



Article Original

Effets Inhibiteurs de l'Huile Essentielle et des Extraits Bruts des Écorces de *Greenwayodendron Suaveolens* (Engl. & Diels) Verdc. Subsp. *Suaveolens* contre les Bactéries Responsables de la Pneumonie

Inhibitory Effects of the Essential Oil and Crude Extracts from *Greenwayodendron Suaveolens* (Engl. & Diels) Verdc. Subsp. *Suaveolens* Stem-Barks against Pneumonia Bacteria

Betote Diboue PH^{1,3,4}, Nnanga Nga^{4,5,6}, Benga Mekoulou FC⁴, Obono Fouda Mballa P⁴, Beack Bayengue SS³, Tchamgoue DA³, Nyegue MA^{1,2,*}

RÉSUMÉ

¹ Laboratoire de Microbiologie, FMSB Université de Yaoundé I, Cameroun

² Equipe glyco et nanovecteurs pour le ciblage thérapeutique, Université de Montpellier, France

³ Laboratoire de Pharmacologie, IMPM, Yaoundé, Cameroun

⁴ Laboratoire Multidisciplinaire, Département de Pharmacie Galénique et Législation Pharmaceutique, FMSB, Yaoundé, Cameroun

⁵ Laboratoire de Technologie Pharmaceutique, IMPM, Yaoundé, Cameroun

⁶ Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, Département des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, FMSP, Douala, Cameroun

Author correspondant :

Nyegue Maximilienne Ascension
E-mail : maxy_nyegue@yahoo.fr
Téléphone : (+237) 675 053 815

Mots clés : Huile essentielle, extraits bruts, *Greenwayodendron suaveolens*, potentiel antibactérien, pneumonie.

Key Words: Essential oil, crude extracts, *Greenwayodendron suaveolens*, antibacterial efficacy, pneumonia

Objectif. Dans la présente étude, l'huile essentielle et les extraits bruts des écorces de *Greenwayodendron suaveolens* (Engl. & Diels) Verdc. subsp. *suaveolens* ont été testés *in vitro* pour leur potentiel antibactérien contre les bactéries responsable de la pneumonie. **Méthodologie.** Le potentiel *in vitro* antibactérien de l'huile essentielle et des extraits bruts a été testé en utilisant les méthodes de diffusion sur disque et de microdilution en milieu liquide. **Résultats.** Les résultats obtenus ont montré que les extraits testés ont une activité antibactérienne contre les agents pathogènes sélectionnés avec des diamètres de zones d'inhibition variant respectivement de 7,27 mm pour *Klebsiella pneumoniae* à 13,38 mm pour *Haemophilus influenzae*. Concernant les paramètres d'inhibition, l'huile essentielle et les extraits bruts ont également montré une activité antibactérienne avec des concentrations minimales inhibitrices comprises entre 58,59 µg/mL et 1875 µg/mL ; la plus forte activité attribuée à l'huile essentielle pour l'inhibition de la croissance de *Escherichia coli*. **Conclusion.** Les résultats de la présente investigation indiquent que les extraits des écorces de *Greenwayodendron suaveolens* ont le potentiel d'inhiber efficacement la croissance de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 43816, *Haemophilus influenzae* ATCC 49247, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 35218, responsables de la pneumonie. Cependant, l'isolement des composés bioactifs est nécessaire pour les futures investigations.

ABSTRACT

Objective. In this study, the essential oil and crude extracts from the stem-barks of *Greenwayodendron suaveolens* (Engl. & Diels) Verdc. subsp. *suaveolens* was tested for their *in vitro* antibacterial efficacy against pneumonia bacteria. **Methodology.** The essential oil and crude extracts were tested for their *in vitro* antibacterial potential using the disc diffusion and microdilution methods. **Results.** Our results showed that the tested extracts had antibacterial activity against the selected pneumonia pathogens with the zones of inhibition ranging from 7.27 mm for *Klebsiella pneumoniae* to 13.38 mm for *Haemophilus influenzae* respectively. The essential oil and crude extracts also shown antibacterial activity highlighting the minimum inhibitory concentrations (MICs) ranging from 58.59 µg/mL to 1875 µg/mL with the highest activity attributed to essential oil for inhibiting the growth of *Escherichia coli*. **Conclusion.** The present findings indicated that the extracts of stem-barks of *Greenwayodendron suaveolens* has the potential to inhibit effectively the growing of *Klebsiella pneumoniae* ATCC 43816, *Haemophilus influenzae* ATCC 49247, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 35218, responsible of pneumonia. However, the isolation of bioactive components is a toolkit for further investigations.

INTRODUCTION

La pneumonie est une infection des tissus pulmonaires [1,4]. Elle peut également se définir comme étant une forme d'infection aiguë du tractus respiratoire (ARTI) qui affecte les poumons [2,5]. Cependant, les travaux de Mackenziel en 2016, la définissent plus spécifiquement comme étant une infection aiguë du parenchyme pulmonaire causée par un ou une association de

pathogènes (bactéries, champignons, virales et/ou parasitiques) [3,6]. Les virus et les bactéries couramment présents dans les voies nasales ou le pharynx des enfants peuvent infecter les poumons en cas d'inhalation. De plus, la pneumonie est aussi transmissible par voie sanguine, pendant ou peu après la naissance [3,6]. Elle se manifeste généralement par une inflammation des

poumons causée par la présence du pus et de liquides physiologiques dans les alvéoles pulmonaires limitant ainsi la prise de l'oxygène, tout en entraînant une respiration douloureuse [4,7].

La pneumonie est la maladie la plus meurtrière chez les enfants de moins de cinq ans dans le monde. Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), elle fait plus de victimes que le VIH/SIDA, le paludisme et la rougeole réunis dans cette tranche d'âge, avec près de 2 millions de décès en 2003 [8]. Plus de deux millions d'enfants en sont morts durant les années 2004 à 2006 [8]. En 2013 et 2015, bien que l'incidence ait diminué, elle reste responsable respectivement d'environ 1,6 et 1,2 million de décès d'enfants de la même tranche d'âge ; soit 18 % et 15 % des décès d'enfants de moins de cinq ans à l'échelle mondiale [7,8], avec 99 % de tous les décès survenant dans des pays à revenu faible ou intermédiaire [9]. Ces chiffres montrent que cette maladie ne suscite que peu d'intérêt, ce qui a poussé l'OMS à la qualifier de fléau oublié. L'Afrique subsaharienne supporte plus de la moitié du nombre total de cas présumés de pneumonie chez ces enfants dans le monde. Les enfants des pays à faible revenu ont près de 18 fois plus de risques de mourir avant l'âge de cinq ans que les enfants des pays à revenu élevé, principalement à cause de la pneumonie et d'autres infections aiguës [8]. Face à ce fléau, la chimiothérapie reste le moyen recommandé pour guérir de cette maladie. Ceci, malgré le mauvais suivi thérapeutique de la part des populations, qui sont mal instruites, ne respectent pas la posologie des médicaments dû à leurs effets secondaires multiples provoquant ainsi l'émergence des souches multi-résistantes [10]. C'est ainsi que la pneumonie demeure au troisième rang des maladies infectieuses et meurtrières, derrière la tuberculose et l'association VIH/paludisme [11]. Pour y remédier, l'OMS préconise, le développement de nouvelles méthodes de traitement plus efficace et moins coûteuse par rapport aux thérapies actuelles [12]. Il est donc urgent, d'initier la recherche de nouveaux agents, à la fois antimicrobien, antioxydant et anti-inflammatoire moins toxiques en explorant la voie de la médecine alternative et complémentaire [12]. Il apparait donc évident que les plantes de la pharmacopée camerounaise à travers l'utilisation de leurs huiles essentielles et leurs extraits. *G. suaveolens* (Engl. & Diels) Verdc. subsp. *suaveolens*, une plante utilisée en médecine traditionnelle pour traiter les affections inflammatoires pourrait constituer une approche de choix dans cette démarche.

G. suaveolens (Engl. & Diels) Verdc. subsp. *suaveolens* est un long arbre tropical qui mesure jusqu'à 35 – 45 mètres et qui appartient à la famille des Annonacées. Il est utilisé par la population du Cameroun pour traiter le paludisme, la gonorrhée et la stérilité, les maux d'estomac et autres douleurs ; il est également considéré comme diurétique, purgatif et aphrodisiaque, et comme facilitant l'accouchement. Les travaux de MacDonald et al. en 2017, ont révélé que les extraits des fruits de *G. suaveolens* sont non-toxiques et actifs contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* et

Candida albicans avec des CMI comprises entre 25 et 100 mg/mL [13]. Dans la même logique, les travaux de Hye-Dong et al. ont permis d'isoler un nouvel indolosesquiterpène antibactérien « le suaveolindole » de *G. suaveolens*, qui a révélé une activité *in vitro* significative contre *B. subtilis* (ATCC 43223), *S. aureus* (ATCC 6538P) et *S. aureus* résistant à la Méthicilline (ATCC 33591), avec des valeurs de CMI de 4,8 – 8 µg/mL, respectivement [14].

À ce jour, très peu de données sont disponibles sur l'efficacité antibactérienne de l'espèce *G. suaveolens* contre les bactéries responsables de la pneumonie. Par conséquent, l'objectif de la présente étude était d'évaluer *in vitro* les propriétés antibactériennes de l'huile essentielle et des extraits bruts de *Greenwayodendron suaveolens* (Engl. & Diels) Verdc. subsp. *suaveolens*.

MATERIEL ET METHODES

Récolte et identification de l'espèce étudiée

Les écorces de *G. suaveolens*, ont été récoltées le 17 janvier 2018 au Mont Kala (48° 51' 45,81'' N ; 2° 17' 15,331'' E) dans la localité de Nkolbisson, région du Centre (Cameroun). Le spécimen de *G. suaveolens* a été identifié et conservé à l'Herbier National du Cameroun (HNC) de l'Institut de Recherche Agricole pour le Développement (IRAD) sous le numéro d'identification 45578-HNC.

Extraction des écorces de *G. suaveolens*

Extraction de l'huile essentielle

L'huile essentielle des écorces de *G. suaveolens* a été extraite par hydrodistillation utilisant un appareillage de type « Clevenger » pendant 5 heures, séchée avec du sulfate de sodium anhydre et stockée à 4°C avant les tests biologiques [11].

Préparation des macérats

Les extraits bruts ont été réalisés en utilisant les écorces de *G. suaveolens*. Le matériel végétal a été coupé en petits morceaux, séché à l'abri de la lumière et puis écrasé en fines particules. La poudre (500 g) a été macérée individuellement dans deux solvants de polarité élevée, à savoir l'éthanol (95 %, v/v) et de l'éthanol (30 %, v/v) tel que décrit par le protocole de Prakash et Gupta [15]. Les extraits éthanolique et hydroéthanolique obtenus, ont été stockés à 4°C avant les tests biologiques.

Evaluation de l'activité *in vitro* antibactérienne de l'huile essentielle et extraits bruts contre les germes responsables de pneumonie

Souches bactériennes

Cette étude a utilisé quatre souches de référence de type « ATCC : American Type Culture Collection », notamment : *Klebsiella pneumoniae* ATCC 43816, *Haemophilus influenzae* ATCC 49247, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Escherichia coli* ATCC 35218. Ces souches ont été offertes par le Laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalier Universitaire de Yaoundé et conservées au Laboratoire de Microbiologie du Département de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I.

Milieux de culture et substance de référence

Les milieux Mueller Hinton Agar et Mueller Hinton Broth ont été utilisés dans cette étude et ont été fournis par Sigma-aldrich, France. La Levofloxacin[®] a été utilisée comme molécule de référence.

Préparation des inocula bactériens

Les colonies pures de *Klebsiella pneumoniae* ATCC43816, *Haemophilus influenzae* ATCC49247, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 et *Escherichia coli* ATCC35218 ont été prélevées à l'aide d'une anse en plastique sur un milieu gélosé Mueller Hinton coulé en boîte de Pétri et ensemencées dans un bouillon Mueller Hinton. La densité optique (D.O) a été lue à 625 nm et comprise entre 0,08 et 0,1 permettant de standardiser l'inoculum bactérien concentré à 1.5×10^8 cellules/mL [16].

Tests de sensibilité des souches bactériennes aux extraits de plantes

Les boîtes de Pétri ont ensemencées par écouvillonnage avec la solution d'inoculum de chacune des souches bactériennes préalablement préparées à la charge de $1,5 \times 10^8$ cellules/mL [15]. Les puits de 6 mm de diamètre ont été réalisés à l'aide du bout large d'un embout. Un volume de 75 μ L des substances à tester a par la suite été déversé dans chacun des puits. Les boîtes de Pétri ainsi ensemencées ont été mises à sécher pendant 15 minutes (pré-diffusion) sous la hotte puis incubées à 37°C pendant 24 heures [17,18]. Les diamètres de zones d'inhibition autour des disques exprimés en millimètres (mm) ont été mesurés à l'aide du pied à coulisse.

La sensibilité aux différents extraits a été classée selon la méthode décrite par Moreira *et al.* en 2005. Le classement des diamètres de zones d'inhibition proposé par cette méthode est le suivant : non sensible pour le diamètre de moins de 8 mm ; sensible (+) pour un diamètre compris entre 9-14 mm ; très sensible (++) pour un diamètre compris entre 15-19 mm et extrêmement sensible (+++) pour un diamètre de plus de 20 mm [19].

Détermination des paramètres d'inhibition par la méthode de microdilution en milieu liquide

La procédure a été réalisée telle que décrite par Collins et Franzblau en 1997 [20] suivie de quelques modifications. 100 μ L de bouillon Mueller Hinton ont été introduit dans les cupules de la deuxième à la dernière ligne et 200 μ L d'extrait dans la première cupule de la plaque. A partir des cupules de la deuxième ligne, une série de 10 dilutions décroissantes obéissant à une progression géométrique de raison 2 a été effectuée pour chaque extrait. Par la suite 100 μ L de solution de la première cupule a été prélevé et introduit dans les 100 μ L de la deuxième cupule. Après homogénéisation, 100 μ L de cette nouvelle solution ont été introduit dans la troisième cupule et ainsi de suite jusqu'à l'obtention de 100 μ L de solution dans toutes les cupules exceptées celles de la première ligne qui contenaient encore 200 μ L de solution. 100 μ L de la solution de la dernière cupule a été prélevé et jeté. Un volume d'inoculum de 10^6 cellules/mL [16] a par la suite été ensemencé et le volume complété à 200 μ L avec le bouillon Mueller

Hinton. Les témoins ne renfermant pas d'extraits (témoin négatif) et ceux ne contenant que les microorganismes (témoin positif) ont été réalisés et les microplaques ont été incubées pendant 24 heures à 37°C. Après incubation, 40 μ L de 0.01 % m/v de Blue Alamar préparé dans l'eau distillée stérile a été ajouté dans chaque cupule puis la microplaque couverte et incubée à 37°C pendant 30 min. L'absence de virage du Blue Alamar au rouge indiquait l'effet antibactérien des substances testées. La CMI a été considérée comme la plus petite concentration ayant inhibée toute croissance visible des microorganismes dans les conditions appropriées de culture. Pour déterminer les CMB, 50 μ L des puits de la troisième colonne test dont les concentrations CMI \geq ont été repiqués dans 150 μ L de milieu MHB et l'ensemble incubé à 37°C pendant 24 heures, puis la croissance bactérienne a été mise en évidence par ajout de 40 μ L d'une solution de Blue Alamar dans chaque puit des trois colonnes tests. L'ensemble sera ré-incubé à 37°C pendant une heure. La CMB a été définie comme la plus faible concentration de la substance testée à laquelle aucune croissance visible du germe n'a été observée [16,20].

Le rapport CMB/CMI a permis de déterminer le profil bactériologique des extraits de plante. L'effet bactéricide sera observé si le rapport CMB/CMI est inférieur à 4, bactériostatique si CMB/CMI est compris entre 4 et 16, et tolérante vis-à-vis du microorganisme mis en présence, si le rapport CMB/CMI est supérieur à 16 [21].

Analyses statistiques

Les résultats ont été analysés par le logiciel Graph Pad Prism version 8.0.1. pour Windows en utilisant le test ANOVA ONE WAY avec un seuil de significativité $p < 0,05$. Ces données ont été représentées sous forme d'une moyenne \pm écart type pour comparer l'efficacité des extraits de plante entre eux, puis avec la Levofloxacin[®].

RESULTATS

Les résultats du test de diffusion en disque de l'huile essentielle et les extraits bruts des écorces de *G. suaveolens* présentés dans le Tableau I montrent que le spectre d'activité des extraits de *G. suaveolens* s'étend sur les quatre souches bactériennes testées avec des diamètres des zones d'inhibition supérieurs à 7 mm. Les diamètres de zones d'inhibition des souches testées ont varié de 7,27 à 13,38 mm. L'activité antibactérienne des extraits de plante reste cependant inférieure à celle de la Levofloxacin, qui a montré une activité sur l'ensemble des souches testées avec des diamètres des zones d'inhibition compris entre 19,05 à 27,57 mm.

Après avoir déterminé la sensibilité des bactéries en présence des extraits des écorces de *G. suaveolens*, un test de microdilution en milieu liquide a été effectué. L'analyse des résultats présentes dans le Tableau II, montre que tous les extraits de *G. suaveolens* ont inhibés la croissance de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 43816, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Haemophilus influenzae* ATCC 49247 et *Escherichia coli* ATCC 35218 avec des concentrations minimales inhibitrices variant de 58,59 μ g/mL à 1875 μ g/mL. L'huile

essentielle *G. suaveolens* est celle qui présente les plus fortes activités sur les quatre souches de référence avec des CMI de 117,18 µg/mL, 468,75 µg/mL, 234,37 µg/mL et 58,59 µg/mL respectivement pour les souches de *K. pneumoniae* ATCC 43816, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *H. influenzae* ATCC 49247 et *E. coli* ATCC 35218, tandis que l'extrait éthanolique est celui qui a montré les plus faibles activités avec des CMI variant de 234,37 µg/mL pour *E. coli*, de 937,50 µg/mL pour *P. aeruginosa* et de 1875 µg/mL respectivement pour de *K. pneumoniae* ATCC 43816 et *H. influenzae* ATCC 49247. Concernant la Levofloxacin, un des antibiotiques utilisé pour traiter la pneumonie, nous constatons qu'il a montré des valeurs de CMI comprises entre 0,24 µg/mL et 0,97 µg/mL. Ces valeurs montrent que la Levofloxacin a une meilleure activité antibactérienne par rapport à l'huile essentielle et aux extraits bruts testés.

DISCUSSION

Le test de sensibilité bactérienne dont le principe est basé sur de la différence de diffusibilité des composés bioactifs sur milieu de culture solide, montrent que

l'huile essentielle de *G. suaveolens* a obtenu la meilleure activité en inhibant la croissance de toutes les bactéries testées avec des valeurs des diamètres des zones d'inhibition de 7,27 mm (*K. pneumoniae*), 8,18 mm (*E. coli*), 8,47 mm (*H. influenzae*) et 13,27 mm (*P. aeruginosa*). Les activités de l'huile essentielle et des extraits bruts de *G. suaveolens* ont été classées selon l'échelle de Moreira et al. en 2005 et celle-ci montre que *H. influenzae* ATCC 49247 n'est pas sensible à l'extrait éthanolique. En ce qui concerne *K. pneumoniae* ATCC 43816 et *P. aeruginosa* ATCC 27853 ; *K. pneumoniae* n'est pas sensible à l'extrait éthanolique et à l'huile essentielle.

Par contre, *P. aeruginosa*, elle n'est pas sensible à l'extrait éthanolique et à l'hydro-éthanolique [19]. Toutes les bactéries testées ont présenté une sensibilité peu prononcée aux extraits de *G. suaveolens*. Cette faible sensibilité pourrait s'expliquer par la structure de leur paroi bactérienne. En effet, de par leur nature Gram négatif, elles possèdent une résistance naturelle due à la présence sur leur paroi d'une membrane extérieure, contrairement aux bactéries Gram positif.

Tableau I : Récapitulatif des diamètres des zones d'inhibition (millimètres) de l'huile essentielle et des extraits éthanolique et hydro-éthanolique des écorces de *G. suaveolens* sur les souches bactériennes responsables de pneumonie.

Extraits de <i>G. suaveolens</i>	Diamètres de zones d'inhibition (mm)			
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 43816	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	<i>E. coli</i> ATCC 35218
Ethanolique	0,00 ± 0,00 ^{d***}	7,47 ± 0,06 ^c	0,00 ± 0,00 ^{d***}	8,54 ± 2,44 ^{b***}
Hydroéthanolique	12,79 ± 0,42 ^b	0,00 ± 0,00 ^{d***}	13,38 ± 0,39 ^{b***}	9,13 ± 0,54 ^{b***}
Huile essentielle	7,27 ± 0,88 ^c	13,27 ± 0,16 ^b	8,47 ± 2,48 ^{c***}	8,18 ± 0,06 ^{b***}
Levofloxacin	19,05 ± 0,82 ^a	19,51 ± 0,35 ^a	27,57 ± 6,74 ^a	20,37 ± 1,64 ^a

Légende : Les moyennes affectées de « *** » sont significativement différentes à p<0,001 (test de Dunnett) ; a>b>c>d et les moyennes affectées à ces lettres (a, b, c et d) sont significativement différentes à p<0,05 (test de Tukey).

Tableau II : Récapitulatif des paramètres d'inhibition de l'huile essentielle et des extraits éthanolique et hydro-éthanolique des écorces de *G. suaveolens* sur les souches bactériennes responsables de pneumonie.

Extraits de <i>G. suaveolens</i>	Souches bactériennes	Paramètres d'inhibition (µg/mL)			Effets antibactériens
		MIC	MBC	MBC/MIC	
Ethanolique	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	1875	7500	2	Bactéricide
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	937,50	>7500	n.d	Non déterminé
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 43816	1875	3750	2	Bactéricide
	<i>E. coli</i> ATCC 35218	234,37	>7500	n.d	Non déterminé
Hydroéthanolique	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	1875	1875	1	Bactéricide
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	937,50	1875	2	Bactéricide
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 43816	468,75	937,50	2	Bactéricide
	<i>E. coli</i> ATCC 35218	937,50	3750	4	Bactéricide
Huile essentielle	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	234,37	937,50	4	Bactéricide
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	468,75	937,50	2	Bactéricide
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 43816	117,18	468,75	4	Bactéricide
	<i>E. coli</i> ATCC 35218	58,59	1875	32	Tolérant
Levofloxacin	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	0,97	7,81	8	Bactériostatique
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,24	0,97	4	Bactéricide
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 43816	0,24	0,24	1	Bactéricide
	<i>E. coli</i> ATCC 35218	0,48	0,97	2	Bactéricide

Cette membrane extérieure, composée de lipopolysaccharides et phospholipides de couverture,

enveloppe la cellule bactérienne et limite la diffusion libre des composés hydrophiles polaires et/ou

hydrophobes neutre bioactifs dans le milieu intracellulaire desdites bactéries [13]. Un autre phénomène, qui pourrait également expliquer les résultats obtenus est la diffusion des substances bioactives sur la gélose qui dépend de la nature chimique des substances diffusantes, de leurs concentrations, de leurs solubilités et du pH du milieu de culture [22]. Ainsi, de par leur nature hydrophobe et fortement polarisés, les composés bioactifs contenus dans les extraits éthanolique et hydro-éthanolique de *G. suaveolens* seraient en faibles concentrations avec des propriétés de diffusibilités faibles, puisque n'ayant pas pû traverser la membrane extérieure des bactéries testées. Contrairement aux extraits bruts, la faible activité biologique révélée par l'huile essentielle de *G. suaveolens* ne serait pas liée à l'absence de composés hydrophiles bioactifs doués de propriétés médicinales responsables de l'activité antibactérienne observée mais aux conditions inadéquates de diffusibilité sur milieu solide [23]. La non sensibilité des bactéries Gram négatif étudiée pourrait être due à plusieurs facteurs, notamment : la faible concentration des extraits de *G. suaveolens* en métabolites secondaires actifs, la présence de la membrane extérieure des bactéries testées et le développement par les bactéries des mécanismes de résistance par exemple, l'inactivation des enzymes par la modification structurale et fonctionnelle des site actif et catalytique, et la faible accumulation des métabolites bioactifs dans le milieu intracellulaire des bactéries [24]. Concernant les paramètres d'inhibition, leur détermination montre que tous les extraits de *G. suaveolens* ont présenté une activité antibactérienne sur les bactéries testées. Nous remarquons que l'huile essentielle de *G. suaveolens* a obtenu les meilleures activités sur l'inhibition de la croissance des bactéries Gram négatif avec une CMI variant entre 58,59 µg/mL (*E. coli* ATCC 35218), 117,18 µg/mL (*K. pneumoniae* ATCC 43816), 234,37 µg/mL (*H. influenzae* ATCC 49247) et 468,75 µg/mL (*P. aeruginosa* ATCC 27853). On constate également que toutes les bactéries non sensibles aux différents extraits lors des tests de susceptibilité, ont également présenté une faible activité antibactérienne à l'exception de l'huile essentielle. Toutefois, les effets antibactériens obtenus par le calcul du ratio CMB/CMI montrent que les extraits de *G. suaveolens* sont bactéricides sur toutes les souches testées excepté l'huile essentielle qui est toléré par *E. coli* ATCC 35218. Ces résultats sont en accord avec ceux de McDonald *et al.* (2017) qui ont montré que *G. suaveolens* possède des activités antibactériennes sur *E. coli* (25 mg/mL) et *P. aeruginosa* (50 mg/mL) [13]. Dans le même ordre d'idée, une indolosesquiterpène connue sous le nom de « suaveolindole » isolée de *G. suaveolens* par les travaux de Yoo *et al.* (2005), a montré des activités antibactériennes intéressantes sur *K. pneumoniae* ATCC 10031 et *P. aeruginosa* ATCC 9027 avec une CMI de 1,25 µg/mL respectivement [14]. Similairement aux tests de sensibilité, les résultats de la détermination des paramètres d'inhibition montrent que l'huile essentielle de *G. suaveolens* a obtenu le meilleur potentiel antibactérien. Cette activité antibactérienne

serait due à son caractère lipophile attribué par la nature phytochimique des composés hydrophiles polaires et/ou hydrophobes neutre qui la constitue et lui octroierait la capacité de traverser les lipopolysaccharides et phospholipides de couverture de la paroi des bactéries Gram négatif testées. Quant aux extraits bruts, les résultats observés pourraient s'expliquer par le fait que les composés bioactifs qu'ils contiennent, possèdent des mécanismes d'action leur permettant d'inhiber la croissance des bactéries Gram négatif [25], mais du fait de leur extraction par les solvants polaires leur donnant une nature hydrophobe et fortement polarisés, la diffusion libre de ces biomolécules serait limitée par la membranaire extérieure de la paroi bactérienne [13]. On note également que, toutes les souches bactériennes sont plus sensibles en milieu liquide par la méthode de microdilution qu'en milieu solide par diffusion. Cette sensibilité en milieu liquide s'explique par une meilleure exposition des microorganismes aux métabolites secondaires des extraits de *G. suaveolens*. Cette exposition qui parallèlement augmente le temps et la surface de contact avec les microorganismes, et par conséquence une meilleure efficacité antibactérienne. Les composés bioactifs retrouvés dans l'huile essentielle et les extraits bruts des écorces de *G. suaveolens* sont responsables de l'activité antibactérienne et peuvent avoir une action synergistique [26,27].

CONCLUSION

Les résultats de cette étude mettent en exergue l'effet inhibiteur des écorces de *Greenwayodendron suaveolens* sur les souches de *Klebsiella pneumoniae* ATCC43816, *Haemophilus influenzae* ATCC49247, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 et *Escherichia coli* ATCC35218. Les plantes peuvent être considérées comme une source de substances bioactives, dont une partie seulement a été exploitée. Les études futures, auront pour objectif d'isoler les substances bioactives des écorces de *Greenwayodendron suaveolens* et d'évaluer leurs potentiels antimicrobiens. Les résultats de cette étude suggèrent que les extraits des écorces de *Greenwayodendron suaveolens* peuvent être utilisés seuls ou en combinaison avec d'autres agents antimicrobiens pour améliorer ou traiter les pneumonies. Grâce aux résultats de ces travaux et à d'autres, la possibilité de développer un médicament traditionnel amélioré approprié pour le traitement de la pneumonie est envisageable. Cependant, il serait nécessaire de réaliser des travaux de recherche dans des conditions *in vivo* pour évaluer la toxicité et les effets pharmacologiques probables.

Conflit d'intérêt

Les auteurs ne déclarent aucun conflit d'intérêts.

Remerciements

Au Laboratoire de Microbiologie du Département de Microbiologie de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I et au Laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalier Universitaire de Yaoundé.

Source de financement

La présente investigation est une étude préliminaire financée par le Laboratoire Multidisciplinaire du Département de Pharmacie Galénique et Législation Pharmaceutique de la Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales de l'Université de Yaoundé I.

RÉFÉRENCES

- Hippocrates (1849). The genuine works of Hippocrates, 1:324. In: Translated from the Greek with a preliminary discourse and annotations by Francis Adams. London: Sydenham Society.
- Laennec R.T. (1838). A treatise on the diseases of the chest and on mediate auscultation. In: Translated from the 3rd French ed. by J. Forbes, with notes of Prof. Andral from the 4th edition. New York: SS & Wm. Wood.
- Rokitansky C. (1852). Inflammations of the lungs (pneumoniae). In: Manual of Pathological Anatomy. London: Sydenham Society.
- NICE (National Institute for Health and Care Excellence) (2014). Pneumonia in adults: diagnosis and management: Clinical guideline. Published: 3 December 2014. nice.org.uk/guidance/cg191 ; visited on December 7th 2018.
- Nga T. (2013). Priority Medicines for Europe and the World "A Public Health Approach to Innovation". Background Paper 6.22 Pneumonia.
- Mackenzie G. (2016). The definition and classification of pneumonia. *Pneumonia*. 8:14; DOI 10.1186/s41479-016-0012-z.
- OMS (2019). Organisation mondiale de la santé. Global Pneumonia Report 2019. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia>. Visité le 11 Janvier 2020.
- UNICEF (United Nations International Children's Emergency Fund) (2012). Pneumonia and diarrhoea: Tackling the deadliest diseases for the world's poorest children. New York.
- UN Inter-agency Group for Child Mortality Estimation (2011). Levels and Trends in Child Mortality: Report 2011.
- Rudan I., Theodoratou E., Zgaga L., Nair H., Chan K.Y., Tomlinson M., et al. (2012). Setting priorities for development of emerging interventions against childhood pneumonia, meningitis and influenza. *J Glob Health*. 2: 010304. Medline: 23198129; doi:10.7189/jogh.01.010304.
- Moni N.E.D.F., Assam A.J.P., Nyegue M.A., Feudjieu E.G., Penlap B.V., Etoa F-X. (2018). Anti-mycobacterial efficacy of three essential oils from medicinal plants currently used traditionally to treat tuberculosis in Cameroon. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*. 6(3): 10-18; ISSN: 2321-9114.
- Mahady G.B. (2005). Medicinal Plants for the Prevention and Treatment of Bacterial Infections. *Current Pharmaceutical Design*. 11: 2405-2427.
- MacDonald I., Oghale O., Nosa O.O., Osaigbovo O. (2017). Phytochemistry, Antimicrobial and Toxicological Studies of *Greenwayodendron suaveolens* Seed Extracts. *J Basic Pharmacol Toxicol*. 1(1): 8-12.
- Yoo H-D., Peadar A.C., Lu Z., Eliane G., Caroline T.W., Chris M.L., Matt G.G., Mark O'Neil-J., Gary R.E., Jin-Feng H. (2005). Suaveolindole, a New Mass-Limited Antibacterial Indolosesquiterpene from *Greenwayodendron suaveolens* Obtained via High-Throughput Natural Products Chemistry Methods. *J. Nat. Prod*. 68(1) : 122-124.
- Tereshuck M.L., Riera M.V., Castro G.R., Abdala L.R. (1997). Antimicrobial activity of flavonoid from leaves of *targets minutq*. *Journal of Ethnopharmacology*. 56(3):227-232.
- CLSI. (2011). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne : 3-4.
- Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A. Jawetz M., Adelberg's (2004). Medical Microbiology. 23rd Ed. International Edition, Singapore, 167-168.
- Cos P., Vlietinck A.J., Berghe D.V., Maes L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro proof-of-concept. *Journal of Ethnopharmacology*. 10(6): 290-302.
- Moreira M.R., Ponce A.G., de Valle C.E., Roura S.I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie-LWT*. 38:565-570.
- Collins L., Franzblau S. (1997). Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-through put screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41(5): 1004-1009, ISSN 0066-4804.
- Fauchère J.L., Avril J.L. (2002). Bactériologie générale et médicale. Edition Ellipses. Page 365.
- Tekwu E.M., Pieme A.C., Beng V.P. (2012). Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance. *Journal of Ethnopharmacology*. 142: 265-273.
- Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F., Tian Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chemistry*. 102: 771-776.
- Schwarz S., Noble W.C. (1999). Aspect of bacterial resistance to antimicrobial used in veterinary dermatological practice. *Veterinary dermatology*. 3(10): 163-176
- Eloff J.N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimum inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*. 64: 711-713.
- Olufunmiso O.O., Anthony J. A. (2012). Synergistic interactions of methanolic extract of *Acacia mearnsii* De wild. with antibiotics against bacteria of clinical relevance. *International Journal of Molecular Sciences*. 13: 8915-8932.
- Afagnigni A.D. (2019). Etude des propriétés antidiarrhéiques de deux plantes médicinales (*Dissotis multiflora* (Sm) Triana et *Paullinia pinnata* Linn) du Cameroun. Thèse de doctorat/Ph.D. de l'Université de Yaoundé I ; p238.