à laquelle est issue la cellule testée. Selon Nora (2003), la phase exponentielle se traduit par une forte activité cellulaire alors que la phase stationnaire présente un ralentissement de cette activité, entraînant des modifications chimiques à la surface de la cellule.

Le passage des souches de l'état adhérent à l'état planctonique expose davantage les cellules bactériennes à l'effet antibactérien des flavonoïdes et alcaloïdes contenus dans l'extrait de plante (Donadieu, 2008). Les alcaloïdes sont des cations hydrophobes aux propriétés antibactériennes et ayant pour cible l'ADN cellulaire (Amin *et al.*, 1969). Cet effet inhibiteur est modulé par le temps de contact cellule adhérente-extrait, les temps de contact longs agissant sur des cibles non atteintes par des temps de contact relativement courts ; ceci expliquerait en partie l'abondance des morts cellulaires enregistrées après 3h de contact des supports avec l'extrait. Les pourcentages d'inhibition d'*Escherichia coli* entéropathogène, pour l'ensemble des quatre phases de croissance cellulaire, varient entre 73,56 % et 99,49 %, la concentration d'*Eucalyptus microcorys* 2 % étant celle qui entraîne de fort taux d'inhibition cellulaire.

La présence des souches bactériennes toujours vivantes à l'état planctonique dans l'extrait pourrait s'expliquer par le phénomène de résistance comme le phénomène de résistance microbienne aux antibiotiques. En effet, Wright (2005) a indiqué que les bactéries peuvent synthétiser des enzymes capables de détruire ou de modifier des molécules antibactériennes, les réactions enzymatiques conduisant à cette destruction ou à cette modification, bien que variant avec la souche bactérienne, peuvent s'effectuer par hydrolyse, transfert de groupements chimiques. Le mécanisme de résistance observé dans la présente étude semble multifactoriel. En effet deux mécanismes sont généralement avancés pour expliquer la résistance des biofilms aux antibactériens. Elle peut être due soit à une limitation de la diffusion des agents antibactériens dans le biofilm par la matrice polysaccharidique qui enrobe les bactéries, soit à l'état physiologique particulier (faible taux de croissance) des bactéries du biofilm, conséquence de la limitation nutritionnelle que subissent les bactéries au sein du biofilm (Costerton *et al.*, 1987, Suci *et al.*, 1994). Pour Costerton *et al.* (1987), la matrice polyanionique hydratée qui enrobe les bactéries dans les biofilms, limite la diffusion des molécules du milieu environnant et plus particulièrement des molécules chargées.

III.2.7- Hiérarchisation des degrés d'implication des facteurs considérés sur l'adhésion et/ou détachement des cellules en présence d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*

Le test d'ANOVA à plusieurs facteurs révèle que les phases de croissance cellulaire et les concentrations d'extrait sont les premiers facteurs influençant le processus d'adhésion cellulaire à travers le détachement ou le maintien des cellules après séjour du fragment de polyéthylène dans la solution d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*. L'action des solutions désinfectantes sur les microorganismes pourrait dépendre d'un certain nombre de facteurs, dont certains sont intrinsèques à l'organisme et d'autres sont liés à l'environnement. La connaissance de ces facteurs devrait conduire à une meilleure réalisation de la désinfection et de la stérilisation. Dans notre étude, l'état physiologique de la cellule contrôle majoritairement l'adhésion cellulaire. Le détachement cellulaire du support solide après action de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* semble considérable pour les 3 premières heures d'adsorption, lorsque les cellules sont issues des phases de déclin, stationnaire et de latence. Une résistance des cellules adhérees à l'extrait de plante est observée au bout de 9 heures d'incubation lorsque les cellules sont issues de la phase exponentielle de croissance. La phase de latence correspond à l'adaptation de l'inoculum à son nouvel environnement alors que la phase de déclin est la période correspondant à l'épuisement de toutes les ressources nutritives. Il y a accumulation de métabolites toxiques (Corroler, 2006). Sous l'action des enzymes protéolytiques endogènes, la lyse cellulaire entraîne une diminution d'organismes viables (Delhalle *et al.*, 2012).

L'angle de contact du fragment de polyéthylène, suivi de la durée du test d'adhésion cellulaire, elle-même suivie de la durée de séjour des cellules adhérees dans la solution d'extrait et de l'hydrophobicité de surface de ces cellules sont les autres facteurs qui contrôlent le processus étudiés. Selon (Boulard, 2012), cette variation serait liée à la nature intrinsèque des surfaces, telles que les propriétés de la double-couche, le nombre et la nature des sites réactifs de surface. Le mode de liaison adsorbant à la surface et l'effet d'autres complexants qui peuvent provoquer soit la désorption ou améliorer l'adsorption, sont également des paramètres à considérer. De plus l'hydrophobicité de surface cellulaire varie avec les phases de croissance et les conditions expérimentales (Hamadi *et al.*, 2005). La mesure de l'angle de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface en fonction de sa mouillabilité. L'utilisation de l'eau en tant que liquide de pose de la goutte permet d'évaluer le caractère hydrophile/hydrophobe de la surface. Dans notre cas, l'angle de contact a varié de $83,1 \pm 0,6$ à $85,8 \pm 0,8^\circ$. La goutte d'eau a donc tendance à ne pas bien s'étaler sur le fragment de polyéthylène. Le polyéthylène utilisé dans le cadre de notre étude est moyennement hydrophobe et hydrophile ($30^\circ < \Theta < 90^\circ$). En effet, la surface du polyéthylène ne porte pas suffisamment de groupements fonctionnels ioniques ou polaires, ni de

sites adéquats pour la formation de liaisons hydrogène. Cette surface est inerte vis-à-vis de l'eau. Les molécules d'eau se trouvant à proximité de cette surface ont tendance à s'en éloigner pour s'entourer d'autres molécules d'eau (Guillemot, 2006). Une hydrophobicité de surface importante des microorganismes est souvent corrélée à une adhésion forte aux supports plastiques, par nature hydrophobes (Kuhn *et al.*, 2002). Les mêmes tendances sont observées lors de l'adhésion des cellules au polystyrène. Les microorganismes ayant une hydrophobicité de surface élevée, adhèrent plus fortement sur des supports hydrophobes (Gallardo-Moreno *et al.*, 2002).

Les résultats obtenus par la méthode MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbons) au cours de la présente étude ont montré que *E. coli* entéropathogène est plus hydrophobe lorsque les cellules proviennent de phases de croissance exponentielle et stationnaire. La valeur minimale du pourcentage d'hydrophobicité a été enregistré avec des cellules récoltées à partir de la phase avec des valeurs variaient de 47,12 à 50,92 % de la croissance de déclin.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La présente étude avait pour objectif d'évaluer l'inhibition de la cultivabilité des bactéries sanitaires planctoniques et / ou adhérentes par l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* en microcosme aquatique. La concentration de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys*, le temps de séjour des bactéries dans la solution d'extrait, la température des solutions, l'intensité lumineuse, l'état physique et l'état physiologique de la cellule, sont des facteurs qui ont été considérés dans diverses expérimentations conduites.

De façon générale, les résultats montrent que la présence de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys* réduit significativement la cultivabilité des bactéries planctoniques dans l'eau. Les vitesses d'inhibition des cellules planctoniques les plus élevées sont généralement enregistrées à la concentration d'extrait 2 %. Ces vitesses augmentent progressivement avec l'augmentation de l'intensité lumineuse et sont faibles en absence de lumière. Toutefois, une inactivation lente mais apparente des espèces bactériennes étudiées a été constatée au cours des expériences réalisées en l'absence de lumière. Le taux d'inhibition de la cultivabilité cellulaire augmente avec la température de l'incubation. A l'inverse, les faibles températures inhibent plutôt l'action bactéricide d'*Eucalyptus microcorys*. Le degré de l'activité antibactérienne varie relativement en fonction de l'espèce cellulaire présente et des conditions d'environnement.

Cet extrait agit sur les bactéries adhérentes au substrat en provoquant d'abord un relargage dans l'eau de ces bactéries, puis une baisse de leur cultivabilité, induisant une diminution de leurs abondances. Les phases de croissance cellulaire et les concentrations d'extrait sont les premiers facteurs influençant le processus d'adhésion cellulaire à travers le détachement ou le maintien des cellules après séjour du fragment de polyéthylène dans la solution d'extrait d'*Eucalyptus microcorys*.

Le criblage phytochimique de l'extrait aqueux d'*Eucalyptus microcorys* a révélé la présence de certains métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les anthraquinones, les flavonoïdes, les saponines, les anthocyanidines et tannins galliques. Les flavonoïdes, anthraquinones, alcaloïdes et les saponines sont relativement plus abondants que les autres constituants chimiques. Ces métabolites secondaires sont des composés bioactifs à activités antibactériennes.

L'utilisation des plantes médicinales en application à la désinfection de l'eau offre de nombreuses possibilités de recherche dans un monde où l'accès à l'eau potable reste une préoccupation permanente pour les pouvoirs publics. Les données obtenues de ce travail exploratoire permettent d'envisager l'utilisation des extraits d'*Eucalyptus microcorys* comme procédé alternatif dans la désinfection de l'eau. Cependant, les modalités pratiques d'application

devraient être précisées par des travaux complémentaires. Ces travaux futurs prendraient en compte entre autres :

- l'isolement et la purification des métabolites secondaires et des huiles essentielles d'*Eucalyptus microcorys* ;

- les tests d'activité antibactérienne en condition de microcosme aquatique avec chacun des constituants chimiques isolés ;

- l'activité de ces métabolites secondaires et des huiles essentielles purifiés sur la survie, l'enkystement et la réactivation des kystes des protozoaires pathogènes, ainsi que sur des levures et champignons qui contaminent souvent l'eau ;

- l'impact de ces constituants chimiques sur les propriétés abiotiques et les qualités organoleptiques de l'eau.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Aguilar-Galvez A., Dubois-Dauphin R., Destain J., Campos D. et Thonart P. (2012). Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 1 (16) : 67-76.
- Allahdin O., Gothard-Bassebe M., Biteman O., Foto E., Mabingui J. et Lutgen P. (2008). Essai de désinfection de l'eau de puits par *Artemisia annua* en République Centrafricaine. *Revue Technique Luxemboursoise*, 3.
- Allion A. (2004). **Environnement des bactéries et sensibilité aux biocides : mise au point d'une technique rapide pour déterminer in situ l'efficacité bactéricide d'agents antimicrobiens**. Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'ENSIA, France, 194 pages.
- Alma M., Nitz S., Kollmannsberger H., Digrak M., Efe T. et Yilmaz N. (2004). Chemical Composition and Antimicrobial activity of the essential oils from the gum of Turkish pistachio (*Pistacia vera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (12): 3911-3914.
- Amin A., Subbaiah T. et Abbasi K. (1969). Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action. *Canadian journal of Microbiology*, 15: 1067-1076.
- Amvam Zollo P., Biyiti L., Tchoumboungang F., Menut C., Lamaty G. et Bouchet PH. (1998). Aromatic plants of tropical Central Africa. Part XXXII chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of Cameroon. *Flavour and Fragrance Journal*, 13: 107-114.
- Armando C., Hussein Y. et Rahma. (2009). Evaluation of the yield and the antimicrobial activity of the essential oils from: *Eucalyptus globulus*, *Cymbopogon citratus* and *Rosmarinus officinalis* in Mbarara district (Uganda) Bch Rev. *Colombiana de ciencia Animal*, 1(2): 240-249.
- ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire alimentation, environnement, travail). (2015). **Analyse des risques sanitaires liés à la réutilisation d'eaux grises pour des usages domestiques**. France, Edition scientifique, Rapport, 144 pages.
- APHA (American Public Health Association). (1998). **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 364 pages.
- Atkinson N. (1996). Antibacterial activity in members of the native Australian flora. *Nature*, 158 : 876.
- Bachelier G. (1959). Etude pédologique des sols de Yaoundé; contribution à l'étude de la pédologie des sols ferrallitiques. *Agronomie Tropicale*, 14: 279-305.

- Bachir R. et Benali M. (2012). Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(9): 739-742.
- Bakkali F., Averbeck S., et Averbeck D. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.
- Balentine C., Crandall P., O Bryan C., Duong D. et Pohlman, F. (2006). The preand post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science*, 73 : 413-421.
- Banton O. et Bangoy L. (1997). **Hydrogéologie, multiscience environnementale des eaux souterraines**. Saint Foy ed. Québec, 720 pages.
- Barbara A., Jucker A., Zehnder J. et Hauke H. (1998). Quantification of polymer interaction in bacterial adhesion. *Environmental Sciences Technology*, 32: 2909-2915.
- Bellon-Fontaine M., Mozes N., Van der Mei H., Sjollema, J., Cerf O., Rouxhet P. et Busscher H. (1990). A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata. *Cell Biophysics*, 17: 93-106.
- Bellon-Fontaine M., Rault J. et Van Oss, C. (1996). Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron donor/electron acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 7: 47-53.
- Bellon-Fontaine M. et Cerf O. (1991). Mechanisms of microorganism adhesion to surfaces: factors influencing the adhesion. *Journal de l'industries Alimentaires et Agricoles*, 108 : 13-17.
- Beloin C., Roux A. et Ghigo JM. (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322: 249–289.
- Berche P. (2003). **Les bactéries des diarrhées aiguës**. Faculté de Médecine Necker-Enfants malades. In : **Bactériologie Systématique**. DCEM1, 31-47.
- Beresford M., Andrew W. et Shama G. (2001). *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. *Journal of Applied Microbiology*. 90 (6): 1000-1005.
- Biyiti L, Meko'o D, Tamze V. et Amvam Zollo P. (2004). Recherche de l'activité Antibactérienne de quatre plantes médicinales Camerounaise. *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine*, 13 : 11-20.
- Bosgiraud-AEMIP. (2003). **Microbiologie générale et santé**. Editions ESKA, 540 pages.

- Bouharb H., Khalid El., Atmani M., Taj A, et Said C. (2014). Étude ethnobotanique de la flore médicinale de la région Moulay Driss Zerhoun (Maroc central). *Ethnopharmacologia* : 88 pages.
- Boukef I., El Bour M., El Mejri S., Bjaoui B., Mraouna R., Harzallah A. et Boudabous A. (2008). Étude de l'influence des facteurs environnementaux sur la distribution de différentes populations bactériennes dans une station mytilicole de la lagune de Bizerte (Nord-Tunisie). *Revue des Sciences de l'Eau*, 21: 571-583.
- Boukef I., Elbour M., Belhassen M., Mraouna R., Mejri S., Bejaoui B., Harzallah A. et Boudabous A. (2010). Distribution spatiale des *vibrionaceae* dans les sediments lagunaires (la lagune de Bizerte – Nord Tunisie). *Revue de Microbiologie Industrielle, Sanitaire et Environnementale*, 4 (2): 83-94.
- Boulard. E (2012). **L'adhésion bactérienne sondée à l'échelle moléculaire**, Thèse de Doctorat, Université Paris Sud, 185 pages.
- Bourion F. (1995). **Etude de la formation et de la désinfection de biofilms mono- et bimicrobiens de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Listeria innocua***. Thèse de doctorat de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaire, Massy, France, 262 pages.
- Bousbia N. (2011). **Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires**. Thèse de Doctorat en Sciences de L'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique, 175 pages.
- Boutaleb N. (2007). **Etude de la formation des biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable**. Thèse de Doctorat, Université de Bretagne-Sud, 194 pages.
- Bouteleux C., Saby S., Tozza D., Cavard J., Lahoussine V., Hartemann P. et Mathieu L. (2005). *Escherichia coli* behavior in the presence of organic matter released by algae exposed to water treatment chemicals. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (2): 734-740.
- Braca A., Siciliano T., D'Arrigo M. et Germanò M. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. *Fitoterapia*, 79 (2): 123-125.
- Branger A., Richer M. et Roustel S. (2007). **Microchimie et alimentaire**, 2^{ème} éd., Paris, France, 337 pages.

- Bruneton J. (1999). **Pharmacognosie-phytochimie, Plantes médicinales**. Edition Technique et Documentation, 3^{ème} éd Lavoisier, Paris, 1120 pages.
- Bruneton, J. (2009). **Pharmacognosie – Phytochimie, Plantes médicinales**. Tec & Doc, Médicales internationales (Eds.), 4^{ème} éd, 1270 pages.
- Busscher H., Bos R. et Van der Mei H. (1995). Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbiology Letters*, 128: 229-234.
- Canon F. (2010). **Contribution de la spectrométrie de masse à l'étude des interactions entre les protéines salivaires riches en proline et les tanins**. Thèse de Doctorat, Centre International d'Etudes Supérieures en Sciences Agronomiques, 272 pages.
- Canosa A. et Pinilla G. (2001). Total bacteria population in three lentic water bodies of the Colombia and using épifluorescence technic. *Lakes and Reservoirs: Research and Management*, 6: 169-174.
- Castaneda Chavez M., Sedas V., Borunda E. et Reynoso F. (2005). Influence of water temperature and salinity on seasonal occurrences of *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster-producing areas of Veracruz, Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 50: 1641-1648.
- Cavalcante A., Martinez G., Mascio P., Merck C. et Agnez L. (2002). Cytotoxicity and mutagenesis induced by singlet oxygen in wild type and DNA repair deficient *Escherichia coli* strains. *Elsevier DNA Repair*, 1: 1051-1056.
- Cebron A. (2004). **Nitrification, bactéries nitrifiantes et emission de N₂O, la Siene en aval de Paris**. Thèse, Université Paris VI- Pierre et Marie Curie, 290 pages.
- Chaix G. (2002). **Etude des flux de gènes dans un verger à graines d'*Eucalyptus grandis* à Madagascar**. Thèse de doctorat de l'Ecole Doctorale de l'Université de Montpellier II : Biologie Intégrative, Montpellier, 274 pages.
- Chebil, L. (2006). **Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle**. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, 229 pages.
- Chen H., Fujita M., Feng Q., Clardy J. et Fink G. (2004). Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 101: 5048-5052.
- CHU-PS. (2003). **Bactériologie DCEM1**. Université Paris-VI Pierre et Marie Curie, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière. Service de Bactériologie, 122 pages.
- Clarke S. (2001). Diarrhoeagenic *Escherichia coli* - an emerging problem? *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 41: 93-98.

- CNR (Centre National de Référence). (2005). **CNR des *Escherichia coli* et *Shigella* : Les *Escherichia coli* pathogènes**. Portail Institut Pasteur, 3 pages.
- Coeyrehourcq K. (2003). **Etude de méthodes rapides d'analyse de la structure moléculaire du polyéthylène**. Thèse de Doctorat, Ecole des Mines de Paris, Spécialité Science et Génie des Matériaux, 227 pages.
- Corroler L. (2006). **Étude des facteurs non thermiques agissant sur la décroissance microbienne et modélisation**. Thèse de doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale (France), 207 pages.
- Costerton J., Cheng K., Geesey G., Ladd T., Nickel J., Dasgupta M. et Marrie T. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review Microbiology*, 41: 435-464.
- Costerton J., Lewandowski Z., Caldwell D., Korber D et Lappin-Scott H. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review Microbiology*, 49: 711-745.
- Cowan M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12 (4): 564-570.
- Croteau R., Kutchan T. et Lewis N. (2000). Natural products (secondary metabolites). In : Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (Eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists*, 1250-1268.
- Cunin R. (1993). **Génétique bactérienne**. ed. Vigot., Paris, 206 pages.
- Curtis T. et Mara D. (1994). The effect of sunlight on mechanisms for the die-off of faecal coliform bacteria in waste stabilization ponds. *Research Monographs in Tropical Public Health Engineering*, 1: 94.
- Daglia M. (2011). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23: 1-8.
- Daroui-Mokaddem. (2012). **Etude phytochimique et biologique des espèces *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), *Smyrniololus* (Apiaceae), *Asteriscus maritimus* et *Chrysanthemum trifurcatum* (Asteraceae)**. Thèse Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat, 198 pages.
- Davenport W. (2006). Plant poisoning, alkaloids, isoquinoline and quinolone. *Emedecine specialties*, 1-10.
- Davey K. (1989). A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase. *Journal of Applied Bacteriology*, 67: 483-488.

- Davidson J. (1995). Ecological aspect of *Eucalyptus* plantations. In the proceedings of the regional expert consultation on eucalyptus 4-8 october 1993. *FAO Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok. FAO RAPA*, 1 (6): 35-72.
- Davies D., Chakrabarty A. et Geesy G. (1993). Exopolysaccharide production in biofilms: Substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 1181-1186.
- Davies-Colley R., Donnison A., Speed D., Ross C. et Nagels, J. (1999). Inactivation of faecal indicator micro-organisms in waste stabilization ponds: interactions of environmental factors with sunlight. *Water Research*, 33 (5): 1220-1230.
- De Beers D., Srinivasan R. et Stewart P. (1994). Direct measurement of chlorine Penetration into biofilms during disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 : 4339-4344.
- De Billerbeck, V., Roques C., Vanière P. et Marquier P. (2002). Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiènes*, X (3) : 248-251.
- Delhalle L., Daube G., Adolphe Y., Crevecoeur S. et Clinquart A. (2012). Les modèles de croissance en microbiologie prévisionnelle pour la maitrise de la sécurité des aliments (synthèse bibliographique). *Biotechnology and Agronomic Society Environment*, 16 (3), 369-381.
- De Souza, C., Koumaglo, K. et Gbeassor, M . (1995). Evaluation des propriétés antimicrobiennes des extraits aqueux totaux de quelques plantes médicinales. *Pharm. Méd. Trad. Afr*, 103-112.
- Dewolf M. (1986). Boiling Drinking Water: A critical look. *Waterlines*, 5 (1) : 4.
- Djoukeng J. (2005). **Etude phytochimique et activités biologiques de quatre espèces Camerounaises de la famille des Myrtaceae: *Eucalyptus saligna* Sm., *Callistemon viminalis* W., *Syzygium guineense* W. et *Syzygium aromaticum* M. et P.** Thèse présentée à la faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel pour l'obtention du titre de Docteur ès Sciences, 218 pages.
- Doggett M. (2000). Characterization of fungal biofilms within a municipal water distribution system. *Applied Environmental Microbiology*, 66: 1249-1251.
- Donadieu Y. (2008). **La Propolis**. Editions Dangles, Paris, 90 pages.
- Donlan R. et Costerton J. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Revue*, 15: 167-193.

- Downes A. et Blunt T. (1877). Researches on the effect of light upon bacteria and other organisms. *Proceeding of the Royal Society of London*, 26: 488-500.
- Drenkard E. (2003). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Microbes and Infection*, 5: 1213-1219.
- Dukam S., Pirion P. et Levi Y. (1995). **Modélisation du développement des biomasses bactériennes libres et fixées en réseau de distribution d'eau potable.** In : **Adhesion des microorganismes aux surfaces.** Bellon-Fontaine, M.N & Fourniat, J. (éds), Paris, 149-160.
- Dunne W. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Revue*, 15: 155-66.
- Edberg S.C., Rice E.W., Karlin R.J. et Allen M.J. (2000). *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*, 88 (SUP): 106S-116S.
- Eilers H., Pernthaler J., Glockner F. et Amann R. (2000). Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3044-3051.
- Elaïssi A., Salah K., Mabrouk S., Larbi K., Chemli R. et Harzallah-Skhiri F. (2011). Antibacterial activity and chemical composition of 20 *Eucalyptus* species' essential oils. *Food Chemistry*, 129 (4): 1427-1434.
- Elqaj M., Ahami A. et Belghyti D. (2007). **La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires.** Journée scientifique "ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.
- Eno-Belinga S. (1982). Géologie dynamique du paysage de fer de la ville de Yaoundé – Secteur Nord. *Annales de la Faculté des Sciences, Nouvelles séries, Science de la Terre*, 4: 51-66.
- Enriki F. (2003). Quelques méthodes classiques d'évaluation des biomasses fixes sur les parois des matériaux en contact avec l'eau potable. *Journal Européen d'Hydrologie*. 34 : 69-81.
- Estanislau A., Barros S., Pena A., Santos S., Ferri H. et Paula J. (2001). Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 11 : 95-100.
- Farah A., Satrani B., Fechtal M., Chaouch A. et Talbim. (2001). Composition chimique des huiles essentielles extraites des feuilles d'*Eucalyptus camaldulensis* et activités antibacterienne et antifongique (clone 583). *Acta Botanica Gallica*, 148-311.

- Farnsworth R. (1986). Review on biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55 (3): 225-276.
- Farris S., Introzzi L., Biagioni P., Holz T., Schiraldi A. et Piergiovanni, L. (2011). Wetting of biopolymer coatings: contact angle kinetics and image analysis investigation. *Langmuir*, 27(12): 7563-74.
- Ferreira A., Neiva J., Rodriguez N., Lopes F. et Lobo R. (2010). Intake and digestibility of elephant grass silages with the different levels of acerola industry by-product. *Revista Ciência Agronômica*, 41 (4): 693-701.
- Fletcher E., Weissman B., Efron N., Fleiszig S., Curcio A. et Brennan N. (1993). The role of pili in the attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to unworn hydrogel contact lenses. *Current Eye Research*, 12: 1067-1071.
- Ford L.A. (1994). Detection of *Aeromonas salmonicida* from water using a filtration method. *Aquaculture*, 7: 9-12
- Foudil-Cherif Y., Meklati B., Verzera A., Mondello L. et Dugo G. (2000). Chemical examination of essential oils from the leaves of nine *Eucalyptus* species growing in Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 12: 186-191.
- Franco J., Nakashima T., Franco L et Boller C. (2005). Chemical composition and antimicrobial *in vitro* activity of the essential oil of *Eucalyptus cinerea* F. Mull. ex Benth., Myrtaceae, extracted in different time intervals. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15 (3): 191-194.
- Fufezan C., Gross C.M., Sjodin M., Rutherford W., Krieger L. et Kirilovsky D. (2007). Influence of the potential of the primary quinone electron acceptor on photoinhibition in photosystem II. *Journal of Biology and Chemistry*, 282: 12492-12502.
- Fujioka T., Yoshida K., Fujii H., Nagao T., Okabe H. et Mihashi, K. (2003). Antiproliferative constituents from Umbelliferae plants VI. New ursane-type saikosaponin analogs from the fruits of *Bupleurum rotundifolium*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 51: 365-372
- Gallardo-Moreno A., Gonzalez-Martin M., Pérez-Giraldo C., Garduno E., Bruque J., et Gomez-Garcia A. (2002). Thermodynamic Analysis of Growth Temperature Dependence in the Adhesion of *Candida parapsilosis* to Polystyrene. *Applied and Environmental microbiology*, 68: 2610-2613.
- Gamage J. et Zhang Z. (2010). Application of photocatalytic disinfection, *International Journal of Photoenergy*, 1-11.

- Gangoué Piéboji. (2007). **Caractérisation des bêta-lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales**. Thèse de doctorat, Liège, 127 Pages.
- Garcia-Ripoll A., Amat A., Arques A., Vicente R., Ballesteros Martin M., Sanchez Perez J., Oller I. et Malato S. (2009). Confirming *Pseudomonas putida* as a reliable bioassay for demonstrating biocompatibility enhancement by solar photo-oxidative processes of a biorecalcitrant effluent. *Journal of Hazardous Materials*, 162: 1223-1227.
- Gauthier F. (2002). **Biofilms et qualité biologique de l'eau potable au cours de sa distribution**. Mémoire de DESS Qualité et Gestion de l'Eau, Université de Picardie – Amiens, 78 pages.
- Ghalem B. et Mohamed B. (2008). Antibacterial activity of leaf essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2 (10): 211-215.
- Germani Y. et Le Bouguéneq C. (2008). Diagnostic des *Escherichia coli* agents de diarrhée chez l'homme. *Revue francophone des laboratoires*, 38 (400): 67-76.
- George I., Petit M. et Servais P. (2000). Use of enzymatic methods for rapid enumeration of coliforms in freshwaters. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 404-413.
- Gilles J., Zhao M. et Agboola S. (2010). Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chemistry*, 119: 731-737.
- Graham J. et Sieburt J. (1973). Survival of *Salmonella typhimurium* in artificial and coastal seawater. *Rev. Inter. Oceanogr. Med*, 29 : 5-298.
- GSE (Groupe Scientifique de l'Eau). (2002). **Entérocoques et Streptocoques fécaux: dans fiches synthèses sur l'eau potable et la santé humaine**, Institut National de Santé Publique du Québec, 5 pages.
- GSE (Groupe Scientifique sur l'eau). (2003). ***Escherichia coli*, dans fiches synthèses sur l'eau potable et la santé humaine**, Institut national de santé publique du Québec, 4 pages.
- Guillemot G. (2006). **Compréhension des mécanismes à l'origine de l'adhésion de *Saccharomyces cerevisiae* sur acier inoxydable Implications pour l'hygiène des surfaces en industrie agroalimentaire**. Thèse de doctorat de l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, France, 324 pages.
- Haddouchi F., Lazouni H.A., Meziane A. et Benmansour A. (2009). Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. *Afrique Science*, 5 (2): 246-259.

- Hamadi F., Latrache H., El Ghmari A., Zahir H., Mabrouki M. et Elbouadili A. (2005). Determination of *Escherichia coli* negative charge concentration from XPS data and its variation with pH. *Journal of Surface Analysis*, 12 (3):293-302.
- Hasley C. & Leclerc H. (1993). **Microbiologie des eaux d'alimentation**, Technique et document-Lavoisier, Londres-Paris-New York, 494 pages.
- Hodek P., Trefil P. et Stiborova, M. (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*, 139: 1- 21.
- Holt J., Krieg N., Sneath P., Staley J. et William S. (2000). **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed., Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, 787 pages.
- Howard G. (2004). **Villages santé: Guide des communautés et des agents de santé communautaires**. O.M.S., Genève, 33 pages.
- Hubert P. (1998). **Une introduction à la gestion de l'eau**. 2^{ème} Edition, HGA, București, Romania, ISBN 973-98077-6-3. 220 pages
- Humbel F. et Pellier J. (1969). Porosité, densité et perméabilité des sols ferrallitiques rouges et jaunes près de Yaoundé. ORSTOM, série sol, Yaoundé. 50 pages
- Isela G., Sonia G., Arnaldo M. et Norman A. (1977). Quinones and hydroquinones as generators and quenchers of singlet molecular oxygen. *Canadian Journal of Chemistry*. 75(4): 428-432.
- Jain A., Nishad K., and Bhosle B. (2007). Effects of DNP on the cell surface properties of marine bacteria and its implication for adhesion to surfaces. *Biofouling* 23: 171-177.
- Jeffrey W. et Mitchell D. (1997). Mechanisms of UV-induced DNA damage and response in marine microorganisms. *Photochemistry and Photobiology*, 65 (2): 261-263.
- Kanga B. (2014). **Contribution à la valorisation du jardin zoo-botanique de Mvog-Betsi de Yaounde Cameroun: cas des infrastructures et la communication**. Rapport de stage présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Spécialiste de la Faune, 47 pages.
- Karou D., Dicko M., Simporé J., Yameogo S., Sanon S. et Traoré A. (2005). **Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso**. Maîtrise des procédés en vue d'améliorer la qualité des aliments, utilisation des OGM, analyse des risques en agroalimentaire. 8-11 novembre. Ouagadougou.

- Kengne Fodouop. (1993). **La surutilisation de l'espace intra et péri-urbain au Cameroun : cas des villes de Douala et Yaoundé.** Communication présentée au 2^e congrès des Géographes Africains, colloques de Rabat et d'Agadir.
- Koji E., Lontsi Djimeli C., Tamsa Arfao A., Noah Ewoti, V., Tchakonté S., Bricheux G., Nola M. et Sime-Ngando T. (2015). Abundance Dynamic of *Vibrio* Cells Associated with Freshwater Shrimps Atyidae (Crustacea-Decapoda) in the Coastal Surface Waters of Cameroon (Central Africa): Assessment of the Role of some Environmental Factors. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(9): 11-21.
- Kuda T., Iwai A. et Yano T. (2004). Effect of red pepper *Capsicum annum* var. confides and garlic *Allium sativum* on plasma lipid levels and cecal microflora in mice fed beef tallow. *Food Chemistry Toxicology*, 42. 1695-1700
- Kueté M. (1977). **Etude géomorphologique du massif de Yaoundé.** Thèse de Doctorat de 3^{ème} cycle, Université de Bordeaux 3, 279 pages.
- Kuhn D., Chandra J., Mukherjee P et Ghannoum M. (2002). Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic Surfaces. *Infection and Immunity*, 70: 878-888.
- Kurita N., myaji M., kurane R., Takahara Y. et Ichimara K. (1979). Antifungal activity and molecular orbital energies of aldehyde compounds rom oils of higher plants. *Agricultural and Biological Chemistry*. 43: 2365-2371
- Larpent J. et Larpent-Gourgaud M. (1985). **Manuel pratique de microbiologie.** Hermann (éd), Paris, 223 pages.
- Latrache H. (1993). **Les propriétés de la surface d'*Escherichia coli* uropathogènes et leur variation après culture en presence de concentration subinhibitrice de nitroxoline.** Thèse de l'Université Paris Sud.
- Lawler I., Stapley J., Foley W. et Eschler B. (1999). Ecological example of conditioned flavor aversion in plant-herbivore interactions: effect of terpenes of Eucalyptus leaves on feeding by Common Ringtail and Brushtail Possums. *Journal of Chemical Ecology*, 25 : 401-415.
- Leclerc H. (2003). Y a-t-il des infections bactériennes opportunistes transmissibles par les eaux d'alimentation ? *Journal Européen d'Hydrologie*, 34(1) :11-44.
- Le Minor L. et Véron M. (1989). Bactériologie Médicale. Flammarion ed., Paris. 1107 pages.

- Lee J., Takeda S., Livolsi P. et Paoletti L. (1993). Effets of in vitro and in vivo growth conditions on expression of type 8 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus*. ***Infection and Immunity***, 61: 1853-1858.
- Lessard E. et Siebuth J. (1983). Survival of natural sewage populations of enteric bacteria in diffusion and bath chambers in the marine environment. ***Applied and Environmental Microbiology***, 45: 950-959.
- Lester M., Merkt R., Heil C. A., Vargo G. A., Neely M. B., Spence D.N., Melahn L. et Walsh J. (2001). Harmful Algal Blooms. ***Applied and Environmental Microbiology***, 161-164.
- Lethola M., Miettinen I., Keinänen M., Kekki T., Laine., Hirvonen A., Vartiainen T. et Martikainen P. (2004). Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes. ***Water Resource***, 38: 3769-3779.
- Lethola M., Miettinen I., Lampola T., Hirvonen A., Vartiainen T., Martikainen P. (2005). Pipeline materials modify the effectiveness of disinfectants in drinking water distribution systems. ***Water Resource***, 39: 1962–1971.
- Levine M. (1987). *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohaemorrhagic, and enteroadherent. ***Journal of Infectious Disease***, 155: 377-389.
- Lindstrom E. (2000). Bacterioplankton community. Composition in five lakes differing in trophic status and humic content. ***Microbial Ecology***, 40 : 104-113.
- Little B., Wagner P., Maki J.,Walch M. et Mitchell R. (1986). Factors influencing the adhesion of microorganisms to surfaces. ***The Journal of Adhesion***, 20: 187-210.
- Loguercio A., Battistin A., Agueda Castagna de Vargas A., Andréia Henzel A. et Niura M. (2005). Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). ***Ciência Rural***, 35 : 371-376.
- Lontsi Djimeli C., Tamsa Arfao A., Rossi V., Nsulem N., Raspal V., Bricheux G., Nola M. et Sime-Ngando T. (2016). Impact of two disinfectants on detachment of *Enterococcus faecalis* from polythene in aquatic microcosm. ***Research in Biotechnology***, 7: 28-42.
- Lutgen P. et Michels B. (2008). Bactericidal properties of *Artemisia annua* tea and dosimetry of artemisinin in water by fluorescence under UV light. Proceedings of the International Conference “Maladies tropicales, aspects humanitaires et économiques”, Luxembourg, June 3-4.

- Macheix J., Fleuriet A. et Jay–Allemand C. (2005). **Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique**. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes, 4-5.
- Madigan M. et Martinko J. (2007). **Biologie des micro-organismes**. Onzième édition: Université Carbondale de l'Illinois du Sud. Pearson Education, 1047 pages.
- Madigan M., J. Martinko, and J. Parker. (2000). **Biology of microorganisms**. ninth edition ed.: Prentice hall Inc.
- Maiga Y. (2010). **Processus d'élimination d'*Escherichia coli* et des Entérocoques des bassins de Lagunage sous Climat Sahélien: Influence de la radiation solaire**. Thèse de Doctorat, Unité de Formation et de Recherche Science de la Vie et de la Terre (UFR-SVT), Université de Ouagadougou, 153 pages.
- Manges A.R., Johnson J.R., Foxman B., O'Bryan T., Fullerton K. et Riley L. (2001). Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *New England Journal of Medicine*, 345: 1007-1013.
- Mao Y., Doyle M. et Chen J. (2001). Insertion mutagenesis of wca reduces acid and heat tolerance of enterohemorrhagic. *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Bacteriology*, 183: 3811-3815.
- Marchal N., Bourdon J. et Richard D. (1991). **Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification des bactéries**. Dion. 3^{ème} (éd), Paris, 505 pages.
- Marsh K., Foley W., Cowling A. et Wallis I. (2003). Differential susceptibility to *Eucalyptus* secondary compounds explains feeding by the common ringtail (*Pseudocheirus peregrinus*) and common brushtail possum (*Trichosorus vulpecula*) *Journal of Comparative Physiology B*, 173: 69-78.
- Mason T. et Wasserman B. (1987). Inactivation of red beet beta-glucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry*, 26 : 2197-2202.
- Masscheleir-Kleiner et Heylen J. (1968). Analyse des laques Rouges anciennes, *Studies in Conservation*, 13 : 87-89.
- Mauguin G., Delion N. et Corsin P. (2004). La température de l'eau, un paramètre important pour la production d'eau destinée à la consommation humaine. *L'eau, l'Industrie, les Nuisances*, 27: 23-29.
- McDonnell G. et Russell D. (1999). Antiseptics and Disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (1): 147-179.

- Mc Feters G. et Stuart D. (1972). Survival of coliform bacteria in naturel waters : field and laboratory studies with membrane-firter chambers. *Applied Microbiology*, 24 : 805-811.
- McGuigan K.G., Joyce T.M., Conroy R.M., Gillespie J.B. et Elmore-Meegan M. (1998). Solar disinfection of drinking water contained in transparent plastic bottles: characterizing the bacterial inactivation process. *Journal of Applied microbiology*, 84 (06):1138-1148.
- Meierhofer R. et Landolt G. (2008). Factors supporting the susbstained use of solar water dinsfection- Experiences from a global promotion and dissemination programme. *Water and Sanitation in Development and Disaster Relief*, 164-170.
- Meierhofer R. et Wegelin M. (2002). Solar Water Disinfection: A guide for the application of Sodis (cited 2007 June 18).
- Mela C. (1950). Presence of substances having antibiotic action in the higher plants. *Fitoterapia*, 21: 98-99.
- Meyer A., Deiana J. et Leclerc H. (1994). **Cours de microbiologie générale**. Nouvelle édition. Dion (éd), Paris, 365 pages.
- Milane H. (2004). **La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques**. Thèse de Doctorat. Strasbourg, 268 pages.
- Mitchell D. (1997). Ultraviolet radiation damage to DNA. In *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference* (Edited by R. A. Meyers) VCH Publishers, New York, 939-943.
- Mobili O., Lontsi D., Tamsa Arfao A., Nougang M., Allahdin O., Noah O., Mabingui J., Bricheux G., Simé-Ngando T. et Nola M. (2015). Synergistic effect of light, pH and *Artemisia annua* extract on *Enterococcus faecalis* in aquatic microcosms. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 3: 62-72.
- Modaressi H. et Garnier G. (2002). Mechanism of wetting and absorption of water droplets on sized paper: effects of chemical and physical heterogeneity. *Langmuir*, 18: 642-649.
- Moellering R. (1992). Emergence of Enterococcus as a significant pathogen. *Clinical Infectious Diseases*, 14(6): 1173-1176.
- Mohmmedi Z. (2013). **Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie : Substances naturelles, Activités Biologiques et Synthèses**, Thèse de Doctorat en Biologie, Université Abou Bekr Belkaid, Algérie, 170 pages.

- Moleyar V, Narasimham P. (1986). Antifungal activity of some essential oil components. *Food Microbiology*, 3: 331-336.
- Moore B., Wallis I., Pala-paul J., Brophy J., Willis R., Foley W. (2004). Antiherbivore chemistry of *Eucalyptus*, cues and deterrents for marsupial folivores. *Journal of Chemical Ecology*, 30: 1743-1769.
- Moore B., Foley W., Wallis I., Cowling A. et Handasyde K. (2005). *Eucalyptus* foliar chemistry explains selective feeding by koalas. *Biology Letters*, 1(1): 64-67.
- Moudallal S. (1997). **Les ressources hydrauliques au Liban**. 1re éd., Beyrouth, Liban, 62 pages.
- Mounang L., Nola M., Nougang M., Noah Ewoti O., Chihib N., Krier F. et Servais P. (2013). Abundance of heterotrophic aerobic bacteria (HAB) adsorbed on Granite, Basalt and Migmatite rock fragments immersed in wells in Central Africa: Temporal variation and assessment of the hierarchical influence of some abiotic factors, *International Journal of Research in BioSciences*, 2 (2): 13-25.
- Müller F. (1860). *Fragmenta Phytographie Australiae*, 2(12): 50
- Nestor J., Lutgen P et Schosser P. (2006). Mise en œuvre de la méthode de stérilisation de l'eau SODIS en Colombie. *Revue Technique Luxembourgeoise*, 3: 151-152.
- Ngo S., MC kinnon R. et Stupans I. (2003). The effects of *Eucalyptus* terpenes on hepatic cytochrome P450 CYP4, peroxisomal Acyl CoA oxidase (AOX) and peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 136 : 165-173.
- N'Guessan K., Kouassi E. et Zirihi N. (2006). Etude botanique et Tri phytochimique de *Pertersianthus macrocarpus* (P.beauv.) Liben (Barringtoniaceae), dans la lutte contre le choléra. *Pharma.Méd.Trad. Afri*, 14 : 97-116.
- Nicolas JP. (2012). **Plantes médicinales du Nord de Madagascar Ethnobotanique antakarana et informations scientifiques**. Editions Jardins du monde, 150 pages.
- Noah Ewoti O.V., Nola M., Mounang L.M., Nougang M.E., Francois K. et Nour-Eddine C. (2011). Adhesion of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* on Rock surface in aquatic Microcosm: Assessment of the influence of Dissolved Magnesium Sulfate and Monosodium Phosphate. *Research Journal of Environment and Earth Science*, 3(4): 364-374.
- Noah Ewoti O.V. (2012). **Retention des bactéries dans le sol et sur les fragments de roche en milieu aquatique : Influence du type de cellules et de quelques paramètres**

chimiques de l'environnement. Thèse de Doctorat/PhD, Faculté des Sciences. Université de Yaoundé I, 143pages.

- Nola M., Njiné T., Monkiédje A., Sikati F., Djuikom E. et Talliez R. (1998). Qualité bactériologique des eaux souterraines de Yaoundé (Cameroun). *Cahier Santé*, 8 : 330-336.
- Nola M., Simo M., Mobili O., Nougang M., Krier F., Chihib N., Hornez J. et Njine T (2010a). Photoinactivation of *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus* in the model aquatic microcosm: effect of light intensity and dissolved biodegradable organic compound. *Water Science and Technology*, 62(8): 1775-1783.
- Nola M., Nlep R., Servais P., Kemka N., Zebaze Togouet S., Krier F., Chihib N-E., Hornez J-P et Njine T. (2010b). Assessment of the effects of sulfate and nitrate on the temporal evolution of *Klebsiella oxytoca* and *Staphylococcus aureus* abundance under shaking conditions, in aquatic microcosm. *Revue des Sciences de l'Eau*, 23 : 197-212.
- Nora H. (2003). **Interactions des bactéries marines responsables de la formation des biofilms avec les matériaux biospécifiques.** Thèse Institut Galilée-Université Paris, XIII, 235 pages.
- Nougang M.E., Nola M., Djuikom E., Noah Ewoti O.V., Mougang L.M. et Ateba Bessa H. (2011). Abundance of faecal coliforms and pathogenic *E. coli* strains in groundwater in the coastal zone of Cameroon (central Africa), and relationships with some abiotic parameters. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 3(6): 622-632.
- Odebiyi O et Sofowora E. (1978). "Phytochemical screening Nigeria medicinal plants," *Loydia*, 41: 234-235.
- OMS. (2004). **Guidelines for drinking water quality.** OMS Recommandations éd, Geneva, 233 pages.
- OMS. (2009). **Statistiques Sanitaires Mondiales**, Rapport, 149 pages.
- OMS. (2014). **Statistiques Sanitaires Mondiales**, Rapport, 182 pages.
- Orgogozo L., Golfier F. et Buès M. (2010). Modèles de transport d'espèces chimiques en solution dans des conduites colonisées par un biofilm : perspective d'applications en système d'eau potable. *European Journal of Water Quality*, 41(2) : 77
- Oyedeji A., Ekundayo O., Olawore O., Adenivi B. et Koenig W. (1999). Antimicrobial activity of the essential oils of five *Eucalyptus* species growing in Nigeria. *Fitoterapia*, 70 (5): 526-528.
- Pamplona-Roger G. (1999). Encyclopedia of Medicinal Plants, 1 and 2, (2nd Edn), *Education and Health Library, the European Union, U.K*, 128-150.

- Parekh J., et Chanda S. (2007). In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plant. *Turkish Journal of Biology*, 31: 53-58.
- Park J. D., Rhee D. K. et Lee Y. H. (2005). Biological activities and chemistry of saponins from Panax ginseng C. A. Meyer. *Phytochemistry Reviews*, 4: 1579-1584.
- Pass G., MClean S. et Stupans I. (1999). Induction of xenobiotic metabolising enzymes in the common brushtail possum, *Trichosurus vulpecula*, by *Eucalyptus* terpenes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 124: 239-246.
- Payment P., Waite M. et Dufour A. (2003). **Introducing parameters for the assessment of drinking water quality.** In **Assessing microbial safety of drinking water.** OECD ed, Geneva, 452 pages.
- Pelletier J-L. (1969). **Données générales sur la répartition des principaux types de sol de la région de Yaoundé.** Document ORSTOM, série sol.
- Pilet E., Bourdon J., Marchal et Ballastido N. (1983). **Systématique bactérienne Bactériologie Médicale et Vétérinaire.** Dion. 2^{ème} (éd), Paris, 1384 pages.
- Pouneh K. (2009). **Formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* : évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing.** Thèse de Doctorat. Université Paul Sabatier, Toulouse III, 328 pages.
- Probert HM. et Gibson GR. (2002). Bacterial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 3:23–27.
- Pryor L. et Johnson L. (1971). A classification of the *Eucalyptus*, Austrelian National University Press, Canberra.
- Rai M., Acharya D. et Wadegaonekar P. (2003). Plant derived-antimycotics : Potential of Asteraceous plants, In: Plant-derived antimycotics: *Current Trends and Future prospects*, *Haworth press, N-York, Londin, Oxford*, 165-185.
- Rakotonirainy M. et Lavédrine B. (2005). Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 55 (2): 141-147.
- Raven P., Evert R. et Eichhorn S. (2007). **Biologia vegetal.** 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 728 pages.
- Regnault J. (2002). **Eléments de microbiologie et d'immunologie.** Editions Décarie, 601 pages.
- Reynolds T. et Fink G. (2001). Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science*, 291: 878-881.

- Rizk A. (1982). Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterapia*, 52 (2): 35- 42.
- Rodier J. (1996). **L'analyse de l'eau**. DUNOD. 8^{ème} éd, Paris, 1384 pages.
- Rompré A., Servais P., Baudart J., De-Roubin M. et Laurent P. (2002). Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal Microbiology Methods*, 49: 31-54.
- Rosenberg M., Gutnick D., et Rosenberg E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 9: 29-33.
- Rubio C. (2002). **Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention**. Thèse de Doctorat PhD, Université Paris 6, 276 pages.
- Russell A. D. et Chopra I. (1996). **Understanding Antibacterial Action and Resistance**, 2nd edn. Ellis Horwood, Chichester, UK.
- Russell H. et Ayliffe's. (2004). **Principles and practice of disinfection preservation & sterilization**. Blackwell, 4^{ème} éd.
- Rutala W., Barbee S., Aguiar N., Sobsey M.D. et Weber D. (2000). Antimicrobial activity of home disinfectants and natural products against potential human pathogens. *Infection Control in Hospital Epidemiology*, 21: 33-38.
- Sabbahi S., Alouini Z. et Jemli M. (2000). Etude de la désinfection Photodynamique des eaux usées par le Rose de Bengale sel dissodique RB-2Na. *Proceedings International conference on waste water treatment and Reuse Adapted to Mediterranean Area*, 137-140.
- Scalbert A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemical*, 30: 3875-3883.
- Samranki M., Roques C. et Michel G. (1997). Influence of trophic conditions on exopolysaccharide production: bacterial biofilm susceptibility to chlorine and monochloramine. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 751-758.
- Santos S. et Mello J. (2003). Taninos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Orgs). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 615-683.
- Sartorelli P, Marquioreto A., Amaral-Baroli A., Lima M. et Moreno P. (2006). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. *Phytotherapy Research*, 21(3): 231-233.
- Schuch L., Wiest J., Coimbra H., Prestes L., Toni L. et Lemos J. (2008). Cinética da atividade antibacteriana in vitro de extratos naturais frente a microorganismos relacionados a mastite bovina. *Ciencia Animal Brasileira*, 9 (1): 161-169.

- Sighomnou D., 2004. **Analyse et redéfinition des régimes climatiques et hydrologiques du Cameroun: perspectives d'évolution des ressources en eau.** Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Yaoundé I, Cameroun, 289 pages.
- Simoni S., H Harms., Bosma T. et Zehnder A. (1998). Population heterogeneity affects transport of bacteria through sand columns at low rates. *Environmental Science & Technology*, 32: 2100-2105.
- Sinton L., Hall C., Lynch P. et Davies-Colley R. (2002). Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1122–1131.
- Sivropoulou A., Nikolaou C., Papanikolaou E., Kokkini S., Lanaras T. et Arsenakis M. (1997). Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 3197-3201.
- Smallfield B. (2001). Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crops & Food Research*, 45: 1- 4.
- Stanier R., Ingraham L., Wheelis, M. et Painter P. (1990). **General Microbiology.** MacMillan, London.
- Stanley N., Britton R., Grossman A. et Lazazzera B. (2003). Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. *Journal of Bacteriology*, 185: 1951-1957.
- Stanley P. (1983). Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Canadian Journal of Microbiology*, 29: 1493-1499.
- Stern P. (1998). Rain-Water harvesting. *Community Water Development*, 3: 28-34.
- Stevens M., Daniel R., Illing N. et Errington J. (1992). Characterization of a sporulation gene, spoIVA, involved in spore coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 174 (2): 586-594.
- Stockigt J., Sheludko Y., Unger M., Gerasimenko I., Warzecha H. et Stöckigt D. (2002). High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic–electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Review Journal of Chromatography*, 967: 85-113.
- Storz G., Tartaglia L. et Ames B. (1990). OxyR, a transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science*, 248:189-194.
- Stupans I., Jones B. et MCKinnon R. (2001). Xenobiotic metabolism in Australian marsupials. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 128 (3): 367-376.

- Suchel B. (1972). **La répartition des pluies et les régimes pluviométriques au Cameroun.** Travaux et document de géographie tropicale (C.E.G.CNRS), 5: 1-288.
- Suci P., Mittelman M., Yu F. et Geesey G. (1994). Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 38: 2125-2133.
- Sunda M., Rosillon F et Taba K. (2008). Contribution à l'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec des extraits de plantes. *European Journal of Water quality*, (39) 2 : 199-209.
- Sunda M. (2012). **Contribution à la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec des extraits de plantes.** Thèse de Doctorat, Université de Liège, Belgique, 160 pages.
- Sutherland I. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147: 3-9.
- Taba K. et Luwenga E. (1999). L'effet de la photosensibilisation des extraits de plantes dans la désinfection de l'eau, Med. Fac., Landbouww, Univ. Gent, 64/1.
- Takahashi T, Kokubo R et Sakaino M. (2004). Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculate*. *Letters in Applied Microbiology*, 39 (1): 60-64.
- Takeo Y., Oie S., Kamiya A., Konishi H. et Nakazawa T. (1994). Efficacy of disinfectants against biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbios*, 79: 19-26.
- Tang N. (2002). **Characterization of *Campylobacter Jejuni* growth survival and Biofilm formation using conventional and molecular methods.** Thesis of University of Guelph, 174 pages.
- Thompson J., Randa M., Marcelino L., Tomita-Mitchell A., Lim E. et Ploz M. (2004). Diversity and dynamics of a north Atlantic Coastal *Vibrio* community. *Applied Environmental Microbiology*, 70: 4103-4110.
- Tofallis C. (2009). Least squares percentage regression. *Journal of Models Applied Statistical Methods*, 7: 526-534.
- Trabulsi L. et Altherthum F. (2005). **Microbiologia.** 5^{ème} ed. São Paulo: Atheneu. 718 pages
- Trabulsi L., Keller R. et Tardelli T. (2002). Typical and atypical Enteropathogenic *E. coli*. *Emerging infectious diseases*, 8(5): 508-513
- Traore N., Sidibe L., Bouare S., Harama D., Somboro A., Fofana B., Diallo D., Figueredo G. et Chalchat J-C. (2013). Activités antimicrobiennes des huiles essentielles de *Eucalyptus*

- citriodora*, Hook et *Eucalyptus houseana* W.Fitzg. ex Maiden. ***International Journal of Biological and Chemical Sciences***, 7(2): 800-804.
- Trease G. et Evans W. (1983). Orders and families of plant in pharmacognosy. ***Oxford University Press***, 12: 343-383.
 - UN-Water. (2006). **Coping with water scarcity: A strategic issue and priority for system-wide action**, UN-Water, 12 pages.
 - Upadhyay N., Kumar Y. et Gupta A. (2010). Antioxidant, cytoprotective and antibacterial effects of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. ***Food and Chemical Toxicology***, 48(12): 3443-3448.
 - Urquiaga I. et Leighton F. (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. ***Biological Research***, 33 (2): 55-64.
 - Van Loosdrecht M., Lyklema J., Norde W et Zehnder A. (1990). Influence of interfaces on microbial activity. ***Microbiology Review***, 54: 75-87.
 - Van Loosdrecht M., Lyklema J., Norde W., Schraa G. et Zehnder A. (1987). Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. ***Applied and Environmental Microbiology***, 53: 1898-1901.
 - Vasconcelos G. et Swartz R. (1976). Survival of bacteria in seawater using a diffusion chamber apparatus in situ. ***Applied and Environmental Microbiology***, 31: 913-920.
 - Vigneron P. (2000). **Classification des sous genres *Symphomyrtus* et *Telocalyptus*, genre *Eucalyptus* l'Herit. (Myrtaceae)**. Cirad-forêt, Montpellier, 20 pages.
 - Vincken J-P., Heng L. DE Groot A. et Gruppen H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. ***Phytochemistry***, 68: 275-297.
 - Voravuthikunchai S., Sririrak T, Limsuwan S., Supawita., Iida T. et Honda T. (2005). Inhibitory effects of active compounds from *Punica granatum* pericarp on verocytotoxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. ***Journal of Health Sciences***, 51 (5): 590-596.
 - Voss-Rech D., Klein C. et Techio V. (2011). Antibacterial activity of vegetal extracts against serovars of *Salmonella*. ***Ciência Rural, Santa Maria***, 41(2): 314-320.
 - Walter III M.C., Roe F., Bugnicourt A., Franklin M. et Stewart P. (2003). Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. ***Antimicrobial Agents and Chemotherapy***, 47: 317-323.

- Wegelin M., Canonica S., Mechsner K., Fleischmann T., Pesaro F. et Metzler A. (1994). Solar water disinfection: scope of the process and analysis of radiation experiments. *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA*, 43 (3): 154-169.
- Wei C., Lin W., Zainal Z., Williams N., Zhu K., Kruzic A., Smith R. et Rajeshwar K. (1994). Bactericidal activity of TiO₂ photocatalyst in aqueous media: Toward a solar-assisted water disinfection system. *Environmental Science & Technology*, 28(5): 934-938.
- Wéthé J., Radoux M et Tanawa E (2003). Assainissement des eaux usées et risques socio-sanitaires et environnementaux en zones d'habitat planifié de Yaoundé (Cameroun). *Revue en Sciences de l'Environnement*, 5 : 23-25.
- Williams J., Brooker M. (1997). *Eucalypts: an introduction*. Eucalypt ecology: individuals to ecosystems. Cambridge. *Cambridge university press*, 278-302
- Woodward R. (1999). Contact angle measurements using the drop shape method. *Portsmouth, VA: First Ten Angstroms Inc*, 1-8.
- Wright G. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57: 1451-1470.
- Yongue-Fouateu R. (1986). **Contribution à l'étude pétrographique de l'altération et des faciès de cuirassement ferrugineux des gneiss migmatiques de la région de Yaoundé.** Thèse de Doctorat, Université de Yaoundé, 214 pages
- Zhang H., Kong B., Xiong Y. et Sun X. (2009). Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4°C. *Meat Science*, 81: 686-692.
- Zimmer N. et Cordesse, R. (1996). Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *Inra Productions Animales*, 9 (3): 167-179.

ANNEXES

Annexe 1 : Valeurs des vitesses d'inhibition cellulaire par heure (et leurs coefficients de régression) de quelques bactéries pathogènes à chaque température d'incubation et à chaque concentration d'extrait

Espèces bactériennes et température d'incubation		Vitesses d'inhibition cellulaire par heure (et coefficient de régression)						
		NaCl (0,85%)	0,05%	0,1%	0,5%	1%	1,5%	2%
<i>E. coli</i> entéro-pathogène	7 °C	0,112 (0,506)	0,107 (0,415)	0,113 (0,415)	0,118 (0,398)	0,107 (0,404)	0,116 (0,342)	0,122 (0,315)
	23 °C	0,103 (0,392)	0,125 (0,452)	0,110 (0,331)	0,116 (0,327)	0,135 (0,365)	0,152 (0,254)	0,229 (0,392)
	37 °C	0,109 (0,528)	0,112 (0,428)	0,159 (0,656)	0,267 (0,773)	0,244 (0,774)	0,330 (0,891)	0,349 (0,776)
	44 °C	0,118 (0,574)	0,134 (0,482)	0,165 (0,439)	0,224 (0,548)	0,259 (0,436)	0,293 (0,462)	0,476 (0,753)
<i>S. typhi</i>	7 °C	0,112 (0,368)	0,119 (0,376)	0,134 (0,380)	0,155 (0,352)	0,192 (0,534)	0,216 (0,458)	0,232 (0,445)
	23 °C	0,156 (0,572)	0,162 (0,536)	0,183 (0,628)	0,232 (0,757)	0,217 (0,642)	0,207 (0,461)	0,223 (0,422)
	37 °C	0,147 (0,536)	0,155 (0,479)	0,165 (0,425)	0,182 (0,420)	0,183 (0,291)	0,209 (0,359)	0,255 (0,412)
	44 °C	0,130 (0,504)	0,138 (0,419)	0,227 (0,708)	0,161 (0,537)	0,178 (0,375)	0,205 (0,394)	0,238 (0,390)
<i>V. cholerae</i>	7 °C	0,040 (0,602)	0,113 (0,820)	0,129 (0,763)	0,122 (0,462)	0,134 (0,770)	0,146 (0,792)	0,142 (0,468)
	23 °C	0,112 (0,916)	0,150 (0,856)	0,147 (0,820)	0,077 (0,569)	0,106 (0,637)	0,147 (0,823)	0,161 (0,808)
	37 °C	0,040 (0,741)	0,099 (0,659)	0,110 (0,620)	0,117 (0,559)	0,134 (0,583)	0,159 (0,621)	0,287 (0,788)
	44 °C	0,071 (0,551)	0,080 (0,505)	0,099 (0,521)	0,123 (0,548)	0,235 (0,733)	0,324 (0,904)	0,364 (0,845)

Annexe 2 : Valeurs des vitesses d'inhibition cellulaire par heure (et leurs coefficients de régression) de quelques bactéries commensales à chaque température d'incubation et à chaque concentration d'extrait (h^{-1})

Espèces bactériennes et température d'incubation		Vitesses d'inhibition cellulaire par heure (et coefficient de régression)						
		NaCl (0,85 %)	0,05 %	0,1 %	0,5 %	1 %	1,5 %	2 %
<i>E. coli</i> commensale	7 °C	0,073 (0,424)	0,099 (0,518)	0,110 (0,417)	0,076 (0,166)	0,123 (0,507)	0,123 (0,463)	0,174 (0,643)
	23 °C	0,144 (0,637)	0,170 (0,653)	0,240 (0,826)	0,264 (0,834)	0,151 (0,354)	0,142 (0,279)	0,152 (0,271)
	37 °C	0,086 (0,551)	0,101 (0,589)	0,080 (0,254)	0,151 (0,688)	0,111 (0,266)	0,113 (0,174)	0,244 (0,559)
	44 °C	0,074 (0,400)	0,111 (0,671)	0,118 (0,566)	0,116 (0,362)	0,155 (0,463)	0,173 (0,363)	0,263 (0,627)
<i>E. faecalis</i>	7 °C	0,123 (0,432)	0,265 (0,654)	0,184 (0,665)	0,284 (0,619)	0,274 (0,498)	0,292 (0,507)	0,343 (0,479)
	23 °C	0,122 (0,434)	0,212 (0,486)	0,223 (0,454)	0,319 (0,577)	0,305 (0,458)	0,329 (0,505)	0,337 (0,459)
	37 °C	0,129 (0,485)	0,164 (0,313)	0,177 (0,339)	0,227 (0,366)	0,253 (0,368)	0,317 (0,402)	0,326 (0,417)
	44 °C	0,132 (0,515)	0,258 (0,511)	0,272 (0,532)	0,267 (0,464)	0,338 (0,509)	0,351 (0,524)	0,347 (0,472)

Annexe 3 : Valeurs des vitesses d'inhibition cellulaire par heure (et leurs coefficients de régression) de quelques bactéries pathogènes à chaque condition de luminosité et à chaque concentration d'extrait (h^{-1})

Espèces bactériennes et température d'incubation		Vitesses d'inhibition cellulaire par heure (et coefficient de régression)						
		NaCl (0,85 %)	0,05 %	0,1 %	0,5 %	1 %	1,5 %	2 %
<i>E. coli</i> entéropath.	Obscurité (0 lux)	0,074 (0,441)	0,102 (0,622)	0,116 (0,649)	0,111 (0,388)	0,123 (0,343)	0,136 (0,353)	0,146 (0,292)
	1000 lux	0,071 (0,427)	0,103 (0,634)	0,115 (0,649)	0,307 (0,842)	0,501 (0,591)	0,639 (0,862)	0,359 (0,737)
	2000 lux	0,228 (0,569)	0,271 (0,622)	0,260 (0,593)	0,308 (0,683)	0,325 (0,667)	0,324 (0,626)	0,366 (0,645)
	3000 lux	0,178 (0,797)	0,343 (0,929)	0,361 (0,868)	0,394 (0,964)	0,300 (0,813)	0,314 (0,727)	0,453 (0,865)
<i>E. faecalis</i>	Obscurité (0 lux)	0,132 (0,437)	0,211 (0,695)	0,216 (0,449)	0,242 (0,461)	0,308 (0,633)	0,301 (0,507)	0,378 (0,589)
	1000 lux	0,141 (0,440)	0,225 (0,627)	0,249 (0,570)	0,251 (0,413)	0,292 (0,499)	0,310 (0,507)	0,362 (0,479)
	2000 lux	0,159 (0,488)	0,180 (0,436)	0,208 (0,358)	0,258 (0,379)	0,284 (0,379)	0,348 (0,409)	0,357 (0,424)
	3000 lux	0,148 (0,512)	0,223 (0,513)	0,287 (0,529)	0,283 (0,466)	0,353 (0,508)	0,366 (0,523)	0,662 (0,763)

Annexe 4 : Analyse des données : Microorganismes planctoniques sous diverses températures d'incubation

***Escherichia coli* entéro-pathogène**

```
> epectemp=read.csv("epectemp.csv")
> fix(epectemp)
> res=aov(log(Abon+1)~tps+temp+conc,data=epectemp)
> summary(res)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Temps d'incub	4	12.6	3.2	0.835	0.505
Tempér d'incub	1	428.6	428.6	113.560	<2e-16 ***
Conc extrait	1	448.4	448.4	118.817	<2e-16 ***
Residuals	113	426.5	3.8		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Temps d'incub. : Temps d'incubation
Tempér d'incub. : Température d'incubation
Conc extrait : Concentrations de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys*
Residuals: Résidus ou fractions n'ayant pas contribué à la hiérarchisation

***Escherichia coli* commensale**

```
> ecomtemp=read.csv("ecomtemp.csv")
> fix(ecomtemp)
> res=aov(log(Abon+1)~tps+temp+conc,data=ecomtemp)
> summary(res)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Temps d'incub	1	2.14	2.14	0.909	0.3424
Tempér d'incub	1	13.95	13.95	5.927	0.0164*
Conc extrait	1	260.83	260.83	110.789	<2e-16 ***
Residuals	116	273.10	2.35		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Salmonella typhi

```
> styphitemp=read.csv("styphitemp.csv")
> fix(styphitemp)
> res=aov(log(Abon+1)~tps+temp+conc,data=styphitemp)
> summary(res)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Temps d'incub	1	13.46	13.46	6.021	0.0156*
Tempér d'incub	1	45.14	45.14	20.189	1.67e-05 ***
Conc extrait	1	310.53	310.53	138.892	<2e-16 ***
Residuals	116	259.35	2.24		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Vibrio cholerae

```
> vibriotemp=read.csv("vibriotemp.csv")
> fix(vibriotemp)
> res=aov(log(Abon+1)~tps+temp+conc,data=vibriotemp)
> summary(res)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Temps d'incub	1	70.42	70.42	30.89	1.77e-07 ***
Tempér d'incub	1	64.05	64.05	28.09	5.59e-07 ***
Conc extrait	1	251.21	251.21	110.18	<2e-16 ***
Residuals	116	264.47	2.28		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Enterococcus faecalis

```
> efaecatemp=read.csv("efaecatemp.csv")
> fix(efaecatemp)
> res=aov(log(Abon+1)~tps+temp+conc,data=efaecatemp)
> summary(res)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Temps d'incub	1	0.0	0.0	0.000	0.9934
Tempér d'incub	1	7.5	7.5	6.347	0.0131 ***
Conc extrait	1	501.6	501.6	426.008	<2e-16 ***
Residuals	116	136.6	1.2		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Annexe 5 : Analyse des données: Microorganismes planctoniques sous diverses intensités lumineuses

Escherichia coli entéropathogène

```
> epeclux=read.csv("epeclux.csv")
> fix(epeclux)
> res=aov(log(Abon+1)~tps+temp+conc+lux,data=epeclux)
> summary(res)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Temps d'incub	1	244.4	244.4	41.562	2.78e-09 ***
Temp d'exp.	1	676.7	676.7	115.083	< 2e-16 ***
Conc extrait	1	376.9	376.9	64.104	1.06e-12 ***
lux	1	2.7	2.7	0.461	0.499
Residuals	115	676.2	5.9		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Temps d'incub. : Temps d'incubation
Tempér d'exp. : Température enregistrée lors de l'expérience
Conc extrait : Concentrations de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys*
Lux : gamme d'intensité lumineuse
Residuals:Résidus ou fractions n'ayant pas contribuées à la hiérarchisation

Enterococcus faecalis

```
> efaecalux=read.csv("efaecalux.csv")
> fix(efaecalux)
> res=aov(log(Abon+1)~tps+temp+conc+lux,data=efaecalux)
> summary (res)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Temps d'incub	1	8.8	8.8	6.681	0.011 *
Temp d'exp.	1	68.8	68.8	52.092	6.11e-11 ***
Conc extrait	1	849.4	849.4	642.935	< 2e-16 ***
lux	1	51.4	51.4	38.923	7.57e-09 ***
Residuals	115	151.9	1.3		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Annexe 6 : Analyse des données: *Escherichia coli* adhérente et détachée

Escherichia coli adhérente

```
> epecadher=read.csv("epecadher.csv")
> fix(epecadher)
> res=aov(log(Abon+1)~durée+DAC+conc+phase+hydro+angle,data=epecadher)
> summary(res)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
durée	1	0.93	0.93	0.578	0.448989
DPAC	1	1.13	1.13	0.705	0.402983
conc extrait	1	25.55	25.55	15.949	0.000125 ***
phase croiss.	3	185.70	61.90	38.638	< 2e-16 ***
hydro	1	0.05	0.05	0.029	0.865514
angle	1	3.61	3.61	2.253	0.136509
Residuals	99	158.61	1.60		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Escherichia coli détachée

```
> epecdétachée=read.csv("epecdétachée.csv")
> fix(epecdétachée)
> res=aov(log(Abon+1)~durée+DAC+conc+phase+hydro+angle,data=epecdétachée)
> summary(res)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
durée	1	2.01	2.01	3.616	0.06014
DPAC	1	0.53	0.53	0.963	0.32878
conc extrait	1	0.25	0.25	0.456	0.50102
phase croiss.	3	119.19	39.73	71.615	< 2e-16 ***
hydro	1	0.42	0.42	0.750	0.38860
angle	1	6.76	6.76	12.188	0.00072 ***
Residuals	99	54.92	0.55		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Durée : durée de séjour dans l'extrait

DPAC : Durée de l'adhésion cellulaire

Phase croiss. : phase de croissance cellulaire

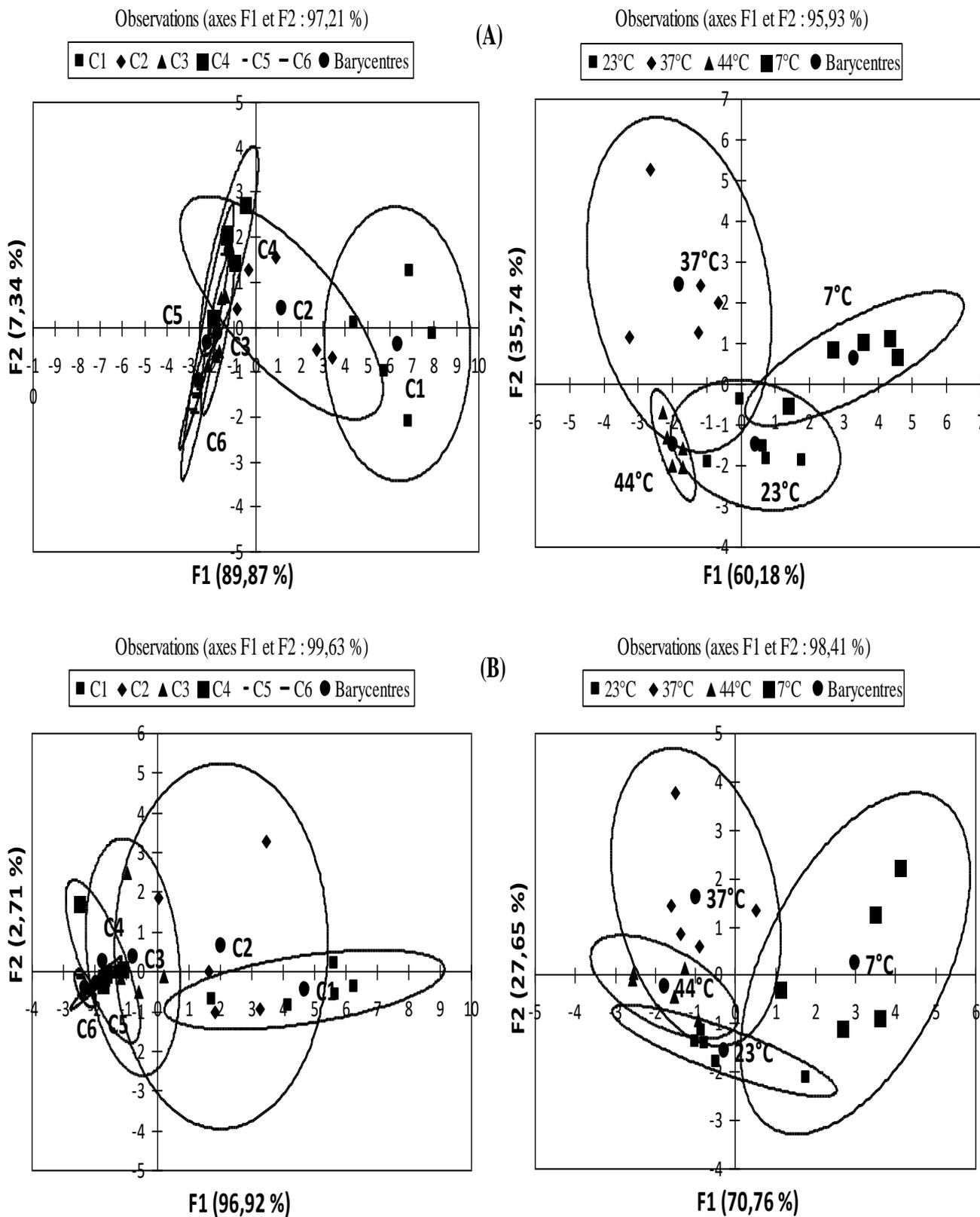
Conc extrait : Concentrations de l'extrait d'*Eucalyptus microcorys*

Hydro. : Hydrophobicité de surf

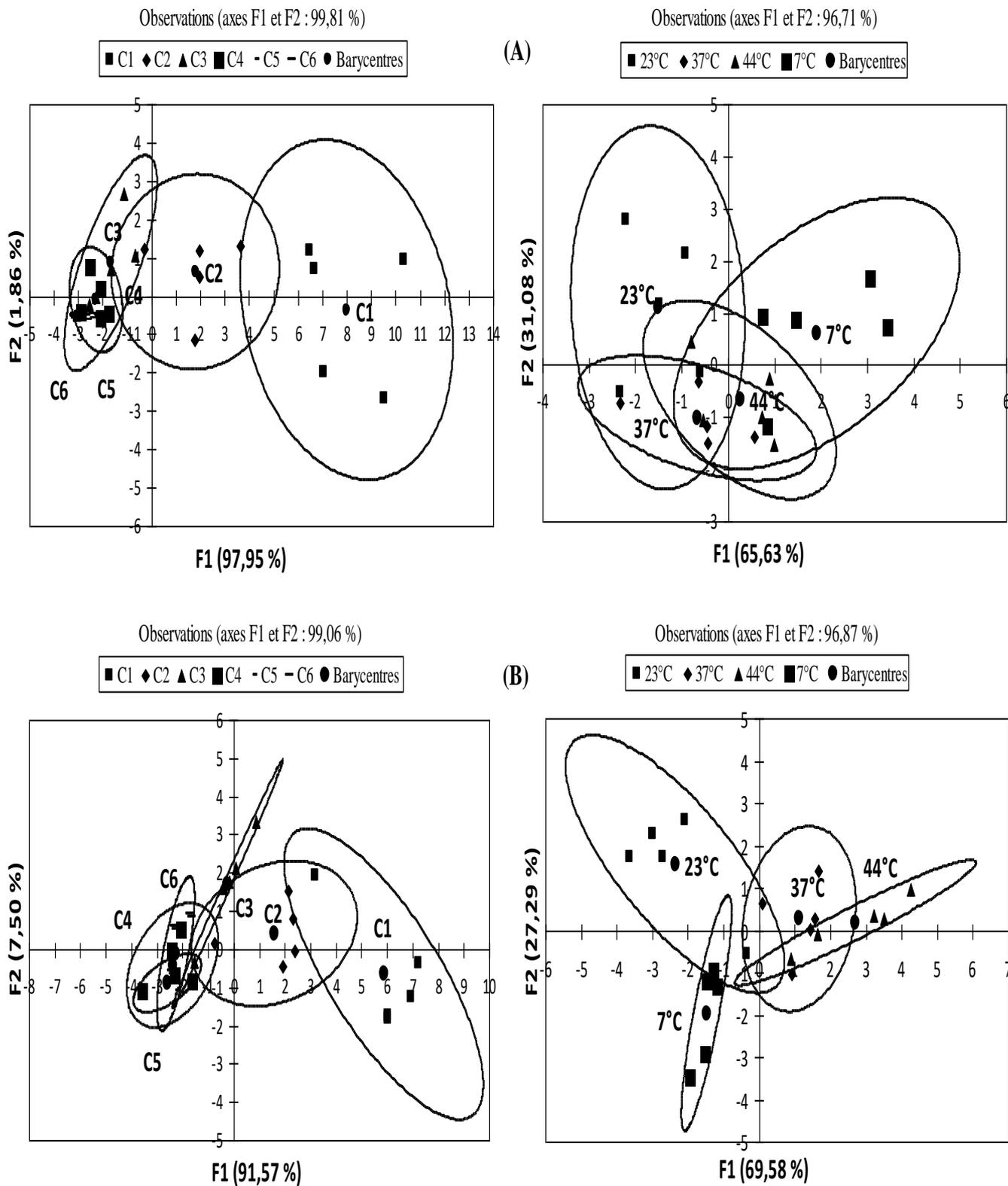
Angle : Angles de contact

Residuals: Résidus ou fractions n'ayant pas contribué à la hiérarchisation

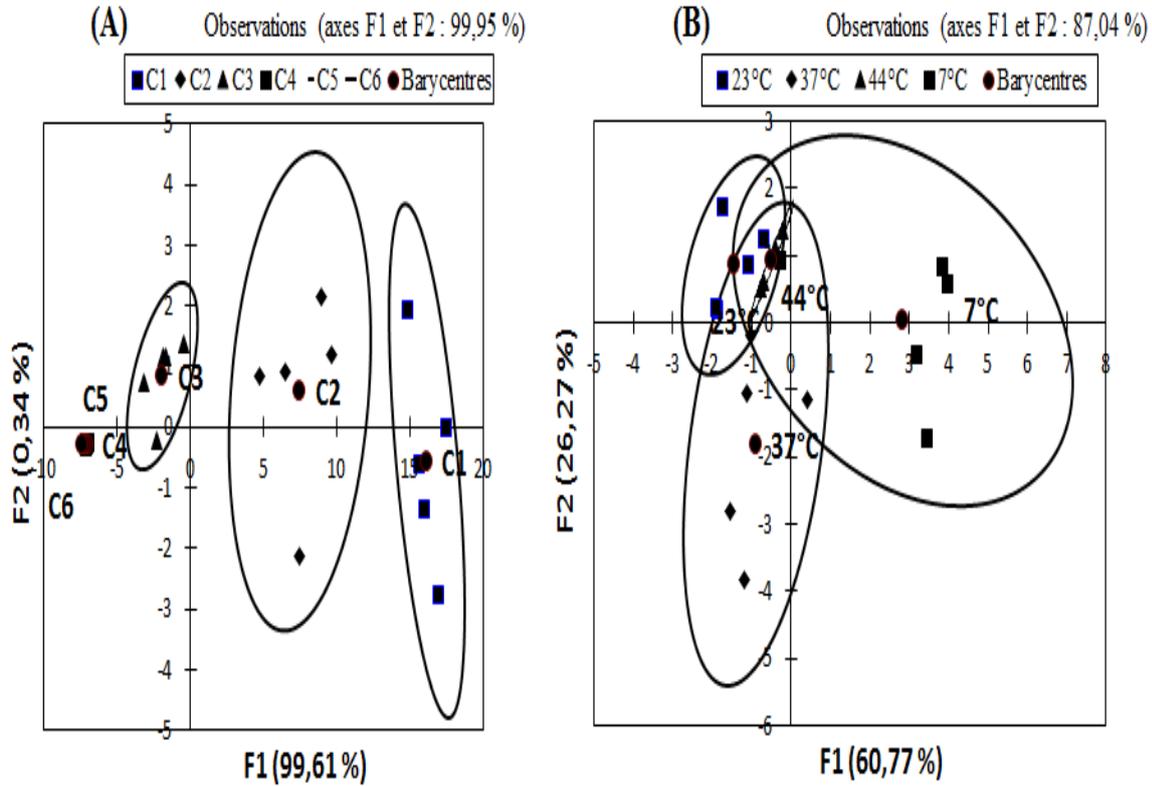
Annexe 7 : Analyse factorielle Discriminante (AFD) montrant l'influence des différentes gammes de concentration d'*Eucalyptus microcorys* (C1=0,05%, C2=0,1%, C3=0,5%, C4=1%, C5=1,5% et C6=2%) et des températures expérimentales sur les abondances cellulaires d'*E. coli* entéropathogène (A) d'*E. coli* commensale (B) et ceci pour l'ensemble des durées d'incubation.



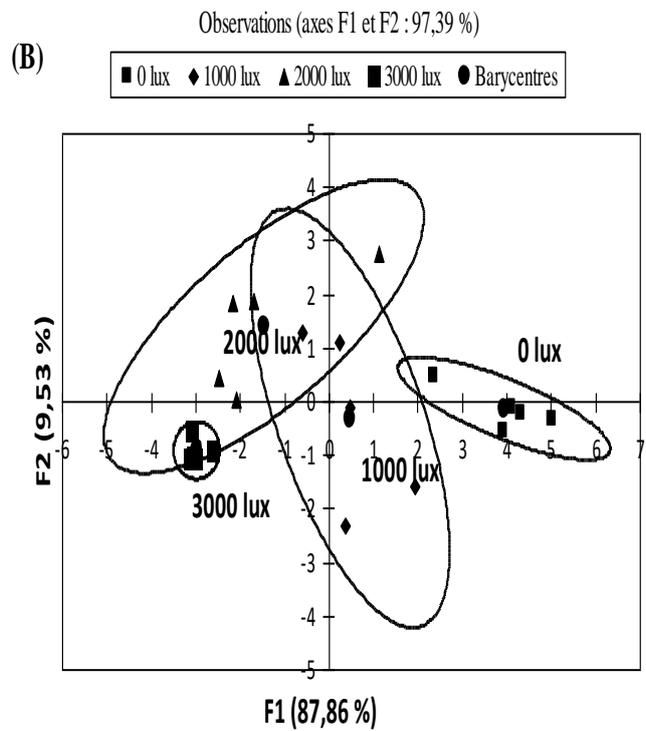
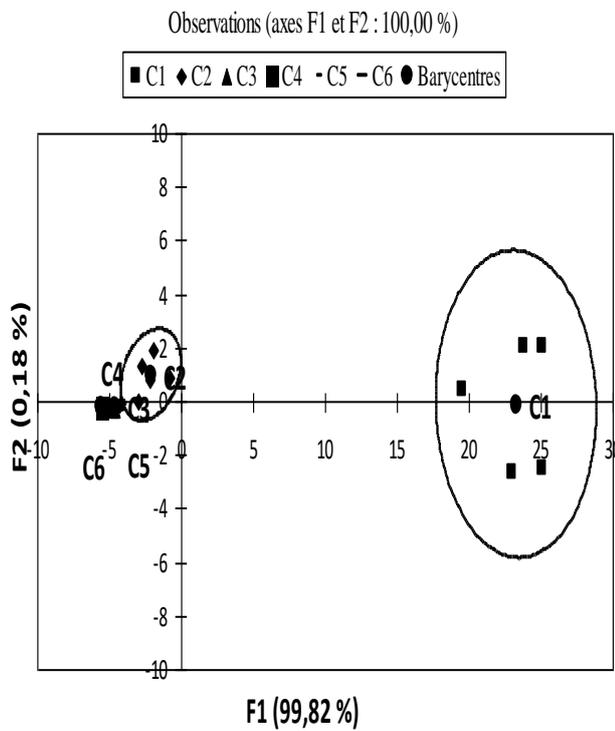
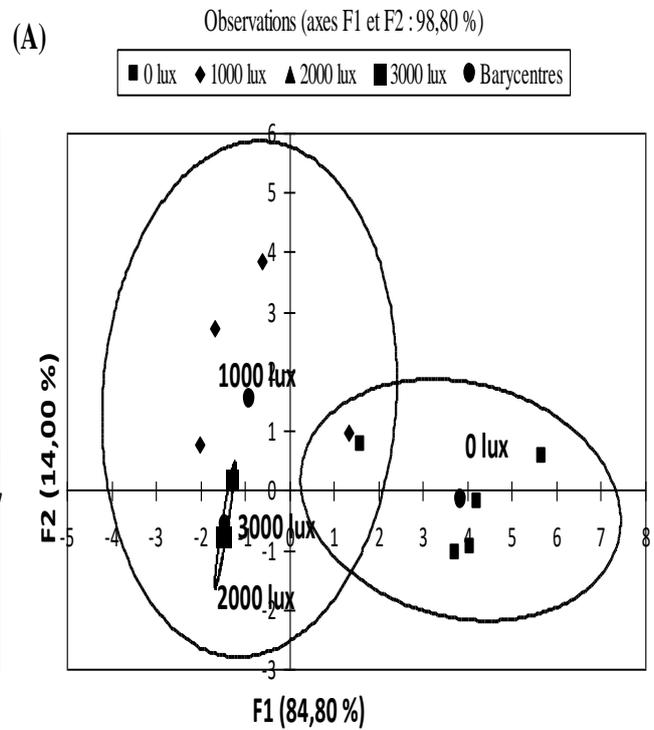
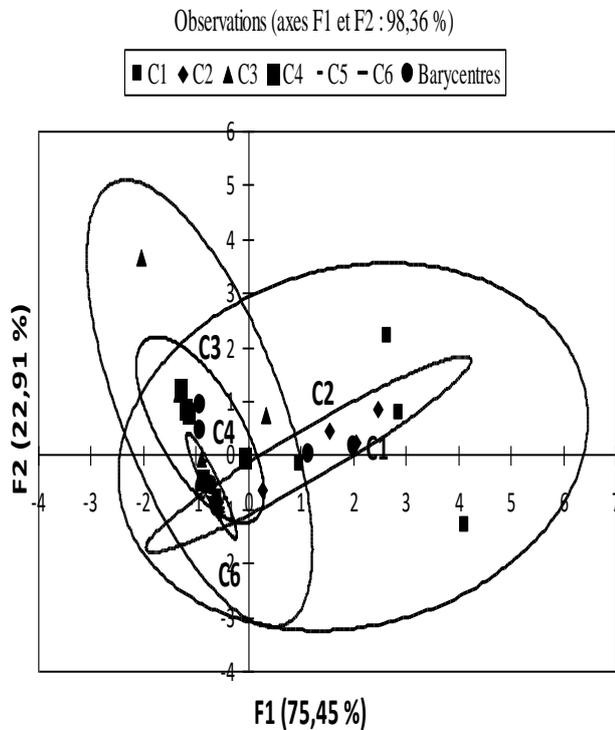
Annexe 8 : Analyse factorielle Discriminante (AFD) montrant l'influence des différentes gammes de concentration d'*Eucalyptus microcorys* (C1=0,05%, C2=0,1%, C3=0,5%, C4=1%, C5=1,5% et C6=2%) et des températures expérimentales sur les abondances cellulaires de *Salmonella typhi* (A) de *Vibrio cholerae* (B) et ceci pour l'ensemble des durées d'incubation.



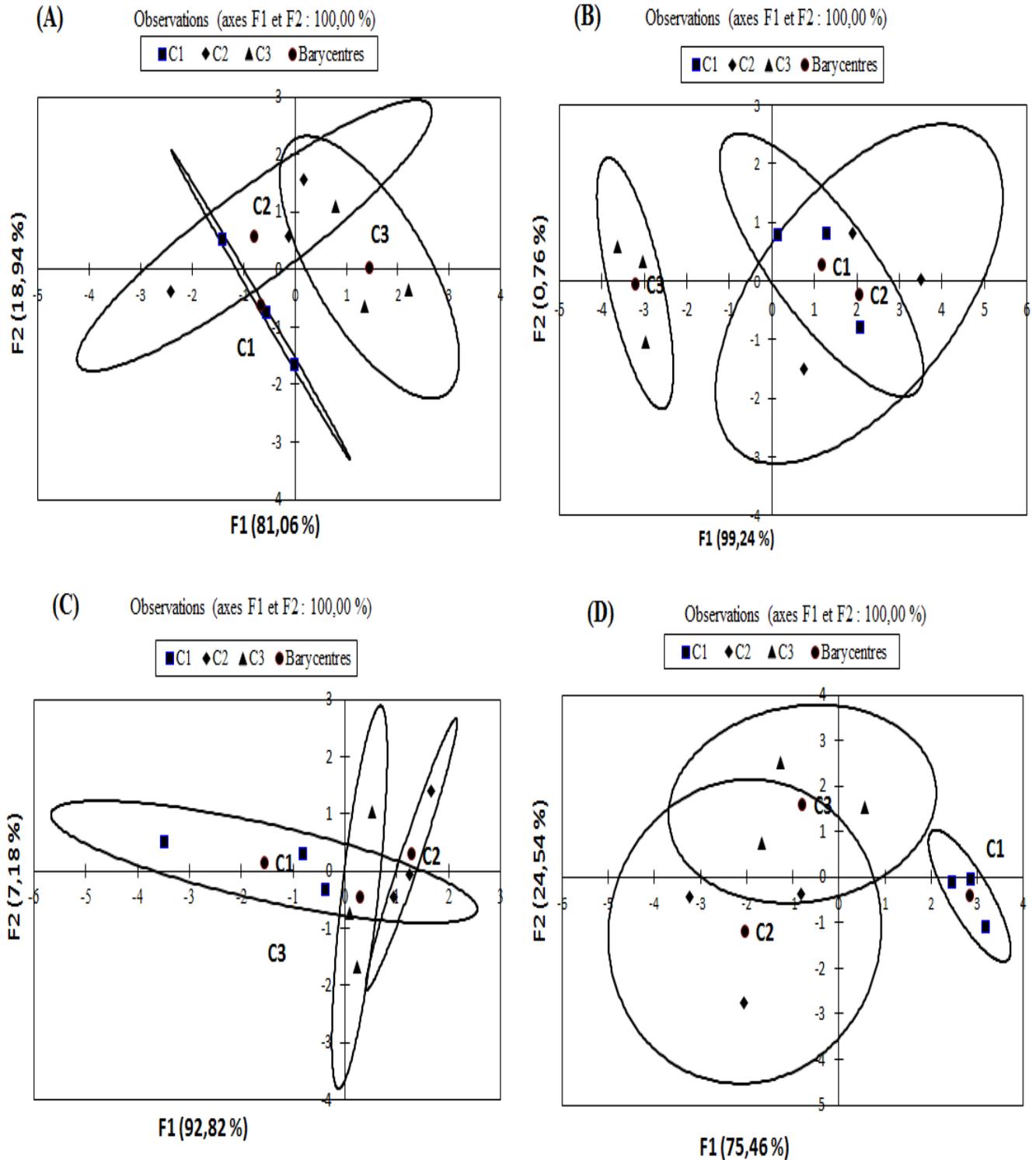
Annexe 9 : Analyse factorielle Discriminante (AFD) montrant l'influence des différentes gammes de concentration d'extrait (A) (C1=0,05%, C2=0,1%, C3=0,5%, C4=1%, C5=1,5% et C6=2%) et des températures expérimentales (B) sur les abondances cellulaires d'*Enterococcus faecalis* pour l'ensemble des durées d'incubation.



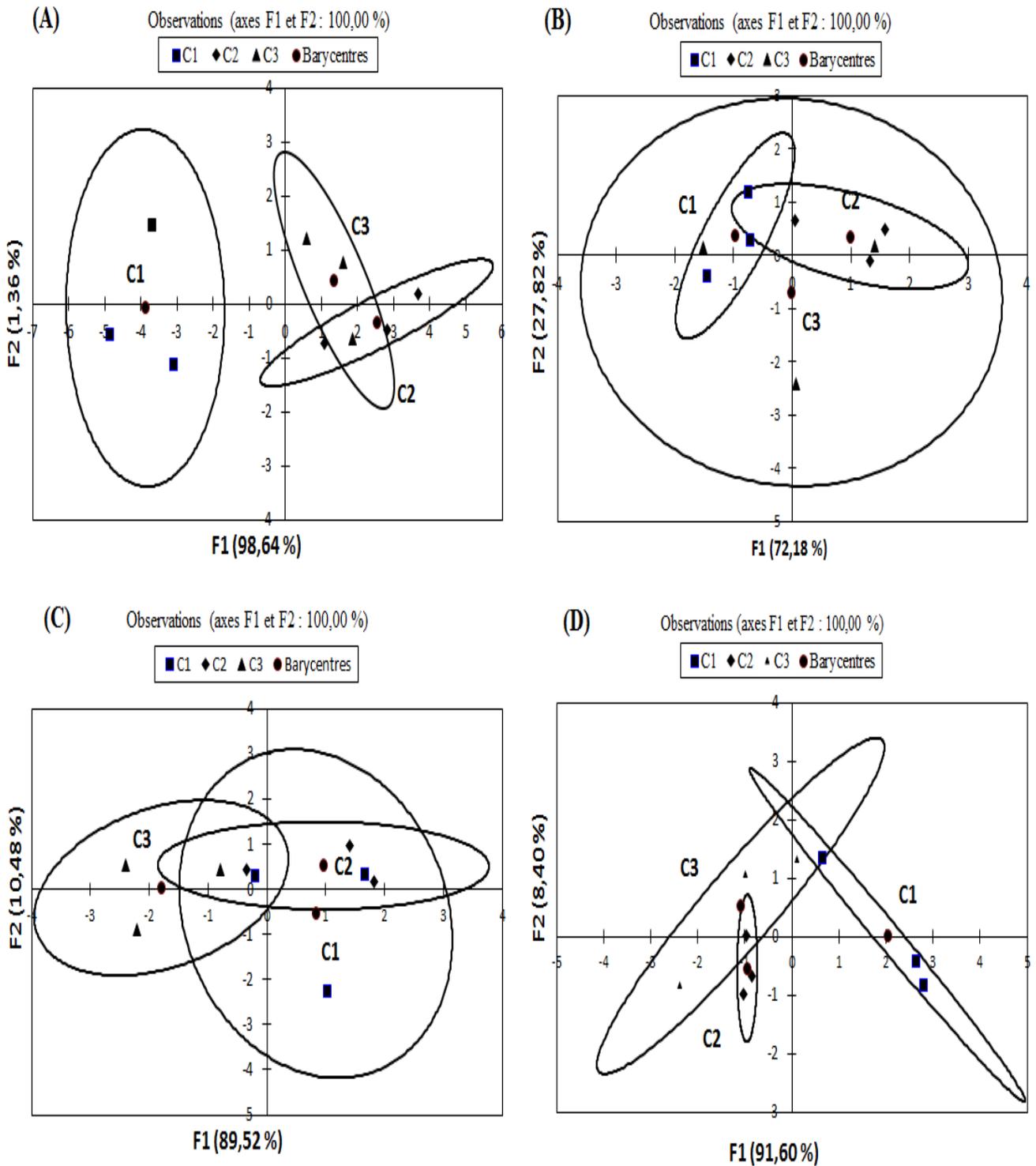
Annexe 10 : Analyse factorielle Discriminante (AFD) montrant l'influence des différentes gammes de concentration d'extrait (C1=0,05%, C2=0,1%, C3=0,5%, C4=1%, C5=1,5% et C6=2%) et d'intensité lumineuse sur les abondances cellulaires d'*E. coli* entéropathogène (A) et d'*Enterococcus faecalis* (B) pour l'ensemble des durées d'incubation



Annexe 11 : Représentation de la dispersion des abondances cellulaires d'*Escherichia coli* entéropathogène détachées après influence des différentes gammes de concentration (C1=1%, C2=1,5% et C3=2%) d'*Eucalyptus microcorys*, les cellules, pour les tests d'adsorption, étant issues de la Phase Latence (A), Phase Exponentielle (B), Phase Stationnaire (C), et de la Phase de Déclin (D), pour l'ensemble des temps de contact et en considérant l'ensemble des durée du processus d'adhésion cellulaire (DPAC).



Annexe 12 : Représentation de la dispersion des abondances cellulaires d'*Escherichia coli* entéropathogène restées adhérees après influence des différentes gammes de concentration (C1=1%, C2=1,5% et C3=2%) d'*Eucalyptus microcorys*, les cellules, pour les tests d'adsorption, étant issues de la Phase Latence (A), Phase Exponentielle (B), Phase Stationnaire (C), et de la Phase de Déclin (D), pour l'ensemble des temps de contact et en considérant l'ensemble des durée du processus d'adhésion cellulaire (DPAC).



LISTE DES PUBLICATIONS

- 1- **Antoine Tamsa Arfao**, Moïse Nola, Chrétien Lontsi Djimeli, Mireille E. Nougang and Jean B. Hounda Fokou. (2013). Cultivability of *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* and enteropathogenic *Escherichia coli* in water microcosm in the presence of *Eucalyptus microcorys* leaves extract: Effect of the concentration of leaves extract and incubation temperature. *International Journal of Research in BioSciences*, 2 (4): 32-46
- 2- **A Tamsa Arfao**, M. Nola C. Lontsi Djimeli, R.V. Nandjou Nguéfack, M.E Nougang, G.Bricheux, and T. Sime-Ngando. (2013). Comparison of the inhibition of commensally and enteropathogenic *E. coli* strains in the presence of *Eucalyptus microcorys* leaves extract in aquatic microcosm. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 2(6): 80-96
- 3- **Antoine Tamsa Arfao**, Chrétien Lontsi Djimeli, Olive V. Noah Ewoti, Geneviève Bricheux, Moïse Nola, and Téléspore Sime-Ngando. (2016). Detachment of adhered enteropathogenic *Escherichia coli* cells from polythene fragments immersed in aquatic microcosm using *Eucalyptus microcorys* extract (Myrtaceae). *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 4 (3): 847-857.

Research Paper

Cultivability of *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* and enteropathogenic *Escherichia coli* in water microcosm in the presence of *Eucalyptus microcorys* leaves extract: Effect of the concentration of leaves extract and incubation temperature

Antoine Tamsa Arfao¹, Moïse Nola^{1,*}, Chrétien Lontsi Djimeli¹, Mireille E. Nougang¹ and Jean B. Hzounda Fokou²

¹Laboratory of General Biology, Faculty of Sciences, University of Yaoundé 1, P.O. Box 812, Yaoundé, CAMEROON

²Laboratory for Phytobiochemistry and Medicinal plants study, Faculty of Sciences, University of Yaoundé 1, P.O. Box 812, Yaoundé, CAMEROON

(Received September 11, 2013, Accepted October 10, 2013)

Abstract

This study aimed to assess the effect of the concentration of an aqueous extract of a Myrtaceae (*Eucalyptus microcorys*) on bacterial survival under various temperature conditions. At 7°C, the highest concentration of cultivable cells were 21.30, 21.32 and 21.08 (Ln (CFU/100 ml)) respectively at the concentration of extract solution 1, 1.5 and 2% for enteropathogenic *E. coli*, 18.12, 16.27 and 15.31 (Ln (CFU/100 ml)) at 1, 1.5 and 2% for *S. typhi*, and 22.32, 22.23 and 19.99 (Ln (CFU/100 ml)) at 1, 1.5 and 2% for *V. cholerae*. At 23 and 37 °C, the highest concentrations of cultivable enteropathogenic *E. coli*, *S. typhi* and *V. cholerae* were all noted at the extract concentration 1%. The hourly cell inhibition rate of enteropathogenic *E. coli* varied from 0.35 to 0.81, from 0.42 to 1.07, and from 0.44 to 1.05 h⁻¹ respectively at the extract concentration 1, 1.5 and 2%. That of *S. typhi* varied respectively from 0.55 to 0.65, from 0.62 to 0.69, and from 0.67 to 0.76 h⁻¹. It varied respectively from 0.29 to 0.40, from 0.32 to 0.48 and from 0.43 to 0.86 h⁻¹ for *V. cholerae*. Secondary metabolites found in the plant extract would have an impact on the variation of the CFUs abundance noted.

Keywords: bacteria cultivability, *E. microcorys* extract, concentration, incubation temperature

Introduction

Water, despite being vital to our lives, is a vehicle for viral, bacterial, fungal, protozoa and helminthes. Water borne diseases possess a relatively high mortality rate in developing countries [1, 2]. Diarrheic diseases are caused by a large range of infectious agents and rank among the most deathly in developing countries, especially in countries between the tropics [3]. The world has witnessed since 2000 an increase in the number of populations who have access to potable water. This process progresses remains, however, minute given the demographic growth of most of these countries. In order to solve their need for potable water, many populations now use underground water.

There are several simple methods used to render water free from microbes. Basically, it involves the use of chlorinated product and boiling. These methods alter the organoleptic properties of water. By solar radiation method or Solar Water Disinfection (SODIS), simple and accessible has been proposed for the destruction of microbes present in water fetched from wells or other point for drinking^[4]. Unfortunately, this method poses a restriction because the water treated with this method can only be conserved during 24 hours at most. Beyond this period, chances for bacteria to regenerate are high^[5]. The adhesion of bacteria-contaminants on rocks immersed has been suggested for reducing planktonic bacteria^[6]. This method, interesting however, remains limited.

To allow the populations to reach a water of good quality, in addition to the means above quoted, a method of water decontamination by the extract of plants has also been proposed like new alternative of water treatment to the level of the households. The use of plant for therapeutic purposes began thousands of years ago. According to the WHO more than 80% of the world's population relies on traditional medicine for primary healthcare needs^[7]. Natural compounds have the advantages of having grand chemical structure diversity with sometime a huge range of biological properties^[8]. In fact some crude extracts of *Lantana camara*, *Cymbogon citratus* and *Hibiscus rosa-sinensis* have been proven to possess bactericide properties in aqueous medium^[9]. The infusion of *Artemisia annua* causes the destruction of bacteria and does not lead to an irreversible sublethal alteration in others^[10]. Lutgen and Michels have reported the bactericide or bacteriostatic effect of *Artemisia annua* linked to the peroxide group of Artemisinin^[11].

Many plant of *Eucalyptus* genus (Myrtaceae) are used to control several diseases derived from microbial infections^[12]. Leaf extracts of *Eucalyptus* have been approved as food additives, and the extracts are also currently used in cosmetic formulations. Recently, attention has been focused on the medicinal properties of these extracts. Research data has demonstrated that the extracts exhibited various biological effects, such as antibacterial, antihyperglycemic and antioxidant activities^[13, 14]. It has been reported that macrocarpals from *Eucalyptus macrocarpa* and grandinol from *Eucalyptus perriniana* were effective against Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*)^[15, 16]. However the use of plant extracts in the process of water purification, destined to drinking, remains low. Few studies have been carried out on the properties of *Eucalyptus microcorys*. This plant belongs to the *Magnoliophyta* division, *Magnoliopsida* Class, *Myrtales* Order, *Myrtaceae* Family and *Eucalyptus* Genus. we have few information on the impact of varying concentration on bacteria, likewise few information relate the influence of the aqueous extract on bacteria with respect to the duration of exposition and to temperature.

The main objective of the present study is to investigate on the effects of extract of *Eucalyptus microcorys* on cultivability of planktonic bacteria *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* and enteropathogenic *E. coli* in aquatic microcosm and to evaluate the impact of extract concentration, incubation temperature and period on this effect.

Materials and Methods

Harvest of *E. microcorys* and crude extract obtaining

Fresh leaves of *Eucalyptus microcorys* were harvest in Yaoundé, center region (Cameroon) and dried up at room temperature (23±2 °C) in the laboratory for 30 days. Thereafter, leaves were ground into powder. Fifty grams of the obtained powder were mixed with 100 ml of warm distilled water and heated immediately up to boiling temperature, thirty minutes after the mixture is left to settle, the supernatant is removed by filtration. The filtrate obtained constitutes the decoction. The latter is dried in an oven at 45-50 °C^[17, 18].

The method used in this experiment was selected for it closeness to that of the herbalists. The obtained crystals were used to prepare the crude extract. The output of the extraction was 22.43% (±0.5%). The output of the extraction is the report of the mass of crystals on the mass of the plant powder (50g) used. Three ranges of extract concentration 1%, 1.5%, 2% have been prepared thus while using sterile physiological water. Every range has been filtered then first with the help of the sterile cotton, then on Whatman membrane, and finally on membrane in nitrate of cellulose of 0.45 µm porosity.

Qualitative phytochemical screening

The phytochemical sifting was done according to the usual protocols [19, 20]. It ascertained the presence of polyphenol, triterpenoids, sterols, alkaloids, saponins, gallic tannins, Flavonoids, Anthraquinones and Anthocyanines.

Bacterial isolation and storage

The bacteria used were *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* and enteropathogenic *Escherichia coli*. These bacteria have been chosen because of their importance in hygiene and in public health [21, 22]. They were isolated from the urban stream in the equatorial region of Cameroon.

Enteropathogenic *E. coli*, *S. typhi* and *V. cholerae* were isolated on Endo (Bio-Rad), Wilson Blair (Bio-Rad) and TCBS (Bio-Rad) agar medium respectively, using membrane filtration technique [23, 24]. Their identification was made according to standard method [25]. For the preparation of bacterial stocks, a colony forming unit (CFU) of each strain from standard agar medium was inoculated into 100 ml of nutriment broth (Oxford) for 24h at 37°C. After cells were harvested by centrifugation at 8000 rev/min for 10 min at 10°C and washed twice with NaCl (8.5 g/l) solution. Each pellet was re-suspended in 50 ml of NaCl solution. After homogenization, 1ml of this was then transferred into 500 ml of sterile NaCl solution (0.85%) contained in the Erlenmeyer flash and the stocked.

Experimental protocol

A number of 60 flasks of 250 ml were used for this study. The latter were organized in four series: A, B, C and D, each series of flask is divided into three subgroups of 5 flasks each. All 15 flasks of series A contained 200 ml of physiological water (NaCl: 0.85%) each and were used as control. The three other series contained 200ml of the extract at different concentrations. The B, C and D series contained 1%, 1.5% and 2% of the extract respectively. One ml of the stock of bacteria was then transferred into each flask. T_0 , the initial time, corresponds to the point of time when the transfer of stock is done. At T_0 the cell concentration was 27×10^8 CFU/ml. The first subgroup of each group A, B, C and D were incubated at 7 ± 1 °C. The second and the third subgroups of each group were respectively incubated at 23 ± 1 °C and 37 ± 1 °C. The counting of bacteria was done in each flask through the surface spreading method on agar medium, this at the end of each incubation period. The Endo (Bio-Rad), Wilson Blair (Bio-Rad) and TCBS (Bio-Rad) agar culture medium were used for bacteria Enteropathogenic *E. coli*, *S. typhi* and *V. cholerae* respectively. Results were expressed in the number of units that constitute a colony in 100ml of physiological water sampled.

Data analysis

The temporal variation of bacterial abundances is illustrated using histograms. The percentage of inhibition (PI) was calculated using the following formulae as described by Namour and Tamsa Arfao et al [18, 26].

$$PI = \left(\frac{N_0 - N_n}{N_0} \right) \cdot 100$$

Where N_0 = number of bacteria in control (NaCl: 0.85%), N_n = remaining bacteria after the action of *Eucalyptus microcorys* extract. Correlation coefficients among considered parameters were assessed using Spearman correlation test. The comparisons of the abundances of planktonic bacteria among the extract concentrations, incubation durations and incubation temperatures have been carried out using the H-test of Kruskal-Wallis on statistical software package (SPSS 16.0).

The straight Ln (number of CFUs) lines against incubation duration of the form $y = ax + b$ were plotted for each of the extract concentrations and incubation temperatures. In this equation, x is the explanatory variable and y is the dependent variable, a is the slope of the regression line, and b is the intercept point of the regression line on the y axis (the value of y when $x = 0$) [27, 28]. The slope of the straight line was then considered as the cell inhibition rate (CIR).

Results and Discussion

Qualitative phytochemical screening

The phytochemical screening of *Eucalyptus microcorys* revealed the presence of Polyphenols, Sterols, Triterpenoids, Flavonoids, Gallic tannins, Anthraquinones, Anthocyanines, Alkaloids and Saponins. Catechics tannins and the lipids are absents.

Temporal variation of cells abundances

Considering temperature 7°C, it was noted that the value abundances of cells in the NaCl solution (0.85%) ranged from 21.19 to 21.40 (Ln (CFU/100 ml)) for enteropathogenic *E. coli*, and ranged from 19.84 to 20.98 (Ln (CFU/100 ml)) for *S. typhi* and finally ranged from 24.54 to 24.78 (Ln (CFU/100 ml)) for *V. cholerae* (Figure 1). In the same condition, in the presence of different concentration extract solution (1%, 1.5% and 2%) of *Eucalyptus microcorys*, the abundance of cells varied from 21.13 to 21.30, from 19.53 to 21.32 and from 19.30 to 21.08 (Ln (CFU/100 ml)) respectively at 1%, 1.5% and 2% for enteropathogenic *E. coli*. It ranged respectively from 16.19 to 18.12, 14.23 to 16.27, and 12.79 to 15.31 (Ln (CFU/100ml)) at 1%, 1.5% and 2% for *S. typhi*. For *V. cholerae* it fluctuated between 19.94 and 22.32 (Ln (CFU/100 ml)) at 1%, between 19.65 and 22.23 (Ln (CFU/100 ml)) at 1.5%, and between 18.92 to 19.99 (Ln (CFU/100ml)) at 2% (Figure 1).

For incubation temperature of 23°C, in the NaCl solution (0.85%), the highest abundance of enteropathogenic *E. coli*, *S. typhi* and *V. cholerae* was recorded respectively 21.71, 20.26 and 24.76 (Ln (CFU/100ml)) (Figure 2). It was observed that, in the extract solution, the density of cells bacteria ranged respectively from 18.84 to 21.15, 14.75 to 20.68 and 13.14 to 20.58 (Ln (CFU/100 ml)) at 1%, 1.5% and 2% for enteropathogenic *E. coli*, it ranged respectively from 16.75 to 18.42, 16.01 to 17.23, and 14.17 to 16.27 (Ln (CFU/100 ml)) at 1%, 1.5% and 2% for *S. typhi*. For *V. cholerae* it ranged from 21.22 to 22.47, from 20.02 to 22.32 and from 18.92 to 21.84 (Ln (CFU/100 ml)) respectively at 1%, 1.5% and 2% (Figure 2).

The highest cell concentrations cell in the NaCl solution (0.85%) were respectively 21.68, 20.37, and 25.08 (Ln (CFU/100 ml)) for enteropathogenic *E. coli*, *S. typhi* and *V. cholerae* at incubation temperature 37°C. In the same condition, the concentration cell, in different concentration extract solution of *Eucalyptus microcorys*, was fluctuated between 15.49 and 21.55 (Ln (CFU/100 ml)) to 1%, between 13.54 and 21.48 (Ln (CFU/100 ml)) to 1.5% and between 12.44 and 17.46 (Ln (CFU/100 ml)) to 2% for enteropathogenic *E. coli* (Figure 3). The cellular density of *S. typhi* is between 13.70 and 16.75 (Ln (CFU/100 ml)) to 1%, between 13.70 and 16.58 (Ln (CFU/100 ml)) to 1.5% and between 12.79 and 14.40 (Ln (CFU/100 ml)) to 2%. For *V. cholerae* the cell abundance ranged from 19.39 to 21.56, from 18.81 to 21.12 and from 13.75 to 18.42 (Ln (CFU/100ml)) respectively at 1%, 1.5% and 2% (Figure 3).

In most cases, the low cellular densities have been observed after 24 h of incubation except enteropathogenic *E. coli* with recorded after 6 h to 23°C [13.14(Ln (CFU/100 ml))] and after 9 h to 37°C [12.44 (Ln (CFU/100 ml))]. The abundance of *S. typhi* was relatively lower after 3 h to 37°C [12.79 (Ln (CFU/100 ml))] (Figure 1 and 3).

Percentage of inhibition

The percentage of inhibition was calculated to evaluate the direct impact of aqueous extract on Culturability of tree bacteria species studied and asses the influence of incubation temperature and duration. The (Table 2) showed that cultivability of enteropathogenic *E. coli* with extract concentration 1%, percentage of inhibition ranged from 3 to 24%, 8 to 91% and 3 to 100% at 7, 23 and 37°C respectively (Table 1). With 1.5% of extract concentration, we observed 100% of inhibition at 37°C after 9 h. The percentage of inhibition attained the maximum value with extract concentration 2% after 1 day and ranged from 86 to 100 % for all incubation temperature and extract concentration. Concerning *S. typhi*, the percentage of inhibition ranged from 10 to 100 %. The lower percentage (9.83%) was noted after 9 h at 7°C at the extract concentration 1%. For *V. cholerae* the inhibition percentage ranged from 25 to 100%. In most cases the inhibition percentage was higher than 80%.

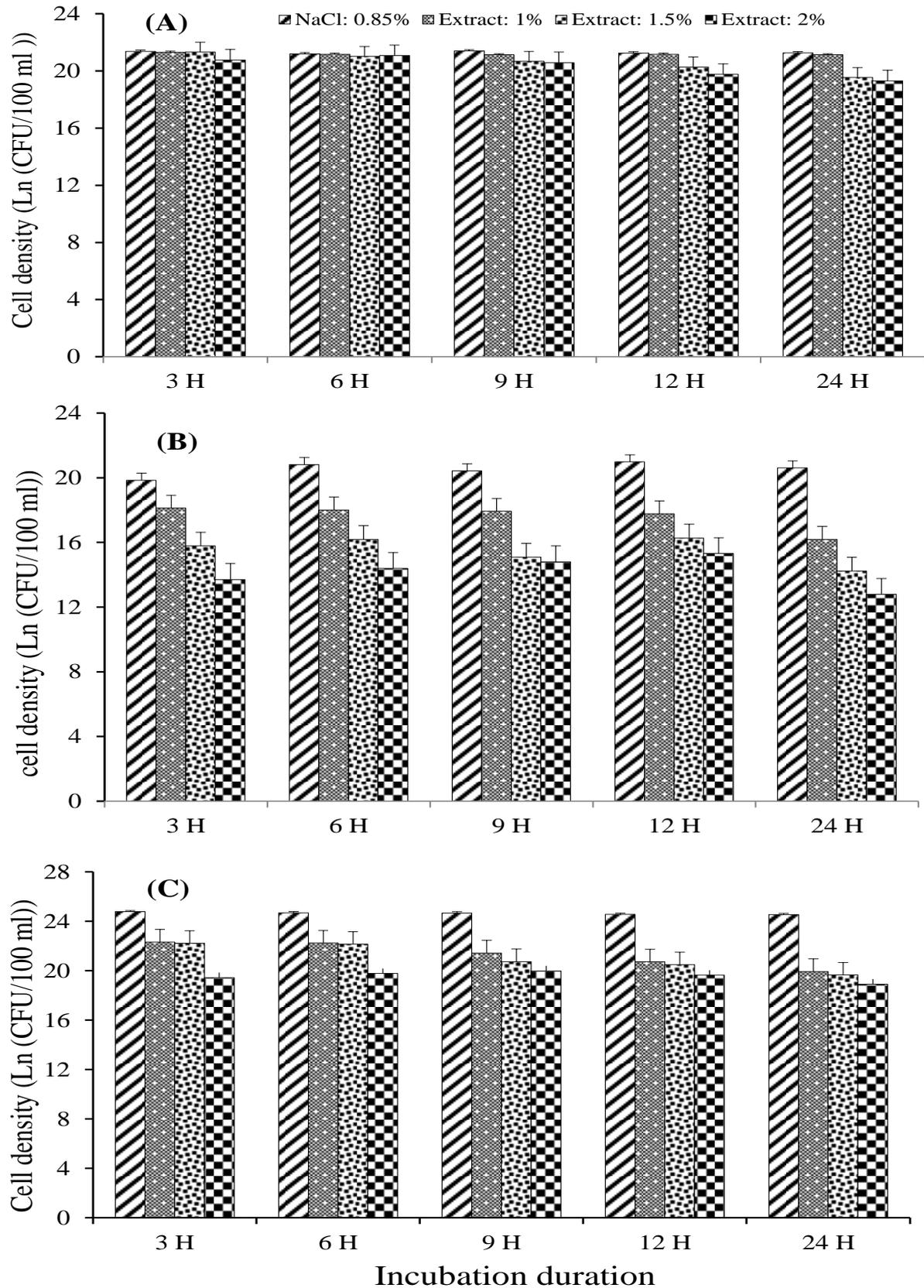


Figure 1: Temporal evolution of planktonic cells abundance in presence of *Eucalyptus* extract at temperature of 7°C ((A): Enteropathogenic *E. coli*, (B): *S. typhi*, (C): *V. cholera*)

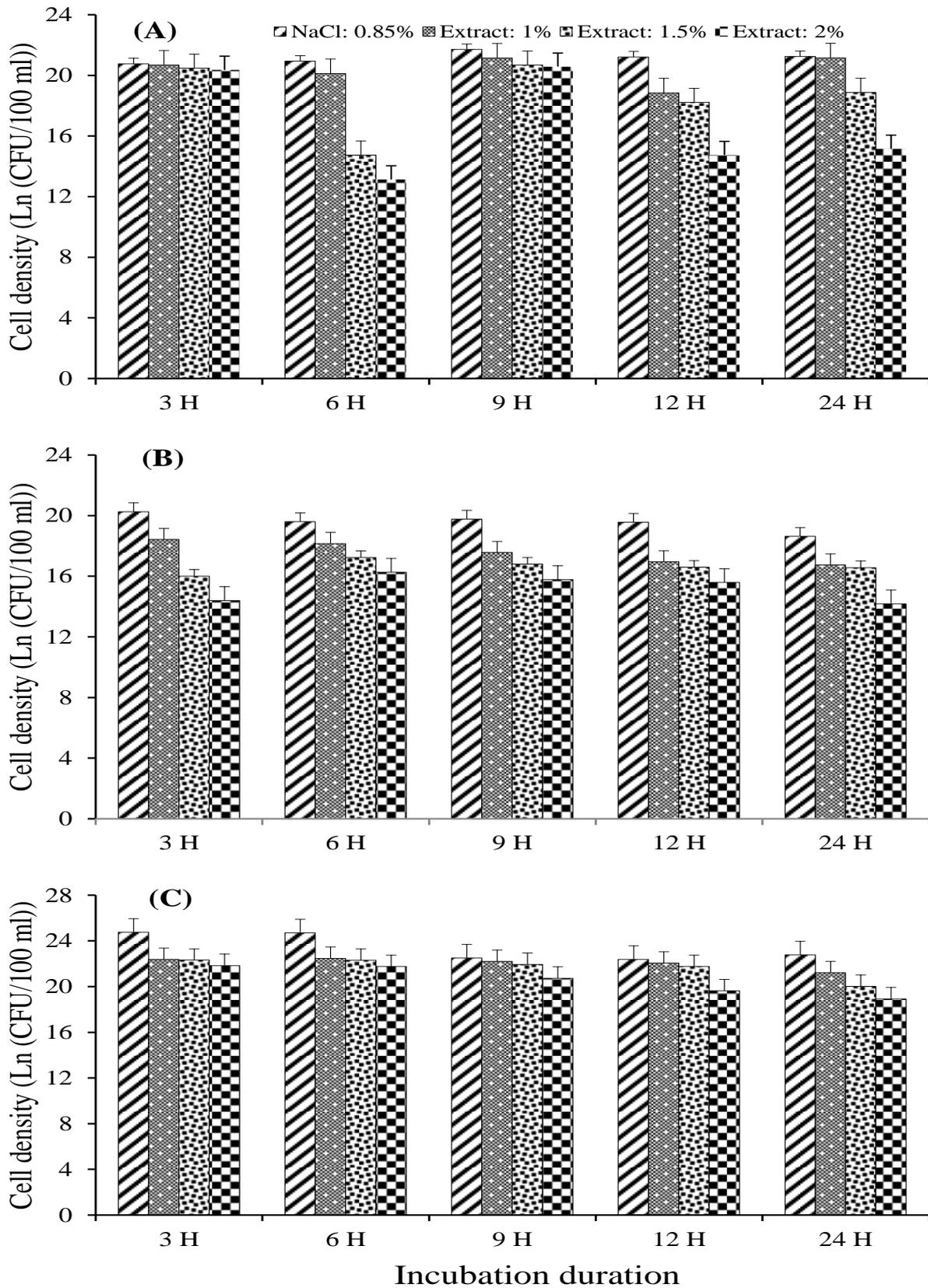


Figure 2: Temporal evolution of planktonic cells abundance in presence of *Eucalyptus* extract at temperature of 23°C ((A): Enteropathogenic *E. coli* , (B): *S. typhi* , (C): *V. cholera*)

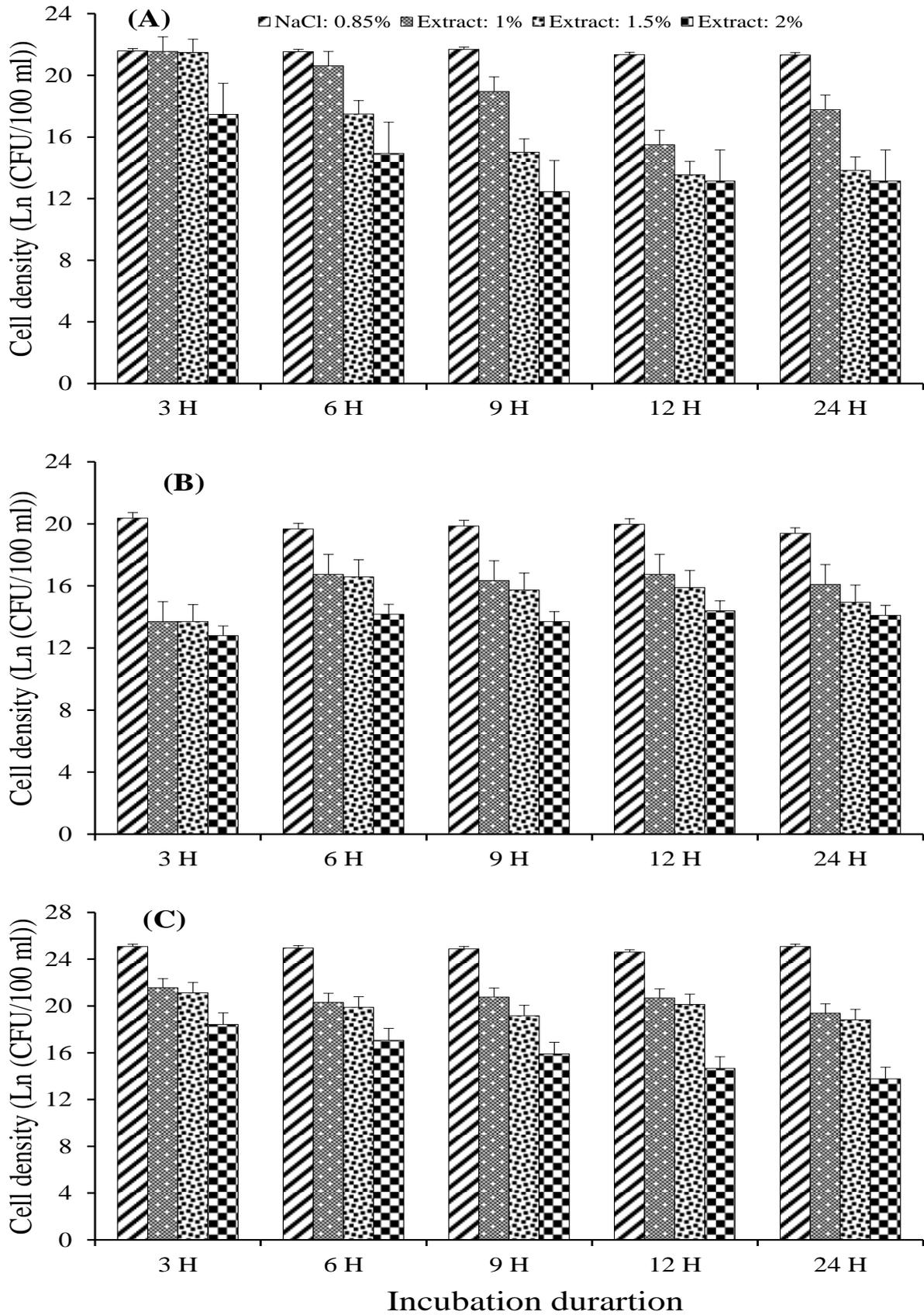


Figure 3: Temporal evolution of planktonic cells abundance in presence of *Eucalyptus* extract at temperature of 37°C ((A): Enteropathogenic *E. coli*, (B): *S. typhi*, (C): *V. cholera*)

Table 1: Percentage of inhibition (PI) of each bacterial species at each incubation temperature and after each incubation period

Bacterial species and incubation temperature with different extracts concentrations			Values of PI (%) after each incubation period				
Bacterial species	Incubation temperature	Extract concentration	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
Enteropathogenic <i>E. coli</i>	7°C	1%	6.52	3.17	23.97	8.96	12.50
		1.5%	5.25	16.67	51.44	62.69	82.35
		2%	45.48	11.11	56.19	77.61	86.03
	23°C	1%	8.45	55.82	43.63	90.70	9.29
		1.5%	25.54	99.79	64.45	95.04	90.65
		2%	32.86	99.96	67.92	99.84	99.78
	37°C	1%	2.54	60.36	93.45	99.71	97.12
		1.5%	9.04	98.25	99.87	99.96	99.94
		2%	98.36	99.86	99.99	99.97	99.97
<i>S. typhi</i>	7°C	1%	82.11	93.97	9.83	95.97	98.79
		1.5%	98.28	99.02	99.52	99.10	99.83
		2%	99.78	99.84	99.64	99.65	99.96
	23°C	1%	84.09	76.37	88.79	92.53	84.78
		1.5%	98.58	90.66	94.86	94.83	87.25
		2%	99.72	96.43	98.13	98.10	98.84
	37°C	1%	99.87	94.64	97.03	96.02	96.28
		1.5%	99.87	95.46	98.39	98.30	98.82
		2%	99.95	99.56	99.79	99.62	99.49
<i>V. cholerae</i>	7°C	1%	91.43	91.31	96.04	97.82	99.00
		1.5%	92.18	92.16	98.03	98.30	99.25
		2%	99.52	99.27	99.07	99.27	99.64
	23°C	1%	90.69	89.20	25.90	27.28	78.92
		1.5%	91.28	90.80	43.08	45.89	93.67
		2%	94.59	94.68	83.00	93.56	97.89
	37°C	1%	97.05	99.04	98.40	98.01	99.66
		1.5%	98.11	99.37	99.67	98.87	99.81
		2%	99.87	99.96	99.99	100.00	100.00

Estimation of Cell Inhibition Rate (CIR)

The straight Ln (number of CFUs) lines against incubation duration were plotted for each of the extract concentrations and incubation temperatures. The slope of each straight line was then considered as the cell inhibition rate (CIR) in each experimental condition. The CIR values are presented in Table 1. Considering enteropathogenic *E. coli* and all concentration extract, the CIR ranged respectively from 0.35 h⁻¹ to 0.44 h⁻¹, from 0.48 h⁻¹ to 0.76 h⁻¹ and from 0.81 h⁻¹ to 1.07 h⁻¹ when water was incubated at 7°C, 23°C and 37°C respectively. At each extract concentration, the highest CIR of enteropathogenic *E. coli* was noted at the highest incubation temperature (37°C). For *S. typhi* at the same incubation temperature, it varied from 0.58 h⁻¹ to 0.70 h⁻¹, from 0.65 h⁻¹ to 0.67 h⁻¹, and from 0.55 h⁻¹ to 0.76 h⁻¹ respectively. We registered the highest value of CIR (0.76 h⁻¹) at the highest incubation temperature (37°C). Those of *V. cholerae* ranged from 0.40 h⁻¹ to 0.44 h⁻¹, from 0.29 h⁻¹ to 0.48 h⁻¹, and from 0.40 h⁻¹ to 0.86 h⁻¹ respectively (Table 2). In most cases, the highest values of the CIR were registered at the highest extract concentrations for a given incubation temperature.

The CIR values thus increased with the increasing of the extract concentration and the incubation temperature (Table 2, Figure 4).

Table 2: Values of CIR (and regression coefficient) of cells at each experimental condition

Bacterial species and incubation temperature		CIR value (h ⁻¹) at each extract concentration and in the NaCl (0.85%) solution			
		NaCl : 0.85%	Extract : 1%	Extract : 1,5%	Extract : 2%
Enteropathogenic <i>E. coli</i>	7°C	0.34 (0.51)	0.35 (0.52)	0.42 (0.65)	0.44 (0.64)
	23°C	0.31 (0.39)	0.48 (0.64)	0.53 (0.36)	0.76 (0.48)
	37°C	0.33 (0.53)	0.81 (0.94)	1.07 (0.95)	1.05 (0.78)
<i>S. typhi</i>	7°C	0.34 (0.37)	0.58 (0.53)	0.69 (0.49)	0.70 (0.39)
	23°C	0.47 (0.57)	0.65 (0.64)	0.62 (0.46)	0.67 (0.42)
	37°C	0.44 (0.54)	0.55 (0.29)	0.63 (0.36)	0.76 (0.41)
<i>V. cholerae</i>	7°C	0.12 (0.60)	0.40 (0.77)	0.44 (0.79)	0.43 (0.47)
	23°C	0.34 (0.92)	0.29 (0.57)	0.32 (0.62)	0.48 (0.81)
	37°C	0.12 (0.74)	0.40 (0.58)	0.48 (0.62)	0.86 (0.79)

Table 3: Spearman correlation coefficients between evolution rate values of planktonic cell abundance and extract concentration, incubation period

Parameters considered	Bacteria species and incubation temperatures								
	Enteropathogenic <i>E. coli</i>			<i>S. typhi</i>			<i>V. cholerae</i>		
	7°C	23°C	37°C	7°C	23°C	37°C	7°C	23°C	37°C
Extract concentration	-0.66**	-0.52*	-0.72**	-0.84**	-0.87**	-0.63*	-0.69**	-0.64**	-0.83**
Incubation period	-0.59*	-0.09	-0.58*	-0.22	-0.22	0.35	-0.54*	-0.72**	-0.42

Ddl: 14, **: Most Significant correlation (p<0.01), *: Significant correlation (p<0.05)

Table 4: Risk values of probability related to the comparison between extract concentration, incubation temperature and the abundance mean of cells bacteria

Parameter considered	Bacteria species		
	Enteropathogenic <i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>V. cholerae</i>
Extract concentration (ddl: 2)	0.008**	0.000**	0.001**
Incubation temperature (ddl : 2)	0.001**	0.026*	0.001**
Incubation period (ddl : 4)	0.058	0.20	0.031*

** : Most Significant difference (P<0.01), * : Significant difference (P<0.05)

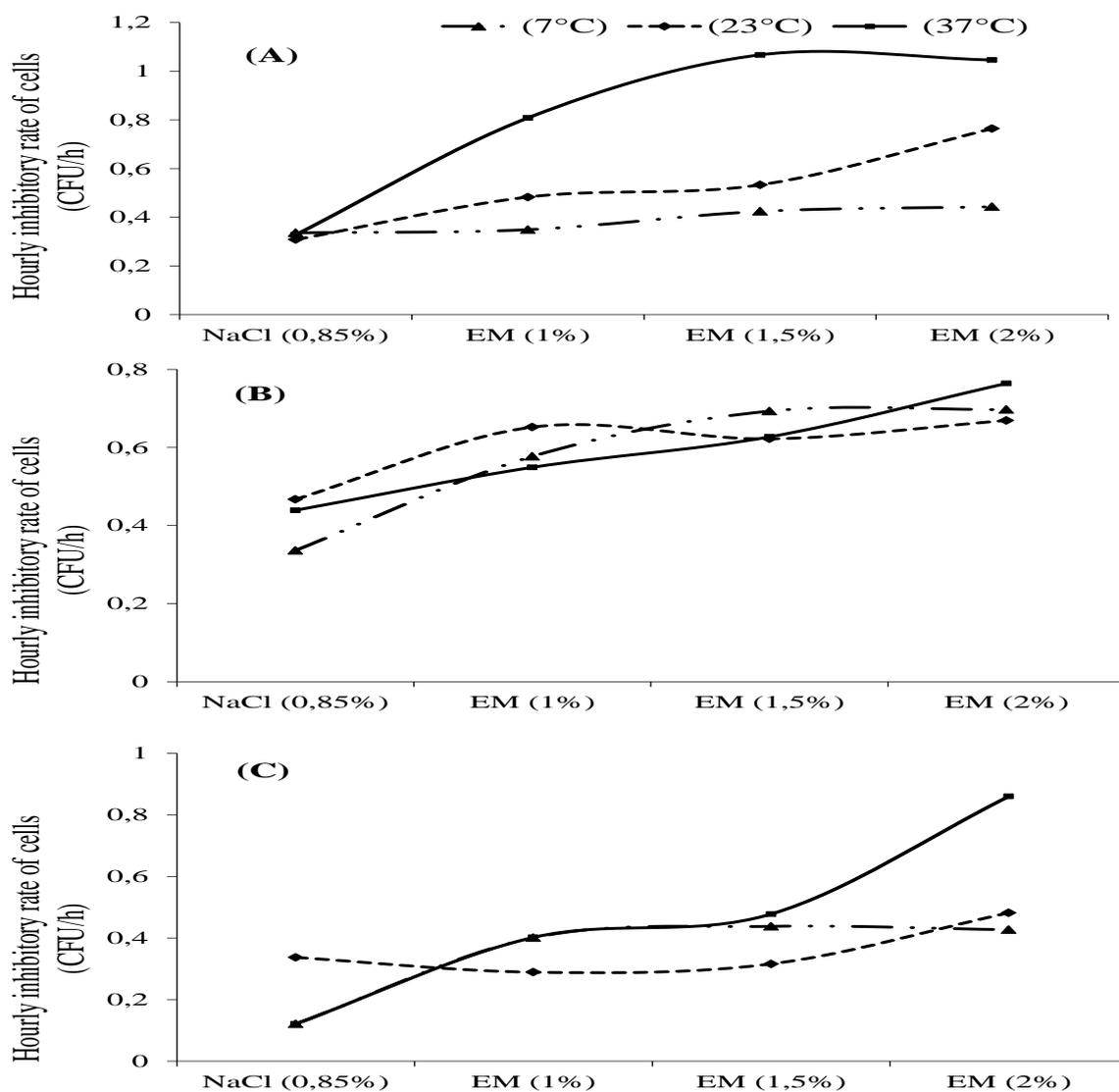


Figure 4: Evolution of the hourly inhibitory rate of cells with respect to each concentration of the *E. microcorys* leaves extract at different incubation temperature ((A): Enteropathogenic *E. coli*, (B): *S. typhi*, (C): *V. cholera*)

Relationship among the considered parameters

The relationships between the cells abundance and the extract concentration of *Eucalyptus microcorys* used at each experimental condition were evaluated. In most cases, it is noted abundance of cells at each incubation temperature significantly decreased ($P < 0.05$) with an increasing of the extract concentration (Table 3). An increasing in the extract concentration would significantly decrease the concentration of the cultivable cells. An overall correlation between bacterial abundances and incubation duration has been carried out considering the concentrations of extract used. It noted that incubation duration do not significantly influence the cultivability of *S. typhi* at each temperature in the presence of the *Eucalyptus microcorys* extract ($P < 0.05$) (Table 3). However, in the presence of this extract, incubation duration significantly impacted the cultivability of *V. cholera* and Enteropathogenic *E. coli* at the most of incubation temperatures used ($P > 0.05$).

Using the Kruskal-Wallis test, the comparison of the cell concentrations of each of bacteria species for the whole extract concentrations and incubation temperatures. The risk values of probability are presented on (Table 4). It shows that the abundance of cultivable cells of each bacteria species

significantly differ from one extract concentration to another and from one incubation temperature to another ($P < 0.05$). No significant difference was noted with incubation period except with *V. cholerae*.

Our study has showed evidence that extract of *Eucalyptus microcorys* has a bactericidal properties whose scope vary relatively according to the type of cell and the environmental conditions. For each of the species of bacteria used, the abundances of cultivable cells varied with respect to the incubation duration and to the concentration of extract. Cultivable cells happen to be relatively less abundant at temperatures 23°C and 37°C than 7°C throughout the study length that stretched from 9 h to 24 h (Figures 1-3). Planktonic cells of Enteropathogenic *E. coli*, *S. typhi* and *V. cholerae* have proven to be more resistant to bactericide properties of the *Eucalyptus microcorys* extract in psychrophilic conditions. The temperature seems to be the cause of the variation of bacterial abundances^[29]. It indirectly influences the productivity of bacteria by modifying the physical and chemical properties of the medium^[30].

An increase in temperature leads to an increase of enzymatic activity, leading to an increase in the speed of metabolic and biochemical reactions and so, impact on the bacteria productivity. The increase in reaction speed is inevitably accompanied by an increase in metabolic wastes, some of them relatively toxic. This may be the reason of the high inhibition rates observed at 23 and 37°C (Table 1). Lessard and Sieburth suggested that with low temperatures bacteria may have better living conditions since their metabolism is slowed down as well as the production of toxic wastes^[31].

It was observed that the concentration of extract increases alongside that the rate of inhibition cell, this with values ranging from 0.29 h⁻¹ to 1.07 h⁻¹. This variation of cell abundances could be due to the accumulation of certain chemical products which may turn to be toxic for the bacteria^[32]. The apparent inhibition may as well be due to the presence of several classes of phenolic products such as flavonoids, triterpenoids, alkaloids, tannins, Saponins present in our extract. Indeed, *Eucalyptus* species is known to produce numerous volatile compounds in large amounts, especially isoprenoids (referred as terpenes) which are accumulated in glands abundantly distributed throughout the leaf parenchyma and bark^[33, 34].

The variations in the percentages of inhibition with respect to incubation temperatures and incubation period have been noted (Table 1). This could be due to the variation of the antibacterial activities of bioactive compounds present in the extract of *Eucalyptus microcorys*. The plant extract contain bioactive compounds whose configuration or properties change with time, like flavonoids. In addition, the complexing properties (reversible and irreversible) of flavonoids may also explain the variations in the percentage of inhibition observed during the incubation period. The stability and the reactivity of secondary metabolites like flavonoids are commonly linked to their molecular structures^[35]. The reactivity of flavonoids dissolved in water leads to the molecular instability and this may vary with changes in environmental properties. Parameters such as light, pH, temperature, nature of the solvent, the presence of enzyme and oxidant can act on flavonoids^[35]. The fluctuation of the percentage inhibition seems to vary with respect to the bacterial species as well as the concentration of the extract, temperature and incubation time. The bactericidal activity of an antibacterial substance or antibiotic may be time-dependent (time-dependent bactericidal antibiotic) or concentration-dependent (dependent bactericidal antibiotic concentration)^[36]. It has also been suggested that antimicrobial agent is differentiated according to the selective toxicity, and bacteriostatic agent is often as inhibitors of protein synthesis and acts by binding to ribosomes. If its concentration is reduced, it would be released from the ribosome and the bacterial growth starts^[1].

The mechanism of the microbial resistance against antibacterial agents may also explain the lower inhibition percentages sometimes observed. Microorganisms can alter the chemical structure of the antibacterial agent in an inactive form and then change the target of the antibacterial agent^[1, 37]. The variation of inhibition percentages may also depends of the potential secondary metabolites which are present. Each of them may act solely or in synergetic with others. The impact magnitude of this may relatively vary with respect to the incubation duration and temperature.

Polyphenolic products, notably flavonoids and tannins are known for their toxicity against microorganisms. The mechanism by which these molecules act is certainly complex and may involve many action modes. On the enzymatic ground, the toxicity mechanism may be associated with the

inhibition of hydrolytic enzymes (the proteases and the carbohydrases), or other interaction for the inactivation of microbial adhesines, transport and envelop proteins^[38]. These molecules equally inhibit extracellular microbial enzymes, the sequestration of necessary substrates for microbial growth or the neutralization of elements such as iron^[39]. Moreover, les flavonoids devoid of free hydroxide group have a higher bactericide action as compare to those that possess this group, with a hydroxide group there is an increase in chemical affinity to lipid membrane. The targets of flavonoids are cell membrane^[38]. The antimicrobial activity depends on the presence of phenolic compound and probably on that of many secondary metabolites, the position and the number of hydroxide groups that it contains^[40, 41].

Tannins can give complex with proteins leading to the inactivation of enzymes, either directly by binding to the active site or indirectly by sterique congestion^[42]. Given their structural configuration, polyphenolic molecules may play a role in the degradation of cellular wall, destabilization of cytoplasmic membrane leading to the release of cellular components. The have a role in DNA and RNA synthesis^[43], as well as of protein and lipid and in mitochondrial function, the cell wall creation is also influence by these elements^[44, 45].

Flavonoids and alkaloids from *Eucalyptus sp* are known to possess antimicrobial activity^[46, 47]. The toxicity of flavonoids against micro organisms results from a non specific interaction such as hydrogen bonds with cellular wall proteins or enzyme, neutralization of metallic ions, inhibition of the bacterial metabolism, sequestration of substances necessary for the cell growth^[48]. Flavonoids such as myricetine impede the growth of multi-resistance bacteria *Burkholderia cepacia*, *Enterococcus vancomycine-resistante*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus epidermidis*^[49].

It has also been noted that for each of the considered bacteria, the concentration of cultivable cells varied most significantly with respect to the extract concentration ($P < 0.01$). The same observation was made with incubation temperature ($P < 0.05$), (Table 4). Globally, this study showed that extract aqueous of *Eucalyptus microcorys* has a real effect on cultivability of each bacteria studied, with the highest percentage inhibition observed at extract concentration 2% in the most cases. The bactericidal effect in aquatic environment was noted using extract aqueous of *Lantana camara*, *Cymbogon citratus* and *Hibiscus rosasinensis*^[9]. The same observations were noted with *E. microcorys* aqueous leaves extracts which can be used in the microbial treatment of water^[18]. Lutgen and Michels showed that the addition of *Artemisia annua* tea to contaminated water drastically reduces the bacterial load and levels lower than those obtained by boiling treatment method^[11].

Conclusion

In the aquatic environment containing *Eucalyptus microcorys* extract, cells cultivability is impacted. The CIR observed may be due to the presence of some chemical compounds contained in *E. microcorys* such as flavonoids, terpenoids, phenolics and alkaloids. Each of these secondary metabolites may act solely or in synergetic with others. The impact magnitude relatively varied with respect to the incubation temperature.

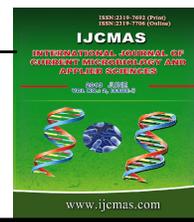
References

1. Madigan M. and Martinko J., Biologie des micro-organismes. Onzième edition: Univresité Carbondale de l'Illinois du Sud. Pearson Education. Pp. 1047 (2007).
2. OMS., Statistiques Sanitaires Mondiales, 149 (2009).
3. Faridabano N., Armelle P., Lan P., Tai T., Philippe S. and Yves, G., Dipstick for rapid diagnosis of Shigella flexneri 2a in stool. PLoS ONE 2(4), 361 (2007).
4. Meieirhofer R. and Landolt G., Factors supporting the susbstained use of solar water disinfection- Experiences from a global promotion and dissemination programme. Water and Sanitation in Development and Disaster Relief, Edinburgh, 164-170 (2008).
5. Nestor J., Lutgen P and Schosser P., Mise en œuvre de la méthode de stérilisation de l'eau SODIS en Colombie. Revue Technique Luxembourgeoise. 3, 151-152 (2006).

6. Noah Ewoti O.V., Nola M., MOUNGANG M., NOUGANG E M., KRIER F. and CHIHIB, N-E., Adhesion of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* on rock surface in aquatic microcosm: Assessment of the influence of dissolved magnesium sulfate and monosodium phosphate. *Research Journal of Environmental and Earth Sciences*. 3 (4), 364-374 **(2011)**.
7. WHO. Traditional medicine (Online) <http://www.int/medecine/areas/traditional/en/ondex.html> **(2008)**.
8. Bérubé-Gagnon J., Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Mémoire comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables. Québec. 76 **(2006)**.
9. Sunda M., Rosillon F. and Taba K., Contribution à l'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec des extraits de plantes. *European Journal of Water quality*. 39 (2), 199-209 **(2008)**.
10. Allahdin O., Gothard-Bassebe M., Biteman O., Foto E., Mabingui J. and Lutgen P., Essai de désinfection de l'eau de puits par *Artemisia annua* en République Centrafricaine. *Revue Technique Luxembourgeoise*. 3, 165-168 **(2008)**.
11. Lutgen P. and Michels B., Bactericidal properties of *Artemisia annua* tea and dosimetry of artemisinin in water by fluorescence under UV light. *Revue Technique Luxembourgeoise*. 2, 73-78 **(2008)**.
12. Ghalem B. and Mohamed B., Antibacterial activity of leaf essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2(10), 211-215 **(2008)**.
13. Gray A. and Flatt P., Antihyperglycemic actions of *Eucalyptus globulus* (*Eucalyptus*) are associated with pancreatic and extra-pancreatic effects in mice. *Journal of Nutrition*. 128, 2319-2323 **(1998)**.
14. Lee K. and Shibamoto T., Inhibition of malonaldehyde formation from blood plasma oxidation by aroma extracts and aroma components isolated from clove and eucalyptus. *Food and Chemical Toxicology*. 39, 1199–1204 **(2001)**.
15. Yamakoshi Y., Murata M., Shimizu A. and Homma S., Isolation and characterization of macrocarpals B-G antibacterial compounds from *Eucalyptus macrocarpa*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 56, 1570–1576 **(1992)**.
16. Nakayama R., Murata M., Homma S. and Aida, K., Antibacterial compounds from *Eucalyptus perriniana*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 54, 231–232 **(1990)**.
17. Bella, N., Ngo, L., Aboubakar, O., Tsala, D. and Dimo, T., Aqueous extract of *Tetrapleura tetraptera* (Mimosacea) Prevents Hypertension, Dyslipidemia and Oxidative Stress in High Salt-sucrose Induced Hypertensive Rats. *Pharmacologia*. 3 (9), 397-405 **(2012)**.
18. Tamsa Arfao A., Nola M., Lontsi Djimeli C., Nandjou Nguéfack R V., Nougang M E., Bricheux G. and Sime-Ngando T., Comparison of the inhibition of commensally and enteropathogenic *E. coli* strains in the presence of *Eucalyptus microcorys* leaves extract in aquatic microcosm. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*. 2(6), 80-96 **(2013)**.
19. Trease G. and Evans W., Orders and families of plant in pharmacognosy. Oxford University Press. 12, 343-383 **(1983)**.
20. Odebiyi O and Sofowora E., Phytochemical screening. *Nigeria medicinal plants*. *Loydia*, 41, 234-235 **(1978)**.

21. Le Minor L. and Véron M., Bactériologie Médicale. Flammarion ed., Paris, 1170 (1989).
22. WHO., Global Water Supply and Sanitation Assessment. Report. (<http://www.who.int/docstore/water-sanitationhealth/globassessment>) (2003).
23. Marchal N., Bourdon J. and Richard C., Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Paris: Doin, 14 (1991).
24. Rompré A., Servais P., Baudart J., De-Roubin M. and Laurent P., Detection and enumeration of coliforms in drinking water: Current methods and emerging approaches. Microbiol. Methods, 49, 23-29 (2002).
25. Holt J., Krieg N., Sneath P., Staley J. and Williams S., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th Edn., Lipponcott Williams and Wilkins, Philadelphia, 787 (2000).
26. Namour P., Autoépuration des rejets organiques domestiques. Nature de la matière organique résiduaire et son effet en rivière. Thèse de Doctorat Université de Lyon, 99 (1999).
27. Bailey N., Statistical methods in biology. Hodder and Stoughton, London, 216 (1981).
28. Tofallis C., Least squares percentage regression. J. Modern Applied Statistical Methods, 7, 526-534 (2009).
29. Davey K., A prédictive model for combined température and water activity on microbial growth during the growth phase. Appl. Bactehol. 67, 483-488 (1989).
30. Mauguin G., Delion N. and Corsin P., La température de l'eau, un paramètre important pour la production d'eau destinée à la consommation humaine. L'eau, l'Industrie, les Nuisances, 27, 23-29 (2004).
31. Lessard E. and Siebuth J., Survival of natural sewage populations of enteric bacteria in diffusion and bath chambers in the marine environment. Appl. Environ. Microbiol, 45, 950-959 (1983).
32. Nola M., Nlep, R., Servais, P., Kemka, N., Zebaze Togouet, S., Krier, F., Chihib, N-E., Hornez, J-P & Njine T., Assessment of the effects of sulfate and nitrate on the temporal evolution of *Klebsiella oxytoca* and *Staphylococcus aureus* abundance under shaking conditions, in aquatic microcosm. Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science, 23, 197-212 (2010).
33. Moleyar and Nasrasimham., Antifungal activity of some essential oil components. Food Microbiol. 3, 331-336 (1986).
34. Farah A., Satrani B., Fechtal M., Chaouch A., and Talbim., Composition chimique et activités antibactérienne et antifongique des huiles essentielles extraites des feuilles d'*Eucalyptus camaldulensis* et de son hybride naturel (clone 583). Société Botanique de France, Acta bot. gall, Lettres botaniques. Acta Bot. Gallica. 148 (3), 183-190 (2001).
35. Chebil L., Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine.229 (2006)
36. Benyoussef S., Médicaments Anti-infectieux en Médecine Vétérinaire. ENMVST, 93 (2011)
37. Lavigne J. P., Antibiotiques et résistance. Bactériologie. Faculté de Médecine de Montpellier-Nîmes. Bulletin N° 8, 3 (2007).
38. Milane H., La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Strasbourg, 268 (2004).

39. Kil H., Seong E., Ghimire B., Chung I., Kwon S., Goh E., Heo K., Kim M., Lim J., Lee D. and Yu C. Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Food Chem*, 115, 1234-1239 **(2009)**.
40. Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. and Abdelly, C. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities .*C. R. Biologies*. 331, 372-379 **(2008)**.
41. Cowan M., Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*. 12 (4), 564-570 **(1999)**.
42. Zimmer N. and Cordesse R., Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRA Prod. Anim.* 9 (3), 167-179 **(1996)**.
43. Zhang H., Kong B., Xiong Y. and Sun X., Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 °C. *Meat Science*. 81, 686-692 **(2009)**.
44. Balentine C., Crandall P., O'Bryan C., Duong D. and Pohlman F., The pre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science*.73, 413-421 **(2006)**.
45. Gangoué P., Caractérisation des bêta-lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales. Thèse de doctorat. Liège, 127 **(2007)**.
46. Alma M., Nitz S., Kolimannsberger H., Digra K., Efe F. and Yilmaz N., Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the Gum of Turkish Pistachio (*Pistaciavera* L). *J. Agri food Chem*. 52(12), 3911-3914 **(2004)**.
47. Sartorelli P., Marquioreto A., Amaral- Baroli A., Lima M. and Moreno P., Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. *Phytother. Res*. 21(3), 231-233 **(2006)**.
48. Karou D., Dicko M., Simporé J., Yameogo S., Sanon S. and Traoré, A., Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*. 4 (8), 823-828 **(2005)**.
49. Hodek P, Trefil P. and Stiborova, M., Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*,139, 1-21 **(2002)**.



Original Research Article

Comparison of the inhibition of commensally and enteropathogenic *E. coli* strains in the presence of *Eucalyptus microcorys* leaves extract in aquatic microcosm

A.Tamsa Arfao¹, M. Nola^{1*}, C. Lontsi Djimeli¹, R.V. Nandjou Nguéfack¹, M.E. Nougang¹, G.Bricheux², and T. Sime-Ngando²

¹University of Yaoundé 1, Faculty of Sciences, General Biology Laboratory, Hydrobiology and Environment Research Unit, P.O. Box 812 Yaoundé, Cameroon.

²Laboratoire 'Microorganismes: Génome & Environnement', UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, Complexe Scientifique des Cézeaux, 24 avenue des Landais, BP 80026, 63171 Aubière Cedex, France

*Corresponding author e-mail: moise.nola@yahoo.com

ABSTRACT

Keywords

E.coli;
commensally
strain;
entero-
pathogenic
strain;
inhibition;
E. microcorys
extract.

This study aimed to assess the inhibition of the commensally and enteropathogenic *E. coli* strains in aquatic microcosm under various concentrations of *Eucalyptus microcorys* leaves extract incubated under different temperatures. The extract concentrations were 1%, 1.5% and 2%. The incubation temperatures were 7°C, 23°C, 37° and 44°C. The abundance of the colony forming units (CFU) of each of the cell strains in the presence of *Eucalyptus* extract, decreased in most cases with respect to the increasing of the concentration of aqueous extract and the incubation temperature. The highest CAIRs were registered at 2% of aqueous extract for both cell strains. The highest CAIRs of the commensally *E. coli* strains were 4.176.h⁻¹, 5.722.h⁻¹, 5.865.h⁻¹ and 6.319.h⁻¹ registered under the incubation temperature 7°C, 23°C, 37°C and 44°C respectively. For the Enteropathogenic *E. coli* strains they were 3.547.h⁻¹, 6.112.h⁻¹, 8.365.h⁻¹ and 7.027.h⁻¹ under the same incubation temperatures respectively. The cell inhibition percentage varied from one strains to another and with respect to the extract concentration and temperature incubation. With each *E. coli* strains, the highest cell inhibition percentage was registered under 37°C at 1%, and under 23°C and 37°C at 1.5% of the extract concentration. At the extract concentration 2%, the highest values of the inhibition percentages were noted with most of the incubations temperatures. A significant difference was noted between the inhibition rate of commensally and enteropathogenic strains (P<0.05).

Introduction

Most regions of the world are confronted with a serious water crisis. But the real tragedy is its effect on the daily life of the

water borne diseases (WWDR, 2003). These diseases are generally due to the presence of numerous pathogenic bacteria

in water such as *Escherichia coli*. Some strains of this bacterium are the commensally of the digestive tract of man and most warm-blooded animals that they colonizes as from the first hours of the birth (Le Minor and Véron, 1989). Frequently isolated from the digestive tract and stools of mammals, *E. coli* is a Gram negative bacillus. It belongs to the group of faecal coliforms and the family of *Enterobacteriaceae*. Other species of *Escherichia* genus such as *E. vulneris*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* and *E. blattae* have been recently described (Baraduc *et al.*, 2000; Holt *et al.*, 2000).

Several strains of *E. coli* are frequently pathogenic (Holt *et al.*, 2000). Since its discovery, *E. coli* was naturally susceptible to antibiotics active against gram-negative bacilli (Jehl *et al.*, 2003). However, the rapid emergence of many bacterial strains insensitive to therapeutic antibiotics makes this a real problem of public health. Many studies have reported several cases of infections caused by contact or consumption of water contaminated by pathogenic strains of *E. coli* (Hörman *et al.*, 2004; Hörman and Hänninen, 2006). Angulo *et al.*, (1997) reported that in many parts of the world, several cases of infections due to consumption of contaminated water by pathogenic bacteria, sometimes causing epidemics which are often followed by loss of human life.

Since thousands of years, humanity has used various plants found in its environment, in order to treat and to take care of all kinds of illnesses. These plants represent an immense reservoir of potential compounds assigned to secondary metabolites that have the advantage of having a large chemical and structural diversity and they possess a very

large range of biological activities. The active principles of plants are the essential components of the majority of our drugs and products of care (Hans, 2007). In spite of the multiple progress of modern medicine, there is a net interest of phytotherapy. More than 80% of the world's populations have resorted to traditional pharmacopy to face the problems of health (Farnsworth *et al.*, 1986). In fact, of the 300 000 plant species counted on the planet more than 200 000 species found in tropical Africa have medicinal virtues (Millogo *et al.*, 2005). Medicinal and aromatic plants are widely used as medicine and constitute a major source of natural organic compounds (Seenivasan *et al.*, 2006). Research data has demonstrated that the extracts exhibit various biological effects, such as antibacterial, antihyperglycemic and antioxidant activities (Lee and Shibamoto, 2001; Gray and Flatt, 1998).

Recently, attention has been focused on disinfection of water with plants extracts (Sunda *et al.*, 2008). Aqueous extract of *Lantana camara*, *Cymbogon citratus* and *Hibiscus rosa-sinensis* have shown a bactericidal effect in aquatic milieu (Sunda *et al.*, 2008). The results obtained by Voss-Rech (2011) indicated that the vegetal extracts tested present potential antimicrobial activity with efficient properties in the inhibition of *Salmonella*, especially vegetal extracts from the Myrtaceae family.

Eucalyptus belongs to Myrtaceae family. It is an aromatic plant and native to Australia. The genus *Eucalyptus* contains about 700 species (Chaix, 2002). The essential oils of the kind *Eucalyptus* sp are especially indicated against the respiratory illnesses (De Billerbeck *et al.*, 2002).

It is used internally and externally as an expectorant, and to treat infections and fevers. It is also used topically to treat sore muscles and rheumatism (Armando *et al.*, 2009). Many studies showed that *Eucalyptus cinerea* has antimicrobial activity against many bacteria (Franco *et al.*, 2005). The antibacterial activity of essential oils from leaves of *Eucalyptus globulus* and *E. camaldulensis* indicated the potential usefulness as a microbiostatic, antiseptic or as a disinfecting agent against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* (Ghalem and Mohamed, 2008).

Although commensally *Escherichia coli* is widely found in the environment, pathogenic strains including enteropathogenic, enterotoxigenic, enteroinvasive and enteroaggregative are often found in water (Nougang *et al.*, 2011). Less information is available about the impact of the aqueous extract of medicinal plant on commensally and pathogenic strains of this bacterium. The main objective of this study is to investigate the effects of aqueous extract of *Eucalyptus microcorys* leaves on culturability of commensally and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in aquatic system and then compare cell inhibition rate and the impact of incubation temperature and incubation duration.

Materials and Methods

Qualitative phytochemical screening

Phytochemical sifting has been done according to the usual protocols (Rizk, 1982; Trease and Evans, 1983; Parekh and Chanda, 2007). It ascertained the presence of polyphenol, triterpenoids, sterols, alkaloids, saponins, catechics and gallic

tannins, Flavonoids, Anthraquinones and Anthocyanines. This phytochemical screening revealed the absence of catechic tannins and lipids, and the presence of other compounds.

Bacterial isolation and storage

The bacteria used were the commensally and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains. These strains were chosen because of their importance in hygiene and sanitation (Le Minor and Veron, 1989; WHO, 2003). These bacteria were isolated from an urban stream in the equatorial region of Cameroon. The *E. coli* cells were isolated on Endo agar medium (Bio-Rad, France) using membrane filtration technique (Rodier, 1996; APHA, 1998). Their identification was performed according to standard method (Holt *et al.*, 2000). For the identification and characterization of the commensally and enteropathogenic strains, only metallic green sheen CFUs were considered and re-growth on the standard agar medium according to Holt *et al.*, (2000).

Ten minutes before the experiments, 10 mL of human blood (group A+ Rh blood) was collected in Falcon tubes. Human blood cells were then harvested by centrifugation at 2515,5 g for 5 minutes at 10 °C, and washed three times using 10 mL of sterilized phosphate buffer (pH = 7.4). The pellets were then resuspended in 1 mL of sterilized phosphate buffer. Characterization tests were done in two steps (Okeke *et al.*, 2000; Yasmeen *et al.*, 2009). Firstly, haemagglutination test was used to characterize the potential pathogenic strains. This characterization was done by agglutination of human red blood cells with strains of isolated *E. coli*. The test was done by emulsifying on a sterile slide one solution consisting of

washed (3 times) human red blood cells (group A+ Rh blood), phosphate buffer (pH = 7.4), a pinch of α -D-mannose, and 2 to 3 colonies collected overnight from cultures of *E. coli* grown at 37°C on Mueller Hinton agar. The slide was rotated manually for 2 min and the result was macroscopically observed for haemagglutination. When the suspension remains consistent after 2 min, the test is negative and the strains is considered as the commensally. It is positive if the suspension agglutinates and the strains is considered as potentially pathogenic.

Secondly, antisera *E. coli* (Bio-Rad, France) were used to confirm the different potential pathogenic strains noted after haemagglutination tests. The antisera *E. coli* used were the Nonavalent, Trivalent I (O111+O55+O26), Trivalent II (O86+O119+O127), Trivalent III (O125+O126+O128), and the Trivalent IV (O114+O124+O142) (Bio-Rad, France).

For the preparation of bacterial stocks, a colony forming unit (CFU) of each strain from standard agar medium was inoculated into 100 ml of nutriment broth (Oxford) and incubated for 24h at 44°C. After these cells were harvested by centrifugation at 8000 rev/min for 10 min at 10°C and washed twice with NaCl (8.5 g/l) solution. Each pellet was re-suspended in 50 ml of NaCl solution. After homogenization, 1ml of this was then transferred into 500 ml of sterile NaCl solution (0.85%) contained in an Erlenmeyer flask and stocked.

Sampling of *E. microcorys* and crude extract obtainment

Fresh leaves of *E. microcorys* were harvested in Yaoundé, center region (Cameroon) and dried up at room

temperature (23±2 °C) in the laboratory for 30 days. Thereafter, leaves were ground into powder. Fifty grams of the obtained powder were mixed with 100 ml of warm distilled water and heated immediately up to boiling point; thirty minutes later, the mixture was left to settle, the supernatant was removed by filtration. The filtrate obtained constituted the decoction. The latter was dried in an oven at 45°C (Bella et al., 2012). The method used in this experiment was selected for its closeness to that of herbalists. The obtained crystals were used to prepare the crude extract. The output of the extraction was 22.43% (±0.5%). The output of the extraction was the ratio of the mass of crystals on the mass of the plant powder (50g) used. Three ranges of extract concentration 1%, 1.5%, 2% were prepared while using sterile physiological water. Every range was first filtered with the aid of a sterile cotton, then on Whatman membrane, and finally on membrane in nitrate of cellulose of 0.45µm porosity (De Souza *et al.*, 1994).

Experimental setup

80 flasks of 250ml were used for this study. They were organized in four series: A, B, C and D; each series of flask was divided into four subgroups of 5 flasks each. All 20 flasks of series A contained 200ml of physiological water (NaCl: 0.85%) each and were used as control. The three other series contained 200ml of the extract at different concentrations 1%, 1.5% and 2% for series' B, C and D respectively. One ml of the bacterial stock was then transferred into each flask. T₀, the initial time, corresponded to the point of time when the transfer of stock was done. At T₀, the cell concentration was 27x10⁸ CFU/ml. The first subgroup of each group of A, B, C and D were

incubated at 7 ± 1 °C. The second subgroups were incubated at 23 ± 1 °C and the third and final subgroups of each group were respectively incubated at 37 ± 1 °C and 44 ± 1 °C. The incubations lasted 3, 6, 9, 12 and 24 hours. The counting of bacteria was done in each flask through the surface spreading method on agar medium, this at the end of each incubation period. The Endo agar (Bio-Rad) was used for EPEC and commensally *E. coli*. Results were expressed in the number of units that constituted a colony in 100 ml water sampled.

Data analysis

Data were first described using histogram to show the evolution of cell abundance of each bacteria strains in the presence of different extract concentrations of *Eucalyptus microcorys* at different temperatures. In the same time, the percentage of inhibition was calculated and also illustrated with histogram. The percentage inhibition (*PI*) of the bacteria was calculated using the following formula as described by Garcia-Ripoll *et al.*, (2009) and Edima *et al.*, (2010):

$$PI = \left(\frac{N_0 - N_n}{N_0} \right) \cdot 100$$

Where N_0 = initial number of bacteria; N_n = remaining bacteria after the action of *Eucalyptus* extract.

To estimate speed of inhibition, a straight regression line was calculated. A linear regression line has an equation of the form $y = ax+b$, where x is the explanatory variable and y is the dependent variable, a is the slope of the regression line, and b is the intercept point of the regression line on the y axis (the value of y when $x = 0$) (Bailey 1981; Tofallis, 2009). The slope of

each regression line was considered as the cell apparent inhibition rate (CAIR). Statistical analysis was performed using SPSS version 12.0. The correlation coefficients among considered parameters were assessed using Spearman correlation test. The comparison of the abundances of cells of the both strains considered was carried out using Kruskal-Wallis, Mann Witney and ANOVA tests.

Result and Discussion

Temporal variation of the cell abundance

In the absence of *Eucalyptus microcorys* extract (Control), the abundance of commensally *Escherichia coli* varied between 22.20 and 23.24 Ln(CFU/100 ml); 22.22 and 23.13 Ln(CFU/100 ml); 22.35 and 23.32 Ln(CFU/100 ml) and between 22.17 and 22.93 Ln(CFU/100 ml) at the incubation temperatures 7°C, 23°C, 37°C and 44°C respectively. In the presence of extract concentration of *Eucalyptus microcorys*, the abundance of commensally *Escherichia coli* ranged from 18.23 to 21.46 Ln(CFU/100 ml) at the extract concentration 1%. The highest and lowest cell densities were observed at 7°C and 44°C respectively (Figure 1). The extract concentrations 1.5% and 2% induced a variation of cell abundance from 15.52 to 21.37 Ln(CFU/100 ml) and from 13.91 to 20.36 Ln(CFU/100 ml) respectively. A relative reduction of planktonic cells was noted in most cases in the presence of *Eucalyptus microcorys* extract. The importance of this reduction depends on concentration of aqueous extract and the incubation at 37°C. When the extract concentration increased, the cell abundance greatly decreased (Figure 1).

In the same condition, the culturability of EPEC was influenced by aqueous extract of *Eucalyptus microcorys*. In the control, the concentration of cells fluctuated between 20.76 and 21.71 Ln(CFU/100 ml) (Figure 2). The extract concentrations 1% and 1.5% induced respectively a variation of cell abundance from 12.44 to 21.55 Ln(CFU/100 ml) and 12.44 to 21.48 Ln(CFU/100 ml). In the presence of extract concentration 2%, the cell count ranged from 12.44 to 21.08 Ln(CFU/100 ml). The lowest cell abundance was observed in most cases at 44°C. The same observation was made as for commensally *Escherichia coli*.

Cell's inhibition assessment

The percentage of cell inhibition was calculated to assess the influence of each parameter considered (aqueous extract concentration, incubation temperature and duration) on the culturability of each of the two bacteria strains. Figures 3 and 4 show that the culturability of commensally *E. coli* was rapidly inhibited by aqueous extract. This inhibition speed was highest with extract concentration 2% after 1 day. With the 3 extract concentrations, the inhibition percentages of commensally *E. coli* at 7° and 23°C were higher than 92 and 95% respectively. The inhibition of culturability was 100% after 6hours of incubation at 37 and 44°C (Figure 3).

Concerning EPEC with the extract concentration 1%, the percentage of inhibition ranged from 3 to 24%, 8 to 91% and 3 to 100% at 7, 23 and 37°C respectively (Figure 4). At 44°C, the speed of inhibition was higher than 98%. With 1.5% of extract concentration, 100% of cell inhibition at 37°C after 6h and at 44°C for the whole incubation duration was observed. The highest rate of inhibition was observed at 44°C in all incubation

periods. The same observation was made with 2% extract concentration. On the whole, aqueous extract of *Eucalyptus microcorys* influenced the culturability of both bacteria studied with 100% of inhibition.

Considering the first 12 hours incubation period, the straight Ln (number of CFUs) lines against exposure duration were plotted. The slope of each regression line was then considered as the hourly cell apparent inhibition rate (CAIR). It appeared that in the presence of extract solution of *Eucalyptus microcorys*, the CAIRs of commensally *E. coli* was respectively 2.962 h⁻¹, 2.951 h⁻¹, and 4.176 h⁻¹ with 1%, 1.5% and 2% of extract concentration at 7°C. At 23°C and 37°C of incubation, the CAIRs ranged respectively from 3.642 h⁻¹ to 5.722 h⁻¹ and from 2.661 h⁻¹ to 5.865 h⁻¹. The speed value was 6.319 h⁻¹ with the extract concentration 2% at 44°C (Table 1). Considering EPEC and all extract concentrations, the CAIR ranged respectively from 2.785 h⁻¹ to 3.547 h⁻¹, 3.861 h⁻¹ to 6.112 h⁻¹, 6.465 h⁻¹ to 8.537 h⁻¹ and from 6.226 h⁻¹ to 7.027 h⁻¹ at 7°C, 23°C, 37°C and 44°C respectively. In addition, a relative increase of the hourly CAIR with increasing extract concentration was noted in most cases (Table 1).

Relationship and comparison between the considered parameters

The relationships were assessed between cell abundances and extract concentrations (1%, 1.5% and 2%) of *Eucalyptus microcorys* at each incubation temperature when considering the whole incubation periods. With the both *E. coli* strains a negative and significant correlation was noted between the incubation duration and cell abundance (P<0.05) (Table 2). The same results was registered between the

Figure .1 Temporal variation of the abundance of planktonic commensally *E. coli* strains in the presence of *Eucalyptus microcorys* extract at different temperatures (**A**: Control; **B**: Extract concentration 1% ; **C**: Extract concentration 1.5% and **D**: Extract concentration 2%).

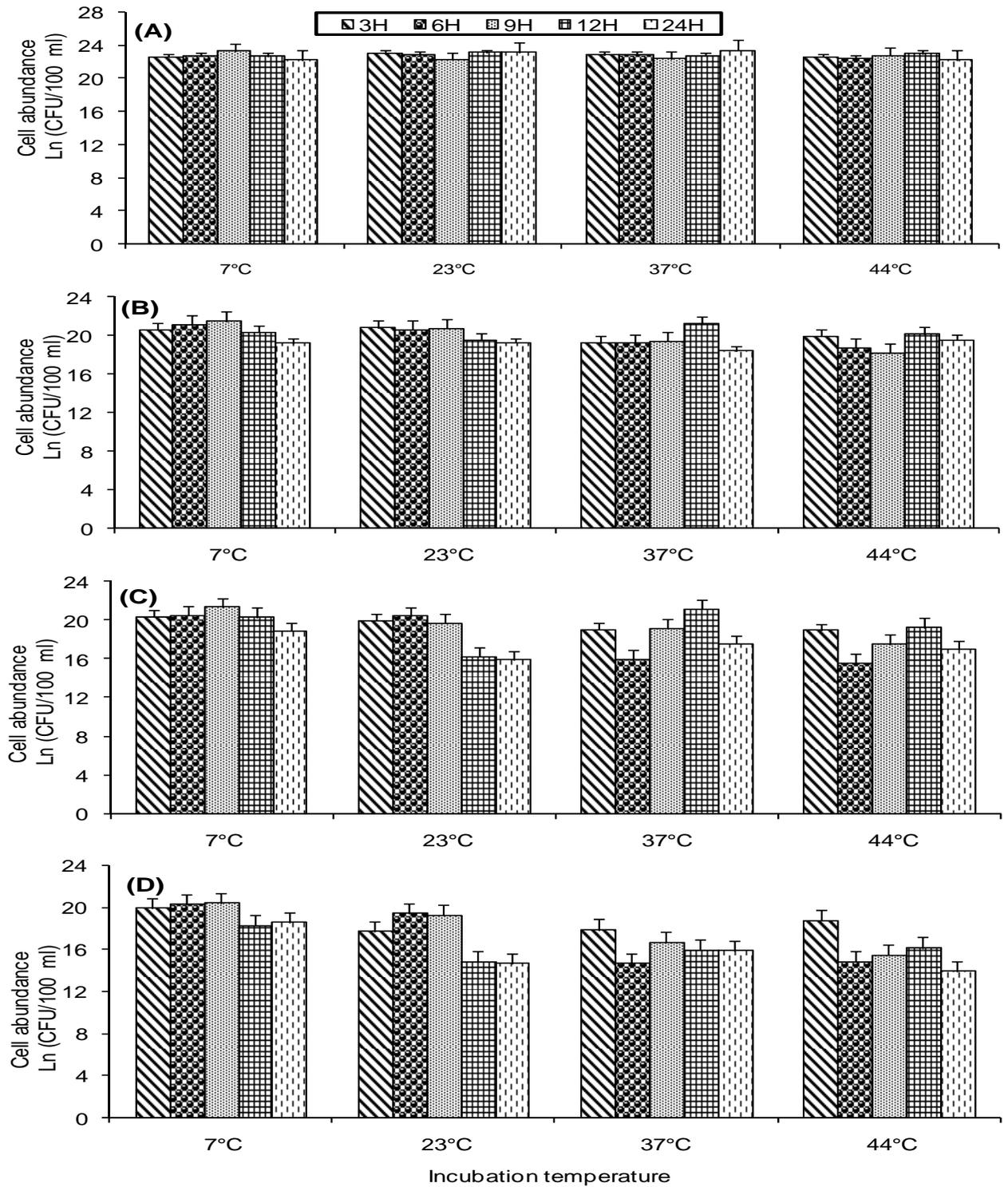


Figure .2 Temporal variation of the abundance of planktonic Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains in presence of *Eucalyptus microcorys* extract at different temperatures (A: Control; B: Extract concentration 1% ; C: Extract concentration 1.5% and D: Extract concentration 2%).

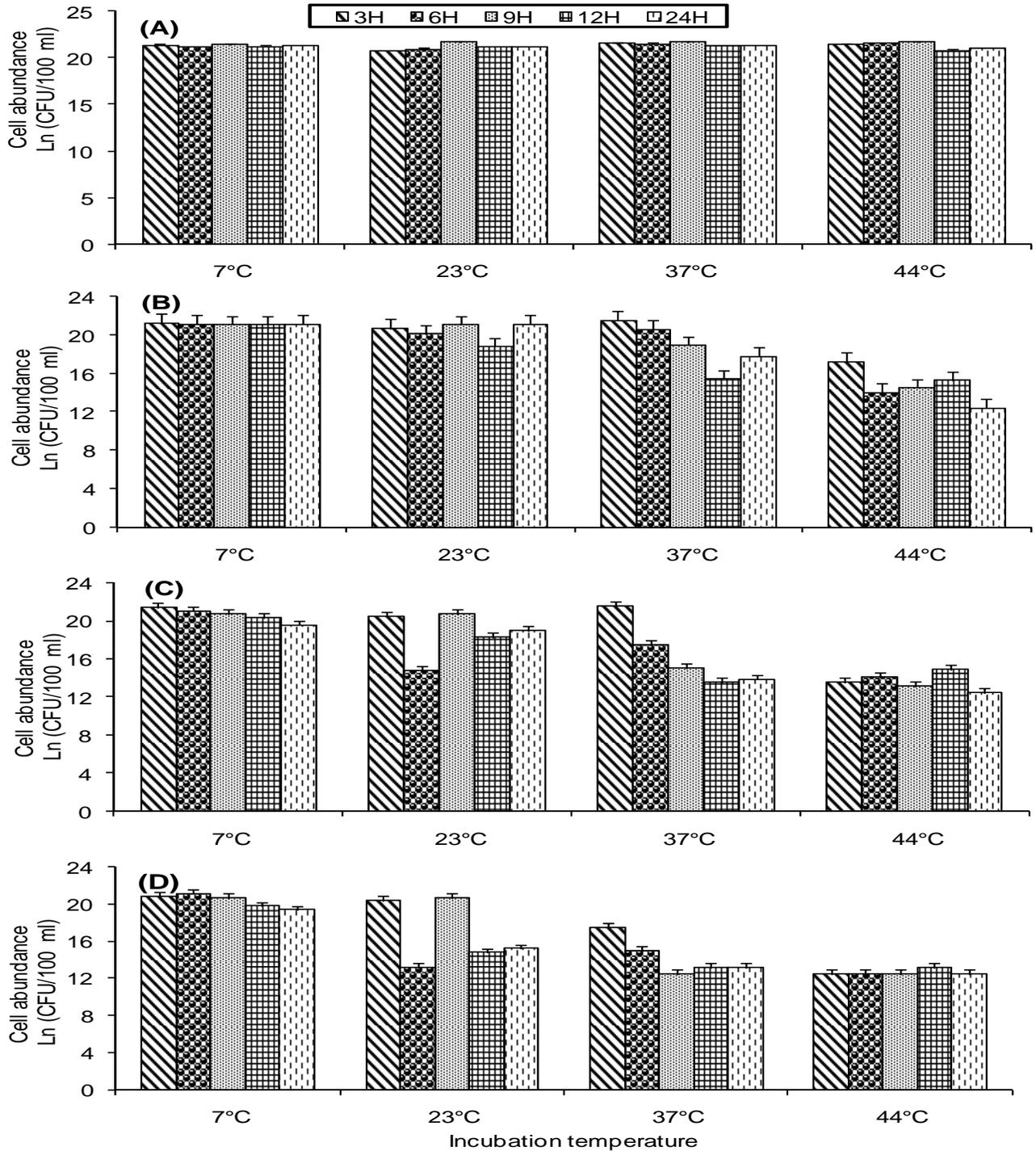


Figure.3 Temporal variation of the percentage of inhibition of commensally *E. coli* strains at each incubation temperature and after each incubation period (A: Extract concentration 1%; B: Extract concentration 1.5% and C: Extract concentration 2%)

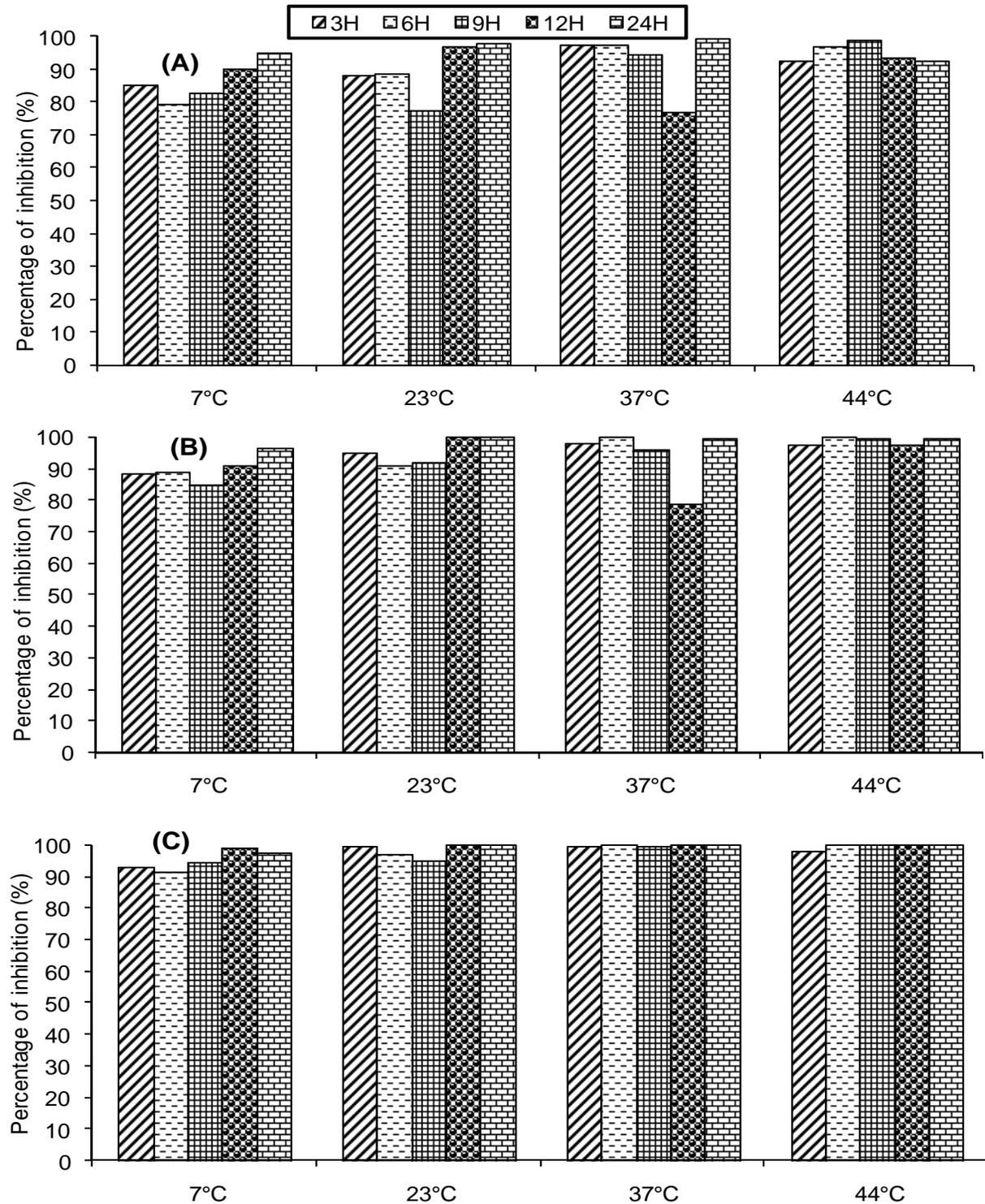


Figure .4 Temporal variation of the percentage of inhibition of Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains at each incubation temperature and after each incubation period (**A**: Extract concentration 1%; **B**: Extract concentration 1.5% and **C**: Extract concentration 2%).

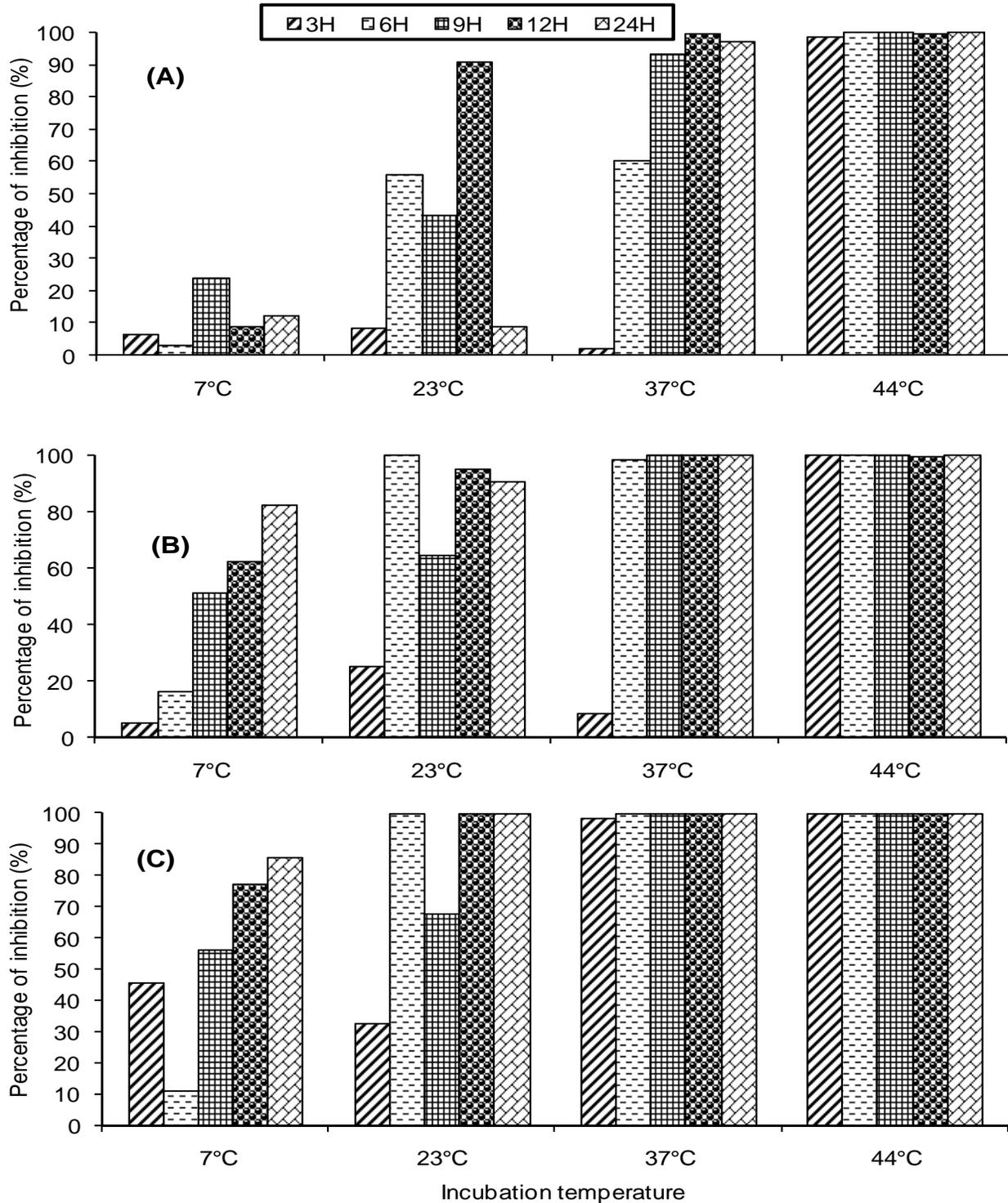


Table.1 Values of Cell Apparent Inhibition Rate (CAIR) (and regression coefficient) of cells at each experimental condition.

Bacterial strains and incubation temperatures		Hourly values of CAIR			
		NaCl (0.85%)	Extract (1%)	Extract (1.5%)	Extract (2%)
Commensally <i>E. coli</i>	7°C	1.758 (0.424)	2.962 (0.507)	2.951 (0.463)	4.176 (0.643)
	23°C	1.936 (0.499)	3.642 (0.645)	5.450 (0.786)	5.722 (0.642)
	37°C	2.054 (0.551)	2.661 (0.266)	2.700 (0.174)	5.865 (0.559)
	44°C	1.769 (0.400)	3.727 (0.463)	4.141 (0.363)	6.319 (0.627)
Enteropathogenic <i>E. coli</i> (EPEC)	7°C	2.690 (0.506)	2.785 (0.522)	3.394 (0.654)	3.547 (0.641)
	23°C	2.465 (0.392)	3.861 (0.637)	4.264 (0.359)	6.112 (0.476)
	37°C	2.625 (0.528)	6.465 (0.942)	8.537 (0.955)	8.365 (0.776)
	44°C	2.843 (0.574)	6.619 (0.596)	6.226 (0.436)	7.027 (0.462)

Table.2 Correlation coefficients between cell abundances and extract concentrations at each incubation temperature when considering the whole incubation periods

Bacterial strains	Correlation coefficients			
	7°C	23°C	37°C	44°C
Commensally <i>E. coli</i>	-0.548*	-0.680**	-0.738**	-0.756**
Enteropathogenic <i>E. coli</i> (EPEC)	-0.662**	-0.520*	-0.719**	-0.655**

Number of observations: 15; * :P<0,05 ; ** : P<0,01

Table.3 Correlation coefficient between the cell abundances and the incubation durations at each of the incubation temperature when considering the whole extract concentrations

Bacterial strains	Correlation coefficient			
	7°C	23°C	37°C	44°C
Commensally <i>E. coli</i>	-0.546*	-0.633*	-0.055	-0.131
Enteropathogenic <i>E. coli</i> (EPEC)	-0.590*	-0.087	-0.584*	-0.271

Number of observations: 15; *: P<0,05 ; **: P<0,01

Table.4 Correlation coefficient between cell abundances and incubation temperatures at each extract concentration when considering the whole incubation periods

Bacterial strains	Correlation coefficient		
	1%	1.5%	2%
Commensally <i>E. coli</i>	-0.496*	-0.516*	-0.609**
Enteropathogenic <i>E. coli</i> (EPEC)	-0.791**	-0.753**	-0.859**

Number of observations: 20 ; *: P<0,05 ; **: P<0,01

cell abundances and the incubation duration at each of the incubation temperature when considering the whole extract concentrations, with the commensally strains at 7°C and 23°C, and with enteropathogenic strains at 7°C and 37°C (Table 3). For the both *Escherichia coli* strains studied, a negative correlation was noted between cell abundance and incubation temperature at each extract concentration when considering the whole incubation periods (Table 4).

The comparison between the average abundances of commensally *E. coli* and that of Enteropathogenic *E. coli* showed a significant difference when considering all the extract concentrations and incubation temperatures (P<0.05). The Mann Whitney test confirmed this significant difference of cell abundances between 7 and 23°C, 7 and 37°C, 7 and 44°C and 23 and 44°C; and between 1 and 2% of

extract concentrations (P>0.01). A comparison between the values of CAIRs of commensally and enteropathogenic *E. coli* was performed using ANOVA test. A significant difference (P<0.05) was noted under different temperatures.

The present study aimed at assessing the antimicrobial activity of aqueous extract of *Eucalyptus microcorys* leaves on cultivability of *Escherichia coli* (commensally and enteropathogenic strains) in water. The relative inhibition of the cell cultivability was observed under our experimental conditions. The investigations showed that the cell abundance varied according to the incubation temperature and the increase of *Eucalyptus* extract concentrations (Figures 1 and 2). Temperature seems a factor of a great importance. It acts on chemical reactions of microbial metabolism although this is with respect of bacterial enzyme properties (Regnault, 2002).

In psychrophilic conditions as under 7°C and even 23°C, the EPEC strains showed a resistance at the extract concentrations 1% and 1.5%. Under this range of temperatures, the toxic products are slowly metabolized by mesophilic bacteria (Lessard and Sieburth, 1983) and their metabolism would be relatively low.

In the other respect, the increase of the temperature is generally correlated to the increase of the speed of metabolic and biochemical reactions and hence the toxic products are metabolized, thus the high percentages of inhibition is observed at 44°C with these two bacterial strains with all extract concentrations (Figures 3 and 4). It has been noted that at 7° C, 23° C and 37°C, the enteropathogenic *E. coli* strains seems to resist the effects of the extract concentrations 1% and 1.5% in contrary to the commensally strains with which the relatively higher percentages were observed in the same conditions. Enteropathogenic *E. coli* strains resistance observed may be due to natural or acquired resistance to antibiotics. Different susceptibility of the serovars may be probably related to defense mechanisms, since it is well known that bacteria can develop protecting mechanisms such as changes in the permeability and structure of the cell wall, production of inhibitory enzymes and alteration of the antibacterial molecules (Trabulsi and Altherthum, 2005). This could explain the difference observed between CAIRs of both bacteria strains studied.

A negative and significant correlation ($P < 0.05$) between incubation duration and cell abundance was observed, while a high significant and negative correlation ($P < 0.01$) was noted with the incubation temperature and extract concentration. The increase of hourly CAIRs was correlated

with the increasing of the extract concentration in most cases. The phytochemical screening revealed the presence of many compounds like polyphenols, flavonoids, tannins, sterols, terpenes, alkaloids and saponins in *Eucalyptus microcorys* aqueous extract. The inhibition observed on the culturability of both strains may be due to the presence of flavonoids and tannins.

Polyphenols including flavonoids and tannins are recognized due to their antimicrobial properties although this could vary from bacterial species to another (Santos and Mello, 2003; Loguercio *et al.*, 2005; Voravuthikunchai, 2005; Raven *et al.*, 2007). The mechanism of toxicity may be related to the inhibition of hydrolytic enzymes (proteases and carbohydrase) or other interactions leading to inactivate microbial adhesins, transport proteins and to change cell membrane properties (Cowan, 1999). Cowan (1999) assumed that flavonoids lacking the free hydroxyl groups have antimicrobial activity more than those that are filled, which leads to an increase of the chemical affinity for membrane lipids.

The phenolic compounds also entail the inhibition of the extracellular enzymes, the substrate sequestration needed for the microbial growth or the chelation of metals such as iron (Milane, 2004). The tannins also have potential to form complexes with proteins thus causing the inactivation of the enzymes, either directly by fixing to the active sites, or indirectly by steric clutter created by the fixing of tannins molecules on the enzyme (Zimmer and Coordesse, 1996). While taking into account the structural and molecular constitution, the polyphenols also play a role in the degradation of the cell wall, the disruption of the cytoplasmic membrane,

thus causing a loss in the cell composition. They also influence the synthesis of DNA and RNA (Zhang et al., 2009), proteins, lipids and the mitochondrial function (Balentine et al., 2006), as well as the formation of complexes with the cell wall (Gangoué Piéboji, 2007).

The Student "t" test showed a significant difference between extract concentration 1% and 2% for commensally *E. coli* strains and between 7° and 37°C, 7° and 44°C, and 23° and 37°C for the EPEC strains (P<0,05). The pathogenic strains differ from the commensally with the virulence genes that are most often located on plasmids. These virulence factors are antibiotics inactivating enzymes which confer a mechanism of bacterial resistance.

The results obtained during this study show a real force of inhibition of the aqueous extract of *E. microcorys* towards the *E. coli* strains studied. The culturability of these germs could not only be influenced by the concentration of the extract, but also by the temperature and the period of incubation. The high percentages of inhibition observed during the study could be due to the presence of the secondary metabolites in the plants extracts. Besides, the effectiveness of these extracts could be due to the combined action of all the secondary metabolites which act together. The results obtained lead to check how the *E. microcorys* aqueous leaves extracts can be used in the microbial treatment of water as *Lantana camara*, *Cymbopogon citratus* and *Hibiscus rosa-sinensis* which has been recommended in the disinfection of aquatic environment by Sunda et al., (2008).

References

- Angulo, F., S. Tippen, D. Sharp, B. Payne, C. Collier, J. Hill, T. Barrett, R. Clark, E. Geldreich, H.D. Donnell and Swerdlow, D. 1997. A Community Waterborne Outbreak of salmonellosis and the effectiveness of a Boil Water Order. American J. Public Heal. 87 (4): 580-584.
- APHA., 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA, pp. 1220.
- Armando, C., Y. Hussein and Rahma. 2009. Evaluation of the Yield and the antimicrobial activity of the essential oils from: *Eucalyptus globulus*, *Cymbopogon citratus* and *Rosmarinus officinalis* IN MBARARA DISTRICT (Uganda) Bch Rev. Colombiana cienc. Anim. 1(2): 240-249.
- Bailey, N., 1981. Statistical methods in biology. Hodder and Stoughton, London, pp. 216.
- Balentine, C., P. Crandall, C. O'Bryan, D. Duong and Pohlman, F. 2006. The pre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. Meat Sci. 73 : 413-421.
- Baraduc, R., A. Darfeuille-Michaud, C. Forestier, C. Jallat, B. Joly and Livrelli, V. 2000. *Escherichia coli* et autres *Escherichia*, *Shigella*. Précis de bactériologie clinique. 59: 1115-1129.
- Bella, N., L. Ngo, O. Aboubakar, D. Tsala and Dimo, T. 2012. Aqueous extract of *Tetrapleura tetraptera* (Mimosaceae) Prevents Hypertension, Dyslipidemia and Oxidative Stress in High Salt-sucrose Induced Hypertensive Rats. Pharmacologia. 3 (9) : 397-405.

- Chaix, G., 2002. Etude des flux de gènes dans un verger à graines d'Eucalyptus grandis à Madagascar. Thèse de doctorat de l'Ecole Doctorale de l'Université de Montpellier II : Biologie Intégrative, Montpellier, pp. 274.
- Cowan, M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clini.Microbiolo. Rev.* 12 (4) : 564-570.
- De Billerbeck, V.-G., C. Roques, P. Vanière and Marquier P. 2002. Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygienes.* X(3) : 248-251.
- De Souza, C., K. Koumaglo and Gbeassor, M. 1994. Contribution à l'étude des procédés de conservation des denrées alimentaires d'origine animale en milieu tropical : Evaluation de l'action antimicrobienne de quelques plantes aromatiques et épices. *Microb. Hyg. Alim.* 6(16) : 3-12.
- Edima, H., L. Tatsadjieu, C. Mbofung and Etoa, F-X . 2010. Anti-bacterial profile of some beers and their effect on some selected pathogens. *African. J. Biotechnol.* 9(36): 5938-5945
- Farnsworth, N.R., O. Akerele, A.S. Bingel, D.D. Soejarto and Guo, Z. 1986. Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bull. de l'organisation. mondiale de la santé.* 64 (2): 159-164.
- Franco, J., T. Nakashima, L. Franco and Boller, C. 2005. Chemical composition and antimicrobial *in vitro* activity of the essential oil *Eucalyptus cinerea* F. Mull. ex Benth., Myrtaceae, extracted in different time intervals. *Rev. bras. farmacogn.* 15(3) : 191-194.
- Gangoué, P., 2007. Caractérisation des bêta-lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales. Thèse de doctorat. Liège. pp. 127.
- Garcia-Ripoll, A., A.M. Amat, A. Arques, R. Vicente, M.M. Ballesteros Martin, J.A. Sanchez Perez, I. Oller and Malato, S. 2009. Confirming *Pseudomonas putida* as a reliable bioassay for demonstrating biocompatibility enhancement by solar photo-oxidative processes of a biorecalcitrant effluent. *J. Hazard. Mater.* 162: 1223-1227.
- Ghalem, B., and Mohamed, B. 2008. Antibacterial activity of leaf essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*. *African. J. Pharm. Pharmacol.* 2(10): 211-215.
- Gray, A.M., and Flatt, P.R. 1998. Antihyperglycemic actions of *Eucalyptus globulus* (*Eucalyptus*) are associated with pancreatic and extra-pancreatic effects in mice. *J. Nutrit.* 128 : 2319-2323.
- Hans, W. K., 2007. 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terre édition. pp.6-7.
- Holt, J., N. Krieg, P. Sneath, J. Staley and Williams, S. 2000. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 9th Edn., Lipponcott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp.787.
- Hörman, A., and Hänninen ML. 2006. Evaluation of the lactose Tergitol-7, m-Endo LES, colilert 18, readycult coliforms 100, water-check-100, 3M petrifilm EC and dry cult coliform test methods for detection of total coliforms and *Escherichia coli* in water samples. *Water Res.* 40: 3249-3256.
- Hörman, A., R. Rimhanen-Finne, L. Maunula, C.H. Von Bonsdorff, N. Torvela, A. Heikinheimo and Hänninen, M.L. 2004. *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., noroviruses, and indicator organisms in surface water in South western Finland, 2000- 2001. *Appl.*

- Environ. Microbiol. 70: 87-95.
- Jehl, F., M. Chomarar, M. Weber and Gerard, A. 2003. De l'antibiogramme à la prescription. Paris : édition Biomerieux. pp 22.
- Le Minor, L., and Véron, M. 1989. Bactériologie Médicale. Flammarion ed., Paris. pp 1170.
- Lee, K., and Shibamoto, T. 2001. Inhibition of malonaldehyde formation from blood plasma oxidation by aroma extracts and aroma components isolated from clove and eucalyptus. Food. Chem. Toxicol. 39: 1199-1204.
- Lessard, E., and Siebuth, J. 1983. Survival of natural sewage populations of enteric bacteria in diffusion and bath chambers in the marine environment. Appl. Environ. Microbiol. 45: 950-959.
- Loguercio, A., A. Battistin, A. Vargas, A. Henzel and Witt, N. 2005 Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). Ciência Rural. 35(2): 371-376.
- Milane, H., 2004. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Strasbourg. pp 268.
- Millogo, H., I.P. Guisson, O. Nacoulma and Traore, A. S. 2005. Savoir traditionnel et médicaments traditionnels améliorés. Colloque du 9 décembre. Centre européen de santé humanitaire -Lyon.
- Nougang, M.E., M. Nola, E.Djuikom, O.V. Noah Ewoti, L.M. Mounsang and Ateba Bessa, H. 2011. Abundance of faecal coliforms and pathogenic *E. coli* strains in groundwater in the coastal zone of Cameroon (central Africa), and relationships with some abiotic parameters. Curr. Res.J. Biol.Sci. 3(6): 622-632.
- Odebiyi, O., and Sofowora, E. 1978. Phytochemical screening. Nigeria medicinal plants. *Loydia*. 41: 234-235.
- Okeke, I., N. Lamikanra, A. Steinruck and Kaper, J.B. 2000. Characterization of *Escherichia coli* strains from cases of childhood diarrhea in provincial South western Nigeria. J. Clinical. Microbiol.. 38: 7-12.
- Parekh, J., and Chanda, S. V. 2007. In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plant. Turkish. J. Biol. 31: 53-58.
- Raven, P. H., R.F. Evert and Eichhorn, S. E. 2007. Biologia vegetal. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. pp 728.
- Regnault, Jean-Pierre., 2002. Eléments de microbiologie et d'immunologie. Editions Décarie. Montréal. pp 601.
- Riberau-Gayon, J., and Peynaud, E. 1968. Les composés phénoliques des végétaux, Traité d'œnologie, Dunod éd., Paris. pp.254.
- Rizk, A.M., 1982. Constituents of plants growing in Qatar, Fitoterapia. 52 (2) : 5 - 42.
- Rodier, J., 1996. L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer, chimie, physicochimie, microbiologie, biologie, interprétation des résultats, Paris (France), Dunod. pp.1384
- Santos, S.C., and Mello, J.C.P. 2003. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O. (Orgs). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, pp.615-683.
- Seenivasan, P., J. Manickkam and Savarimuthu, I. 2006 *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complemen. Alter. Med. 6:39.

- Sunda, M., F. Rosillon and Taba, K. 2008. Contribution à l'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec des extraits de plantes. *European. J. Water quality.* 39 (2): 199-209.
- Tofallis, C., 2009. Least squares percentage regression. *J. Mod. Appl. Statist. Method.* 7: 526-534.
- Trabulsi, L.R., and Altherthum, F. 2005. *Microbiologia.* 4.ed. São Paulo:Atheneu. pp 718.
- Trease, G., and Evans, W. 1983. *Orders and familys of plant in pharmacognosy.* Oxford University Press. 12: 343-383.
- UNESCO, WWDR (World Water Development Report), 2003. Edition UNESCO, Division des Sciences de l'eau, pp.36.
- Voravuthikunchai, S.P., T. Sirirak, S. Limsuwan, T. Supawita, T. Iida and Honda, T. 2005. Inhibitory effect of active compounds from *Punica granatum* on Verocytotoxin production by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *J. Health Sci.* 51: 590-596.
- Voss-Rech, D., C.S. Klein and Techio, V. H. 2011. Antibacterial activity of vegetal extracts against serovars of *Salmonella*. Gerson Neudi ScheuermannI Gilberto RechII Laurimar Fiorenti Ciência Rural, Santa Maria. 41(2): 314-320
- WHO., 2003. Global Water Supply and Sanitation Assessment. Report. (<http://www.who.int/docstore/water-sanitationhealth/globassessment>).
- Yasmeen, K., K.C. Sneha, D.N. Shobha, L.H. Halesh and Chandrasekhar M.R., 2009. Virulence factors, Serotypes and Antimicrobial Suspectibility pattern of *Escherichia coli* in urinary Tract Infections. *Al Ameen. J. Med. Sci.* 2(1): 47-51.
- Zhang, H., B. Kong, Y.L. Xiong and Sun, X. 2009. Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 °C. *Meat. Sci.* 81 : 686-692.
- Zimmer, N., and Cordesse, R. 1996. Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRA Prod. Anim.* 9 (3) : 167-179.

Detachment of adhered enteropathogenic *Escherichia coli* cells from polythene fragments immersed in aquatic microcosm using *Eucalyptus microcorys* extract (Myrtaceae)

Antoine Tamsa Arfao^{1,2}, Chrétien Lontsi Djimeli¹, Olive V. Noah Ewoti¹, Geneviève Bricheux³, Moïse Nola^{1,*} and Téléphore Sime-Ngando³

¹ Hydrobiology and Environment Research Unit, University of Yaoundé 1, Faculty of Sciences, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon

² Laboratoire de Microbiologie et Biotechnologie Saint Jérôme Polytechnique, Institut Universitaire Catholique Saint Jérôme de Douala, Cameroon

³ Laboratoire 'Microorganismes: Génome & Environnement', UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, Complexe Scientifique des Cézeaux, 24 avenue des Landais, BP 80026, 63171 Aubière Cedex, France

* Corresponding author: Moïse Nola; e-mail: moise.nola@yahoo.com

Received: 08 April 2016

Accepted: 24 April 2016

Online: 02 May 2016

ABSTRACT

This study aimed to assess the effect of the concentration of an aqueous extract of *Eucalyptus microcorys* on the detachment of enteropathogenic *E. coli* cells previously adhered on polythene surface. The results showed that the extract causes a detachment of cells adhered and the importance of detachment depends on incubation duration of substrate in the plant extract solution. The higher value of detached cell abundance, after 3 hours duration of cell adhesion process (DCAP), was 8.72 (Ln (CFU/cm²)) and the percentage of detached cells reached value of 11.2% when the bacteria cells were harvested from the lag growth phase. For cells coming from exponential growth phase, after 9h of DCAP, the abundance of cells detached reached value of 8.95 (Ln (CFU/cm²)) and the higher percentage of detached cells was 68.8%. The values of 48.5% and 55.6% were noted when cells harvested from stationary and decline growth phases respectively. The cell detachment process observed could be due to the presence of some secondary metabolites such as flavonoids, triterpenoids, alkaloids, tannins which can disrupt physicochemical characteristics of bacteria surface. They seem to have a significant impact on exopolysaccharids matrix secreted by bacteria during the cell adhesion process. An overall significant difference (P<0.01) was observed between the mean abundances of detached cells for each extract concentrations at different growth stages.

Keywords: *E. microcorys* extract, *E. coli* cells, detachment, adhesion, cell growth phase.

1. INTRODUCTION

Freshwater is approximately 0.6% of water resources on the planet and it is most exploited for the human feeding [1]. It can be superficial or subterranean. Surface water is exposed to various pollutants including suspended solids, microorganisms from soil, industrial and domestic waste. Due to these pollutants, lack of potable drinking water is a major factor of risk for mortality and morbidity, notably those due to diarrheal diseases [2]. Although the number of people

with access to good water quality has increased worldwide since 2000, rapid population growth impedes these improvements in many countries. Nearly one billion people still lack access to safe drinking water, half of whom live in the African and Pacific regions [2]. Bacteria known to be responsible for the microbiological water pollution included *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Yersinia*, *Campylobacter* and *Vibrio* species [3].

The bacterium *Escherichia coli* belongs to the group of fecal or thermotolerant coliforms [4]. Its presence in water usually indicates the deterioration of its bacteriological quality, due to the contamination by other microorganisms which could be pathogenic for human [5]. For nearly a decade, numerous epidemics attributed to pathogenic *E. coli* strains have been reported in the world [6-8]. In the East Region of Cameroon, from December 1997 to April 1998, 298 peoples have contracted a gastroenteritis epidemic caused by *E. coli* O157: H7 [9]. The contamination is made orally by ingestion of contaminated water or food.

Most physical and chemical methods used in the disinfection of bacteria-polluted water don't always yield positive results due to the fact that germs develop the ability to form complex ecosystems called biofilms, providing them with an increased resistance to disinfectants [10]. A biofilm is a set of microcolonies surrounded by a highly hydrated matrix, consisting of anionic and exopolysaccharides (EPS) [11]. The biofilms formation in the aquatic environment can be reversible or irreversible and results from interactions between the microbial and solid surface; it is often modulated by the physicochemical properties of water [12]. Several studies have been carried out on bacterial adhesion to substrates in the aquatic environment. It appears that this process also depends on the cell physiology and surface properties as well as the chemical characteristics of water and solid particle [13].

Disinfection is widely used to eliminate biofilms; unfortunately it is often ineffective [14]. Microorganisms in adhered state are often more resistant to antimicrobials than those in planktonic [15]. Numerous studies have been conducted in view of highlighting the inactivation of various waterborne pathogens by various disinfectants, including sodium hypochlorite, hydrogen peroxide, ozone, and chlorine dioxide [11]. Water disinfection by plant extracts has been suggested as a new alternative for treating water at the household level. The use of plants for therapeutic purposes is a common practice for millennia. This has been a resurgence of interest with the first research on the antibacterial properties of plant extracts in an attempt to provide a scientific basis for these empirical practices [16].

Plants have been used for the treatment of diseases all over the world before the advent of modern clinical drugs and are known to contain substances that can be used as precursors for the synthesis of useful drugs [17]. Over 50 % of modern drugs are of natural origin and most of them play an important role in the development of novel drugs in the pharmaceutical industries [18]. In Cameroon as in other developing countries, many plants used in traditional medicine against infectious diseases have been reported [19-21]. These works, achieving a microbiological and chemical screening, are of great importance. They contribute to

the orientation of people to plants with a real healing power, giving them medicines at low cost. Many studies have shown that medicinal plants contain many bioactive compounds such as flavonoids capable to act on planktonic bacteria [22]. It has also been indicated that *Eucalyptus microcorys* aqueous leaves extracts acts against planktonic bacterial metabolism [23]. Few data is available on the effect of medicinal plants extracts on bacteria adhered to organic or inorganic substrates immersed in water. The main purpose of this study was to assess in aquatic microcosm the effect of the aqueous extract of *Eucalyptus microcorys* on enteropathogenic *Escherichia coli* cells in adhered state, with respect to the cell growth phase.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Harvest of *E. microcorys* and crude extract preparation

Fresh leaves of *E. microcorys* were harvested in Yaounde (Cameroon, Central Africa) and dried up at laboratory temperature ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) for 30 days. Thereafter, leaves were ground into powder. Fifty grams of the obtained powder was mixed with 100 ml of warm distilled water and heated up to boiling temperature. Thirty minutes after the mixture was left to settle, the supernatant was removed by filtration using sieve and whattman filter membrane. The filtrate obtained constitutes the decoction. This was then dried in an oven at $45-50^{\circ}\text{C}$ until evaporation (3 days) [23, 24]. The obtained crystals were used to prepare the crude extract. The output of the extraction (ratio between the weight of crystals and the weight of the powder used) was 22.43% ($\pm 0.5\%$). Three ranges of extract concentration (1%, 1.5%, 2%) have been prepared using sterile NaCl (0.85%) solution. Each extract solution was then filtered firstly through sterile cotton, then using Whattman filter membrane and cellulosic membrane (porosity 0.45 μm).

2.2 Qualitative phytochemical screening

Phytochemical screening was made according to the published protocols [25, 26]. It ascertained the presence or absence of polyphenol, triterpenoids, sterols, alkaloids, saponins, gallic and catechic tannins, flavonoids, anthraquinones and anthocyanines.

2.3 Choice of substrate used and contact-angle measurements

The choice of high density polythene as adsorbent substrates was based to its relatively high resistance to shocks, high temperatures and ultra-violet rays [27, 28], its wide use in household utensils (barrels, buckets, cans) for water supply and the drinking water distribution networks. In addition, the hydrophobic character of polythene makes it a favorable adhesion of bacteria material [28].

The contact-angle measurements were made using a contact-angle goniometer with a drop-shape analysis system (Easy Drop, Kruss). For these measurements, a 3 μL sessile droplet was placed on a substrate surface, under ambient conditions, with a computer controlled

syringe. Operation was monitored with the video capture system. Once equilibrium was reached, the image of the droplet profile was saved. The computer with the "Drop Shape Analysis" software provides the contact-angle on the surface of the drop at right and left, and calculates the average. For the very low values of the angles (lower than 25°), the image of the drop was magnified on the computer, and then photographed. The angles were then measured manually using a protractor [29].

2.4 Bacterial isolation, characterization and storage

The bacterial specie used was enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strain. This bacterium was isolated from an urban stream in the equatorial region of Cameroon on Endo agar medium (Bio-Rad, France), using membrane filtration technique [30]. Metallic green sheen CFUs were then considered and re-growth on the standard agar medium. Its identification was then performed according to standard method [4].

Ten minutes before the experiments, 10 ml of human blood (group A+ Rh blood) were collected in Falcon tubes. Human blood cells were harvested by centrifugation at 2515,5 g for 5 minutes at 10°C, and washed three times using 10 ml of sterilized phosphate buffer (pH = 7.4). The pellets were then resuspended in 1 ml of sterilized phosphate buffer. Characterization tests were done in two steps [31]. Firstly, haemagglutination test was used to characterize the potential pathogenic strains. This characterization was done by agglutination of human red blood cells with strains of isolated *E. coli*. The test was done by emulsifying on a sterile slide one solution consisting of washed (3 times) human red blood cells (group A+ Rh blood), phosphate buffer (pH = 7.4), a pinch of α -D-mannose, and 2 to 3 colonies collected overnight from cultures of *E. coli* grown at 37°C on Mueller Hinton agar. The slide was rotated manually for 2 minutes and the result was macroscopically observed for haemagglutination. When the suspension remains consistent after 2 minutes, the test is negative and the strains is considered as the commensally. It is positive if the suspension agglutinates and the strain is considered as potentially pathogenic [4, 5].

Secondly, antisera *E. coli* (Bio-Rad, France) were used to confirm the different potential pathogenic strains noted after haemagglutination tests. The antisera *E. coli* used were the Nonavalent, Trivalent I (O111+O55+O26), Trivalent II (O86+O119+O127), Trivalent III (O125+O126+O128), and the Trivalent IV (O114+O124+O142) (Bio-Rad, France) [23].

For the preparation of bacterial stocks, a colony forming unit (CFU) of each strain from standard agar medium was inoculated into 100 ml of nutriment broth (Oxford) and incubated for 24h at 37°C. After these cells were harvested by centrifugation at 8000 rev/min for 10 min at 10°C and washed twice with NaCl (0.85%) solution. Each pellet was re-suspended in 50 ml of NaCl solution. After homogenization, 1ml of this

was then transferred into 500 ml of sterile NaCl solution (0.85%) contained in an Erlenmeyer flask and stocked.

2.5 Assessment of the cell growth phase

Three sets of 15 test tubes each containing 10 ml of sterile tryptone (Biokar) solution were used. Tubes of each set were labeled t_0 , t_2 , t_4 , t_6 , t_8 , t_{10} , t_{12} , t_{14} , t_{16} , t_{18} , t_{20} , t_{22} , t_{24} , t_{26} and t_{28} [32]. Prior to the experiments, the stock frozen vial containing cells was thawed at room temperature. The culture (300 μ l) was then transferred into 10 ml of nutrient broth (Oxford) and incubated at 37°C for 24 hours. After, cells were then harvested by centrifugation at 8000 rpm for 10 min at 10 °C and washed twice with sterile NaCl (0.85%) solution. The pellet was then re-suspended in 10 ml of sterilized solution containing NaCl (0.85%) solution. After dilution, 100 μ l was added to 100 ml of sterilized NaCl (0.85%) solution, in each of the 15 tube containing sterilized peptone solution.

Cell suspensions in the 3 tubes coded t_0 were immediately analyzed. Those in tubes coded t_2 , t_4 , t_6 ... t_{28} were incubated for 2, 4, 6... 28 hours at 37°C. The colony Forming Units (CFUs) was counted after each incubation period. The average of the CFUs after each incubation period was calculated from the results of the triplicate and the log (CFU) also calculated. The straight log (number of CFUs) curve against storage duration was plotted and then assimilated as the cell growth curve. The cell growth phases were then assessed.

2.6 Cell adhesion and detachment protocol

On the basis of previous studies, rectangular shaped (0.9 cm wide, 3.24 cm length and 0.9 cm in height) of polythene fragments with 13.28 cm² of the total surface were prepared [33] and were immersed in thirty flasks of 250 ml divided in three subgroups A, B and C. Each set, noted A_1 , A_2 A_9 for the first subgroup, B_1 , B_2 B_9 for the second subgroup and C_1 , C_2 C_9 for the third subgroup, contained 99 ml of NaCl solution (NaCl: 0.85%). Meanwhile, the controls were made and were coded A_0 , B_0 and C_0 . The experiments were conducted in static water conditions to promote the adhesion of bacterial cells to the surfaces of the plates [34]. The whole was then autoclaved.

Prior to the experiments, stocks frozen vial containing EPEC were thawed at room temperature. Then 100 μ l of the culture was transferred into test tubes containing 10 ml of nutrient broth (Oxford) and incubated at 37°C for 24 hours. Cells from a specific growth phase were then harvested by centrifugation at 8000 rpm for 10 min at 10°C and washed twice with sterile NaCl solution (0.85%). The pellets were then re-suspended in 50 ml of sterilized NaCl solution (0.85%). 1 ml of the suspension was added to 199 ml of sterilized NaCl solution (0.85 %) contained in an Erlenmeyer flask. The initial concentration of bacteria (data at $t = 0$) in each solution was adjusted to 6×10^8 CFU/ml by reading the optical density at 600 nm using a spectrophotometer (DR 2800) followed by culture on agar [34].

After each incubation duration (3h, 6h and 9h), the fragment was removed from Erlenmeyer flask A₀, B₀ and C₀ and introduced into 10 ml of sterilized NaCl solution (0.85%) as control. The fragments of each set were removed and were introduced into test tubes containing 10 ml of *Eucalyptus microcorys* extract at different concentration. Those of A₁, B₁ and C₁, after 3h of cell adhesion process in NaCl solution (0.85%), were removed and introduced during 1 hour incubation in the plant extract solution at extract concentration 1%, 1.5% and 2% respective, A₂, B₂ and C₂ were removed and introduced during 2 hours incubation in the plant extract solution at the same respective extract concentration and A₃, B₃ and C₃, were removed and introduced during 3 hours incubation in the plant extract solution at extract concentration 1%, 1.5% and 2% respective. The process was done with those removed after 6h and 9h of cell adhesion process in NaCl solution (0.85%).

After each incubation in the plant extract solution, the unhooking of adhered cells was performed by vortex agitation at 1000-1200 rpm for 10 seconds in three consecutive series of 10 ml sterilized NaCl solution (0.85%). This technique allows the unhooking of maximum adhered cells [35]. The total volume of the suspension containing the unhooked bacterial cells was 30 ml. the isolation and enumeration of unhooked cells were made by culture on Endo (Bio-Rad) agar medium, by the method of surface spreading, followed by incubation on Petri dishes at 44°C for 24 hours. The same technique of unhooking cells was used for the control substrate.

2.7 Assessment of the cell surface hydrophobicity

Enteropathogenic *E. coli* surface hydrophobicity was measured by the adhesion test on polythene using the MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbons) method [36] as recently described by Jain *et al.* [37]. After culture on Endo agar medium (Bio-Rad, France), cells were centrifuged at 8000 rev/min for 10 min at 10 °C, washed and resuspended at a concentration of 10⁸ CFU/ml in distilled water (pH 4.9) by reading the spectrophotometer DR 2800. The optical density (OD) of the solution was measured at 400 nm (A₀). 1 ml of this solution is introduced in 3 Erlenmeyer flasks A₁, A₁' and A₁'' containing 99 ml sterilized NaCl solution (0.85%) and parallelepipedic shaped fragments of polythene of 13.28 cm² total surface area suspended to a wire of 0.1 mm diameter. The mixture was incubated at room temperature (25°C ± 1) for 3h, 6h and 9h. After each incubation period, the fragment was removed from Erlenmeyer flask and the OD of the aqueous phase was measured (A₁, A₁' and A₁''). Concentrations of enteropathogenic *E. coli* were assessed by turbidity and expressed by measuring the optical density (OD 600

nm) on a spectrophotometer DR 2800. A density of 0.08 to 0.1 corresponded to 6 x 10⁸ CFU/ml [34]. The percentage of cells adhered to the polythene was calculated using the following formula [37]:

$$\text{Cell adhered (\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

In this formula, A₀ is the OD of the solution measured at 400 nm before the substrate immersion, and A₁ is the OD of the aqueous phase measured after cell adhesion process. The more the value obtained was closer to 100 % the more enteropathogenic *E. coli* was hydrophobic. According to Rosenberg [35] and Jain *et al.* [36], the percentage of cells adhered to the polythene in this condition is closely proportional to the cell surface hydrophobicity. According to those authors, the more the value obtained is closer to 100% the more enteropathogenic *E. coli* is hydrophobic. The percentages of cells adhered were then compared to the hydrophobicity percentages [37].

2.8 Data analysis

To estimate cell adhesion kinetics (CAK) or cell adhesion speeds, a straight Ln (number of CFUs adhered/cm² of the fragment) lines was plotted. A linear line has an equation of the form $y = ax + b$. In this equation, x is the explanatory variable, a is the slope of the regression line, and b is the intercept point of the regression line on the y axis (the value of y when x = 0) [38, 39]. The slope of the straight line was divided by 3 and then was considered as the hourly cell adhesion kinetics (CAK). The Spearman correlation coefficients and comparisons amongst considered parameters were assessed. Statistical analysis was performed using SPSS version 19.0

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Phytochemical screening of *E. microcorys* extract

The phytochemical screening of *Eucalyptus microcorys* revealed the presence polyphenols (+), sterols (+), triterpenoids (+), flavonoids (++), gallic tannins (+), anthraquinones (+++), anthocyanines (+), alkaloids (+++) and saponins (++)

3.2 Contact angle values of polythene surface

The results obtained during contact angle measurements with the use of a goniometer and the DROP computer program showed that the mean value of contact angle obtained for three polythenes tested is 84.8° ± 1.1° to the left and is 84.9° ± 1.9° to the right. This contact angle variation corresponds to a surface moderately hydrophobic-hydrophilic surface [40].

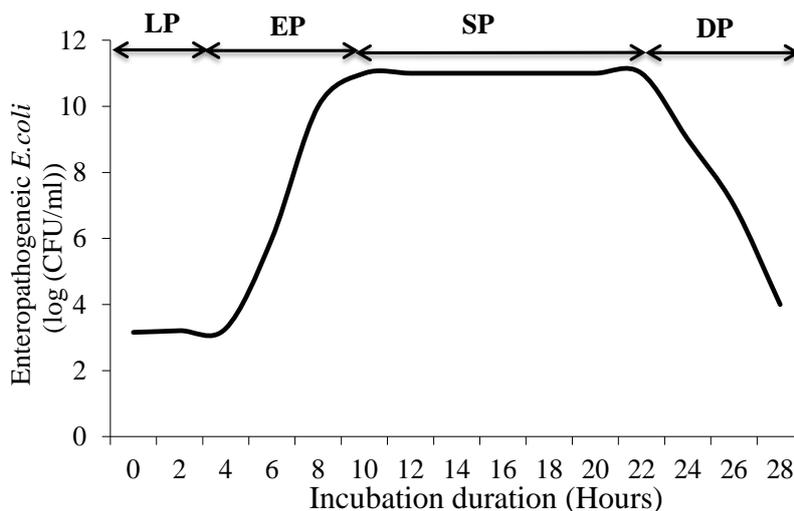


Figure 1: Growth curve of enteropathogenic *E. coli* (LP: Lag growth Phase; EP: Exponential growth Phase; SP: Stationary growth Phase; DP: Decline growth Phase).

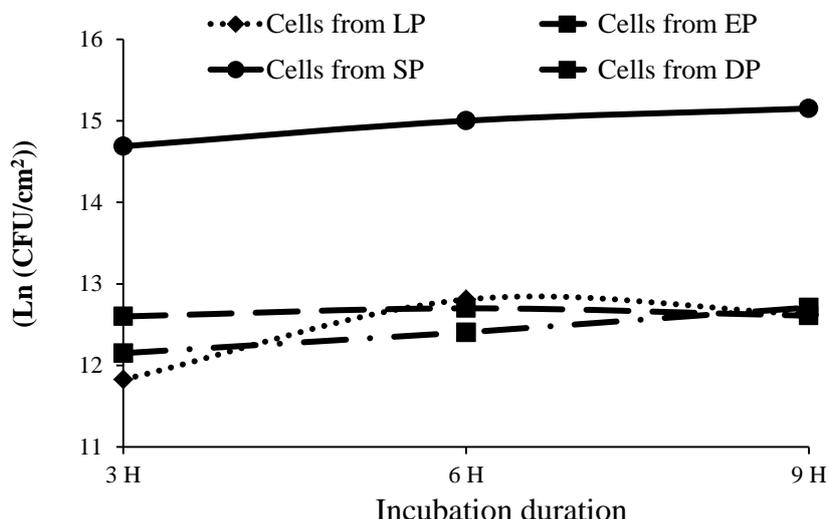


Figure 2: Number of adhered cells of enteropathogenic *E. coli* in NaCl (0.85 %) solution, cells are harvested from different growth phase (LP: Lag growth Phase; EP: Exponential growth Phase; SP: Stationary growth Phase; DP: Decline growth Phase).

3.3 Cell growth curve

The illustration of enteropathogenic *E. coli* growth rate in liquid medium non-renewed peptone show a hyperbolic curve in 4 phases. When considered t_{0h} as the initial moment, the 4 growth phases are temporally divided as follow: the lag growth phase from t_{0h} to t_{5h} , the exponential growth phase from t_{5h} to t_{11h} , the stationary growth phase from t_{11h} to t_{23h} , and the decline growth phase from t_{23h} to t_{28h} (Figure 1).

3.4 Cell adhesion kinetics

Considering the first 9 hours incubation duration of adhesion process of enteropathogenic *E. coli* to the surface of polythene substrate in NaCl solution (0.85%), the straight Ln (number of CFUs/cm²) lines against incubation duration of the form $y = ax + b$ were plotted. The slope of the straight line was then considered as cell adhesion kinetic (CAK). It appeared

that, the CAKs varied from one growth phase to another. The highest CAK was 0.133 cell adhered/cm²/h; this was registered with cells harvested from the lag growth phase. The lowest CAK 0.001 cell adhered/cm²/h was noted with cells harvested from the exponential growth phase (Table 1).

3.5 Numeration of adhered enteropathogenic *E. coli* cells in NaCl (0.85 %) solution

Figure 2 show the temporal variations of enteropathogenic *E. coli*, harvested from different growth phases, during the cell adhesion process on polythene surface in NaCl solution (0.85%). The bacterial abundances on polythene control, expressed in Napierian Logarithmic units (CFUs/cm²) ranged from 11.8 to 12.8 from 12.6 to 12.7, 14.7 to 15.2 and

12.2 to 12.7 respectively at the lag, the exponential, the stationary and the decline growth phases (Figure 2).

3.6 Percentage of cells of enteropathogenic *E. coli* adhered

In sterilized NaCl solution (0.85 %), the percentage of adhered enteropathogenic *E. coli* ranged from 67.78 to 72.89% for cells coming from lag growth phase; 80.11 to 83.24% for cells coming from exponential growth phase; 79.49 to 82.62% for bacteria coming from

stationary growth phase and from 47.12 to 50.92% from cells coming from decline growth phase. These percentages relatively increased with incubation duration. For the whole experiment, the highest values were recorded at the exponential growth phase and the lowest recorded from cell harvested from decline growth phase (Figure 3).

Table 1: Value of cell adhesion kinetics (and regression coefficient) of enteropathogenic *E. coli* with respect to growth phases.

Cellular growth phases	Adhesion kinetics (Cell adhered/cm ² /h)
Lag	0.133 (0.586)
Exponential	0.001 (0.006)
Stationary	0.077 (0.960)
Decline	0.093 (0.997)

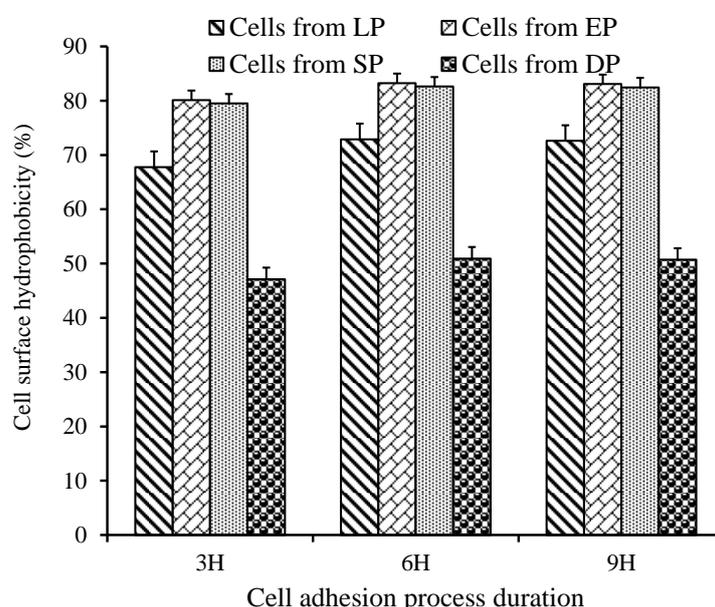


Figure 3: Physicochemical surface properties of adhered enteropathogenic *E. coli* cells harvested from Lag growth Phase (LP), Exponential growth Phase (EP), Stationary growth Phase (SP), and Decline growth Phase (DP).

3.7 Immersion of cells adhered in the plant extracts solution and cells detached assessment

Substrates with cells adhered were immersed in *Eucalyptus microcorys* extract solutions at different concentrations (1%, 1.5% and 2%). The cells detachment was then observed during incubation periods (1h, 2h and 3h). The detached cells, after withdrawal of substrate contained adhered cells harvested from each growth phase, fluctuated with to the incubation duration and the extract concentration (Figure 4). For cells stemming from lag growth phase, the highest values of abundance of detached cell were 8.71, 8.72 and 8.61 (Ln (CFU/cm²)) after 1h, 2h and 3h incubation respectively. This was noted after 3 hours duration of cell adhesion process (DCAP) and at the concentration of 2%. After 6h of DCAP and for the whole extract concentrations, detached cell abundances ranged from 7.15 to 9.29, from 7.45 to 9.43 and from 9.23 to 9.81 (Ln (CFU/cm²)) respectively after

1h, 2h and 3h. After 9h of DCAP, the detached cell abundances ranged from 10.25 to 10.43, from 9.77 to 10.31 and from 8.41 to 10.43 (Ln (CFU/cm²)) respectively after 1h, 2h and 3h.

For cells coming from exponential growth phase, the higher value of detached cell abundances after 1h incubation was 10.54 (Ln (CFU/cm²)). It was registered after 3 hours of DCAP, at the extract concentration 2%. After 2h and 3h of incubation, the highest values were respectively 9.29 and 10.24 (Ln (CFU/cm²)). For the whole extract concentrations after 6h of DCAP, detached cell abundances ranged from 10.18 to 10.77, from 8.42 to 10.32 and from 8.38 to 10.25 (Ln (CFU/cm²)) respectively after 1h, 2h and 3h. After 9h of DCAP, they ranged from 9.44 to 10.11, from 8.33 to 8.62 (and from 7.97 to 8.95 (Ln (CFU/cm²)) respectively after 1h, 2h and 3h incubation in the plant extract solution.

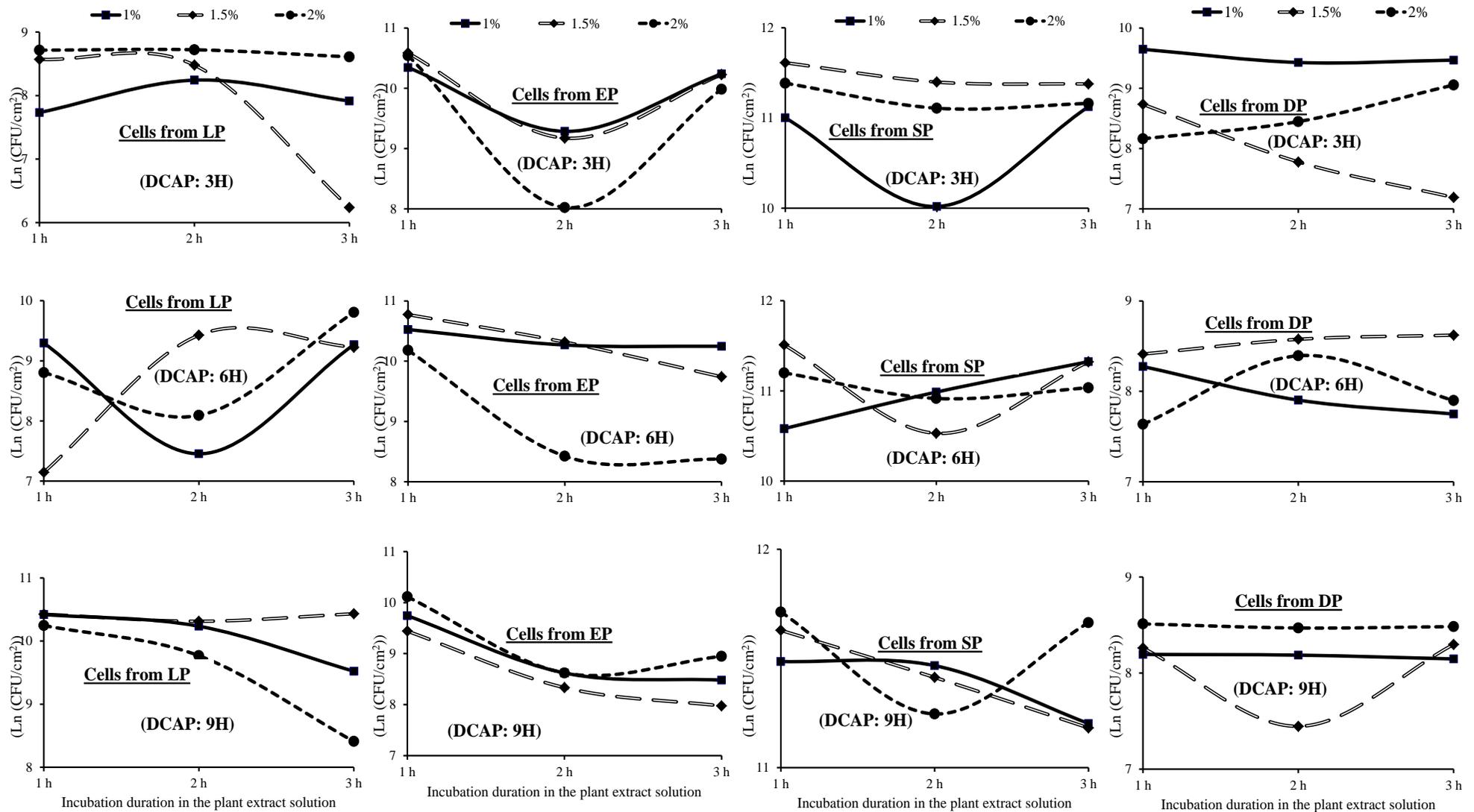


Figure 4: Temporal variation of the abundance of detached enteropathogenic *E.coli* cells after the living in the plant extract solution at different concentrations (1 %, 1.5 % and 2 %), cells harvested from Lag growth Phase (LP), Exponential growth Phase (EP), Stationary growth Phase (SP), and from Decline growth Phase (DP), after the duration of cell adhesion process (DCAP) of 3H, 6H and 9H.

For cells harvested from stationary growth phase and after 3 hours DCAP, the detached cell abundances ranged from 11.00 to 11.39, from 10.02 to 11.40 and from 11.12 to 11.38 (Ln (CFU/cm²)) respectively after 1h, 2h and 3h incubation. After 6h DCAP, they ranged from 10.58 to 11.51, from 10.53 to 10.99 and from 11.03 to 11.32 (Ln (CFU/cm²)) respectively after 1h, 2h and 3h incubation in the plant extract solution. After 9h of DCAP they ranged from 11.49 to 11.7, from 11.25 to 11.47 and from 11.18 to 11.66 (Ln (CFU/cm²)) respectively after 1h, 2h and 3h incubation in the plant extract solution.

The lowest count of cell detached was noted after 3 hours incubation in the plant extract solution at concentration 1.5% when cells coming from decline growth phase. After 6h of DCAP, the detached cell abundances fluctuated between 7.64 and 8.41, 7.90 and 8.58 and between 7.75 and 8.62 (Ln (CFU/cm²)) respectively after 1h, 2h and 3h incubation. Variations of the detached cell abundances were also observed after 9h of DCAP (Figure 4).

Table 2. Percentage of detached cell (% D) after 1h, 2h or 3h incubation in the plant extract solution of the concentration 1 %, 1.5 % and 2 %, after each Duration of cell adhesion process (DCAP: 3H, 6H and 9H) in NaCl solution (NaCl 0.85 %) when cells were from each growth phase.

Cell growth phase and duration of cell adhesion process		Percentage of detached cell (% D) after 1h, 2h or 3h incubation in the plant extract solution of the concentration 1 %, 1.5 % and 2 %								
Cell growth phase	Duration of cell adhesion process	1%			1.5%			2%		
		1h	2h	3h	1h	2h	3h	1h	2h	3h
Lag	3H	1.7	2.8	2.0	3.9	3.5	0.4	4.4	4.5	4.0
	6H	2.9	0.5	2.9	0.4	3.4	2.8	1.8	0.9	4.9
	9H	11.0	9.2	4.5	11.1	9.9	11.2	9.3	5.7	1.5
Exp.	3H	10.5	3.6	9.4	13.3	9.3	62.8	12.7	1.0	7.3
	6H	11.4	8.8	8.6	14.6	5.2	68.8	8.1	1.4	1.3
	9H	5.7	1.9	1.6	4.2	0.9	12.9	8.3	1.9	2.6
Stat.	3H	33.3	12.4	37.6	4.6	3.7	48.5	3.7	2.8	2.9
	6H	16.0	24.0	33.6	3.1	2.5	33.5	2.2	1.7	1.9
	9H	34.0	33.4	25.6	3.0	1.9	25.1	2.9	1.3	1.8
Decl.	3H	55.6	44.9	48.3	3.3	0.7	9.7	1.9	2.5	4.5
	6H	21.3	14.7	12.6	1.8	2.3	30.2	0.9	1.8	1.1
	9H	14.5	14.4	13.8	1.2	1.2	16.0	1.5	1.8	4.8

Lag.: lag growth phase ; Exp.: exponential growth phase ; Stat.: stationary growth phase ; Decl.: decline growth phase

3.8 Percentage of detached cells

Different percentages of detached cells, after incubation with *Eucalyptus microcorys* extract solution at different considered concentrations are summarized in Table 2. When the bacteria cells were harvested from the lag growth phase, the percentage of detached cells fluctuated between 1.7 and 11, 0.5 and 9.2, and between 2.0 and 4.5% after 1h, 2h and 3h incubation respectively at concentration 1% of extract solution. At the concentration 1.5%, it fluctuated between 0.4 and 11.1, 3.4 and 9.9, and between 0.4 and 11.2% after 1h, 2h and 3h incubation respectively. At the concentration 2%, it fluctuated between 1.8 and 9.3, 0.9 and 5.7, and between 1.5 and 4.9% after 1h, 2h and 3h incubation also.

From cells coming from exponential growth phase, the highest counts of cells detached were 11.4, 8.8 and 9.4% after 1h, 2h and 3h of incubation at the extract concentration solution of 1%. They were 14.6, 9.3 and 68.8% after the same incubation periods at concentration 1.5%, and were 12.7, 1.9 and 7.3% in the plant extract solution at concentration of 2%. Variation in the abundances of cells detached was also noted when cells used for experiments were harvested from stationary phase. In most cases, the highest percentages of detached cells are observed with cells

coming from exponential, stationary and decline growth phases. The highest percentages of detached cells (above 50%) were noted for solution of extract at 1% concentration with cells coming from decline growth phase (Table 2).

3.9 Relationships between considered parameters

Spearman correlation coefficients between the abundances of adhered cells when the polythene was immersed in NaCl solution (0.85%) and the abundances of detached cells after living in the plant extract solution at each extract concentration were calculated. A positive and significant relationship ($P < 0.01$) was noted between these two parameters for each of the three extract concentrations. The Kruskal-Wallis test was used to compare the abundances of detached cells harvested at different cell growth stages. Differences ($P < 0.01$) were statistically significant even when we considered each of the three extract concentrations.

The growth curve of enteropathogenic *E. coli* obtained showed a lag phase from 0 and 5 hours, during which the bacteria adapt to a fresh medium, an exponential growth phase from the 5th to the 11th hour, a stationary growth phase from the 11th to the 23th hour, and a decline phase or phase of death cells which starts from the 23th hour after incubation duration. When cells are

transfer in an environment where new biosynthesis are required, they take time called lag time, for the implementation of enzymes that intervene in these syntheses [41]. Use of nutrient and cell duplication occurs during the exponential growth period. During the stationary growth phase, no significant temporal variation is observed in the cells abundance. However, in the stationary growth phase many cellular functions, including energy metabolism and biosynthesis, continue. The decline phase is the period when all food resources are exhausted: toxic metabolite accumulates; the concentration of viable organisms decreases; the cellular lysis by endogenous proteolytic enzymes can also occur. However, a low growth rate could still be detected following the releasing of substances during lysis (cryptic growth) [42].

The use of enteropathogenic *E. coli* cells harvested at different cellular growth phases, has achieved the adsorption tests on polythene substrate. It has been noted that cells adhesion depends on the physiological state of the bacteria. The evaluation of cell adhesion speeds showed a kinetic of 0.133 cell adhered/cm²/h for cells harvested from the lag growth phase, 0.001 cell adhered/cm²/h for cells harvested from the exponential growth phase, 0.077 cell adhered/cm²/h for cells harvested from the stationary growth phase and 0.077 cell adhered/cm²/h for cells harvested from the decline growth phase. The variation of these cell adhesion speeds may be influenced by the mechanism of reversible and irreversible adhesion and also could be explained by changes in cell physiology [11, 43].

Cells adhesion to a solid particle uses different types of interaction depending on the nature of the substrate to colonize. It also depends on the reversibility of the initial stage of the process due to the adsorption-desorption phenomena [44]. The bacterial adhesion to substrates involves two main steps: reversible adhesion and irreversible adhesion [45]. The reversible adhesion is governed by physico-chemical interactions of type Van der Waals and Lewis acid-base [28]. The irreversible adhesion is slower than the previous one, the irreversibility of the membership using the bacterial metabolism step. The hydrophobicity of the surfaces of microorganisms is generally regarded as one factor among others in the adhesion phenomenon.

The physicochemical properties of the surface hydrophobicity of the microorganisms are related to the chemical composition of the outer membrane and the conformations of the resulting molecular structures. This hydrophobicity could influence the capacity of cells to adhere on polythene. For authors the hydrophobicity of the bacterial surface is the key parameter that governs bacterial adhesion to inert supports [46, 47]. The results obtained by the MATH method showed that enteropathogenic *E. coli* is more hydrophobic when the cells comes from exponential and stationary growth phases. The cell surface hydrophobicity increased with incubation periods. The minimum value of the hydrophobicity percentage was

recorded with cells harvested from the decline growth phase of with values ranged between 47.12 to 50.92%. The moderately hydrophilic-hydrophobic nature of polythene can also influence the adhesion of the bacterial cells. The influence of the solid surface's hydrophobicity on the adhesion has been indicated [48].

The bacterial adhesion process to substrates is based on physicochemical properties of the latter [28]. The hydrophobic - hydrophilic character of substrate is reflected by measuring the contact angle. Surfaces with contact angles greater than 90° are designated as hydrophobic. When 30° < θ < 90°: the support is moderately hydrophobic and hydrophilic [40]. A contact angle of 73.3° on polythene was found by other authors [29, 49]. It has been noted that *Aureobasidium pullulans* adheres more on media with increasing hydrophobicity [50]. These results are similar with those on *Enterococcus faecalis* with a higher adhesion to the silicon compared to the glass [50, 51].

During the present study, it has been noted that the abundance of enteropathogenic *E. coli* attached to the polythene varies when the latter is immersed in the *Eucalyptus microcorys* extract solution. The cell's detachment has been observed. The extract causes cell's detachment and this depends on the incubation duration of substrate as well as on the concentration of the plant extracts. The cell detachment observed could be due to the presence of some secondary metabolites in aqueous *Eucalyptus microcorys* extract which can disrupt physicochemical surface characteristics of enteropathogenic *E. coli*.

In this study, the phytochemical of the plant extract revealed the presence of several organic compounds as polyphenol, triterpenoids, sterols, alkaloids, saponins and gallic tannins, flavonoids, anthraquinones and anthocyanines. The presence of these compounds has been reported in other studies [23, 52]. Polyphenols in the plant extract would be a form of stress and would probably lack the bacteria of their protective glycocalyx causing disruption and dislodging biofilm bacteria on the surface of polythene substrate. These secondary metabolites would cause of the rupture of hydrogen bonds within the exopolysaccharide protective matrix secreted by bacterial cells. However, the rates of detached cells are sometimes lower to 15%. This relative low rate could be due to the exopolymer covering bacteria that creates a concentration gradient so that the leakage of the protective layer is not complete. Thus, only the bacterial cells located at certain distance of the solid are achieved dislodged. Also, some bacteria have specific plasmid genes that encode virulence factors (the type IV pili, adhesins, and toxins) which play an important role in the cell adhesion process [53]. They allow the interconnection of bacteria in micro-colonies promoting their stabilization, which could cause resistance to the cell detachment.

It has also been noted that the cellular growth phase from which cells used in the experiments were harvested impacted the abundance the cell adhesion detachment process. A positive and significant correlation ($P < 0.01$) between the cell abundances adhered to substrate control and the abundances of detached cells has been noted. The abundances of detached cells are positively and significantly correlated with the cellular growth phases. Significant difference ($P < 0.01$) between adhered and detached cells abundances after living in the plant extract solution. All this could be due to the accession rate that varies depending on cellular growth phase that bacteria come from, during the adsorption test. The exponential growth phase results in a high cell activity whereas the stationary growth phase has a slowing down of this activity, resulting in chemical modifications to the surface of the cell [54]. The stability and the reactivity of secondary metabolites like flavonoids are commonly linked to their molecular structures [55]. The reactivity of flavonoids dissolved in water leads to the molecular instability and this may vary with changes in environmental properties. The amount of detached cells seems to vary with the cell growth phase as well as with the concentration of the plant extract and incubation duration. This variation may also depend on the potential of secondary metabolites which are present. Each of them may act solely or in synergetic with others [56].

4. CONCLUSION

Bacterial adhesion process is well reported to exhibit increased resistance to antimicrobial agents compared with their planktonic counterparts, due in part to the physical barrier that they create. The use of the extract of *Eucalyptus microcorys* seems to have a significant impact on this barrier. Causing detachment of cells to substrate, they are more exposed to secondary metabolites that have a relative antibacterial activity. The polyphenols, present in the extract plant, would act by permeabilization of the exopolymere secreted at the formation of the biofilm. The use of the bioactive compounds of the *Eucalyptus microcorys* extract can be an alternative process, therefore, in the struggle against the processes of adhesion to the support of the bacteria or against the present biofilms in the ways of pipeline, and also in the bacterial cell inhibition.

5. REFERENCES

- O. Banton and L.M. Bangoy. (1997). Hydrogéologie, multiscience environnementale des eaux souterraines, PUQ-AUPELF, Saint Foy Edn., Québec. pp 460.
- OMS. (2009), Statistiques Sanitaires Mondiales. pp 144.
- WHO (2004). Guidelines for Drinking-Water Quality, 3rd edition. World Health Organization, Geneva. pp 1050.
- J. Holt, N. Krieg, P. Sneath et al. (2000). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th Edn., Lipponcott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp.787.
- CEAEQ (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec). (2004). Recherche et dénombrement simultanés des coliformes totaux et d'*Escherichia coli* dans l'eau potable avec le milieu de culture MI: méthode par filtration sur membrane. MA. 700- Ecctmi.1.0, Ministère de l'Environnement du Québec. pp 25.
- S.C. Clarke, Haigh R D, Freestone P et al. (2003). "Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen," *Clinical Microbiology Reviews*. 16 (3): 365-378.
- J. Mainil. (2003). "Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli*: Franchissement des muqueuses et propriétés invasives," *Annale Médicale et Vétérinaire*. 147: 159-171.
- Y. Germani and C. Le Bouguéneq. (2008). "Diagnostic des *Escherichia coli* agents de diarrhée chez l'homme," *Revue francophone des laboratoires*, 38 (400): 67-76.
- P. Cunin, E. Tedjouka, Y. Germani, et al. (1999). "An epidemic of bloody diarrhea: *Escherichia coli* O157 emerging in Cameroon?" *Emerging Infectious Disease*. 5: 285-290.
- F. Hamadi, H. Latrache, E. Mliji et al. (2009). "Adhésion de *Staphylococcus aureus* au verre et au téflon". *Revue Microbiologie Industrielle, Sanitaire et Environnementale*, 12 : 1-16.
- G. O'Toole and R. Kolter. (1998). "Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development". *Molecular Microbiology*, 30(2): 295-304.
- T.A. Camesano and B. Logan (2000). "Probing bacterial electrostatic interactions using atomic force microscopy," *Environmental Science and Technology*, 34: 3354-3362.
- A. Filloux and I. Valet. (2003). "Biofilm: Establishment and organization of the bacterial community". *Médical Science*, 19: 77-83.
- M. Lechevallier, Cawthon C and Lee R. (1988). "Inactivation of biofilm bacteria". *Applied and Environmental Microbiology*, 54: 2492-2499.
- F. Dubois-Brissonnet, C. Ntsama, Bouix et al. (1995). Activité bactéricide de six désinfectants sur des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* obtenus en conditions statistiques. In : BELLON-FONTAINE M.N., FOURNIAT J., (Ed), Adhésion des Microorganismes aux surfaces, Tec et Doc Lavoisier. Paris (France), pp 310.
- N. Atkinson. (1996). "Antibacterial activity in members of the native Australian flora". *Nature*, 158, p.876.
- O. Ayepola and B. Adeniyi. (2008). "The antibacterial activity of leaf extracts of *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae)," *Journal of Applied Sciences Research*. 4(11): 1410-1413.
- R. Jeyachandran and A. Mahesh. (2007). "Antimicrobial evaluation of *Kigelia Africana* (Lam)". *Res. J. Microbiol.* 2(8): 645 649.
- L.F. Biyiti, D.J. Meko'o, V. Tamze et al. (2004). "Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales Camerounaise," *Pharm. Méd. Trad. Afr.* 13 : 11-20.
- P. Lutgen and B. Michels. (2008). "Bactericidal properties of *Artemisia annua* tea and dosimetry of artemisinin in water by fluorescence under UV light," *Revue Technique Luxembourgeoise*. 2:73-78.
- M. Sunda, F. Rosillon and K. Taba. (2008). "Contribution à l'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec des extraits de plantes". *European Journal of Water quality*. 39 (2): 199-209.
- Y. Donadieu. (2008). *La Propolis* Editions Dangles, Paris. pp 90.
- A. Tamsa Arfao, M. Nola, C. Lontsi Djimeli et al. (2013). "Comparison of the inhibition of commensally and enteropathogenic *E. coli* strains in the presence of *Eucalyptus microcorys* leaves extract in aquatic microcosm". *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 2(6): 80-96.
- N. Bella, L. Ngo, O. Aboubakar et al. (2012). "Aqueous extract of *Tetrapleura tetraptera* (Mimosaceae) prevents hypertension, dyslipidemia and oxidative stress in high salt-sucrose Induced Hypertensive Rats". *Pharmacologia*, 3 (9): 397-405.
- G. E. Trease and W. C Evans. (1983). "Orders and families of plant in pharmacognosy". *Oxford University Press*. 12:343-383.
- O. Odebiyi and E.A. Sofowora. (1978). "Phytochemical screening Nigerian medicinal plants," *Loydia*. 41: 234-235.
- K.L. Coeyrehourcq. (2003). "Etude de méthodes rapides d'analyse de la structure moléculaire du polyéthylène". [Thèse de Doctorat], Ecole des Mines de Paris, Spécialité Science et Génie des Matériaux, pp 227.
- N. Boutaleb. (2007). "Etude de la formation des biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les

- canalisations d'eau potable," [Thèse de Doctorat], Université de Bretagne-Sud, pp 194.
29. E. Boulard. (2012). "L'adhésion bactérienne Sondée à l'échelle moléculaire", [Thèse de Doctorat], Université Paris Sud, Pp 185.
 30. APHA. (1998). "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 20th ed, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA, pp.1220.
 31. K. Yasmeen, K. C. Sneha, D. N. Shobha et al. (2009). "Virulence factors, serotypes and antimicrobial susceptibility pattern of *Escherichia coli* in urinary tract infections," *Al Ameen. J. Med. Sci.* 2(1): 47-51.
 32. C. Lontsi Djimeli, A. Tamsa Arfao, O. V. Noah Ewoti et al. (2014). Adhesion of *Candida albicans* to polythene in Sodium hypochlorite disinfected aquatic microcosm and potential impact of cell surface properties. *Current Research in Microbiology and Biotechnology.* 2 (5): 479-489
 33. L. M. MOUNGANG, M. NOLA, M. E. NOUGANG et al. (2013). "Abundance of heterotrophic aerobic bacteria (HAB) adsorbed on Granite, Basalt and Migmatite rock fragments immersed in wells in Central Africa: Temporal variation and assessment of the hierarchical influence of some abiotic factors," *International Journal of Research in BioSciences* 2 (2): 13-25.
 34. O.V. Noah Ewoti, M. Nola, L.M. MOUNGANG et al. (2011). "Adhesion of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* on rock surface in aquatic microcosm: Assessment of the influence of dissolved magnesium sulfate and monosodium phosphate," *Research Journal of Environmental and Earth Sciences*, 3(4), 364-374.
 35. S. Dukam, P. Pirion and Y. Levi. (1995). "Modélisation du développement des biomasses bactériennes libres et fixées en réseau de distribution d'eau potable," In : *Adhésion des microorganismes aux surfaces*, Bellon-Fontaine, M.N. et Fourniat, J. (éds), Paris, pp 149-160.
 36. M. Rosenberg, D. Gutnick, and E. Rosenberg. (1980). "Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity," *FEMS Microbiology Letters* 9: 29-33.
 37. A. Jain, K. Nishad, and B. Bhosle. (2007). "Effects of DNP on the cell surface properties of marine bacteria and its implication for adhesion to surfaces," *Biofouling* 23:171-177.
 38. N. Bailey. (1981). *Statistical methods in biology*, Hodder and Stoughton, London, pp 216.
 39. C. Tofallis. (2009). "Least squares percentage regression". *J. Modern Applied Statistical Methods*, 7: 526-534.
 40. S. Farris, L. Introzzi, P. Biagioni, et al. (2011). "Wetting of biopolymer coatings: contact angle kinetics and image analysis investigation". *Langmuir*.
 41. M. Madigan and J. Martinko. (2007), *Biologie des microorganismes*, Onzième édition: Université Carbondale de l'Illinois du Sud, Pearson Education, pp. 1047.
 42. C. Rubio. (2002). "Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention", [Thèse de Doctorat], Université Paris 6, pp 276.
 43. S. Parot. (2007). "Biofilms Electroactifs : formation, caractérisation et mécanismes," [Thèse de Doctorat], Institut National polytechnique de Toulouse, pp 257.
 44. A. Branger, M. Richer et S. Roustel.(2007). *Microchimie et alimentaire*, 2ème éd., Paris, France, pp 337.
 45. K. Pouneh. (2009). "Formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* : évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing", [Thèse de Doctorat], Université Paul Sabatier, Toulouse III, pp 328.
 46. T. K. Jana, A. K., Srivastava, K. Csery, et al. (2000). "Influence of growth and environmental conditions on cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas fluorescens* in nonspecific adhesion", *Can. J. Microbiol*, 46:28-37.
 47. S. Cappello and P. Guglielmino. (2006). "Effects of growth temperature on polystyrene adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853", *Brazilian Journal of Microbiology.* 37:205-207.
 48. J.S. Webb, H.C. Van der Mei, M. Nixon, et al. (1999). "Plasticizers increase adhesion of the detriogenic fungus *Aureobasidium pullulans* to polyvinyl chloride", *Appl Environ Microbiol*, 65: 3575.
 49. C. J. Van Oss, R. J. Good and M. K. (1988). "Chaudhury additive and nonadditive surface tension components and the interpretation of contact angles," *Langmuir*, 4:884-891.
 50. A.M. Gallardo-Moreno, M.L. González-Martin, C. Pérez-Giraldo et al. (2002). "Thermodynamic analysis of growth temperature dependence in the adhesion of *Candida parapsilosis* to polystyrene", *Appl Environ Microbiol*, 68: 2610.
 51. Kuhn, D. M., J. Chandra, P. K. Mukherjee, et M. A. Ghannoum. (2002). Comparison of Biofilms Formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic Surfaces. *Infection and Immunity.* 70:878-888.
 52. G. Pamplona-Roger. (1999). *Encyclopedia of Medicinal Plants*, 1 and 2, (2nd Edn)", Education and Health Library, the European Union, U.K, pp 128-150.
 53. L. R. Trabulsi, R. Keller, and T. A. Tardelli gomes. (2002). "Typical and atypical Enteropathogenic *E. coli*", *Emerging infectious diseases*, 8(5): 508-513.
 54. H. Nora. (2003). "Interactions des bactéries marines responsables de la formation des biofilms avec les matériaux biospécifiques", [Thèse de Doctorat], Institut Galilée-Université Paris, XIII, pp 1-235.
 55. L. Chebil. (2006). "Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle", [Thèse de Doctorat], Institut National Polytechnique de Lorraine, pp 229.
 56. A. Tamsa Arfao, M. Nola, C. Lontsi Djimeli, Mireille et al. (2013). "Cultivability of *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* and enteropathogenic *Escherichia coli* in water microcosm in the presence of *Eucalyptus microcorys* leaves extract: Effect of the concentration of leaves extract and incubation temperature", *International Journal of Research in BioSciences*, 2(4):32-46.

© 2016; AIZEON Publishers; All Rights Reserved

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
