



UNIVERSITE SIDIMOHAMMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
FES

PROJET DE FIN D'ETUDES
FILIERE : BIOTECHNOLOGIE, HYGIENE ET SECURITE DES ALIMENTS

Extraction et Caractérisation Des Extraits Bactériens à Effet Antimycobactérien

Elaboré par :

Melle OUMAIMA ELAMIN

Encadré par :

Mr. Houari Abdellah
Professeur chercheur à la
F.S.T de Fès

Soutenu devant le jury composé de :

-Pr HOUARI Abdellah :

Professeur chercheur à la F.S.T de Fès

-Pr IRAQUI HOUSAINI Mohamed :

Professeur chercheur à la F.S.T de Fès

-Pr HAGGOU Abdellatif :

Professeur chercheur à la F.S.T de Fès

Stage réalisé au laboratoire de Biotechnologie Microbienne
Faculté des sciences et techniques de Fès

Année universitaire : 2010/2011

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
B.P. 2202 – Route d'Imouzzer – FES – MAROC

Tél. +212 (0) 535 60 80 14 – +212 (0) 535 60 96 35 – +212 (0) 535 60 29 53 – Fax : +212 (0) 535 60 82 14

TABLEAU DES FIGURES :

FIGURES	TITRES	PAGES
Fig 1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> vue au microscope électronique à balayage. 15549X	2
Fig 2	Mise en évidence d'auréole d'inhibition due à la production par la souche AF de substances inhibant la croissance de <i>M.smegmatis</i>	28
Fig 3	Mise en évidence de l'effet antimycobactérien (<i>M.smegmatis</i>) des extraits des souches AF et AV	29
Fig 4	Mise en évidence de l'activité anti mycobactérienne de l'extrait de la souche AF sur <i>M.smegmatis</i> après traitement par la protéinase K (A) (Prot K= traité, SK: non traité) et après traitement à différentes températures (B) et le tamoin S non traité	30
Fig 5	Résultats de la CCM pour la souche AF et la souche AV	31
Fig 6	Essai de localisation de la bande responsable de l'activité antimycobactérienne de la souche AF après CCM sur gel de silice par culture sur <i>M.smegmatis</i>	31
Fig 7	Effet des extraits des souches souches AF et AV sur la croissance des souches de <i>Bacillus subtilis</i> (à gauche) et <i>Staphylococcus aureus</i> (à droite).	32
Fig 8	Effet de l'extarit de la souche AF sur la croissance des souches <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (à gauche) et <i>Escherichia coli</i> (à droite).	32
Fig 9	Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% des produits d'amplification du gène codant pour l'ARN 16S en utilisant le couple d'amorces Fd1/RS16 en utilisant comme matrice les ADN extraits par la méthode 3 (puits 1 et 2) pour la souche AV et la méthode 4 (puits 3) pour la souche AF.	33

TABLEAUX :

<i>TABLEAUX</i>	<i>TITRES</i>	<i>PAGES</i>
<i>Tableau 1</i>	<i>Les différentes formes d'atteinte tuberculeuse</i>	<i>3</i>
<i>Tableau 2</i>	<i>Tuberculose: estimations de l'incidence, de la prévalence et de la mortalité (2009)</i>	<i>5</i>
<i>Tableau 3</i>	<i>Classification des antituberculeux selon l'OMS</i>	<i>7</i>
<i>Tableau 4</i>	<i>Médicaments utilisables dans le traitement de la tuberculose multirésistante</i>	<i>8</i>
<i>Tableau 5</i>	<i>principales propriétés et mécanismes de résistance des antituberculeux Indication des puissances des microondes et du temps de traitement des différents échantillons</i>	<i>14</i>
<i>Tableau 6</i>	<i>Indication des puissances des microondes et du temps de traitement des différents échantillons</i>	<i>24</i>
<i>Tableau 7</i>	<i>Séquences nucléotidiques des amorces universelles utilisées dans la PCR</i>	<i>26</i>
<i>Tableau 8</i>	<i>Composition du mélange réactionnel pour la PCR</i>	<i>26</i>
<i>Tableau 9</i>	<i>Diamètres d'auréoles d'inhibition après traitement à différentes températures et à la protéinase K de la souche AF</i>	<i>29</i>
<i>Tableau 10</i>	<i>Diamètres des auréoles d'inhibition pour les quatres souches étudiées</i>	<i>32</i>

ABREVIATIONS :

<i>BAAR</i>	<i>Bacille Acido-Alcool-Résistante</i>
<i>BCG</i>	<i>Bacille Calmette-Guérin</i>
<i>CCM</i>	<i>Chromatographie sur Couche Mince</i>
<i>CMI</i>	<i>Concentration Minimale Inhibitrice</i>
<i>DO</i>	<i>Densité Optique</i>
<i>INH</i>	<i>Isonicotinic acid hydrozide= Isoniazide</i>
<i>J-C</i>	<i>Jésus Christ</i>
<i>M</i>	<i>Mycobacterium</i>
<i>MDR</i>	<i>Multiple drug resistant</i>
<i>OMS</i>	<i>Organisation Mondiale de la Santé</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>Pb</i>	<i>Paire de base</i>
<i>rpm</i>	<i>Rotation par minute</i>
<i>SIDA</i>	<i>Syndrome d'immunodéficience acquise</i>
<i>TB</i>	<i>tuberculose</i>
<i>UFC</i>	<i>Unité Formant Colonie</i>
<i>VIH</i>	<i>Virus d'immunodéficience humain</i>
<i>XDR</i>	<i>Extensively drug resistant</i>

Table de matière :

Introduction.....	1
I. Les mycobactéries: Caractéristiques generals.....	2
1. Classification selon Bergey's.....	2
2. Classification selon l'importance Clinique.....	3
3. Les mycobactéries : à l'origine de la tuberculose.....	3
II. La tuberculose.....	3
1. Description et épidémiologie.....	3
2. Evolution de l'incidence.....	4
3. VIH et la tuberculose.....	5
4. Infection et transmission.....	6
III. Traitement de la tuberculose.....	6
1. Les médicaments antituberculeux.....	6
2. Traitement de la tuberculose chez les patients infectés par le VIH.....	8
3. Traitement de la tuberculose résistante.....	8
4. Nouveaux médicaments antituberculeux.....	9
4.1.Nouveaux dérivés ou nouvelles indications de médicaments existants...9	
4.1.1. Rifapentine	9
4.1.2. Nouvelles quinolones.....	10
4.1.3. Linézolide.....	11
4.2.Nouvelles molécules.....	11
IV. BCG et mise au point de nouveaux vaccins.....	11
V. Problème de la résistance.....	11
1. Résistance primaire.....	12
2. Résistance secondaire ou acquise.....	12
3. La multi résistance.....	12
4. Épidémiologie des résistances.....	13
5. Mécanisme de résistance.....	13
5.1. Isoniazide.....	13
5.2. Rifampicine.....	13
5.3. Pyrazinamide.....	13
5.4. Ethambutol.....	13
6. Facteurs favorisant la résistance aux antituberculeux.....	15
VI. Recherche de nouvelles molécules à effet anti-mycobactérien.....	15
1. Synthèse de molécules chimiques.....	15
2. Activités des extraits des plantes	15
3. Activité des principes actifs produit par les microorganismes.....	16
Matériel et méthodes.....	17
1. Matériel biologique.....	17
1.1. Souches bactériennes utilisées.....	17
2. Méthodes.....	17
2.1. Milieux de cultures.....	17
2.1.1. Milieu LB liquide.....	17
2.1.2. Milieu LB solide.....	18
2.1.3. Milieu TSB.....	18
2.1.4. Milieu TSB modifié liquide.....	18

2.1.5. Milieu TSB modifié solide.....	18
2.2. Cultures bactériennes.....	18
2.2.1. Culture de la bactérie indicatrice M. smegmatis.....	18
2.2.2. Culture des bactéries à tester.....	19
3. Test de conservation de l'activité des souches isolées après repiquage.....	19
4. Extraction et concentration des molécules bioactives du surnageant de culture..	19
5. Test de l'activité antimycobactérienne des extraits.....	19
5.1. Technique des disques.....	19
5.1.1. Réalisation d'une suspension.....	19
5.1.2. Préparation de la gélose.....	20
5.2. La technique des puits.....	20
6. Etude physico-chimique des principes actifs.....	20
6.1. Sensibilité des principes actifs au traitement thermique.....	20
6.2. Sensibilité des principes actifs à la protéinase K	21
7. Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince de silice (CCM)....	21
8. Essai de localisation des bandes actives après CCM.....	22
9. Essai de purification des bandes actives après CCM.....	22
10. Détermination du spectre d'action des principes actifs des souches AF et AV...22	
11. Extraction d'ADN.....	23
11.1. Première méthode Protocole classique au phénol- chloroforme.....	23
11.2. Deuxième méthode : Extraction d'ADN par microonde.....	24
11.3. Troisième méthode.....	24
11.4. Quatrième méthode.....	25
12. Amplification de l'ADN 16 S par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	25
12.1. Amorces utilisées.....	25
12.2. Mélange réactionnel.....	26
12.3. Conditions de la réaction PCR.....	27
13. Analyse des produits de la PCR par électrophorèse sur gel d'agarose.....	27
13.1. Préparation du gel d'agarose.....	27
13.2. Dépôt des produits d'amplification.....	27
13.3. Électrophorèse.....	27
Résultats et discussions.....	28
1. Test de conservation de l'activité antimycobactérienne des souches AF et AV après repiquage.....	28
2. Test d'activité des extraits.....	28
3. Sensibilité des principes actifs au traitement thermique et à la protéinase K.....	29
4. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	31
5. Spectre d'action des principes actifs des extraits des souches AF et AV.....	32
6. Extraction d'ADN et amplification par PCR.....	33
Conclusion et perspectives.....	34
Références bibliographiques.....	35
Annexe.....	40

Introduction générale

La tuberculose (TB) humaine est une des maladies les plus anciennes de l'humanité. Des traces de cette maladie ont été retrouvées sur des gisements osseux humains datant de la Préhistoire et sur les momies égyptiennes, témoignant des ravages qu'elle causait déjà entre 5000 et 3000 ans avant J-C. [Zink, A. R. et al, 2003] C'est en 1868 que le chercheur français Jean Antoine Villemin démontra la nature contagieuse de la tuberculose en infectant des lapins à partir des crachats de patients tuberculeux. Avec la mise en place de moyens préventifs comme le vaccin BCG (1921), et la découverte de nombreux antibiotiques efficaces (1944-1965), l'éradication de la tuberculose était envisageable pour la fin du 20ème siècle [George Coumba Yoya. 2010]. Cependant, au début des années 90, on a observé une augmentation de l'incidence de cette maladie à l'échelle mondiale suite à la mobilité croissante, aux migrations d'origine économique et politique et aux déficiences des programmes de lutte, de nombreux patients ne recevant pas un traitement adéquat. Cela a favorisé l'apparition problématique de mycobactéries multirésistantes aux antituberculeux [Jost (M.), et al, 2001]. En outre, les patients immunodéprimés, surtout ceux infectés par le VIH, sont particulièrement menacés [Mohle-Boetani (J.C.), et al, 2002].

La tuberculose représente la huitième grande cause de décès dans les pays à revenu faible et intermédiaire (la septième chez les hommes et la neuvième chez les femmes) ; chez les adultes âgés de 15 à 59 ans, elle représente la troisième cause de décès, après le VIH/sida et la cardiopathie ischémique [Lopez AD et al, 2006]

Les prévisions de l'OMS estiment que pour la période 2000-2020, un milliard de personnes seront nouvellement infectées par *Mycobacterium tuberculosis*, 200 millions développeront la maladie et 35 millions mourront de tuberculose si aucune amélioration n'est apportée dans le traitement et le contrôle de cette infection [OMS - Stratégie régionale de contrôle de la tuberculose pour 2005-2015. CD 46/18, Washington, 2005, 16 p].

Le nombre de nouveaux cas de tuberculose multi résistante survenant chaque année est estimé à 450000, ces souches ont largement diffusé géographiquement, mais c'est en Chine et dans les pays de l'ex-Union soviétique que l'on constate les taux les plus élevés. [Jeanne Maugein, et al, 2010]

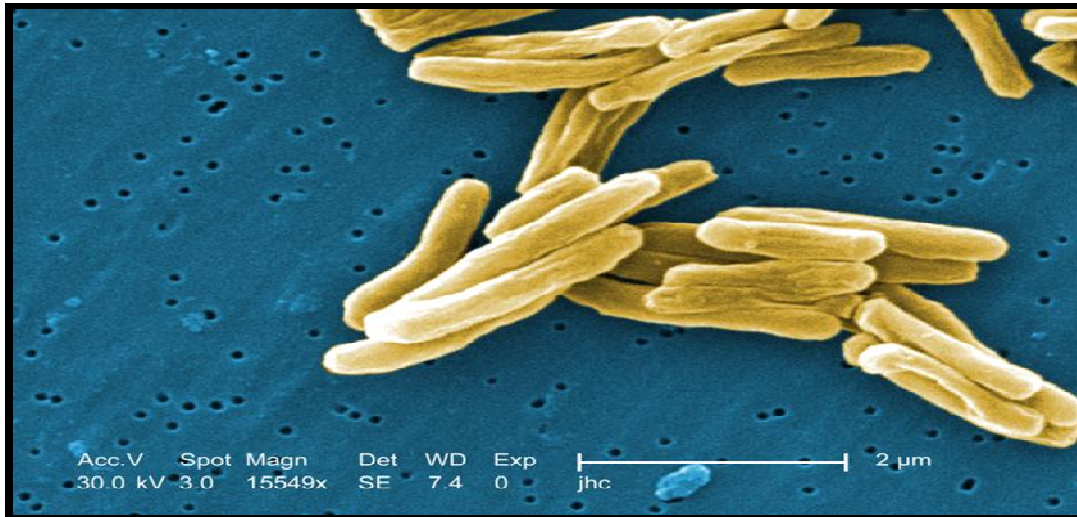
Par conséquent, face à un tel problème de santé internationale, lié principalement à l'apparition de souches résistantes ou multi-résistantes aux antibiotiques et à une co-infection entre le VIH et le bacille tuberculeux particulièrement mortelle, il est indispensable de mettre en évidence de nouveaux agents antimycobactériens efficaces.

C'est dans ce cadre que s'inscrit le présent travail de caractérisation des extraits bactériens à effet antimycobactérien Pour mieux contrôler les infections mycobactériennes et diminuer la fréquence des souches multi-résistantes.

I. Les mycobactéries: Caractéristiques générales

Le genre *Mycobacterium*, seul genre appartenant à la famille des *Mycobacteriaceae* dans l'ordre des Actinomycétales, est composé de plus de 90 espèces mycobactériennes. Ce sont des bactéries à Gram positif, aérobies, acido-alcoolo-résistantes.

Selon la définition classique du genre *Mycobacterium*, reposant sur les propriétés morphologiques, les mycobactéries se présentent comme des bacilles droits et incurvés, immobiles, ne formant ni spores ni capsules (Figure 1).



**Fig 1 : *Mycobacterium tuberculosis* vue au microscope électronique à balayage. 15549X
Mag. CDC**

Certaines mycobactéries apparaissent comme filamenteuses ou en mycélium. De nombreuses espèces produisent des pigments de type caroténoïdes, conférant aux colonies une couleur jaune à orange foncé, après photo-induction ou en absence de toute exposition à la lumière. [George Coumba Yoya. 2010].

1. Classification selon Bergey's

Les mycobactéries sont incluses dans la classification de Bergey's dans:

- Phylum des Actinobacteria
- Classe Schizomycetales
- Sous classe des Actinobacteridae
- Ordre des Actinomycetales
- Sous ordre des Corynebacterineae
- Famille des Mycobacteriaceae
- Genre: *Mycobacterium*

2. Classification selon l'importance clinique

En fonction de leur signification clinique, les mycobactéries peuvent être classées en deux groupes : les mycobactéries typiques et les mycobactéries atypiques dont les premiers ont un parasitisme strict et un pouvoir pathogène bien établi, alors que les seconds peuvent donner des pathologies divers chez les immunodéprimés et des infections nosocomiales en colonisant l'environnement hydro-tellurique à partir duquel l'homme et les animaux se contaminent [Carbonnelles, et al, 2003 ; Ziza, et al, 2006]

3. Les mycobactéries : à l'origine de la tuberculose

Les bactéries responsables de la tuberculose humaine sont des mycobactéries du complexe tuberculis : *M. tuberculosis*, *M. bovis* et *M. africanum* [George Coumba Yoya. 2010]

II. *La tuberculose*

Tableau 1: Les différentes formes d'atteinte tuberculeuse [Manuel de la tuberculose | Mai 2007 Ligue pulmonaire suisse]

Exposition à la tuberculose		Contact avec un patient tuberculeux contagieux
		Sensibilisation des lymphocytes T (test tuberculinique ou test

Infection tuberculeuse latente		interféron gamma positifs) sans maladie déclarée ni atteinte radiologique
Tuberculose (maladie)	Primo-infection	Symptômes généraux, toux occasionnelle
	Réactivation	Atteinte pulmonaire et/ou extrapulmonaire avec signes cliniques et/ou radiologiques
	Séquelles de tuberculose	Lésions fibreuses, calcifications, cicatrices sans activité bactériologique ni symptômes

1. Description et épidémiologie

La tuberculose est une infection bactérienne contagieuse et perilleuse provoquée par le complexe *Mycobacterium tuberculosis* incluant principalement *mycobacterium tuberculosis*, *mycobacterium bovis*, *mycobacterium africanum*, *mycobacterium microti* et *mycobacterium canettii* [Heym, et al, 2007, Oscar et al. 2008]

Peu de temps après la mise en évidence du caractère infectieux et contagieux de la tuberculose par J. A. Villemin, R. Koch identifia le bacille responsable de la maladie (1882) : *M. tuberculosis*. Les travaux initiaux de A. Calmette et C. Guérin (1908) aboutirent en 1921 à la mise au point du vaccin BCG, seul vaccin utilisé à nos jours [George Coumba Yoya. 2010]

en 1944, S. Waksman découvrit le premier antibiotique actif contre la tuberculose : la streptomycine. Durant les 20 années suivantes (1944-1965) de nombreux antituberculeux virent le jour. Cinq de ces antibiotiques, l'isoniazide, l'éthambutol, la rifampicine, le pyrazinamide, et la streptomycine sont dits majeurs ou de première ligne [George Coumba Yoya. 2010]

A ce jour, malgré l'existence d'un vaccin (le BCG) et d'une polychimiothérapie efficace mise en place dès les années 70, la tuberculose reste la première cause de mortalité due à un agent infectieux unique [George Coumba Yoya. 2010]

La tuberculose pulmonaire (phtisie) est la plus fréquente et la seule contagieuse [Enarson et al, 2000]. Cependant il existe d'autres formes de tuberculose extrapulmonaire, qui peuvent toucher d'autres parties du corps humain. Ces dernières peuvent entraîner des atteintes osseuses (mal de pott, tumeur blanche du genou...etc), rénales, intestinales, génitales, méningées et cutanées. Lorsque la maladie atteint plusieurs organes, on parle de tuberculose disséminée ou miliaire [Enarson et al, 2000]

La source essentielle de dispersion de *Mycobacterium tuberculosis* provient des patients atteints de tuberculose pulmonaire et dont les crachats contiennent des bacilles acido-alcool-résistants (BAAR). [T. May, et al, 2005]

La plupart des cas ont été constatés dans les régions africaines, de l'Asie du Sud-Est et du Pacifique occidental, avec des taux de 35 %, 30% et 20% respectivement. On estime que les VIH-positifs représentent entre 11 et 13% de l'ensemble des nouveaux cas de TB, la Région africaine comptant pour environ 80% de ces cas. [Rapport 2010 sur la lutte contre la tuberculose dans le monde]

2. Evolution de l'incidence

A la fin des années 1970, avec la mise en place d'un traitement basé sur une polychimiothérapie obligatoire d'une durée de six mois, l'éradication était envisagée pour les années 2005-2010 dans les pays développés [OMS, aide mémoire N° 104 Mai 2008]. Cependant, la tuberculose est aujourd'hui en recrudescence. En effet, ces dix dernières années, le nombre de tuberculeux dans le monde a augmenté de 20% et l'OMS estime que le

nombre de morts imputé à la tuberculose va croître pour atteindre 5 millions en 2050. **[Davies, P. D, 2003]**

En 2009, 1,7 million de personnes (dont 380 000 femmes) ont perdu par la tuberculose, dont 380 000 vivant avec le VIH, ce qui équivaut à 4 700 morts par jour

En 2009, on a dénombré 9,4 millions de nouveaux cas de tuberculose, dont 3,3 millions de femmes et 1,1 million chez des personnes vivant avec le VIH

Tableau 2: Tuberculose: estimations de l'incidence, de la prévalence et de la mortalité (2009) (*)

Région de l'OMS	Incidence ¹			Prévalence ²		Mortalité (hors VIH)	
	Nombre en milliers	% du total mondial	Pour 100 000 habitants	Nombre en milliers	Pour 100 000 habitants	Nombre en milliers	Pour 100 000 habitants
Afrique	2 800	30%	340	3 900	450	430	50
Amériques	270	2,9%	29	350	37	20	2,1
Méditerranée orientale	660	7,1%	110	1 000	180	99	18
Europe	420	4,5%	47	560	63	62	7
Asie du Sud-Est	3 300	35%	180	4 900	280	480	27
Pacifique occidentale	1 900	21%	110	2 900	160	240	13
Ensemble du monde	9 400	100%	140	14 000	164	1 300	19

¹Incidence: nouveaux cas survenant pendant une période déterminée.
²Prévalence: nombre de cas existant dans la population à un moment déterminé.

3. VIH et la tuberculose

La relation entre l'infection par le VIH et la tuberculose est aujourd'hui bien établie. Une co-infection peut être retrouvée dans 30 à 60 % des cas, particulièrement dans les pays en développement d'Afrique Noire et d'Asie où l'endémie tuberculeuse est particulièrement prévalent, **[J.E COULAUD, 1995]**

L'incidence de la tuberculose chez les sidéens est 500 fois plus élevée que chez la population générale **[Soualhine. 2001]**.

En 2009, 26% des patients atteints de tuberculose, 53% de la Région africaine, connaissaient leur statut pour le VIH (en 2008, ils n'étaient que 22%) **[Rapport 2010 sur la lutte contre la tuberculose dans le monde]**.

D'après les estimations de l'OMS, 70 des cas infectés simultanément par le VIH et la tuberculose, vivaient en Afrique sub-saharienne **[Raviglione et al, 1995]**

L'épidémie du sida a été aussi responsable de survenue des surinfection occasionnées par les bactéries non tuberculeuses lorsque l'immunodépression est importante avec des taux de T₄ inférieurs à 50 cellules par mm³, ce qui a engendré l'augmentation de la fréquence de ces mycobacterioses en les rendant une préoccupation pathologique majeure telle est l'infection par *mycobacterium avium* devenant plus fréquente et responsable de 80 % des mycobacterioses du sida **[Dautzenberg, 1994 ; Leclerc, 2003 ; durand, 2005]**.

4. Infection et transmission

La tuberculose est une maladie contagieuse. Comme un rhume banal, elle se propage par voie aérienne. Seules les personnes dont les poumons sont atteints peuvent transmettre l'infection.

Lorsqu'elles toussent, éternuent, parlent ou crachent, elles projettent dans l'air les germes de la maladie, appelés bacilles tuberculeux. Il suffit d'en inhaler quelques-unes pour être infecté.

En l'absence de traitement, une personne atteinte de tuberculose évolutive peut infecter en moyenne 10 à 15 autres personnes en l'espace d'une année. Cependant, les sujets infectés ne font pas nécessairement une tuberculose. Le système immunitaire oppose un «rempart» au bacille tuberculeux qui, protégé par une épaisse couche cireuse, peut rester quiescent pendant des années. Les sujets infectés dont le système immunitaire est affaibli sont plus susceptibles de développer la maladie.

- Un tiers de la population mondiale est actuellement infecté;
- De 5 à 10% des sujets infectés (non infectés par le VIH) développent la maladie ou deviennent contagieux au cours de leur existence. Les personnes infectées à la fois par le VIH et le bacille tuberculeux sont beaucoup plus susceptibles de développer la maladie.

III. Traitement de la tuberculose

Les grandes lignes du traitement de la tuberculose n'ont pas changé au cours des trois dernières décennies: celui-ci repose le plus souvent sur une quadrithérapie pendant deux mois (isoniazide, rifampicine, pyrazinamide et éthambutol) relayée par une bithérapie pendant quatre mois (isoniazide, rifampicine). [P.Tattevin, 2007]

1. Les médicaments antituberculeux

Le panel des antituberculeux est spécifique et très limité. Actuellement, on distingue les antibiotiques dits de 1^{re} ligne comme l'isoniazide, la rifampicine, l'éthambutol et le pyrazinamide et les antibiotiques de 2^e ligne comme les aminoglycosides, polypeptides, fluoroquinolones, thioamides, cycloserine et acide para-amino salicylique que l'OMS ou World Health Organization propose de classer les antituberculeux en 5 groupes (tableau 3).

Tableau 3 : Classification des antituberculeux selon l'OMS

groupes	molécules
Groupe 1 : 1 ^{ère} ligne orale	Isoniazide, rifampicine, éthambutol, pyrazinamide
Groupe 2 : injectable	Kanamycine, amikacine, capreomycine, viomycine, streptomycine
Groupe 3 : fluoroquinolones	Moxifloxacine, levofloxacine, ofloxacine
Groupe 4 : 2 ^e ligne orale bacteriostatique	Ethionamide, prothionamide, cycloserine, terizidone, acide p-aminosalicylique
Groupe 5 : activité douteuse (non recommandés par l'OMS)	Thiocetazone, clofazimine, linezolid, clarithromycine

Les cinq médicaments antituberculeux majeurs sont:

- Isoniazide = H
- Rifampicine = R
- Pyrazinamide = Z

- Ethambutol = E
- Streptomycine = S

H et R sont de puissants bactéricides actifs contre tous les types de bacilles. S est efficace contre les germes en multiplication rapide. E est bactériostatique. Z est actif en milieu acide contre les bacilles intracellulaires. En association à 3 autres antituberculeux majeurs, il permet de raccourcir la durée du traitement. La pénétration des antituberculeux dans les méninges et le liquide céphalorachidien est aléatoire. Elle est bonne pour H et Z, moins bonne pour R, S et E, qui pénètrent surtout lorsque les méninges sont enflammées, soit lors des stades précoces de la maladie. Ces éléments pharmacocinétiques ont été déterminants pour définir les schémas thérapeutiques actuellement standardisés par catégories de cas [Leuenberger P, et al, 2000] Les mycobactéries atypiques sont généralement résistantes à de nombreux antibiotiques et nécessitent des traitements de plus longue durée, avec des antibiotiques différents de ceux utilisés pour la tuberculose pouvant être actifs contre les mycobacterioses tels que :

- La clarithromycine, un nouveau macrolide utilisé en trithérapie avec l'éthambutol et la rifabutine pour traiter les infections à *mycobacterium avium*.
- Le traitement contre *mycobacterium marinum* fait appel aux tétracyclines et cotrimoxazole.
- Le doxycycline est utilisé pour traiter les infections à *mycobacterium fortuitum-chelonei* [fauville, 2005]

2. Traitement de la tuberculose chez les patients infectés par le VIH

Globalement, la réponse clinique et l'efficacité bactériologique ne semblent pas différentes en cas d co-infection par le VIH mais sont parfois plus lentes. [American Thoracic Society 2003] En revanche, plusieurs problèmes sont plus fréquents : risque de résistance des bacilles, intolérances et interactions médicamenteuses, risque d'aggravation paradoxale, risque de rechute. Le taux de mortalité reste élevé. Dans le cas d'une tuberculose à bacilles sensibles, le traitement standard de 6 mois est suffisant. Cependant, un schéma thérapeutique de 9 mois (2 + 7), voire plus, est préconisé en cas de culture positive persistante des expectorations après 2 mois de traitement, le principe étant de prolonger le traitement d'au moins 4 mois après la négativation des cultures. [C. Billy, et al, 2004]

3. Traitement de la tuberculose résistante

Le traitement des formes résistantes consiste en l'utilisation d'antituberculeux testés comme efficace sur la souche en question, complété par une fluoroquinolone et par des antibiotiques, dits de seconde ligne. La prise en charge a fait l'objet d'un document de recommandations publié par l'OMS en 2006 [World Health Organization, Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis Geneva: WHO, 2006]

Tableau 4 : Médicaments utilisables dans le traitement de la tuberculose multirésistante (MDR-TB) [Manuel de la tuberculose | Mai 2007 Ligue pulmonaire suisse]

Médicaments de première ligne	Injectables	Fluoroquinolones	Bactériostatiques	Autres
<ul style="list-style-type: none"> - (Isoniazide) - (Rifampicine) - Pyrazinamide - Ethambutol 	<ul style="list-style-type: none"> - Streptomycine, Amikacine - Capreomycine - Kanamycine 	<ul style="list-style-type: none"> - Ciprofloxacine, Ofloxacine, Levofloxacine, Moxifloxacine, Gatifloxacine, Sparfloxacine 	<ul style="list-style-type: none"> - Ethionamide, Prothionamide - Cycloserine - PAS 	<ul style="list-style-type: none"> - Rifabutine - Amoxicilline / ac. clavulanique - Linezolid - Clarithromycine - Thiacetazone -Isoniazide intermittent à haute dose

4. Nouveaux médicaments antituberculeux

Malgré l'urgence et l'augmentation du nombre des cas de tuberculose dans le monde, les principaux médicaments antituberculeux disponibles sont encore ceux qui ont été introduits entre 1950 et 1970. Depuis lors, aucun médicament majeur n'a été mis sur le marché. La raison en est, entre autres, la difficulté de la recherche sur un germe à croissance très lente et le peu d'intérêt de l'industrie pharmaceutique pour un marché peu rentable en termes économiques. En outre, un certain nombre de médicaments dits de seconde ligne, utiles pour le traitement des cas devenus résistants aux médicaments de base (isoniazide et rifampicine) ont un coût si élevé qu'ils ne peuvent pas être utilisés dans les pays où ils seraient indispensables, ou ne sont simplement plus disponibles sur le marché. [P. Leuenberger, et al, 2004]

Depuis plus de vingt ans, le schéma thérapeutique antituberculeux fait appel à une combinaison de médicaments administrés pendant six à huit mois. Même qualifié de «court» par l'OMS, ce schéma est très long pour le malade, associé à des effets indésirables parfois importants, et très coûteux si les médicaments doivent être achetés au prix du marché libre. Depuis quelques années cependant, sous la pression des autorités sanitaires internationales, OMS et Union internationale contre la tuberculose en tête, l'industrie et la recherche se sont mises à nouveau au travail. Si aucun médicament vraiment nouveau n'a vu encore le jour, on enregistre cependant quelques progrès encourageants. [P. Leuenberger, et al, 2004]

La recherche a permis de trouver de nouveaux antituberculeux (soit parmi les antibiotiques connus, soit de nouvelles molécules), actuellement en phases cliniques chez l'homme, avec des résultats inattendus. Parmi les molécules déjà commercialisées, on retrouve la moxifloxacine, la gatifloxacine, le linézolide, la rifapentine et la rifabutine. D'autres études sont nécessaires pour mieux positionner l'utilisation de ces fluoroquinolones. L'efficacité du linézolide est contrebalancée par ses effets secondaires. Quant aux rifamycines, leur activité est confirmée et elles sont déjà utilisées dans plusieurs pays. Parmi les nouvelles molécules, ont été sélectionnées le PA-824, l'OPC-67683, la diarylquinolone TMC207, la diamine SQ109 et les dérivés pyrroles. Pour la plupart, leur mécanisme d'action n'est connu que partiellement. Autant le PA-824 nécessite d'autres études cliniques pour confirmer son efficacité, autant les autres nouveaux composés sont en attente de phases II (OPC-67683, TMC207, SQ109) et de phase I (les dérivés pyrroles). Plusieurs molécules sont en phase d'évaluation préclinique. [Marigot-Outtandy D, et al, 2009]

4-1. Nouveaux dérivés ou nouvelles indications de médicaments existants:

4-1-1. Rifapentine

La rifapentine, dérivée de la rifampicine, possède une demi-vie beaucoup plus longue et se prête de ce fait à une utilisation intermittente, par exemple une fois par semaine, ce qui permettrait de réduire le risque d'erreur ou d'interruption liée au traitement quotidien. Diverses études ont été entreprises pour évaluer l'utilité de la rifapentine, en général accompagnée de l'isoniazide, dans la phase d'entretien de la chimiothérapie antituberculeuse. La comparaison est faite avec le régime habituel associant la rifampicine et l'isoniazide. Dans un modèle animal de tuberculose chez la souris, la monothérapie de rifapentine en administration hebdomadaire pendant six mois permettait de stériliser les lésions après une phase initiale de traitement quotidien associant au moins trois médicaments pendant deux mois ou en association hebdomadaire avec l'isoniazide après une phase de trithérapie quotidienne pendant deux semaines. L'association avec la moxifloxacine a permis d'obtenir un taux de guérison similaire à celui de l'association avec l'isoniazide. [Lounis N, et al, 2001] Dans un essai clinique chez l'homme, l'association d'isoniazide et de rifapentine en une seule dose

hebdomadaire pendant la phase d'entretien était associée à un taux plus élevé d'échecs (9,2%) que l'association de rifampicine et d'isoniazide administrés deux fois par semaine (5,6%) [Benator D, et al, 2002] Le taux sérique d'isoniazide influençait le résultat thérapeutique [Weiner M, et al, 2003] Dans une autre étude, où le régime initial comprenait la streptomycine, le taux d'échecs était également plus élevé dans le groupe traité une fois par semaine par l'association de rifapentine et d'isoniazide que chez les malades recevant trois fois par semaine une association de rifampicine et d'isoniazide, indépendamment du taux sérique d'isoniazide. [Tam CM, et al, 2002]. La place exacte de la rifapentine dans le traitement de la tuberculose n'est donc pas encore établie. [Rieder HL, et al, 2001]

4-1-2. Nouvelles quinolones

Les quinolones possèdent une activité bactéricide contre *M. tuberculosis* et un profil de sécurité intéressant, mais leur emploi était jusqu'ici réservé aux cas de résistance ou d'intolérance aux antituberculeux majeurs ou aux traitements d'attente chez les patients suspects d'être atteints de germes multi résistants. Jusqu'à présent, les deux dérivés les plus utilisés étaient la ciprofloxacine et l'ofloxacine, qui diffèrent peu en termes d'efficacité et de tolérance. Parmi les autres quinolones, la lévofloxacine, la gatifloxacine et la moxifloxacine ont également une activité antimycobactérienne. La moxifloxacine possède le profil le plus intéressant, du fait que le rapport de la concentration sérique maximale à la concentration minimale inhibitrice (C_{max}/CMI) est le plus élevé (5 à 10 fois celui de la ciprofloxacine) et que le temps pendant lequel la concentration sérique se situe au-dessus de la concentration minimale inhibitrice est trois à quatre fois plus long que pour les autres quinolones. La moxifloxacine possède un pouvoir bactéricide proche de celui de l'isoniazide et pourrait même devenir un des médicaments antituberculeux de base. [Ginsburg AS, et al, 2003] En outre, son profil permet de l'utiliser aux doses usuelles (400 mg/j) et non à la dose double de la dose habituellement recommandée, comme pour les autres quinolones. Si l'effet bactéricide et la longue durée d'action se confirment, l'association de moxifloxacine et de rifapentine en administration hebdomadaire pendant la phase de continuation du traitement permettra peut-être de simplifier le schéma thérapeutique en réduisant la durée du traitement et le nombre de doses.

4-1-3. Linézolide

Le linézolide fait partie du groupe des oxazolidinones, dont les propriétés antimycobactériennes in vitro sont connues depuis plus de dix ans [Rodriguez JC, et al, 2002] Le produit est indiqué dans le traitement des infections à germes Gram-positif résistant aux autres antibiotiques. Il est également actif contre les mycobactéries à croissance rapide. Dans un modèle animal, l'activité du linézolide contre *M. tuberculosis* a été confirmée. [Cynamon MH, et al, 1999] L'activité chez l'homme n'a pas encore été démontrée dans des études prospectives, mais le produit est parfois utilisé dans le traitement de cas de tuberculose multirésistante. Son prix très élevé pourrait représenter un obstacle à un emploi plus large.

4-2. Nouvelles molécules

De nombreuses substances, dérivées de médicaments antituberculeux connus ou appartenant à des classes chimiques nouvelles, sont actuellement en cours d'évaluation in vitro ou dans des modèles animaux, mais aucun ne se trouve actuellement au stade des essais cliniques larges ni

à la veille d'une introduction en pratique clinique. [Tomioka H. 2000; Parrish NM, et al., 2001]

IV. BCG et mise au point de nouveaux vaccins

Le BCG est un vaccin bactérien vivant mis au point par Calmette et Guérin et qui dérive d'une souche atténuée de *mycobacterium bovis* cultivée. La première vaccination humaine a lieu en 1921 à Paris [Billy et Levy-Bruhl, 2007], le BCG reste jusqu'à aujourd'hui le seul vaccin anti tuberculeux disponible [Ann Ginsberg, 2002]

La protection conférée par le BCG est une prévention primaire qui vise à infecter le sujet avec un vaccin vivant atténué avant le premier contact infectant avec *Mycobacterium tuberculosis*. Cette vaccination a pour but principal de protéger les jeunes enfants des formes graves de la tuberculose précoce, méningites tuberculeuses et miliaires en particulier. L'efficacité du vaccin BCG est estimée entre 75 et 85% pour les formes graves du nourrisson et du jeune enfant, notamment méningite et tuberculose disséminée et entre 50 et 75 % pour la tuberculose de l'adulte : il ne permet donc pas d'empêcher la transmission de la maladie et d'enrayer l'épidémie mondiale.

L'immunité liée à cette vaccination ne garantit pourtant pas une protection absolue, mais permet essentiellement d'atténuer les formes graves de la maladie [Ait-khalid et Enarson, 1999]

V. Problème de la résistance

La résistance aux antituberculeux n'est pas un phénomène récent, les souches résistantes à la streptomycine sont apparues très rapidement après l'introduction de cet antibiotique dans le traitement de la tuberculose. La résistance est due à des mutations chromosomiques spontanées avec une fréquence variable selon les antibiotiques (tableau 5), elle est non transférable d'une souche à une autre. Ces mutations portent soit sur les gènes de structure de la cible (rifampicine, aminosides) soit sur le gène codant pour l'enzyme activatrice des prodrogues (INH, pyrazinamide).

Elle est due à des traitements insuffisants en doses ou en durée [Espinal MA, et al, 2001]. Elle pose des problèmes importants car la tuberculose est beaucoup plus délicate à soigner, surtout en cas de résistances à plusieurs anti-tuberculeux (*multi résistance*). Dans le pire des cas, elle est dite *étendue* lorsque qu'elle concerne des antibiotiques de première intention (isoniazide, rifampicine) et un ou plusieurs antibiotiques de seconde intention. Son incidence est d'environ 10 % des nouveaux cas (pour un seul antibiotique) et de 1 % (pour plusieurs antibiotiques). Dans certains pays, ces chiffres peuvent atteindre plus de 50 % des cas (notamment en Russie) [Mohamed Abdel Aziz, et al, 2006]

1. Résistance primaire

La résistance primaire rencontrée chez les malades qui n'ont jamais été traités par des médicaments antituberculeux, mais qui ont été contaminés par des bacilles résistants émis par des malades déjà traités. Elle concerne la streptomycine ou à l'isoniazide et parfois les deux. La résistance primaire à la rifampicine est actuellement exceptionnelle au Maghreb. [M. Adnaoui, et al, 2009]

2. Résistance secondaire ou acquise

La résistance secondaire ou acquise observée chez les malades qui ont reçu une chimiothérapie antituberculeuse inadéquate, réalisant une monothérapie délibérée ou accidentelle (intolérance médicamenteuse ou posologie insuffisante d'un ou plusieurs médicaments prescrits). Le taux de résistance acquise est d'autant plus élevé et d'autant plus grave (en nombre d'antibacillaires) que la chimiothérapie appliquée a été anarchique et les malades ont reçu plusieurs cures thérapeutiques antituberculeuses. [M. Adnaoui, et al., 2009]

Dans le cas de souches résistantes à plusieurs antibiotiques, chaque résistance est acquise indépendamment, le plus souvent en fonction des antibiotiques utilisés. [Jeanne Maugein et Audrey Chemoul, 2010]

3. Multirésistance

Les souches MDR sont définies comme des souches résistantes à l'INH et à la Rifampicine
 Les souches XDR-TB sont définies comme résistantes à l'INH, la rifampicine les fluoroquinolones et a au moins deux antibiotiques de seconde ligne injectables, c'est-à-dire amikacine, capreomycine et kanamycine. Ces phénotypes sont dus à une accumulation séquentielle de mutations dans différents gènes.

4. Epidémiologie des résistances

L'Organisation mondiale de la Santé a estimé à environ 0,5 million le nombre de tuberculoses multirésistantes en 2006. Les souches MDR sont présentes dans la quasi-totalité des pays mais avec des taux très variables, les plus élevés sont décrits dans certains pays comme la Chine et l'ex-Union soviétique.

En Europe en 2007, la proportion des souches MDR était d'environ 4% mais là encore avec une disparité selon les pays, elles sont plus fréquentes dans les pays baltiques [Annual epidemiological report on communicable disease 2009, surveillance report, European centre for disease prevention and control].

5. Mécanismes de résistance

5.1. Isoniazide

De nombreuses mutations ont été mises en évidence, mais deux seulement sont à l'origine des principales résistances en clinique. (I) La mutation ou les délétions partielles du gène *katG* implique dans la transformation de l'INH en produit actif qui donne un niveau de résistance élevé (CMI > 10 µg/ml). (II) La mutation du gène *inhA* implique dans la synthèse des acides gras qui se traduit par une résistance de bas niveau (CMI > 0,2 mais < 1 µg/ml), cette résistance est croisée avec celle de l'éthionamide. [Jeanne Maugein et Audrey Chemoul, 2010]

5.2. Rifampicine

La résistance est liée à des mutations du gène *rpoB* codant la sous-unité S de l'ARN polymérase. Ces mutations se trouvent dans une région 81 Pb du gène, les mutations en position 531, 526 et 516 sont les plus fréquentes et donnent une résistance de haut niveau (CMI > 32 µg/ml), celle-ci est croisée pour toutes les rifamycines. Des mutations spécifiques en 511, 516, 518 et 522 sont associées à un bas niveau de résistance et dans ce cas la souche peut être sensible à la rifabutine [Zhang Yet Yew W, 2009]

5.3. Pyrazinamide

Les mutations du gène *pncA* codant la pyrazinamidase serait le mécanisme principal de la résistance au pyrazinamide [Scorpio A, et al, 1997]

5.4. Ethambutol

La mutation est liée à des mutations du gène *embB* et occasionnellement *embC*. D'autres mutations sont situées en amont de l'opéron *embABC*. Il a été montré [Safi H, et al, 2008] que le niveau de résistance était très différent selon l'acide amine substituée. Cependant, 35 % des souches résistantes à bas niveau (CMI < 10 µg/ml) n'ont pas de mutation, ce qui suggère qu'il existe d'autres mécanismes de résistance.

Tableau 5 : principales propriétés et mécanismes de résistance des antituberculeux [Zhang Y, Yew W. 2009].

antibiotiques	CMI mg/l	Site d'action	activité	Gènes impliqués dans la	Proportion mutants R	Function du gène

				résistance		
Isoniazide	0,02-0,2	Acides mycoliques	Bactericide	<i>katG</i> <i>inhA</i>	10 ⁻⁵	Catalase peroxydase Inhibition de la proteine inhA
Rifampicine	0,05-1	Synthese proteique	Bactericide	<i>rpoB</i>	10 ⁻⁷	Sous-unite ? de la RNA polymerase
Pyrazinamide	16-50		Bactericide	<i>pncA</i>		Nicotinamidase / pyrazinamidase
Ethambutol	1-5	Arabinogalactane	Bacteriostatique	<i>embB</i>	10 ⁻⁶	Arabinosyl transferase
Streptomycine	2-8	Synthese proteique	Bactericide	<i>rpsL</i> <i>rrs</i> <i>gidB</i>	10 ⁻⁶	Proteine ribosomale 16S rRNA 16S rRNA methyltransferase
Amikacine kanamycine	2-4	Synthese proteique	Bactericide	<i>rrs</i>	10 ⁻⁶	rRNA 16S
Capreomycine		Synthese proteique	Bactericide	<i>tlyA</i>		Methyltransferase
Fluoroquinolones	0,5-2,5	DNA gyrase	Bactericide	<i>gyrA</i> <i>gyrB</i>	10 ⁻⁷	Sous unite A de DNA gyrase Sous unite D de DNA gyrase
Ethionamide Thiacetazone	2,5-10	Acides mycoliques	Bactericide	<i>etaA/ethA</i>	10 ⁻³	Mono- oxygenase
Acide para-amino salicylique	1-8	Acide folique Metabolisme du fer ?	Bactericide	<i>thyA</i>	10 ⁻⁵	Thymidylate synthetase
Cycloserine		Peptidoglycane	Bacteriostatique	<i>alrA</i> / <i>ddl</i>	10 ⁻²	D-alanine racemase / ligase

6. Facteurs favorisant la résistance aux antituberculeux

La monothérapie: l'administration d'un seul antibiotique favorise la sélection de mutants résistants à cet antibiotique.

L'irrégulation du traitement: la tuberculose pharmaco-résistante résulte d'un traitement suivi de façon irrégulière ou partielle, les malades omettent de prendre régulièrement tous leurs médicaments jusqu'à la fin de la période prescrite (6 à 9 mois) par ce qu'ils commencent à se sentir mieux, ou parce que les médecins ou les agents de santé ne prescrivent pas le bon processus thérapeutique, ou encore parce que l'approvisionnement en médicaments n'est pas fiable [khadir, 1992]

VI. Recherche de nouvelles molécules à effet anti-mycobactérien

1. Synthèse de molécules chimiques

La chimie combinatoire permet la synthèse de nouvelles molécules pour la tuberculose par l'intermédiaire de deux approches de base:

La synthèse des analogues et modification de molécules existantes. On parle des antibiotiques de semi-synthèse ayant pour but de transformer les antibiotiques naturels pour qu'ils ne soient plus reconnus par les mécanismes de résistance mycobactérienne, citant par exemple

l'approche d'hybridation moléculaire entre la structure de l'isoniazide et une variété de dérivés d'acide trans-cinnamiques qui a généré une molécule dont la concentration antimycobactérienne inhibitrice minimale est comprise entre 3.12 et 12.5 µg/ml ce qui peut représenter ainsi une bonne initiative à exploiter contre la tuberculose résistante [carvalho.et al,2008].

L'innovation des antibiotiques de synthèse qui diffèrent de point de vue structural et fonctionnel des homologues naturels des bacilles multirésistants, tel que les dihydropyridines qui ont montré une activité anti-tuberculose selon une étude menée par Amini et ses collaborateurs [Amini et al, 2008].

Certains 3,5-bis (benzylidène)-4-1 pipéridones ont d'excellentes propriétés antimycobactériennes et sont bien tolérés chez la souris. Les 1 - [4 - (2-aminoéthoxy) phénylcarbonyl] -3,5-bis (benzylidène)-4-pipéridones 3-6 sont un nouveau groupe de puissants représentant antimycobactériens qui stimulent la respiration dans les mitochondries. En général, ces composés sont bien tolérés chez la souris. [Das, et al, 2008].

2. Activités des extraits des plantes

Le règne végétal est une source inépuisable de nouveaux agents antituberculeux. Des plantes médicinales et aromatiques pourraient permettre le traitement ou la prévention de maladies chroniques et/ou graves, et résoudre le problème de la résistance bactérienne vis-à-vis des agents antibactériens actuels. Les recherches sur les activités antimycobactériennes, le mode d'action et la composition chimique des plantes connaissent un regain d'intérêt [Hakima SQALLI, et al, 2007]

Plusieurs travaux ont montré l'activité antimycobactérienne in vitro des extraits de plantes. Oueslati et ses collaborateurs en 1984 ont montré que les extraits aqueux et éthanoliques de certaines plantes utilisées en médecine traditionnelle en Tunisie, inhibent la croissance de quelques bactéries dont *mycobacterium smegmatis* [Dorman et Deans, 2000].

Autre étude menée par Bapela et ses collaborateurs a mis en évidence l'effet antimycobactérien d'*Euclea natalensis*, une plante provenant de l'Afrique du sud et très utilisée en médecine traditionnelle pour traiter les complications respiratoires tels que les douleurs thoraciques, les bronchites, la pleurésie et l'asthme [Bapela et al, 2008]

3. Activité des principes actifs produit par les microorganismes

Les microorganismes présentent une voix prometteuse afin d'avoir des antibiotiques d'origine naturelle.

Les Rifamycines sont des antibiotiques utilisés dans le traitement chimiothérapeutique de la tuberculose, la lèpre et infections liées au sida mycobactériennes. Ils reprennent de l'importance en raison de leur utilisation dans le traitement de la tuberculose associée au SIDA. [Y. Mahalaxmi et al. 2010]

En plus, une forte activité contre les antimycobactériens *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra souche) a été montrée par l'extrait de *Phomopsis* sp. PSU-D15, isolé à partir de feuilles de *Garcinia dulcis* (Roxb.) Kurz. Le genre phomopsien est une source riche de métabolites secondaires biologiquement actifs, y compris antimicrotubules phomopsidin [Vatcharin Rukachaisirikul, et al. 2008]

1. Matériel biologique

1.1. Souches bactériennes utilisées

Les souches utilisées dans les différentes manipulations sont les suivantes:

- *Mycobacterium smegmatis* : mycobactérie atypique non pathogène et à temps de génération d'environ 3 h, à croissance rapide, thermophile, saprophyte, et non pigmenté, mais les cultures vieilles peuvent devenir pigmentées en jaune-orange [Grosset et al, 1995]

Cette souche est utilisée comme modèle pour les tests des activités antimycobactérienne, car elle présente les mêmes caractéristiques que *mycobacterium tuberculosis* sauf qu'elle est non virulente.

- **Souche AV**: c'est une souche isolée au laboratoire de Biotechnologie de la FST de Fès à partir de l'eau de moulay Yakoub (Fès) et qui possède un effet inhibiteur contre les mycobactéries.

- **Souche AF**: c'est une souche isolée au laboratoire de Biotechnologie de la FST de Fès à partir du sol. Elle possède l'activité dépollution des métaux lourds (EL GHACHTOULI, communication personnelle) et elle présente également un bon effet antimycobactérien.

- *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aerogenosa* : sont fournies gracieusement par le Pr LATRACH de la FST Beni Mellal

- *Escherichia coli* DH 5 α : (Laboratoire de biotechnologie FST –Fès)

2. METHODES

2.1. MILIEUX DE CULTURES

2.1.1. Milieu LB (Luria - Bertoni) liquide (g/L) [Maniatis 2^{ème} ed. 1989]

- | | |
|----------------------|---------|
| - Peptone: | 10 |
| - Na Cl: | 10 |
| - Extrait de levure: | 5 |
| - L'eau distillée : | qsp 1 L |

2.1.2. Milieu LB solide: la composition de ce milieu est identique à LB liquide sauf qu'il est additionné d'un agent solidifiant l'Agar-Agar à raison de 15 g/L.

2. 1. 3. Milieu TSB (Trypton Soy Broth) (g/L)

- Bacto- tryptone

- Bacto-soytone (soja)	3
- Glucose	2,5
- Chlorure de sodium	5
- Phosphate bipotassique d'hydrogène	2,5

2. 1. 4. Milieu TSB modifié (Trypton Soy Broth) liquide (g/L), [J M Ballester et al. 1980]

- TSB :	30
- Na Cl:	30
- Extrait de levure :	3

2. 1. 5. Milieu TSB (Trypton Soy Broth) modifié solide: au milieu TSB liquide on ajoute 15 g/L d'Agar-Agar.

Les différents milieux utilisés sont stérilisés par autoclave pendant 30 min à 121°C,

Les milieux gélosés sont laissés refroidir jusqu'à 50°C environ avant d'être coulé aseptiquement dans des boîtes de Pétri, ceci permet d'éviter la formation des gouttelettes d'eau sur les couvercles des boîtes de Pétri.

Ensuite les milieux préparés sont testés pour la stérilité par une incubation d'une nuit à 37°C.

2.2. Cultures bactériennes

2. 2. 1. Culture de la bactérie indicatrice *M. smegmatis*

La souche de *M. smegmatis* estensemencée par stries sur des boîtes de Pétri contenant le milieu LB puis incubé dans l'étuve pendant 24 à 48 h. La culture est mise en suspension dans 1 ml d'eau stérile par grattage de la culture, puis 50 à 100 µl (environ 10⁶ à 10⁷ UFC/ml) est étalé à la surface de la gélose contenu dans des boîtes de Pétri.

2. 2. 2. Culture des bactéries à tester

Les cultures des bactéries à tester pour l'activité antimycobactérienne sont maintenues par repiquage sur milieu solide. Le milieu LB pour la souche AF, et le milieu TSB modifié pour la souche AV.

Pour les cultures en milieu liquide les incubations sont réalisées pendant 48 h à 37°C et sous agitation.

3. Test de l'activité des souches isolées après repiquage

Après croissance des souches AF et AV, la conservation de l'activité antimycobactérienne est testée directement par ensemencement par piqûre sur milieu gélosé contenant 50µl (environ 10⁶ UFC) de la souche indicatrice *M.smegmatis* préalablement étalée sur boîtes. Ces derniers sont ensuite incubés à 37°C pendant 24 heures puis les diamètres des auréoles d'inhibition sont mesurés.

4. Extraction et concentration des molécules bioactives du surnageant de culture

[S. REGHIOUA, 2008]

La souche AF est cultivée dans 300 ml du milieu LB liquide et la souche AV est cultivée dans 100ml du milieu TSB modifié liquide pendant 48 heures à 30°C et sous agitation. Les cellules sont éliminées par centrifugation à 7000 rpm pendant 15 minutes, le surnageant des cultures est récupéré. L'extraction est réalisée par un volume d'un solvant non miscible (acétate d'éthyle) et sous agitation au moins 2h. Le mélange est soumis à une décantation dans une ampoule à décanter pendant 30 min. La phase organique supérieure d'acétate d'éthyle est récupérée, le solvant est éliminé par évaporation à l'aide d'une rotavapeur. Le résidu obtenu est solubilisé dans 1 ml d'eau distillée stérile puis conservé à 4°C jusqu'à utilisation.

5. Test de l'activité antimycobactérienne des extraits

L'effet de l'extrait est testé par la suite sur *M.smegmatis* selon deux méthodes (méthodes des puits et méthodes des disques)

5.1. Technique des disques (méthode de diffusion)

5.1.1. Réalisation d'une suspension

La suspension de la bactérie indicatrice est réalisée comme suit :

- Mettre stérilement de l'eau physiologique dans un tube eppendorf;
- Prélèvement ou grattage des colonies ou des stries de la culture pure de la souche indicatrice et la mettre en suspension dans 500 µl d'eau stérile.

NB : Si la suspension est trop trouble, ajuster l'opacité en ajoutant de l'eau stérile.

5.1.2. Préparation de la gélose

- Prendre une boîte de Pétri contenant la gélose LB, vérifier l'absence d'eau à la surface ; s'il y en a, laissé sécher.
- Annoter où sera positionnés les disques d'antibiotiques sur le fond de la boîte (Il faut les éloigner au minimum de 1cm du bord)

- Ensemencer la gélose par étalement de 50µl (environ 10⁶ UFC) de la suspension de la bactérie indicatrice
- Laisser sécher 15 min à température ambiante
- Déposer les disques de papier filtre de 6 mm de diamètre préalablement stérilisés.
- Déposer 30µl de l'extrait sur le disque et laisser 30 min à température ambiante pour assurer la diffusion du principe actif
- Incuber à l'étuve à 37°C pendant 24 h

NB : Le témoin correspond à un disque imprégné d'eau distillée.

5.2. Technique des puits

Des puits sont réalisés dans la gélose à l'aide d'une pipette pasteur stérile, puit un volume de 30 µl d'extrait est déposé dans chaque puits. Ensuite la boîte de Pétri est incubée environ une heure à la température ambiante pour assurer la diffusion du principe actif dans la gélose, l'incubation est faite à 37°C pendant une nuit.

6. Etude physico-chimique des principes actifs

6.1. Sensibilité des principes actifs au traitement thermique

Un volume de 30 µl de l'extrait de la souche AF est subi un traitement à différentes températures : 50°C, 80°C et 100°C pendant 30 minutes.

Puis les tests des activités sont réalisés par la méthode des disques et des puits comme décrit précédemment (5.1, 5.2).

Après incubation une nuit à 37°C, les diamètres des zones d'inhibitions sont mesurés. Et les résultats sont rapportés en mm.

6.2. Sensibilité des principes actifs à la protéinase K

Un volume de 30µl de l'extrait de la souche AF est mélangé avec 6 µl d'une solution de protéinase K à 10 mg/ml, le mélange a été bien homogénéisé et incubé à 37°C pendant une heure, l'effet des principes actifs traités par la protéinase K sur *M.smegmatis* est étudiée en utilisant la méthode des puits et la méthode des disques. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24 heures avant la lecture des résultats par mesure des diamètres des zones d'inhibitions exprimés en mm.

7. Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince de silice (CCM)

Pour les deux souches AF et AV, des CCM sur plaque de silice sensible au UV sont réalisés tout en suivant le protocole expérimental suivant :

- * Un trait horizontal (*ligne de dépôt*) est tracé à environ 1 cm du bas de la plaque de CCM, et trois points de dépôt sont marqués.
- * À l'aide d'une micropipette, on dépose petit à petit 30 µl de l'extrait sur chaque point en séchant après chaque volume déposé.
- * Les différentes phases mobiles testées sont constituées des mélanges suivants

[S. REGHIOUA et al, 2008]

- Mélange 1: n-butanol - méthanol - eau (40 :10 :50)
- Mélange 2 : méthanol -n -hexane (60 :40)

Le mélange est placé dans une cuve à chromatographie (bocal avec couvercle).

- * La plaque de CCM est placée dans la cuve contenant l'éluant. Le solvant migre le long de la plaque par capillarité en entraînant les composés solubles.
- * La migration est arrêtée avant que le front de l'éluant sort de la plaque puis on marque ce niveau par un crayon et on sèche la plaque à 37°C pour éliminer l'éluant.
- * Pour visualiser les différentes taches, la plaque est placée sous une lampe UV. La plaque apparaît en vert fluorescent et les produits qui absorbent les UV apparaissent sous forme de taches sombres et on marque le niveau par un crayon.

8. Essai de localisation des bandes actives après CCM

Pour localiser la bande responsable de l'activité antimycobactérienne, des parties des plaques CCM sont stérilisées sous UV pendant 10 min, puis déposées sur boîtes gélosées préalablement étalées par *M.smegmatis*. L'incubation est faite à 37°C pendant une nuit.

Les autres parties des plaques sont utilisées pour la purification des bandes actives.

9. Essai de purification des bandes actives après CCM

Après avoir révélé sur boîte le niveau de la bande responsable de l'activité, cette zone est grattée et la silice est solubilisée dans 50 µl de l'eau distillée stérile par agitation à l'aide d'un vortex, puis le surnageant est récupéré par centrifugation. La quantité récupérée est déposée sur un disque pour tester son activité.

10. Détermination du spectre d'action des principes actifs des souches AF et AV

Le spectre d'action des principes actifs des souches AF et AV est étudié sur quatre souches bactériennes, deux à Gram- : *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, et deux à Gram+ : *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*.

Cette étude est réalisée selon le protocole expérimental suivant :

Quatre boîtes LB chacune est étalée avec 50µl (environ 10^6 UFC/ml) d'une culture liquide d'une nuit des quatre souches sont préparées, puis deux disques sont déposés dans chaque boîte à l'aide d'une pince stérile, pour chaque boîte 30µl de l'extrait de AF est déposé sur le premier disque et 30 µl de l'extrait de AV est déposé sur le deuxième disque.

Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant une nuit. Après les diamètres de zones d'inhibition sont mesurées et exprimées en mm.

11. Extraction d'ADN

Quatre méthodes sont utilisées a fin d'extraire l'ADN des souches AF et AV :

- Une culture liquide des souches AF et AV est réalisé tout en inoculant 5 ml du milieu LB avec la souche AF, et 5 ml du milieu TSB modifié avec la souche AV, les cultures ainsi préparées sont incubées une nuit à 37°C et sous agitation. Ensuite chaque culture est répartie en 5 tubes eppendorf de 1,5 ml à raison de 1 ml/tube, les milieux de cultures sont éliminés par centrifugation et les culots cellulaires sont soumis aux différentes méthodes d'extractions d'ADN génomique puis testés pour l'amplification par PCR.

11.1. Première méthode Protocole classique au phénol- chloroforme [Maniatis 2^{ème} éd. 1989]

- Lyse cellulaire

- ◆ Les cellules sont récupérées par centrifugation à 3200 tr/min pendant 10 minutes.
- ◆ Eliminer soigneusement le surnageant.
- ◆ Resuspendre le culot dans 0,7 ml de la solution de lyse (NaCl 100 mM, Tris HCl 10mM pH8, EDTA 25 mM pH8, SDS 0.5 %, protéinase K 0.2 mg/ml).
- ◆ la lyse se fait par incubation à 54 °C pendant 3 heures.

- Extraction

- ◆ ajouter 1V de chloroforme/phénol (1 :1) et agiter bien.
- ◆ centrifuger à 3200tr/min pendant 5 minutes.
- ◆ récupérer la phase aqueuse supérieure (environ 0,5 ml).

- Précipitation d'ADN

- ◆ Ajouter 50 µl d'acétate de sodium 3M (1/10 du volume).
- ◆ Ajouter 2V d'éthanol (1 ml) ou 1V d'isopropanol.
- ◆ incuber 15 minutes à -20°C.
- ◆ Centrifuger 15 minutes à 9000 rpm.
- ◆ Éliminer le surnageant.
- ◆ Laver avec de l'éthanol 70%
- ◆ centrifuger 15 minutes à 9000 rpm.
- ◆ Evaporer l'éthanol sous la hotte.
- ◆ Reprendre le culot dans 20 µl de H₂O stérile.

11. 2. Deuxième méthode : Extraction d'ADN par microonde [Salgado et al, 2008]

- ◆ Une culture liquide de chacune des souches AF et AV est réalisée tout en inoculant 5 ml du milieu LB liquide avec la souche AF, et 5 ml du milieu TSB liquide avec la souche AV. les cultures ainsi préparées sont incubées une nuit à 37°C.
- ◆ deux tubes eppendorf sont préparés pour chaque culture : dans chaque tube on a mis 1,5 ml de la culture, puis une centrifugation à 7000 tr/min est réalisée pendant 15 minutes, le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 150 µl d'eau distillée stérile, puis la quantité est répartie dans six tubes à raison de 20 µl/tube.
- ◆ un traitement par microonde pour les six tubes est fait selon le tableau suivant :

Tableau 6 : Indication des puissances des microondes et du temps de traitement des différents échantillons

Tubes	Potentiel (W)	Temps
4	470	20 s
1	470	30 s
2	470	1 min
3	470	1 min 30 s

5	400	1 min 30 s
6	400	2 min

- ◆ Après centrifugation 2,5 µl est utilisé dans les essais de l'amplification par PCR

11. 3. Troisième méthode [Hoffman et al. 1987]

- ◆ Centrifuger 5 ml d'une culture liquide des souches AF et AV, puis éliminer le surnageant et laver les cellules avec 0.5 ml d'eau stérile.
- ◆ Ajouter 0.2 ml de tampon A (2% TritonX-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0) et 0.2 ml phénol:chloroforme: alcool isoamylique (25:24:1).
- ◆ Vortexer 5 min, puis ajouter 0.2 ml TE.
- ◆ Centrifuger 5 min à 8000 rpm, puis récupérer le surnageant.
- ◆ Réaliser une extraction par le chloroforme.
- ◆ Ajouter 1ml d'EtOH 95%, et placer à -20°C pendant 30 min, puis centrifuger 2 min à 12000 rpm
- ◆ Évaporer l'EtOH puis ajouter 0.4 ml de TE.
- ◆ Ajouter 10 µl d'acétate d'ammonium 4M, mélanger puis ajouter 1ml d'EtOH 100% et mélanger
- ◆ Centrifuger pendant 2 min à 12000 rpm puis sécher le culot. Puis le resuspendre dans 50 µl de TE

11. 4. Quatrième méthode [Burton W et al. 2011]

- ◆ Prélever une petite partie de la colonie suspecte (toucher légèrement la surface au moyen d'une anse ou d'un cône jaune) et mettre en suspension dans un tube eppendorf de 1,5 ml contenant 50 µl de tampon d'ACP 1 X (annexe). Pour le témoin négatif, utiliser un tube contenant 50 µl de tampon ACP 1 X sans cellules.
- ◆ Ajouter 50 µl de Triton X 100 à 2 % (p/v) aux tubes contenant les suspensions de cellules et le témoin négatif, et mélanger avec un agitateur un vortex.
- ◆ Incuber à 100 °C pendant 10 minutes. Laisser refroidir à la température ambiante 10 min et centrifuger les tubes à 2000 rpm pendant 5 min.

12. Amplification de l'ADN 16 S par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

12.1. Amorces utilisées

Les amorces choisies sont des amorces universelles utilisées pour l'identification des eubactéries par séquençage de l'ADNr 16 S [Weisberg, et al, 1999]

Tableau 7: Séquences nucléotidiques des amorces universelles utilisées dans la PCR

Primer	Séquence	Produit PCR
FD 1	5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'	1500 pb
RS 16	5'TACGGCTACCTTGTACGACTT 3'	

12. 2. Mélange réactionnel

Dans un tube eppendorf adapté au thermocycleur, le mélange réactionnel est réalisé comme suit:

Tableau 8: Composition du mélange réactionnel pour la PCR

Réactifs	Volume en μ l	Concentration finale
Tampon Taq (10X)	2	1 X
MgCl ₂ (25 mM)	1.2	1.5 mM
dNTPs (1mM)	4	0.2 mM
fD1 (10 μ M)	2	1 μ M
RS 16 (10 μ M)	2	1 μ M
Taq polymérase (5U/ μ l)	0.2	1U
H ₂ O pure	6.1	-
ADN	2.5	-
Volume final	20	-

12. 3. Conditions de la réaction PCR

Après avoir placé les tubes dans le thermocycleur, une pré-dénaturation à 94°C pendant 5 min est entamée. Ensuite, l'amplification est exécutée selon trois étapes durant 35 cycles :

- Dénaturation à 94°C pendant 30 secondes.
- Hybridation à 55°C pendant 45 secondes.
- Élongation à 72°C pendant 1 min 30 secondes.

A l'issue des cycles, une post-élongation peut être effectuée à 72°C pendant 10 minutes afin de terminer la synthèse des brins d'ADN inachevés.

Les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %

13. Analyse des produits de la PCR par électrophorèse sur gel d'agarose

Cette technique classique permet de séparer des fragments d'ADN selon leur taille. Elle s'effectue comme suit :

13.1. Préparation du gel d'agarose

Une solution d'agarose à 1% est préparée dans le tampon de migration TAE 1X. Cette solution est chauffée jusqu'à la dissolution complète puis refroidie à 50°C. Après un volume de 2 µl de BET (0.5mg/ml) est ajouté, ensuite le mélange est coulé dans un plateau et un peigne à 16 puits y est placé. Après polymérisation, le gel est placé dans une cuve d'électrophorèse contenant le tampon de migration TAE 1X (annexe).

13.2. Dépôt des produits d'amplification

Avant le dépôt, un volume de 3 µl des produits de PCR est mélangé à 2 µl de la solution de charge (annexe)

13.3. Electrophorèse

La migration est réalisée au moyen d'un générateur de courant sous un voltage de 70 V.

Celle-ci est arrêtée lorsque le témoin de migration (bleu de bromophénol) (annexe) atteint les trois-quarts de la longueur du gel.

L'ADN est visualisé à l'aide de la fluorescence du BET par un transilluminateur à UV puis le gel est photographié.

1. Test de l'activité antimycobactérienne des souches AF et AV après repiquage

Le test du pouvoir inhibiteur des souches est réalisé par piqure sur milieu gélosé LB préétabli par *M.smegmatis*, Les résultats de ce test ont permis de confirmer l'activité antimycobactérienne des souches AF et AV. Ainsi les deux souches étudiées sont capables de sécréter des principes actifs qui inhibent la croissance de *M.smegmatis*. Cette inhibition est matérialisée par la formation d'une auréole d'inhibition autour des colonies des souches testées

- Une auréole d'inhibition de 10 mm de diamètre tout autour de la culture de la souche AF témoignant d'une activité antimycobactérienne de cette souche.

- Très faible auréole d'inhibition tout autour de la culture de la souche AV. Ceci est expliqué par la mauvaise croissance d'AV sur le milieu LB. Un autre test d'activité est réalisé sur un

autre milieu (TSB modifié) favorable à la croissance rapide de cette souche. Malheureusement un problème de contamination donne des résultats non interprétables.

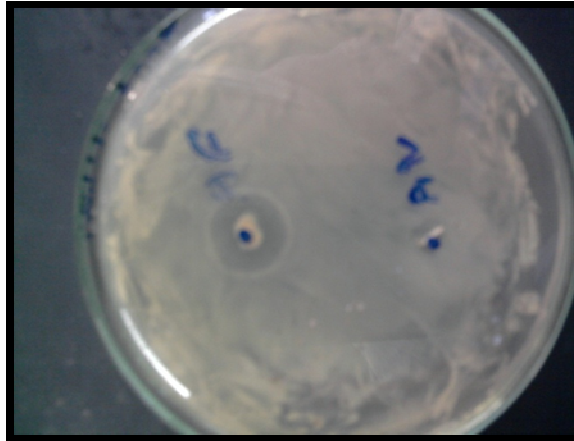


Figure 2 : Mise en évidence d'auréole d'inhibition due à la production par la souche AF de substances inhibant la croissance de *M.smegmatis*

2. Test d'activité des extraits

L'activité des extraits des souches AF et AV obtenus selon le protocole expérimental précédemment détaillé est testée sur *M.smegmatis*. Les résultats de ce test a permis de révéler la présence d'auréole d'inhibition autour des disques (et des puits).

L'activité antibactérienne de ces extraits est mise en évidence par deux techniques: la technique des puits et la technique des disques. Cette dernière a donnée des résultats plus clairs que la première. Donc la technique des disques permet de concentrer les composés actifs contrairement à la technique des puits.

Les diamètres d'auréoles d'inhibition pour les souches AF et AV sont respectivement 13 mm et 11 mm (figure 3)

Ces résultats montrent clairement que des substances à effet antimycobactérien sont secrétées dans le milieu. L'acétate d'éthyle permet d'extraire les principes actifs produits par les souches AF et AV. Ceci est en accord avec les études décrites par [S. REGHIOUA et al. 2008]

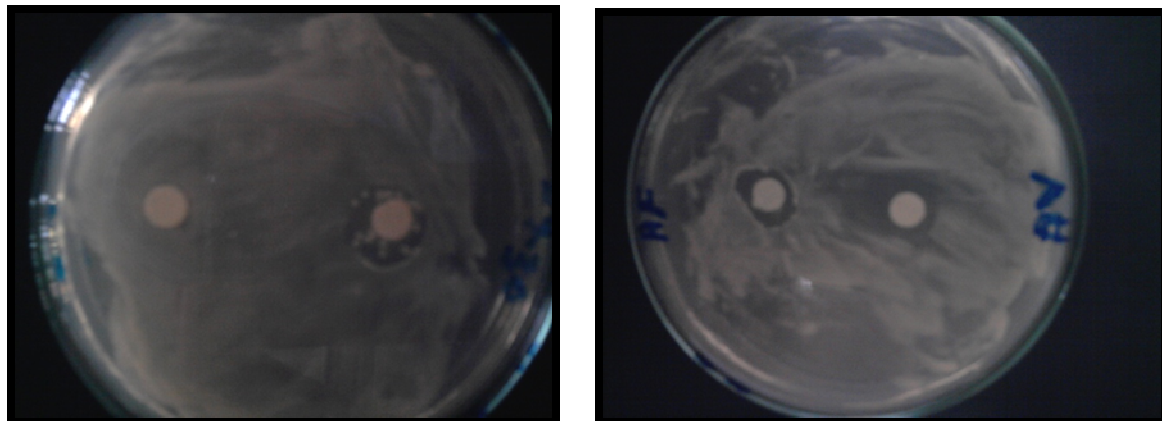


Figure 3 : Mise en évidence de l'effet antimycobactérien (*M.smegmatis*) des extraits des souches AF et AV

3. Sensibilité des principes actifs au traitement thermique et à la protéinase K

Le but de ces tests a été de déterminer la nature des principes actifs secrétés par la souche AF. Les résultats obtenus pour ces tests sont indiqués dans le tableau 9 et la figure 5 ci-dessous.

Tableau 9: Diamètres d'auréoles d'inhibition après traitement à différentes températures et à la protéinase K de la souche AF

Traitement	Témoin : extrait brut	50°C	80°C	100°C	Protéinase K
Diamètre d'Auréole d'inhibition pour la Souche AF (mm)	10	11	9	9	9

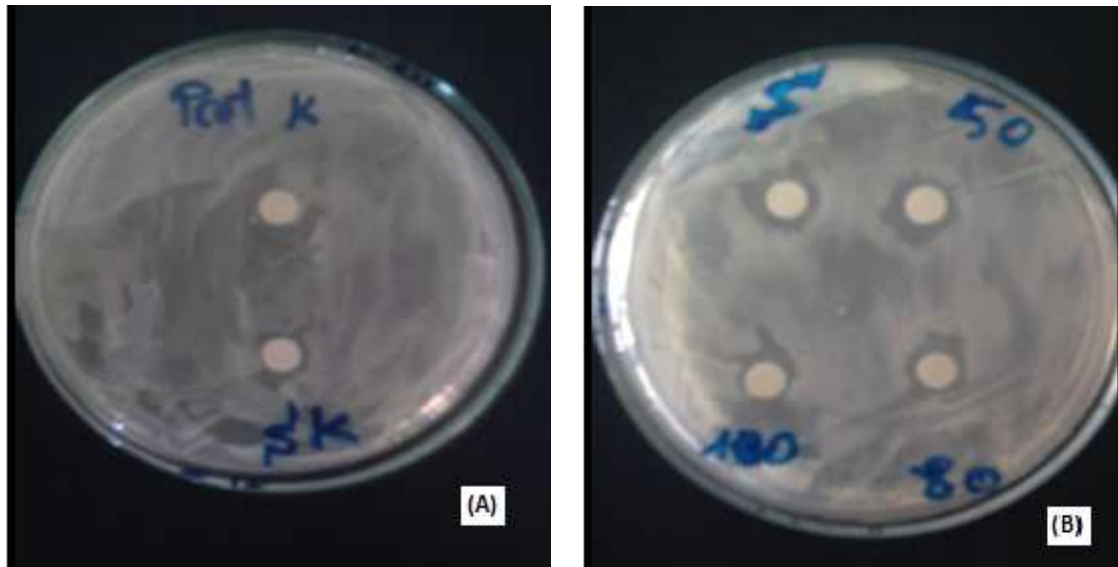


Figure 4: Mise en évidence de l'activité anti mycobactérienne de l'extrait de la souche AF sur *M.smegmatis* après traitement par la protéinase K (A) (Prot K= traité, SK : non traité) et après traitement à différentes températures (B) (S=témoin non traité)

Les résultats obtenus pour la souche AF, montrent la persistance des zones d'inhibition tout autour des disques après traitement de l'extrait à différentes températures pendant 30 minutes, ce qui montre que le traitement thermique n'a aucun effet sur les principes actifs de la souche AF, ceci suggère que les principes actifs responsables de l'effet antimycobactérien de la souche AF ne sont pas de nature protéique.

Ce résultat a été confirmé par le deuxième test: traitement par la protéinase K. on a remarqué ainsi la présence d'auréole d'inhibition autour des disques imprégnés par l'extrait de la souche AF déjà traité par la protéinase K pendant une heure.

On peut conclure alors que les antibiotiques élaborés par la souche AF ne sont pas de nature protéique.

4. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les résultats concernant ce test sont représentés ci-dessous (figure 6)

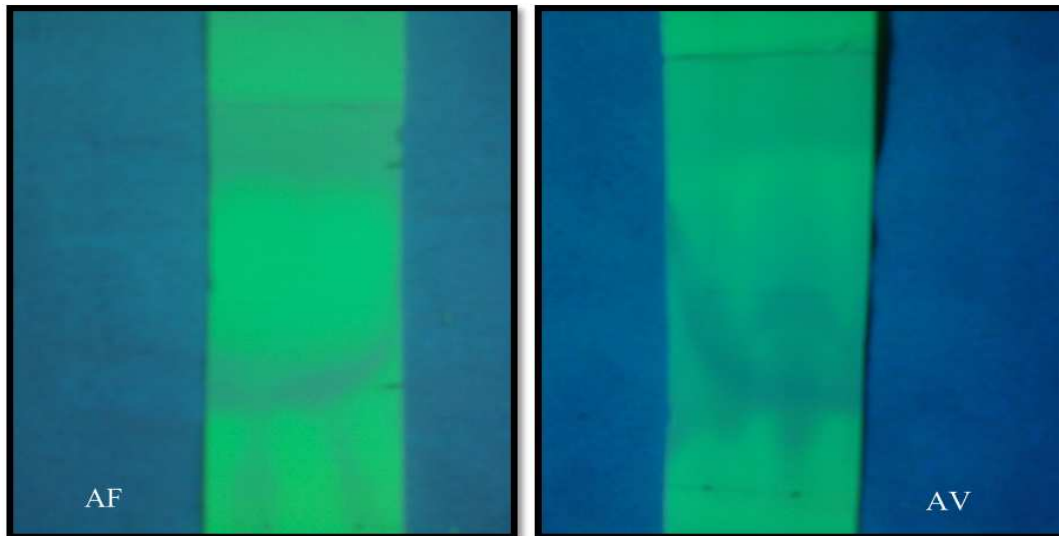


Figure 5: Résultats de la CCM pour la souche AF et la souche AV

Les extraits étudiés ont été analysés par CCM sur gel de silice. La CCM a permis de séparer les deux extraits au moins en deux bandes distinctes en utilisant l'eluant méthanol –n hexane. L'activité antimycobactérienne de la souche AF peut être due à l'une des deux bandes au bien à toute les deux. Pour s'assurer la plaque CCM a été déposée sur boîte gélosée préalablement étalée par *M.smegmatis*. Après incubation on a remarqué une zone d'inhibition tout autour de la bande en haut. Ce qui montre que c'est cette bande qui est responsable de l'activité antimycobactérienne de la souche AF.

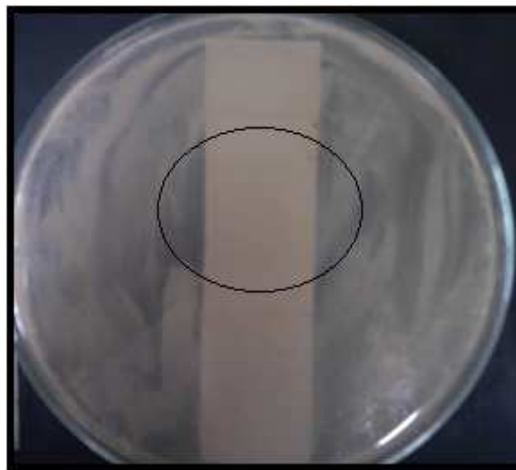


Figure 6: Essai de localisation de la bande responsable de l'activité antimycobactérienne de la souche AF après CCM sur gel de silice par culture sur *M.smegmatis*

5. Spectre d'action des principes actifs des extraits des souches AF et AV

L'étude de spectre d'action des extraits des souches AF et AV sur des souches à Gram- et à Gram+ a montré une activité inhibitrice des extraits sur les quatres souches étudiées ; Les diamètres d'auréoles d'inhibition sont les suivantes :

Tableau 10: Diamètres des auréoles d'inhibition pour les quatre souches étudiées

Souches	Les diamètres d'auréoles d'inhibition (mm)	
	Extrait de AF	Extrait de AV
<i>Escherichia coli</i>	9	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	10
<i>bacillus subtilis</i>	9	15
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	9



Figure 7: Effet des extraits des souches souches AF et AV sur la croissance des souches de *bacillus subtilis* (à gauche) et *Staphylococcus aureus* (à droite).

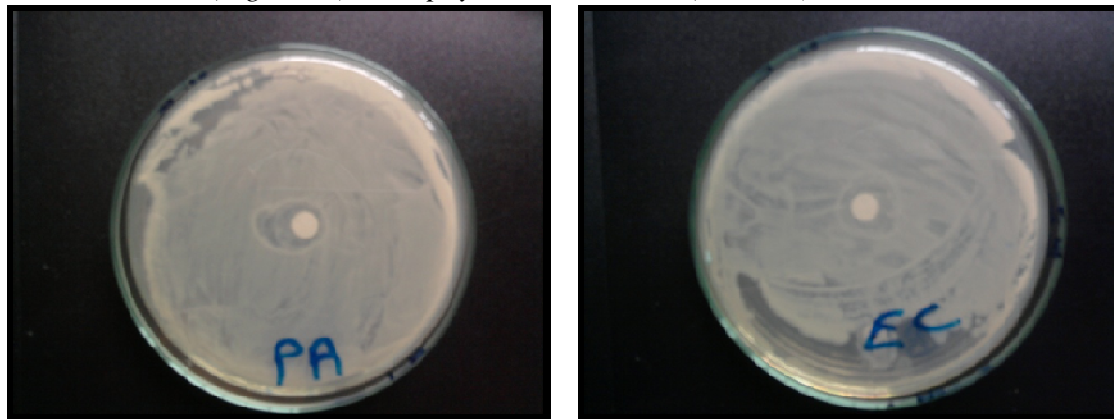


Figure 8: Effet de l'extarit de la souche AF sur la croissance des souches *Pseudomonas aeruginosa* (à gauche) et *Escherichia coli* (à droite).

6. Extraction d'ADN et amplification par PCR

Parmis les quatre méthodes utilisées pour l'extraction de l'ADN génomique des bactéries Gram+, seulement deux méthodes (3^{ème} et 4^{ème}) ont permis une amplification par PCR. Donc une extraction d'ADN des Gram+ qui a servi comme matrice pour l'amplification (**figure 9**)

La méthode des microondes a permis l'extraction des ARN et pas l'ADN. Ceci peut être expliqué par la création de petits trous au niveau de la membrane et qui permettent la sortie des ARN car ils sont de faible taille par rapport à l'ADN génomique.

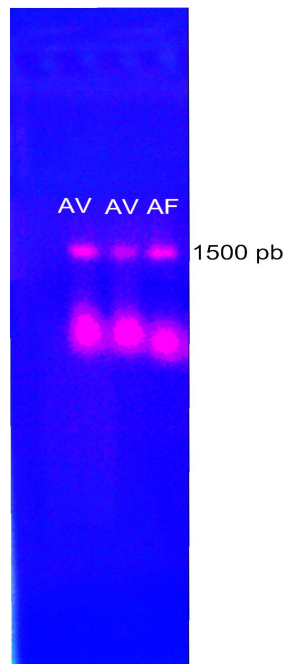


Figure 9: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% des produits d'amplification du gène codant pour l'ARN 16S en utilisant le couple d'amorces Fd1/RS16 en utilisant comme matrice les ADN extraits par la méthode 3 (puits 1 et 2) pour la souche AV et la méthode 4 (puits 3) pour la souche AF.

Ce stage avait pour but la caractérisation de nouvelles substances d'origine bactérienne à effet antimycobactérien de deux souches AF et AV précédemment isolées à partir du sol et de l'eau et qui sont identifiées pour leur pouvoir de sécréter des substances inhibant la croissance de mycobactérie (*M. smegmatis*).

Les principes actifs des souches ainsi identifiées pour leur effet antimycobactérien sont extraits par l'acétate d'éthyle, ces extraits sont testés et révélés actifs contre *M. smegmatis*.

Par la suite, la nature non protéique des principes actifs de la souche AF est prouvée en s'appuyant sur un test de l'effet de température et un traitement par la protéinase K ; Ainsi l'activité antimycobactérienne n'est pas altérée après ces deux traitements.

De plus, la CCM sur gel de silice des deux souches AF et AV a montré que les extraits de ces dernières renferment deux bandes dont l'une a été responsable de l'activité antimycobactérienne pour la souche AF.

L'étude a montré aussi un large spectre d'action des souches AF et AV contre des bactéries à Gram+ et à Gram-, on note une forte sensibilité de *Bacillus subtilis* à l'extrait de AV.

En fin une extraction d'ADN des deux souches bactériennes est réalisée suivie d'une PCR

Ces résultats montrent que l'ADN extrait par traitement au lysozyme - protéinase K et triton plus ébullition donnent les bonnes amplifications par PCR

Les produits de PCR obtenus sont conservés pour réaliser le séquençage afin d'identifier les deux souches bactériennes.

En perspective,

Plusieurs tâches intéressantes pourraient être réalisées :

- ❏ Électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide pour la souche AV.
- ❏ Séquençage des souches AF et AV afin de les identifier.
- ❏ Détermination de la protéine (ou les protéines) responsable (s) de l'activité antimycobactérienne.
- ❏ Détermination des concentrations minimales inhibitrices des agents inhibiteurs.
- ❏ Étude de la toxicité des principes actifs.
- ❏ Étude de l'effet antimycobactérien des principes actifs in vivo.
- ❏ Purification et élucidation structurale des substances bioactives.

- **A. Salgado, N. Ramirez, E. Sandoval, H. Sandoval (2008)**: Fast method for DNA extraction in *Nocardia* and *saccharomonospora*. *Journal de Mycologie médicale* **18**, p 100-102
- American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: Treatment of tuberculosis. *AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE* **2003(167)** 603–662
- **Amini M., Navid pour L., Shafiee A.** (2008). Synthesis and antitubercular activity of new N,N-diaryl-4-(4,5-dichloroimidazole-2-yl)-1,4-dihydro-2,6-dimethyl-3,5-pyridined, carboxamides. *DARU* Vol.16, No. 1 p: 9-12
- **Ann Ginsberg M.** (2002). What's new in tuberculosis vaccines? *Bulletin Of the WHO.* **(80)** 483-488
- Annual epidemiological report on communicable disease **2009**, surveillance report, European centre for disease prevention and control
- **Benator D, Bhattacharya M, Bozeman L, et al.** (2002): Rifapentine and isoniazid once a week versus rifampicin and isoniazid twice a week for treatment of drug-susceptible pulmonary tuberculosis in HIV-negative patients: A randomised clinical trial. *Lancet*, 360: 528-34
- **Billy C. Perronne C.** (2004): Aspects cliniques et thérapeutiques de la tuberculose chez l'enfant et l'adulte. *EMC-Maladies Infectieuses*, 1: p 81–98
- **Bapela, J.M., Kuete, V. Qu Toit, E. Marion Meyer, J.J.Lall, N.etra,** (2008): Fermentation-induced changes in growth parameters and antimycobacterial activity of *Euclea natalensis* (Ebanaceae), *South African journal of Botany*, p: 1-7
- **Bendadda O.** (2003): Tuberculose humaine à *Mycobacterium bovis*: Enquête bactériologique et application de la PCR à la détection et l'identification du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (PhD Thesis). Faculté des sciences Dhar Mehraz, Fès, 23
- **Billy, C. Lévy-Bruhl, D.** (2006). Vaccin BCG et place de l'intradermoréaction en 2006. *La Revue De Médecine Interne*. P: 2
- **Burton W et al.** (2011). Identification des *Listeria monocytogenes* présumés positifs dans les aliments et les échantillons environnementaux au moyen de l'amplification en chaîne par polymérase (ACP) MFLP-78
- **Carbonnelle E, B., Dailoux, M., Lebrun, L., Maugein, J., Perot, C.,** (2003). Cahier de formation biologie médicale mycobactéries mycobactérioses N 29 p: 14
- **CARVALHO, S. A. ; Edson F. da Silva ; SOUZA, M. V. N. ; LOURENCO, M. C. S. ; VICENTE, F. R. C.** 2008. Synthesis and antimycobacterial evaluation of new trans-cinnamic acid hydrazide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 18, p. 538-541,
- **Cynamon MH, Klemens SP, Sharpe CA, Chase S.** (1999): Activities of several novel oxazolidinones against *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother*; **43**: 1189-91

- **Das. U. Das, S. Bandy, B. Stables, James P. Dimmock Jonathan R. et al.,** (2008) Bioorganic. Medicinal Chemistry. P: 1-6
- **Dautzenberg B. Mercat A.** (1994). Mycobactérioses atypiques. Presse Med; 23: 1483-8
- **Davies, P. D** (2003). *Annals of medicine*, 35, 235-243
- **Dirand. E.** (2005). Infection par le VIH. Documents pour le médecin du travail N^o 103. P : 289-322
- **Dorman HJD. And Deans SG.** (2000). Antimicrobial agents from plant: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal Of Applied Microbiology. 88, 308-316
- **Enarson DA., Rieder HL., Arnadottir T. and Trébucq A.,** 2000. Management of tuberculosis. A guide For Low Income Countries. Trébucq A. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD), Paris, 99
- **Espinal MA, Laserson K, Camacho M et als.** (2001): Determinants of drug-resistant tuberculosis: analysis of 11 countries [archive], Int J Tuberc Lung Dis; 5:887-93
- **Fauville, M.** (2005). Tuberculose et mycobacterioses. Rapport annuel 2004-2005 Institut scientifique de santé publique. P: 61
- **George Coumba Yoya.** (2010). Synthèse d'analogues cinnamiques: inhibiteurs potentiels contre Mycobacterium Tuberculosis. Université Toulouse – Paul Sabatier
- **Ginsburg AS, Grosset JH, Bishai WR** (2003): Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. Lancet Infect Dis, 3: 432-42
- **Hakima SQALLI , Asmae EL OUARTI , Abdeslam ENNABILI , Saad IBNSOUDA , Abdellah FARAH , Abdellatif HAGGOURD , Abdellah HOUARI , Mohammed IRAQUI** (2007) : Evaluation de l'effet antimycobactérien de plantes du centre nord du Maroc . *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 146, 271-288
- **Heym, B., Chinet, T.,** (2007). Méthodes diagnostiques de l'infection tuberculeuse en 2007: intradermoréaction à la tuberculose ou interférongamma. La Revue interne. Edition Elsevier Masson SAS. P1-3

- **Hoffman, C.S. and Winston, F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* (57) 267- 272.

- **J.E COULAUD** (1995): Tuberculose et VIH: Comment diminuer les délais thérapeutiques ? *Mtd Mal Infect.* 25 : 321-6

- **Jeanne Maugein, Audrey Chemoul (MAI 2010).** La résistance aux antituberculeux. REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES - N°422
- **J M Ballester, M Ballester, and J P Belaich.** 1980 May. **Purification of the viridicin produced by *Aerococcus viridans*.** *Antimicrob Agents Chemother.* 17(5): 784–788.
- **Jost (M.), Rügger (M.), Zellweger (J.P.), Shang (H.), Cartier (B.), Gutzwiller (A.)** (2001)- Tuberculose dans le cadre professionnel - Risques et prévention. SuvaPro, 82 p. <http://www.witsp1.suva.ch/sap/its/mimes/waswo/99/pdf/02869-35-f.pdf>
- **Khadir K.** (1992). Résistance du Mycobacterium tuberculosis aux antibacillaires (PhD Thesis). Faculté de médecine, casa, 24
- **LECLERC, H.** (2003) ya-t-il des infections bactériennes opportunistes transmises par les eaux d'alimentation? *Journal Européen d'hydrologie*, tome 34, fax. 1, p: 11à44
- **Leuenberger P, Zellweger JP,** (2000): Drugs used in tuberculosis and leprosy. In: Meyler's Side Effects of Drugs, 14th Edition. MNG Dukes and JK Aronson, editors. Elsevier Science
- **Lopez AD et al.** (2006): *Global burden of disease and risk factors*. New York, Oxford University Press and The World Bank

- **Lounis N, Bentoucha A, Truffot-Pernot C, et al (2001):** Effectiveness of once-weekly rifapentine and moxifloxacin regimens against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**: 3482-6
- **M. Adnaoui, N. Benfenatki, A. Hamzaoui (2009):** Épidémiologie de la tuberculose dans les pays du Maghreb. *La Revue de médecine interne*; 30S S265–S267
- **Maniatis et al. (1989).** *Molecular cloning, a laboratory manual*, seconde édition
- **Manuel de la tuberculose (Mai 2007)** Ligue pulmonaire suisse
- **Marigot-Outtandy D, Perronne C (2009):** Les nouveaux antituberculeux. *Réanimation*; **18**:334-42
- **Mohamed Abdel Aziz, Abigail Wright, Adalbert Laszlo, Aimé De Muynck, Françoise Portaels, Armand Van Deun, Charles Wells, Paul Nunn, Leopold Blanc, Mario Raviglione, Lancet 2006 :** *Epidemiology of antituberculosis drug resistance (the Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance)* [archive],; 368:2142-2154
- **Mohle-Boetani (J.C.), Miguelino (V.), Dewsnup (D.H.), Desmond (E.), Horowitz (E.), Waterman (S.H.), Bick (J.), (2002)–** Tuberculosis outbreak in a housing unit for human immuno-deficiency virusinfected patients in a correctional facility: Transmission risk factors and effective outbreak control. - *Clin. Infect. Dis.* **34**, 668-676
- **OMS (2005) -** Stratégie régionale de contrôle de la tuberculose pour 2005-2015. CD 46/18, Washington, 16 p
- OMS, aide mémoire N° 104 Mai 2008
- Organisation mondiale de la santé, page 6 Global tuberculosis control: WHO report 2010. “WHO /HTM /TB /2010.7
- **Oscar E. Larios, MD; an John M. Embil, MD, FR CPC. (2008).** The ABCs of Tuberculosis. *The canadian journal of CME*. P: 57-60
- **P. Leuenberger J.-P. Zellweger T. Rochat (2004):** l’apparition de nouveaux médicaments antituberculeux *Revue Médicale Suisse* N° -536
- **P.Tattevin (2007) :** Le traitement de la tuberculose en 2007, *Médecine et maladies infectieuses*, **37** p : 617–628
- **Parrish NM, Houston T, Jones PB, Townsend C, Dick JD. (2001):** In vitro activity of a novel antimycobacterial compound, N-octanesulfonylacetamide, and its effects on lipid and mycolic acid synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* ; **45** : 1143-50
- **Rapport 2010** sur la lutte contre la tuberculose dans le monde
- **Raviglione MC, Snider DE. And Kochi A., 1995.** Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA*. 273. 220-226
- **Rieder HL, Arnadottir T, Trebucq A, Enarson DA. (2001).** Tuberculosis treatment: Dangerous regimens? *Int J Tuberc Lung Dis*, **5**: 1-3
- **Rodriguez JC, Ruiz M, Lopez M, Royo G (2002):** In vitro activity of moxifloxacin, levofloxacin, gatifloxacin and linezolid against *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Antimicrob Agents*; **20**: 464-7
- **S. Reghioua F. Boughachiche, L. Oulmi, H. Zerizer M. Kitouni, A. Boudemagh, A. Boulahfrouf. 2008.** Séparation et caractérisation préliminaire d’antibiotiques produits par une souche représentative d’actinomycètes isolés de sol aride de la région de BISKRA. *Sciences & Technologie C-N°28* pp. 59-64
- **Safi H, Sayers B, Hazbon MH, et al. (2008):** Transfer of embB codon 306 mutations into clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains alters susceptibility to ethambutol, isoniazid and rifampin. *Antimicrob Agents Chemother*; 52:2027-34
- **Scorpio A, et al. (1997):** Characterisation of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*; 41:540-3
- **Soualine H., (2001).** Caractérisation génétique de la résistance à la rifampicine et à l’isoniazide chez *Mycobacterium Tuberculosis* (PhD thesis). FSDM, Fès, 13

- **T. May, S. Bevilacqua (2005)**: Aspects cliniques actuels de la tuberculose. EMC-Radiologie, 2. 116–120
- **Tam CM, Chan SL, Kam KM, Goodall RL, Mitchison DA. (2002)**: Rifapentine and isoniazid in the continuation phase of a 6-month regimen. Final report at 5 years: Prognostic value of various measures. *Int J Tuberc Lung Dis*, **6**: 3-10
- **Tomioka H. (2000)**: Prospects for development of new antimycobacterial drugs. *J Infect Chemother*; **6**: 8-20
- **Vatcharin Rukachaisirikul, Ubonta Sommart, Souwalak Phongpaichit, Jariya Sakayaroj and Kanyawim Kirtikara. 2008**: Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. **Phytochemistry. (69)** Pages 783-787
- **Weiner M, Burman W, Vernon A, et al. (2003)**: Low isoniazid concentrations and outcome of tuberculosis treatment with once-weekly isoniazid and rifapentine. *Am J Respir Crit Care Med*, **167**: 1341-7
- World Health Organization, *Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis*, Geneva: WHO, **2006**
- **Y. Mahalaxmi, T. Sathish, Ch. Subba Rao and R.S. Prakasham. 2010**: Corn husk as a novel substrate for the production of rifamycin B by isolated *Amycolatopsis* sp. RSP 3 under SSF. **Process Biochemistry. (45)**, Pages 47-53
- **Zhang Y, Yew W (2009)**: Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*; **13(11)**:1320-30
- **Zink A. R.; Sola C.; Reischl U; Rastogi N. J. Clin (2003)**. *Microbiol. 41*, 359-367
- **Ziza, J.-M-Desplaces, N. (2006)** Infections ostéoarticulaires à mycobactéries atypiques. *Revue Du Rhumatisme*, 37 pages 394-400
www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/fr/
www.who.int/tb/publications/global_report/2008
www.who.int/tb
www.sante.gouv.fr
www.textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html

Annexe 1

Tampon de charge

Bleu de bromophénol, 0,25 % (p/v) (ou xylène cyanol FF, 0,25 %)
 Sucrose, 40 % (p/v)
 Eau distillée stérile
 Conserver à 4°C

Tampon ACP 10X

Le tampon pour ACP concentré 10 fois comprend habituellement 500 mM de KCl, 100 mM de Tris-HCl (pH 9,0) et du Triton X-100 à 1 % (p/v).

Tampon TAE 50X

- Tris- base 242 gm
- Acide Acétique glacial 57.1 mL
- 0.5 M EDTA (pH8) 100mL (mélanger vigoureusement avant utilisation)
- H₂O qsp 1 L, puis ajuster le pH 8.5 avec KOH.