



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
Faculté des Sciences et Techniques



MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

Pour obtenir :

Le diplôme de Master Sciences et Techniques
Spécialité : Biotechnologie Microbienne

ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIMYCOBACTERIENNE DES EXTRAITS DE PLANTES MEDICINALES ET AROMATIQUES TOGOLAISES

Présenté par :

Mr. AMOUSSOU Gaffan Ayéwodé

Encadré par :

- Pr IRAQUI Mohammed (FST-Fes)
- Pr FARAH Abdellah (INPMA-Taouate)

Soutenu le 23 juin 2011

Devant les membres du jury:

- Pr IRAQUI Mohammed (FST-Fes) : Président du Jury
- Pr FARAH Abdellah (INPMA-Taouate) : Encadrant
- Pr SQALLI Hakima (FST-Fès) : Examinatrice
- Pr EL FARRICHA Omar (FST-Fès) : Examineur

Année universitaire : 2010/2011



REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont au Professeur Mohammed IRAQUI, professeur chercheur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès. Il a su me guider tout au long de ce travail. Je le remercie pour ces encouragements et pour ces conseils avisés. Ce fut un honneur et un vif plaisir d'avoir eu à travailler avec un enseignant aussi expérimenté durant ce stage, mais aussi durant toutes les deux années de mon Master.

Je remercie vivement le Professeur Abdellah FARAHA, professeur chercheur à l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques (INPMA-Taounate) du Maroc, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, et pour avoir dirigé ce travail avec compétence et efficacité. J'ai eu le privilège d'avoir bénéficié de son enseignement et de son savoir faire, qui alliés à ses qualités humaines font de lui un modèle.

Un grand merci au Pr. Omar EL FARRICHA et Pr. Hakima SQALLI HOUSSAINI pour avoir accepté être membres du jury et examiné ce travail.

Je ne saurai finir sans remercier tous les membres du laboratoire de chimie de la Faculté des Sciences Dar El Merhaz, et plus précisément Mlle Hanane, étudiante en Doctorat pour ses conseils et tout le temps qu'elle m'a accordée.

Mes remerciements vont aussi à Mr SOUADRO étudiant en doctorat à l'INPMA pour avoir partagé avec moi sa passion pour les plantes et pour son encadrement, Mr SAIDI ingénieur à l'INPMA, sans oublier tous les professeurs et membres des laboratoires de l'INPMA, ainsi que ceux du Laboratoire de Biotechnologie Microbienne de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès.

Je remercie également tous mes amis pour leur soutien et tous ces moments partagés dans la recherche de la connaissance.

Je dédie ce travail à mes parents et je les remercie du fond du cœur pour leur amour et pour leur soutien indéfectible, au long de toutes ces années d'étude. Je ne saurai leur dire combien je leur suis reconnaissant pour tout le sacrifice qu'ils ont fait pour que je termine mes études.

Merci à tous.

RESUME

La tuberculose reste, à l'heure actuelle, un problème de santé publique majeure dans plusieurs pays du monde entier. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que près de deux millions de personnes meurent chaque année de cette maladie. De plus, on estime que



l'émergence de souches résistantes de *Mycobacterium tuberculosis* rend la lutte contre cette maladie de plus en plus difficile ; d'où la nécessité de mettre au point de nouvelles molécules contre les mycobactéries pathogènes.

Le présent travail consiste à étudier l'activité antimycobactérienne des extraits de quatre plantes médicinales de la région ouest africaine (Togo) : *Acanthospermum hispidum*, *Fagara zanthoxyloïdes*, *Nauclea latifolia* et *Cymbopogon winterianus*.

Les extraits de *Acanthospermum hispidum* et *Fagara zanthoxyloïdes* ont été préparés par différents solvants et se sont révélés capables d'inhiber la prolifération des mycobactéries. Les extraits à l'acétate d'éthyle ont montré l'activité la plus importante. Ces extraits ont été fractionnés par chromatographie sur couche mince, ce qui a permis l'isolement des fractions actives.

L'étude phytochimique de l'extrait de *Acanthospermum hispidum* a révélé la présence de flavonoïdes, de tanins et de polyphénols. En plus de ces composés, l'extrait de *Fagara zanthoxyloïdes* contient également les alcaloïdes.

L'extrait de *Nauclea latifolia*, obtenu par sonication, s'est révélé inactif sur la croissance des mycobactéries.

L'huile essentielle de *Cymbopogon winterianus* a montré une forte activité bactéricide vis-à-vis des mycobactéries. L'étude de la composition chimique de cette huile a révélé la présence des produits majoritaires suivants : citronellal (34,77%), géraniol (26,13%) et citronellol (9,67%).

Mots clés : Tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, Antibiotique, *Acanthospermum hispidum*, *Fagara zanthoxyloïdes*, *Cymbopogon winterianus*, *Nauclea latifolia*.



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
Faculté des Sciences et Techniques



SOMMAIRE

INTRODUCTION	01
--------------------	----

PARTIE I- SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I- LES MYCOBACTERIES.....	04
1- Classification	04
2- Caractères bactériologiques	06
2.1- Caractères communs	06
2.1.1- Morphologie.....	06
2.1.2- Structure	06
2.1.3- Résistance aux agents physiques et chimiques	07
II- LA TUBERCULOSE.....	07
1- Transmission de la maladie.....	07
2- Tuberculose active : pulmonaire et extra-pulmonaire	08
2.1- Tuberculose pulmonaire.....	08
2.2- Tuberculose extra-pulmonaire	08
3- Epidémiologie	09
3.1- La tuberculose dans le monde.....	09
3.2- la tuberculose en Afrique	10
3.3- La tuberculose en Europe	11
4- Traitement	12
4.1- Traitement de la tuberculose latente.....	12
4.2- Traitement de la tuberculose active	13
5- Résistance aux antituberculeux	13
5.1- Généralités sur la résistance aux antibiotiques	13
5.1.1- Définition de la résistance bactérienne à un antibiotique	13
5.1.2- Détermination de la sensibilité ou de la résistance d'une bactérie à un antibiotique.....	13
5.2- Résistance de <i>M. tuberculosis</i> aux antibiotiques antituberculeux	14
5.2.1- Résistance naturelle et résistance acquise.....	14
5.2.2- Résistance primaire et secondaire	14
5.2.3- Résistance multiple	17
5.3- Différence entre résistance, tolérance et persistance	18
III- DEPISTAGE ET DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE	18
1- Dépistage de la tuberculose latente (primo-infection)	18
2- Diagnostic de la tuberculose active.....	19
IV- LES PLANTES MEDICINALES ET AROMATIQUES	20
1- Situation dans le monde.....	20
2- Quelques éléments actifs des plantes.....	21
2.1- Les phénols	21
2.2- Les flavonoïdes	21
2.3- Les tanins	22
2.4- Les huiles essentielles	22
2.5- Les anthocyanes	23
2.6- Les anthraquinones.....	23
2.7- Les coumarines.....	23

2.8- Les saponines.....	24
2.9- Les polysaccharides.....	24
2.10- Les alcaloïdes.....	24
3- Utilisations des plantes médicinales	24
3.1- Utilisation pour leurs propriétés odorantes.....	24
3.2- Utilisation pour leurs propriétés médicinales.....	24
4- Quelques plantes à activité antimycobactérienne	25
V- LES DIFFERENTES TECHNIQUES D'EXTRACTION	26
1- La distillation.....	26
1.1- L'hydrodistillation	27
1.2- La vapo-hydrodistillation	27
1.3- La vapo-distillation	27
2- La technique de l'enfleurage.....	28
2.1- L'enfleurage a froid ou extraction dans la graisse froide	28
2.2- L'enfleurage a chaud ou extraction dans la graisse chaude	28
3- L'extraction par solvant organique.....	28
4- L'extraction par ultrasons ou sonication.....	29
5- L'extraction par fluide subcritique (eau, co2).....	29
5.1- L'extraction par eau subcritique (Subcritical Water Extraction SWE).....	29
5.2- L'extraction par CO2 subcritique.....	30
6- L'extraction par fluide supercritique (supercritical fluid Extraction SFE).....	30
7- L'extraction assistée par micro-ondes	30
7.1- Extraction par micro-ondes sans solvant (solvent free Microwave extraction, SFME)....	31
7.2- Hydrodistillation par micro-ondes sous vide pulse (vacuum Microwave hydrodistillation)	31
7.3- Extraction par solvant assistée par micro-ondes, ESAM.....	31
8- L'extraction par fluide sous pression (ASE)	32
9- Le flash détente	32

PARTIE II : MATERIELS ET METHODES

I- SOUCHES MYCOBACTERIENNES UTILISEES.....	34
II- CULTURE DES SOUCHES BACTERIENNES	34
III- TEST MICROBIOLOGIQUE	35
IV- MATERIEL VEGETAL.....	36
1- <i>Acanthospermum hispidum</i>	36
1.1- Systématique.....	36
1.2- Description botanique.....	36
1.3- Choix de la plante.....	37
2- <i>Cymbopogon winterianus</i>	37
2.1- Systématique.....	37
2.2- Description botanique.....	37
2.3- Choix de la plante.....	38
3- <i>Fagara xanthoziloides</i>	38

3.1- Systématique.....	39
3.2- Description botanique.....	40
3.3- Choix de la plante.....	40
4- <i>Nauclea latifolia</i>	40
4.1- Systématique.....	40
4.2- Description botanique.....	40
4.3- Choix de la plante.....	40
V- EXTRACTIONS PAR SOLVANT UTILISES	41
1- Méthodologie	41
2- Calcul des rendements	42
VI- FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM) ET IDENTIFICATION DES FRACTIONS ACTIVES.....	43
1- Principe de la chromatographie sur couche mince	43
2- Technique.....	43
3- Identification des bandes actives	44
VII- TESTS PHYTOCHIMIQUES	44
1- Tanins.....	44
2- Les flavonoïdes libres.....	44
3- Les alcaloïdes	45
4- Les polyphénols totaux	45
VIII- EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES	45
IX- ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES	46
1- Analyse des huiles essentielles par Chromatographie en Phase Gazeuse.....	46
2- Identification des constituants des huiles essentielles	47
2.1- Indices Kováts	47
2.2- Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse.....	48

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

I- PREPARATION DES EXTRAITS	50
1- Préparation de l'huile essentielle de <i>Cymbopogon winterianus</i>	50
1-1- Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Cymbopogon winterianus</i>	50
2- Préparation des extraits de <i>Acanthospermum hispidum</i>	52
3- Préparation des extraits de <i>Fagara zanthoxyloïdes</i>	52
4- Préparation de l'extrait de <i>Nauclea latifolia</i>	53
II- ETUDE DU POUVOIR ANTIMYCOBACTERIEN DES EXTRAITS DES PLANTES	53



1- <i>Acanthospermum hispidum</i>	55
2- <i>Fagara zanthozyloides</i>	56
3- <i>Cymbopogon winterianus</i>	55
4- <i>Nauclea latifolia</i>	56
III- FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS	56
1- <i>Acanthospermum hispidum</i>	56
2- <i>Fagara zanthozyloides</i>	57
IV- RESULTATS DES TESTS PHYTOCHIMIQUES	58
1- <i>Acanthospermum hispidum</i>	58
2- <i>Fagara zanthozyloides</i>	59
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	60
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	62

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des espèces de mycobactéries en fonction du risque d'infection chez l'homme.....	05
Tableau 2 : Quelques espèces de plantes reportées comme ayant des activités antimycobactériennes.....	25
Tableau 3: Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Cymbopogon winterianus</i>	51
Tableau 4: Rendements des extractions par différents solvants	52
Tableau 5: Rendements des extractions par différents solvants	53
Tableau 6: Effet des extraits de <i>Acanthospermum hispidum</i> sur les souches mycobactériennes	54
Tableau 7: Effet des extraits de <i>Fagara zanthoxyloïdes</i> sur les souches mycobactériennes	54
Tableau 8: Résultats des différents systèmes de fractionnement	56
Tableau 9: Evaluation de l'effet après fractionnement de <i>Acanthospermum hispidum</i> sur <i>M. smegmatis</i>	57
Tableau 10: Résultats des différents systèmes de fractionnement	57
Tableau 11: Effet des fractions purifiées de <i>Fagara zanthoxyloïdes</i> sur <i>M. smegmatis</i>.....	58
Tableau 12: Tests de révélation phytochimique réalisés sur l'extrait de <i>Acanthospermum hispidum</i>	58
Tableau 13: Tests phytochimiques effectués sur l'extrait de <i>Fagara zanthoxyloïdes</i>.....	59

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Photo d’<i>Acanthospermum hispidum</i>	36
Figure 2 : Photo de <i>Cymbopogon winterianus</i>	37
Figure 3 : Photo de <i>Fagara zanthoxyloides</i>	38
Figure 4 : Photo de <i>Nauclea latifolia</i>	40
Figure 5 : Photo de l’appareil d’extraction par solvant de type Soxhlet	42
Figure 6 : Système de distillation en laboratoire.....	45
Figure 7 : Photo des appareils chromatographiques utilisés au cours de cette étude.....	48
Figure 8 : Familles chimiques de l’huile essentielle de <i>Cymbopogon winterianus</i>	50
Figure 9 : Effet de la variation des concentrations de l’huile essentielle de <i>Cymbopogon winterianus</i> sur la croissance de <i>M. smegmatis</i>	55



LISTE DES ABREVIATIONS

- **ADN** : Acide Désoxyribonucléique
- **ASE** : Accelerated Solvent Extraction
- **B.A.A.R.** : Bacille Acido-Alcool Résistant
- **BCG** : Bacille de Calmette-Guérin ou Vaccination antituberculeuse
- **BK** : Bacille de Koch
- **CCM** : Chromatographie sur Couche Mince
- **CMF** : Cytométrie en flux
- **CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice
- **CPG** : Chromatographie en Phase Gazeuse
- **CPG/SM** : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
- **EB** : Extrait Brut
- **ESAM** : Extraction par Solvant Assistée par Micro-ondes
- **FeCl₃** : Chlorure Ferrique
- **FID** : Détecteur à ionisation de flamme
- **HPLC** : High-Performance Liquid Chromatography
- **IDR** : Intradermoréaction
- **LB** : Milieu de culture Luria-Bertoni
- **M.** : *Mycobactérium*
- **MA** : Mycobactéries atypiques
- **MDR** : Multi Drug-Résistant
- **MS** : Masse de matière sèche
- **NaCl** : Chlorure de Sodium



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
Faculté des Sciences et Techniques



- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **PCR** : Réaction de Polymérisation en Chaîne
- **PDD** : Purified Protéin Derivative
- **PVT** : Température de Vaporisation Programmée
- **Rdt** : Rendement
- **Rf** : Coefficient de migration ou Rapport frontal
- **RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire
- **SFE** : Supercritical Fluid Extraction
- **SFME** : Solvent Free Microwave Extraction
- **SIDA** : Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
- **SWE** : Subcritical Water Extraction
- **TB** : Tuberculose
- **UV** : Ultra-Violet
- **VIH** : Virus de l'immunodéficience Humaine
- **WHO** : World Health Organization
- **XDR** : Extensively Drug-Résistant
- **14C** : Carbone 14
- **14CO2** : Dioxyde de carbone contenant du Carbone 14
- **O2** : Dioxygène
- **%** : pourcentage
- **V** : volume
- **m_s** : matière sèche
- **m_{ext}** : masse de l'extrait recueillie



INTRODUCTION

Les mycobactéries appartiennent à l'ordre des *Actinomycétales* où la famille des *Mycobactériaceae* ne comporte qu'un seul genre, les *Mycobactérium*, caractérisé par une propriété tinctoriale essentielle : ce sont des Bacilles Acido-Alcool Résistants (B.A.A.R.). Cette propriété est due à la richesse de leur paroi en lipides qui les rend imperméables aux colorants usuels.

Les mycobactéries peuvent être classées en trois groupes. Les bacilles de la tuberculose regroupant *Mycobactérium tuberculosis*, *Mycobactérium bovis* et *Mycobactérium africanum*, tous trois rencontrés dans la tuberculose humaine ; le bacille de la lèpre (*Mycobactérium lèprae* ou bacille de Hansen) et les autres mycobactéries qualifiées d'atypiques, dont *Mycobactérium avium*, *xenopi*, *kansasi*, *marinum*.... Ces dernières sont des microorganismes ubiquitaires, répandus dans le sol, dans l'eau, les aliments. Ils sont non pathogènes ou responsables de maladies opportunistes, en particulier chez les immunodéprimés.

Selon l'OMS, « La tuberculose est l'une des principales maladies infectieuses, responsable de décès, de souffrances et d'appauvrissement. L'ampleur de l'épidémie mondiale de tuberculose exige une action urgente et efficace. Le taux d'incidence de la tuberculose continue à croître de 1 % par an au niveau mondial. Malgré les traitements efficaces et peu coûteux dont on dispose actuellement, on continue à dénombrier annuellement dans le monde 9 millions de nouveaux cas de tuberculose et près de 2 millions de décès dus à la maladie, ce qui constitue un fardeau intolérable de souffrance humaine et un obstacle au développement socioéconomique.

Elle touche des millions de personnes. Environ un tiers de la population mondiale est atteinte de tuberculose, c'est-à-dire souffre d'une infection latente et court donc le risque de contracter ultérieurement la maladie. Dès 1993 l'Organisation mondiale de la Santé a déclaré la tuberculose une urgence mondiale » (Organisation mondiale de la Santé, Plan mondial Halte à la tuberculose 2006–2015).

De plus, l'émergence chez ce pathogène de souches résistantes aux antituberculeux classiques, assombrit sérieusement le pronostic des patients tuberculeux, et pose un réel problème de santé publique (Wladimir Sougakoff et al 2008).



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
Faculté des Sciences et Techniques



Face à cette situation, il est urgent d'intensifier les efforts de recherche visant à caractériser de nouvelles cibles et molécules antituberculeuses.

Les autres mycobactéries appelées mycobactéries atypiques ou non-tuberculeuses sont omniprésentes dans l'environnement. Dans certaines circonstances (immunodépression, lésions, maladies préexistantes...) certaines peuvent devenir pathogènes pour l'homme, on parle d'infection opportuniste ou mycobactérienne (Jonsson et al., 2007).

Notre travail porte sur l'isolement et la caractérisation de nouvelles molécules, anti-mycobactériennes à partir de plantes médicinales. Les extraits des plantes, contenant les molécules recherchées, ont été testés sur *Mycobacterium aurum* et *Mycobacterium smegmatis*, deux mycobactéries dont la structure est proche de celle de *Mycobacterium tuberculosis*.

Notre étude a porté sur cinq plantes utilisées dans la pharmacopée traditionnelle africaine. Ces plantes ont été choisies pour leur utilisation déjà avérée contre des affections microbiennes et dans la prise en charge traditionnelle de certaines maladies en Afrique subsaharienne.

L'intérêt pharmacologique de ces plantes tient du fait qu'elles n'ont pas été étudiées pour leur effet contre les mycobactéries et peuvent donc être une source de nouvelles molécules contre ces bactéries.

Au-delà des recherches effectuées dans le cadre de ce stage, s'intéressant essentiellement à l'activité antimycobactérienne, ce travail s'inscrit également dans la valorisation de plantes médicinales et aromatiques et la confirmation des effets antimicrobiens attribués traditionnellement aux plantes étudiées.



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
Faculté des Sciences et Techniques



PARTIE I- SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE



I-LES MYCOBACTERIES

Les mycobactéries sont des bacilles à Gram positif faible, caractérisées par leur aptitude à conserver la coloration malgré l'action combinée de l'alcool et des acides dilués; elles sont appelées bacilles acido-alcool résistants (B.A.A.R.).

Les mycobactéries se distinguent également par leur métabolisme aérobie strict ou micro-aérophile, et par leur croissance lente ou très lente (2 jours à 8 semaines).

1- Classification

La classification taxonomique des mycobactéries est la suivante:

- Ordre des Actinomycétales
- Famille des *Mycobacteriaceae*
- Genre *Mycobacterium*
- Espèces: plusieurs dizaines d'espèces sont maintenant identifiées (54 espèces)
- *Mycobacterium tuberculosis* ou bacille de Koch (BK)
- *Mycobacterium africanum*
- *Mycobacterium bovis*
- *Mycobacterium leprae*
- *Mycobacterium lepraemurium*
- *Mycobacterium microti*
- les espèces dites Mycobactéries «atypiques» (MA) sont regroupées selon un certain nombre de critères (vitesse de croissance, production de pigment) : c'est la classification de RUNYON.

Les mycobactéries peuvent être aussi classées selon des critères cliniques en trois grandes catégories :

- les mycobactéries responsables de la tuberculose des mammifères (*M tuberculosis*, *M africanum*, *M bovis*, *M microti*),
- les mycobactéries responsables de la lèpre de l'homme (*M leprae*) et de celle du rat (*M lepraemurium*) qui ne sont pas, ou difficilement cultivables in vitro,
- les mycobactéries atypiques qui sont saprophytes de l'environnement ou des commensales de l'homme et des animaux. Certaines sont des parasites stricts de l'homme (*M ulcerans*) alors que d'autres, potentiellement pathogènes pour l'homme, sont souvent isolées dans l'environnement. La majorité de ces espèces est constituée de bactéries habituellement peu pathogènes pour l'homme, pouvant occasionnellement entraîner des infections humaines: les mycobactérioses.

Selon le risque infectieux, les mycobactéries peuvent également être classées en trois grands groupes:

- Groupe I: faible risque d'infection pour l'individu et les populations.

Pathogènes rares, ces espèces ne sont jamais, ou rarement responsables de maladies chez l'adulte normal.

- Groupe II: risque modéré pour l'individu. Les bactéries en cause sont à l'origine d'infections de sévérité moyenne dans la population. Elles sont généralement classées parmi les germes opportunistes.

- Groupe III : risque élevé pour l'individu mais modéré pour la population. La maladie faisant suite à l'infection est sévère et parfois mortelle. Il s'agit généralement de pathogènes stricts.

Tableau 1 : Classification des espèces de mycobactéries en fonction du risque d'infection chez l'homme

Groupe de risque I	Groupe de risque II	Groupe de risque III	
<i>M. smegmatis</i>	<i>M. aurum</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. tuberculosis</i>
<i>M. phlei</i>	<i>M. chitae</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. bovis</i>
<i>M. fallax</i>	<i>M. duvalii</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. africanum</i>
<i>M. thermoresistible</i>	<i>M. gadium</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. ulcerans</i>
<i>M. parafortuitum</i>	<i>M. gilvum</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. microti</i>
<i>M. gastri</i>	<i>M. komossense</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. leprae</i>
<i>M. triviale</i>	<i>M. lepraemurium</i>	<i>M. marinum</i>	
<i>M. sphaigni</i>	<i>M. neoaurum</i>	<i>M. paratuberculosis</i>	
<i>M. gordonae</i>	<i>M. vaccae</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	
<i>M. flavescens</i>	<i>M. agri</i>	<i>M. szulgai</i>	
<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. aichiense</i>	<i>M. xenopi</i>	
<i>M. senegalense</i>	<i>M. austroafricanum</i>	<i>M. asiaticum</i>	
<i>M. terrae</i>	<i>M. chubuense</i>	<i>M. haemophilum</i>	
<i>M. porcinum</i>	<i>M. obuense</i>	<i>M. shimoidei</i>	
<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. rhodesiae</i>	<i>M. simiae</i>	
<i>M. pulveris</i>	<i>M. moriokaense</i>		
<i>M. tokaiense</i>	<i>M. poriferae</i>		
<i>M. nonchromogenicum</i>			

2- Caractères bactériologiques

2.1- Caractères communs

2.1.1- Morphologie

Les bactéries du genre *Mycobacterium* se présentent sous la forme de bacilles fins, légèrement incurvés de 2 à 5 μm de long sur 0,2 à 0,3 μm de large, aux extrémités arrondies. Ces bacilles sont immobiles, non capsulés et asporulés.



Bien qu'ayant la structure générale des bactéries à Gram positif, les mycobactéries sont difficilement colorables par les colorants usuels. Elles sont colorées par la fuchsine phéniquée à chaud selon la méthode de ZIEHL-NIELSEN, elles retiennent le colorant malgré l'action combinée des acides dilués et de l'alcool (acido-alcool-résistance) et apparaissent alors comme de fins bâtonnets rouges.

Quand elles sont colorées par l'auramine phéniquée, elles deviennent fluorescentes sous l'influence de la lumière U.V.

- Dans les produits pathologiques, elles apparaissent isolées ou groupées en petit amas, parfois sous forme d'ébauche de cordes et de torsades.
- En culture, on peut observer des formes coccoïdes ou filamenteuses ; dans les cultures âgées ou dans les produits pathologiques provenant de malades sous traitement antibiotique, les mycobactéries ont souvent un aspect granuleux.

2.1.2 - Structure

Les mycobactéries renferment en dehors des sels minéraux (2,30 à 2,60%) et des pigments (caroténoïdes, lutéine, flavines, cryptoxanthine) des protides, des glucides et surtout des lipides.

De toutes les bactéries, les mycobactéries sont celles dont on peut extraire la plus grande quantité de lipides : 20 à 45% du poids de la bactérie soit 60% des constituants de la paroi.

L'étude fine de la structure de la paroi au microscope électronique permet de distinguer notamment :

- le peptidoglycane, structure de base de toute bactérie;
- le mycolate d'arabinogalactane, lipopolysaccharide dont les sucres (arabinose et galactose) sont attachés à des lipides spéciaux (acides mycoliques) seuls constituants acido-alcool-résistants de la bactérie,
- d'autres glycolipides : la cire D, le cord-factor, les mycosides,
- des protéines, qui sont le support de l'activité tuberculinique.

2.1.3 - Résistance aux agents physiques et chimiques

La relative complexité de la structure de la paroi des mycobactéries explique la particulière résistance de ces germes aux agents physiques et chimiques ainsi que l'acido-alcool résistance (Halimatou DIOP et al 1999).

II- LA TUBERCULOSE

1- Transmission de la maladie



La tuberculose se transmet généralement par voie aérienne. Le malade, atteint par une tuberculose pulmonaire en phase active, émet dans l'air de fines gouttelettes (1 à 5 μm) chargées de quelques bactéries, notamment lorsqu'il tousse, parle ou éternue. C'est par l'inhalation de ces gouttelettes en suspension dans l'air qu'un individu sain se contamine.

Dans la majorité des cas, les bacilles tuberculeux sont arrêtés au niveau du nez, des bronches et bronchioles. Ils sont alors entraînés par le mucus vers le pharynx puis déglutis et détruits par l'acidité de l'estomac.

Dans la minorité des cas, les bacilles atteignent les alvéoles pulmonaires. Là, ils entrent en contact avec les macrophages alvéolaires qui, en général, les phagocytent, les dégradent et les éliminent. Cependant, si les défenses immunitaires innées de l'individu sont réduites, si l'infection est importante (charge bactérienne élevée) ou si la bactérie est fortement virulente, il arrive que des bacilles survivent dans les macrophages et s'y multiplient. Les macrophages colonisés finissent par éclater et libérer un grand nombre de bacilles capables d'infecter, à leur tour, d'autres macrophages. Ainsi, un foyer infectieux se développe au niveau du poumon et provoque la formation d'une lésion ou « chancre d'inoculation ». Le corps de la personne infectée réagit à cette « primo-infection » par le développement d'une réponse immunitaire cellulaire et la formation d'un granulome constitué principalement de macrophages infectés et de cellules T (Peyron *et al.*, 2008, Kaufmann, 2002).

Dans 90% des cas, la maladie ne se développe pas. Le granulome se calcifie et les bacilles emprisonnés restent sous contrôle à l'état quiescent, on parle d'« infection tuberculeuse latente (ITL) » (Smith, 2003). Ces patients ne sont pas contagieux. Chez la plupart des individus, la « primo-infection » passe inaperçue. On peut cependant, parfois, observer de la fièvre, une adénopathie, une perte d'appétit,.... La primo-infection peut être mise en évidence chez un patient grâce au test d'hypersensibilité retardée (intradermoréaction à la tuberculine) (Hopewell & Jasmer, 2005).

2- Tuberculose active : pulmonaire et extra-pulmonaire

2.1- Tuberculose pulmonaire

La tuberculose-active ne se développe que chez environ 10% des personnes infectées par *M. tuberculosis* (Kaufmann, 2002). Elle peut se développer soit directement après la primo-infection, soit après plusieurs années suite à la réactivation de l'« infection tuberculeuse latente ». Dans ce cas, la lésion précédemment formée se nécrose et les bacilles tuberculeux

quiescents sont libérés (Smith, 2003). La tuberculose active s'accompagne de signes cliniques et/ou radiologiques. Les signes cliniques de la tuberculose pulmonaire sont une toux persistante avec des expectorations parfois accompagnées de sang, une douleur thoracique et des symptômes plus généraux comme fièvre, sudation nocturne, fatigue, perte d'appétit, et amaigrissement. Un diagnostic peut être proposé par radiographie ou scanner du thorax du patient.

2.2- Tuberculose extra-pulmonaire

La tuberculose pulmonaire (ou phtisie) est la forme la plus commune de la tuberculose (85% des cas), cependant les bacilles tuberculeux peuvent, plus rarement, être transportés dans tout l'organisme, via les systèmes lymphatique et sanguin, créer de nouveaux foyers infectieux et provoquer une tuberculose extra-pulmonaire (15% des cas) (Hopewell & Jasmer, 2005). Les bacilles peuvent infecter différents organes du corps tels que les os, les reins, les ganglions, les méninges, l'intestin, la peau,.... Lorsque la tuberculose est extra-pulmonaire, les symptômes peuvent varier en fonction de la région corporelle atteinte et la radiographie pulmonaire, réalisée habituellement suite à la détection d'une IDR positive, n'apporte aucune information complémentaire dans ce cas (Baydur, 1977). La forme extra-pulmonaire est plus fréquemment observée chez les patients séropositifs (VIH positifs) dont le système immunitaire ne peut contrôler l'infection (Golden & Vikram, 2005). Chez les enfants, les tuberculoses miliaires (disséminées) sont plus fréquentes que les tuberculoses pulmonaires.

Non traitée, la tuberculose active évolue jusqu'au décès du patient. La guérison nécessite un diagnostic précoce et l'administration d'un traitement adapté, correctement suivi jusqu'à son terme.

Certaines personnes font partie de ce que l'on appelle les sujets à risque pour le développement d'une tuberculose active (Nava-Aguilera *et al.*, 2009) :

Dans les pays industrialisés, les personnes à risque sont:

- Les personnes immunodéprimées (VIH, corticothérapie, diabète, cancer,...)
- Les immigrants originaires de pays à forte endémie tuberculeuse
- Les personnes en situation précaire (sans domicile fixe, malnutrition,...)
- Les personnes ayant eu un contact rapproché avec un tuberculeux
- Les personnes âgées et les jeunes enfants
- Les toxicomanes
- Les détenus
- Les professionnels de la santé (contact avec des malades contagieux, manipulation d'échantillons,...)



- Les mauvaises conditions socio-économiques
- Le manque d'hygiène
- La co-infection par le VIH

3-Epidémiologie

3.1- La tuberculose dans le monde

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'approximativement un tiers de la population mondiale (~2 milliards d'individus) est infectée par *M. tuberculosis*, l'agent étiologique de la tuberculose (Dye *et al.*, 1999). Ces personnes sont porteuses de la maladie et donc susceptibles de développer une forme active de tuberculose à un moment de leur vie.

Les organismes de lutte contre la tuberculose utilisent régulièrement l'image très parlante suivante : « chaque seconde, une nouvelle personne est infectée par le bacille tuberculeux ». La prévalence de la tuberculose active dans le monde (c'est-à-dire le nombre de malades) est estimée à 14,4 millions (WHO, 2008b) : elle concerne principalement la population active, c'est-à-dire les individus appartenant à la tranche d'âge 15-49 ans (Dye *et al.*, 1999). Après le syndrome d'immunodéficience acquise dû au VIH, la tuberculose est la seconde cause de mortalité liée à une maladie infectieuse. De ce fait, selon les estimations, la tuberculose sera encore reprise parmi les 10 premières causes de mortalité en l'an 2020 (Murray & Salomon, 1998).

En 2006, 1.7 millions de patients sont décédés de tuberculose et 9.2 millions d'individus ont contracté la maladie. Parmi ces nouveaux cas, 44% présentaient un examen microscopique de crachat positif (contagieux) et 8% étaient séropositifs pour le VIH (WHO, 2008b).

La distribution mondiale de la tuberculose concerne fortement les régions économiquement faibles (pays en voie de développement). Les 3 zones géographiques les plus atteintes sont l'Asie du Sud Est (33% des malades), l'Afrique (29%), et le Pacifique Occidental (22%).

Ensemble, ces 3 régions totalisent 84% des malades souffrant de tuberculose. L'Amérique (Nord et Sud) et l'Europe représentent, respectivement, 4 et 5% des cas de tuberculose (WHO, 2008b). Les plus hautes prévalences sont enregistrées, dans l'ordre, pour l'Inde, la Chine, l'Indonésie, l'Afrique du Sud et le Nigéria. C'est l'Afrique qui présente l'incidence la plus élevée avec 363 nouveaux cas pour 100.000 habitants en 2006 (WHO, 2008b).



L'épidémiologie et les programmes de contrôle ont vu leur complexité augmenter par l'émergence de bacilles résistants aux drogues antituberculeuses et par la synergie de la coinfection *M. tuberculosis*/VIH (Zignol *et al.*, 2006). En effet, en 2006, le nombre de cas de tuberculose multi-résistante (résistante à l'isoniazide et à la rifampicine, les deux antibiotiques majeurs du traitement) a été estimé à 500.000 (soit environ 5% des nouveaux cas annuels estimés à 9.2 millions en 2006) et sur les 1.7 millions de décès, 200.000 concernaient des patients VIH positifs (Zignol *et al.*, 2006, WHO, 2008b). En 2005, le nombre de cas de tuberculoses causées par une souche XDR (résistante à l'isoniazide, la rifampicine, une fluoroquinolone et un antibiotique injectable) fut estimé à 27.000 (soit environ 5% des souches classées comme multi-résistantes) (Goldman *et al.*, 2007, LoBue, 2009).

3.2- la tuberculose en Afrique

La région Afrique de l'OMS ne représente que 11% de la population mondiale mais contribue pour 27% au nombre total de cas de tuberculose signalés en 2003. Plus de 34 pays africains ont des taux de notification d'au moins 300 cas pour 100 000 habitants par rapport à un taux inférieur à 15 pour 100 000 habitants dans les pays développés.

Il existe des différences sous-régionales dans la charge de la tuberculose en Afrique. L'Afrique australe et de l'Est connaît le poids le plus élevé par habitant. Sept pays de l'Afrique australe signalent entre 400 et 700 cas pour 100 000 habitants. Parmi les pays d'Afrique centrale, six sur sept ont signalé un taux de 100 à 200 cas pour 100 000 habitants alors que l'Afrique du Nord connaît le poids de tuberculose le plus faible avec moins de 65 cas pour 100 000 habitants. La plupart des pays de l'Afrique de l'Est signalent moins de 200 cas pour 100 000 habitants, à l'exception du Kenya. Plus de 60% des pays ouest africains enregistrent moins de 100 cas pour 100 000 habitants.

De nombreux facteurs concourent à l'accélération de l'épidémie de tuberculose, tels qu'une mauvaise infrastructure de santé, une piètre organisation et gestion, la pauvreté, des systèmes de santé faibles et une gestion médiocre des ressources humaines. L'épidémie du VIH/SIDA représente l'un des facteurs à risque les plus importants pour l'incidence de la tuberculose et la mortalité en Afrique. En 2003, la prévalence de VIH chez les adultes (15 – 49 ans) en Afrique sub-saharienne était de 9%.

Le VIH a compliqué la prise en charge clinique de la tuberculose, surchargé les services de santé publique et a renforcé la stigmatisation qui accompagne cette vieille maladie. De nos jours, il est plus difficile de diagnostiquer la tuberculose et les patients co-infectés connaissent une mortalité accrue étant donné qu'ils souffrent d'une maladie beaucoup plus grave que les



tuberculeux séronégatifs du fait de leur baisse d'immunité. Il est vrai que la tuberculose elle-même peut être guérie mais le risque de réapparition de la maladie est plus important que chez les tuberculeux séronégatifs. Les patients co-infectés par la tuberculose et le VIH sont également plus susceptibles de mal réagir au traitement, ce qui augmente leur chance d'interrompre le traitement et de développer une maladie multi résistante.

L'Afrique ne connaît pas seulement la pire charge de morbidité due à la tuberculose au monde mais aussi le taux de mortalité le plus élevé parmi les tuberculeux qui s'explique partiellement par l'impact du VIH. Sur les 41 pays où la prévalence d'infection simultanée par le bacille tuberculeux et le VIH est la plus élevée, 29 d'entre eux se trouvent en Afrique. Selon des estimations, presque 250 000 personnes meurent chaque année de la co-infection tuberculose/VIH, plus de 80% d'entre elles meurent en Afrique (Union Africaine, Point sur la lutte contre la tuberculose en Afrique, 2006, Sp/Ex.CL/ATM/4).

3.3- La tuberculose en Europe

Les pays industrialisés ont enregistré une diminution progressive des cas de tuberculose depuis le début du 20^{ème} siècle suite à l'amélioration des conditions de vie et à la découverte d'antibiotiques efficaces. A partir des années 1980-1990, cette régression s'est ralentie, probablement en relation avec le nombre de cas de SIDA mais aussi en rapport avec le relâchement de la lutte contre la tuberculose, le développement de souches résistantes aux antibiotiques et l'importation de cas en provenance de pays à haute prévalence (FARES, 2006a).

En 2006, 423.000 cas ont été rapportés en Europe, ce qui représente environ 7% des cas de tuberculose dans le monde pour cette année. Les cas notifiés en Europe se répartissent comme suit : 73% pour l'Europe de l'Est (Kazakhstan, Moldavie, Géorgie, Arménie, Bélarusse,...), 21% pour l'Union Européenne et l'Europe de l'Ouest et 6% pour les pays des Balkans.

4- Traitement

Le traitement de la tuberculose latente et celui de la tuberculose active doivent être envisagés comme deux entités distinctes.

4.1- Traitement de la tuberculose latente

Lorsqu'une tuberculose latente (primo-infection) est mise en évidence chez un patient, un traitement prophylactique peut être proposé. Ce traitement n'est pas appliqué systématiquement en cas de positivité de l'intradermoréaction mais sera conseillé chez toutes personnes à risque de développer la maladie : individus récemment contaminés,



immunodéprimés (VIH positif,...), jeunes enfants, porteurs de lésions pulmonaires évoquant une tuberculose (ou autre maladie pulmonaire) antérieure, ... (FARES, 2006a, Landry & Menzies, 2008). Dans les pays en voie de développement, on ne traite pas les patients présentant une tuberculose latente.

Dans de rares cas, une chimioprophylaxie antituberculeuse peut être proposée à un patient dont l'intradermoréaction est négative. Cette décision est indiquée, notamment, pour les patients séropositifs ou les enfants ayant eu un contact avec un tuberculeux contagieux (Frothingham *et al.*, 2005).

Le traitement prophylactique consiste, en général, en la prescription quotidienne d'isoniazide (Nicotibine®) pendant au moins 6 à 9 mois (5 mg/kg/jour). Cette monothérapie permet de réduire l'incidence de la tuberculose active avec une efficacité de 65 à 75%. Chez les sujets porteurs du VIH, le traitement est prolongé à 9 ou 12 mois (Cohn, 2003). L'usage d'une monothérapie se justifie par le risque limité d'induire une résistance étant donné le faible nombre de bactéries impliquées dans la tuberculose latente.

4.2- Traitement de la tuberculose active

Il convient d'isoler (avec ou sans hospitalisation) les patients contagieux pendant les 3 premières semaines du traitement afin de limiter les risques de transmission. La levée de l'isolement peut se faire après amélioration de l'état général du patient et l'obtention de trois examens microscopiques des expectorations négatifs (Bouvet *et al.*, 2003).

Le traitement standard fait appel aux antibiotiques dits de « première ligne ». Ces antibiotiques sont : l'isoniazide (Nicotibine®), la rifampicine (Rifadine®), la pyrazinamide (Tebrazid®) et l'éthambutol (Myambutol®). Dans certains pays, la streptomycine est également utilisée comme antibiotique de première ligne à la place de l'éthambutol (Rabarijaona *et al.*, 1999). La durée du traitement standard est de 6 mois et comporte 2 phases successives. La phase initiale dure 2 mois et consiste en l'administration de 4 antibiotiques : l'isoniazide, la rifampicine, la pyrazinamide et l'éthambutol. La deuxième phase, appelée aussi « phase de continuation », dure 4 mois et consiste en une bithérapie à base d'isoniazide et d'un second antibiotique, en général la rifampicine (Tattevin, 2007).

5- Résistance aux antituberculeux

5.1- Généralités sur la résistance aux antibiotiques

5.1.1- Définition de la résistance bactérienne à un antibiotique

La « résistance à un antibiotique » est un caractère phénotypique caractérisant la capacité d'une bactérie à survivre (et à se multiplier), en présence de cet antibiotique, à une



concentration qui est habituellement bactéricide ou bactériostatique (Zhang *et al.*, 2005). La résistance d'une bactérie à un antibiotique entraîne la perte d'efficacité de ce médicament lors du traitement d'une infection causée par cette bactérie. Cette situation nécessite l'adaptation du traitement.

5.1.2- Détermination de la sensibilité ou de la résistance d'une bactérie à un antibiotique

L'importance de la résistance d'une souche bactérienne à un antibiotique est évaluée par détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) et par comparaison de celle-ci avec celle d'une souche dite « sensible ». La CMI est définie comme la concentration minimale d'un antibiotique qui inhibe la croissance *in vitro* de 99% de la population bactérienne testée (Inderlieds & Nash, 2005). Elle s'exprime en général en µg/ml et peut être réalisée par différentes méthodes et sur différents milieux de croissance.

Il faut noter que la CMI ne prédit pas toujours l'effet observé *in vivo*. De même, la CMI déterminée peut varier en fonction du milieu utilisé pour la réalisation du test (Kim, 2005).

5.2- Résistance de *M. tuberculosis* aux antibiotiques antituberculeux

5.2.1- Résistance naturelle et résistance acquise

Les membres du complexe *tuberculosis* sont naturellement résistants à la plupart des antibiotiques usuels. En effet, ils ne sont sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques dits « antibiotiques antituberculeux ». De plus, pour ces antibiotiques, *M. tuberculosis* peut parfois présenter des résistances acquises (Cambau *et al.*, 2003).

Résistance naturelle

Chez les mycobactéries, le phénotype « sensible » ou « résistant » à un antibiotique donné est spécifique d'espèce. Les mycobactéries du complexe *tuberculosis* sont naturellement résistantes aux principales familles d'antibiotiques comme les β-lactamines, les macrolides, les cyclines, les sulfamides et les glycopeptides (Veziris *et al.*, 2005). Les mycobactéries non-tuberculeuses présentent également une résistance naturelle à ces antibiotiques usuels. De plus, elles sont naturellement résistantes à la plupart des antibiotiques efficaces sur *M. tuberculosis* tels que l'isoniazide, la pyrazinamide, l'ethambutol, l'acide p-aminosalicylique ... (Veziris *et al.*, 2005).

La faible perméabilité de la paroi mycobactérienne est, en général, mise en cause pour expliquer le haut niveau de résistance naturelle des mycobactéries (Jarlier & Nikaido, 1994).

La paroi mycobactérienne présente une architecture caractéristique et particulièrement complexe. Son squelette est composé de trois éléments majeurs associés de manière covalente: le peptidoglycane, l'arabinogalactane et les acides mycoliques. Les acides

mycoliques sont de longues chaînes d'acides gras (de 60 à 90 atomes de carbone) insérées parallèlement les unes par rapport aux autres et formant un arrangement compact perpendiculaire au plan de la membrane plasmique (Nikaido et al., 1993). Ainsi, les acides mycoliques constituent une enveloppe lipidique très peu perméable aux composés hydrophiles et en particulier à bon nombre d'antibiotiques. Il a été estimé que la paroi des mycobactéries est, par exemple, 100 à 1000 fois moins perméable au β -lactamines que la paroi d'*E. coli* (Jarlier et al., 1991).

La structure de la paroi n'est pas la seule responsable de la haute résistance naturelle de *M. tuberculosis*. La production d'enzymes modifiant les antibiotiques a également été décrite chez *M. tuberculosis* comme, par exemple, la β -lactamase responsable de la résistance naturelle aux β -lactamines (Voladri *et al.*, 1998) ou l'aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase impliquée dans la résistance aux aminoglycosides (Ainsa *et al.*, 1997).

Résistance acquise

Contrairement aux autres bactéries pathogènes qui acquièrent en général leur résistance aux antibiotiques par transfert horizontal de plasmides ou transposons portant des gènes de résistance, l'acquisition de résistance chez *M. tuberculosis* provient, presque toujours, d'altérations spontanées de gènes chromosomiques spécifiques sous la forme de mutations ponctuelles non-synonymes, de délétions ou insertions (Davies, 1998). En effet, jusqu'à présent, aucun plasmide ou transposon de résistance n'a été décrit chez les mycobactéries (Veziris *et al.*, 2005). Par conséquent, la résistance n'est pas transférable entre les mycobactéries présentes chez un même patient, mais elle se transmet à toute la descendance de la bactérie mutée.

Jusqu'à présent, les mutations impliquées dans la résistance de *M. tuberculosis* aux antibiotiques ont été mises en évidence :

- dans les gènes codant les protéines cibles de l'antibiotique, diminuant l'affinité de la cible pour cet antibiotique
- dans un gène codant une enzyme impliquée dans l'activation de l'antibiotique, empêchant son passage de la forme pro-drogue à la forme active (Veziris *et al.*, 2005, Somoskovi *et al.*, 2001)
- dans une région génomique régulatrice provoquant la surexpression de la cible de l'antibiotique
- dans une région génomique provoquant la surexpression de pompes à efflux.



L'implication de ce mécanisme de résistance, surtout étudié chez *M. smegmatis*, n'a pas encore été confirmée chez *M. tuberculosis* (Takiff *et al.*, 1996, Colangeli *et al.*, 2005).

Les altérations génétiques responsables des différents types de résistances aux antibiotiques chez *M. tuberculosis* ont été en partie définies pour plusieurs antibiotiques, de première et seconde ligne, utilisés communément (Davies, 1998, Ramaswamy & Musser, 1998). En effet, ces dernières années, des progrès importants ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes d'action des agents anti-mycobactériens, ainsi que dans l'étude des mécanismes de résistance aux antibiotiques (Ramaswamy & Musser, 1998). Ces progrès ont pu être réalisés en grande partie au moyen d'outils de biologie moléculaire modernes qui ont permis d'accéder aux bases génétiques impliquées dans ces mécanismes de résistance (Zhang *et al.*, 2005).

Malgré ces avancées majeures, un certain nombre de questions restent encore sans réponse : certaines souches résistantes ne présentent pas de mutation dans le(s) gène(s) identifié(s) comme impliqué(s) dans la résistance aux antibiotiques concernés. En effet, il est rare d'observer 100 % de souches présentant une des mutations de résistance connue. Ce constat suggère l'implication d'autres mécanismes de résistance encore inconnus.

5.2.2- Résistances primaire et secondaire

Une bactérie tuberculeuse résistante isolée d'un patient qui n'a jamais été traité pour une tuberculose auparavant, est considérée comme une souche de « résistance primaire ». Par contre, une bactérie tuberculeuse résistante provenant d'un patient traité précédemment pour une tuberculose (pendant au moins un mois), est probablement une mycobactérie mutante résistante apparue chez ce patient et est alors considérée comme une souche de « résistance secondaire ou acquise » (WHO, 1997).

L'OMS propose de ne plus utiliser le terme de « résistance acquise » car cette catégorie englobe à la fois les patients qui ont en effet développé une tuberculose avec émergence d'une souche résistante mais aussi ceux qui, après traitement, ont été réinfectés par une souche tuberculeuse résistante. Pour lever cette ambiguïté, l'OMS recommande les terminologies « résistance parmi les nouveaux cas » à la place de « résistance primaire » et « résistance parmi des cas précédemment traités » à la place de « résistance acquise » (WHO, 2008a).

Sélection des mutants résistants

Dès que le premier agent antituberculeux fut introduit dans le traitement de la tuberculose, l'émergence d'isolats résistants de *M. tuberculosis* fut observée. Le même scénario s'est répété par la suite pour chaque utilisation d'antibiotiques antituberculeux en



monothérapie (Mc Dermott, 1947, Youmans et al., 1947). Par ailleurs, lorsque les bactéries sont exposées à un antibiotique, la pression de sélection favorise le développement de mutants résistants (David, 1971). Ces observations menèrent les chercheurs à suggérer que la thérapie combinée, utilisant plus d'un antibiotique, pourrait réduire l'émergence de bactéries résistantes durant le traitement (Canetti & Grosset, 1961, Council, 1972). Malgré la mise en place et l'efficacité de cette mesure, on remarque aujourd'hui encore l'émergence de souches de *M. tuberculosis* résistantes aux antibiotiques, représentant un problème croissant pour le contrôle mondial de la tuberculose (Espinal et al., 2001).

L'apparition des bactéries résistantes aux antibiotiques suit la théorie de Darwin sur l'évolution. En effet, la bactérie ayant acquis spontanément une mutation lui conférant une résistance à un antibiotique, présente un avantage sélectif par rapport aux autres bactéries.

Elle peut, dès lors, survivre et se diviser chez le patient traité avec l'antibiotique en question (Zhang *et al.*, 2005). La thérapie combinée devrait éviter ce genre de sélection mais encore faut-il que le traitement soit suivi correctement. En effet, la sélection de mutants résistants survient chez le patient lorsque les concentrations d'antibiotiques dans le site infecté sont sub-thérapeutiques (ou intermittentes), ou lorsque l'antibiothérapie est inappropriée (Mahmoudi & Iseman, 1993, Bradford *et al.*, 1996). Un des facteurs contribuant réside dans la durée du traitement de la tuberculose (Kaufmann, 2001). La nécessité de maintenir des taux sériques élevés d'antibiotiques pendant au moins 6 mois, combinée à la toxicité inhérente des antibiotiques, résultent souvent en une mauvaise observance du traitement par le patient et, par conséquent, une plus grande probabilité d'émergence de bactéries résistantes (Davies, 1998). C'est pourquoi, en plus de la nécessité d'identifier de nouveaux médicaments antituberculeux efficaces, la réduction de la durée du traitement n'est pas moins importante.

5.2.3- Résistance multiple

Une tendance alarmante et une source croissante d'inquiétude pour la santé publique résident dans l'émergence de souches résistantes à plusieurs antibiotiques (Chan & Iseman, 2008).

Les souches multi-résistantes ou MDR pour « multiple drug-resistant » se définissent comme des bacilles tuberculeux résistants au moins à l'isoniazide et la rifampicine, les deux agents antituberculeux les plus puissants (Iseman & Madsen, 1989, Vareldzis et al., 1994). De telles souches ont été décrites dans le monde entier. Le nombre de cas de MDR-TB (tuberculose multi-résistante) a été estimé à environ 500.000 en 2004 et 2006 (Zignol et al., 2006, WHO, 2008b).



Jusqu'à présent, aucune mutation spécifique conférant une multi-résistance n'a été décrite. Les souches responsables de MDR-TB sont le résultat d'une accumulation séquentielle de mutations indépendantes, conférant chacune une résistance à un antibiotique différent (Ramaswamy & Musser, 1998). Une tuberculose multi-résistante n'offre que peu d'options thérapeutiques au médecin : le traitement nécessite l'utilisation d'antibiotiques de seconde ligne qui sont plus chers, plus toxiques et moins efficaces que ceux utilisés pour le traitement habituel de la tuberculose (Rajbhandary et al., 2004, Nathanson et al., 2004). On observe également un pronostic moins favorable pour le patient (réussite du traitement chez seulement 60 à 75% des malades) (Crofton et al., 1997, Chan et al., 2004) lié à de hauts taux de morbidité et de mortalité, un traitement prolongé (parfois plus de 2 ans) ainsi qu'un risque accru de propagation de l'infection avec des isolats résistants dans la communauté (Bifani et al., 1996, Iseman & Madsen, 1989). L'augmentation de la fréquence des souches multi-résistantes est redoutée ; cependant, certaines études montrent que les souches résistants s'adaptent moins bien à leur environnement (diminution de la transmission,...) ce qui réduirait le risque de dominance (Burgos et al., 2003).

Depuis quelques années, l'apparition dans le monde entier de souches XDR (« extensively drug-resistant ») est devenue préoccupante (Shah et al., 2007, Jain & Dixit, 2008). Après plusieurs essais de définition assez confuses, celle adoptée est la suivante : il s'agit de bacilles tuberculeux résistants à au moins l'isoniazide, la rifampicine, une fluoroquinolone et un antibiotique injectable (amikacine, kanamycine ou capréomycine) (Jassal & Bishai, 2009, CDC, 2006). Il va de soi que de telles souches inquiètent fortement quant au succès des programmes de contrôles de la tuberculose car le pourcentage de réussite du traitement chute à seulement 30 à 50 % (LoBue, 2009).

5.3- Différence entre résistance, tolérance et persistance

Chez certains patients tuberculeux traités, les Bacilles de Koch (BK) sont rapidement éliminés des expectorations. Chez d'autres les bacilles persistent plus longtemps. La « tolérance aux antibiotiques » semble être en partie responsable de cette « persistance » (Wallis et al., 1999).

La « tolérance aux antibiotiques » est la capacité que possède un organisme à échapper à l'activité bactéricide d'un antibiotique pour lequel les tests in vitro l'ont pourtant démontré sensible. Les mécanismes de tolérance ne sont pas encore bien compris (Ojha et al., 2008).

L'état physiologique de la bactérie semble jouer un rôle (Mitchison & Selkon, 1956). En effet, on remarque, par exemple, qu'une culture de *M. tuberculosis* en phase stationnaire est



capable de résister 1000 fois plus à l'action de l'isoniazide que lorsque cette même culture est en croissance active (Herbert et al., 1996).

III- DEPISTAGE ET DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE

1- Dépistage de la tuberculose latente (primo-infection)

Comme la primo-infection est souvent asymptomatique (ou peu évocatrice), un examen clinique du patient ne suffit pas. Le diagnostic d'une infection tuberculeuse latente nécessite la réalisation d'une intradermoréaction (IDR) tuberculique (ou test de Mantoux).

Il s'agit d'un test d'hypersensibilité retardée. Cette épreuve consiste en l'injection intradermique (face antérieure de l'avant-bras) d'un mélange de protéines tuberculeuses purifiées appelé PPD (Purified Protein Derivative) ou tuberculine. Une réaction positive à ce test se traduit, 48 à 72 heures après l'injection, par une rougeur et une induration de la peau (> 10 mm de diamètre) au niveau du site d'injection (présence d'une immunité cellulaire contre *M. tuberculosis*).

Une réponse positive à ce test ne signifie pas que le patient présente une tuberculose active mais bien que son organisme a connu, à un moment donné, un contact avec le bacille tuberculeux (primo-infection). Ce test est également utilisé pour réaliser une surveillance des professionnels de la santé exposés à la tuberculose. Les lésions pulmonaires dues à une primo-infection ne sont, en général, pas détectables par l'examen radiographique du thorax.

Des tests immunologiques (QuantiFERON-TB-Gold® et TSPOT-TB®), utilisant les lymphocytes T du patient pour mesurer la production d'interféron- γ , ont été développés, plus récemment, pour le diagnostic de l'infection tuberculeuse latente (Hadj *et al.*, 2006, Lalvani, 2007). Ces tests reposent sur le principe suivant lequel des lymphocytes T préalablement sensibilisés par des antigènes tuberculeux (*in vivo*) produisent des concentrations élevées d'interféron- γ lorsqu'ils sont réexposés aux mêmes antigènes mycobactériens (*in vitro*). Ces tests présentent comme avantage de ne pas être perturbés par une vaccination antérieure au BCG ou par une infection causée par une autre mycobactérie (Al-Orainey, 2009, Bocchino *et al.*, 2009, Richeldi, 2006).

2- Diagnostic de la tuberculose active

La suspicion d'une tuberculose-maladie chez un patient nécessite la réalisation d'examens médicaux plus approfondis :

- Examen radiologique : permet de mettre en évidence les formes pulmonaires de la maladie.



• Examen bactériologique: en général, la recherche du pathogène concerne des échantillons du tractus respiratoire mais celle-ci peut également être réalisée sur des spécimens de nature très variable (urines du matin, aspiration gastrique, etc...). L'identification du bacille de Koch peut être réalisée par :

- L'examen microscopique qui permet la mise en évidence de bacilles tuberculeux après coloration de Ziehl-Neelsen ou par l'utilisation de l'auramine en microscopie à fluorescence (Saltini, 2006)

- La culture aérobie sur milieu spécifique de Löwenstein-Jensen ou de Coletsos (milieux solides). Etant donné la croissance lente de *M. tuberculosis*, 5 à 7 semaines sont nécessaires pour l'obtention d'un résultat définitif. De nouvelles techniques, en milieu liquide, ont été développées afin de réduire ce temps d'attente (Heifets & Desmond, 2005) :

- la méthode radiométrique « BACTEC 460 TB » qui consiste en la mise en culture de l'échantillon provenant du patient dans un flacon contenant de l'acide palmitique marqué au Carbone 14 (^{14}C). La croissance mycobactérienne est détectée par mesure de la quantité de dioxyde de carbone ($^{14}\text{CO}_2$) produite dans le flacon, suite à l'utilisation de l'acide palmitique marqué par les bactéries en croissance (Kirihara *et al.*, 1985). En général, un résultat positif est obtenu en 7 à 10 jours. D'autres systèmes à détection automatisée mais non radioactifs sont maintenant également disponibles.

- « BacT/ALERT 3D » : qui détecte la croissance mycobactérienne grâce à une pastille située à la base du flacon de culture. Celle-ci subit une modification colorimétrique lors de l'acidification du milieu résultant de la production de dioxyde de carbone (CO_2) par les bactéries en croissance (Werngren *et al.*, 2006).

- « BACTEC MGIT 960 » : qui utilise des flacons de culture contenant un sel de ruthénium dont la fluorescence est d'autant plus importante que la pression en dioxygène (O_2) est faible. Toute croissance sera donc détectée par augmentation de la fluorescence (Pheiffer *et al.*, 2008).

Aujourd'hui, de nombreuses techniques moléculaires adaptées au diagnostic de la tuberculose sont utilisées, dont notamment l'amplification génique (PCR) permettant la détection de séquences nucléiques spécifiques; le séquençage, qui permet l'analyse de fragments polymorphiques spécifiques d'espèces; et l'hybridation d'ADN tuberculeux sur sondes spécifiques. Cependant, ces techniques présentent, actuellement, une sensibilité insuffisante lorsqu'elles sont appliquées directement sur des échantillons respiratoires ou



autres (Kim *et al.*, 2009). Elles présentent par contre une sensibilité et une spécificité excellentes lors de leur utilisation à partir d'une culture.

Actuellement, l'examen direct reste la méthode de dépistage la plus largement utilisée. Elle présente l'avantage de pouvoir être réalisée aisément et ne nécessite que peu de matériel.

Cependant, sa sensibilité n'atteint que 50 à 80% à partir d'expectoration (Palomino *et al.*, 2007) Par ailleurs, le diagnostic d'espèce est évidemment impossible par microscopie. La nécessité de la mise au point d'une nouvelle méthode de diagnostic est donc primordiale, mais doit aussi répondre à des critères d'utilisation aisée et économique afin de la rendre applicable notamment dans les pays en voie de développement.

IV- LES PLANTES MEDICINALES ET AROMATIQUES

1- Situation dans le monde

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus. C'est pourquoi on utilise à nouveau l'absinthe chinoise (*Artemisia annua*) et surtout son principe actif pour soigner la malaria lorsque les protozoaires responsables de la maladie résistent aux médicaments.

La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme, est souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en Occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques, comme l'asthme ou l'arthrite. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. On estime que 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques (Iserin, 2001).

Les plantes contiennent des centaines, voire des milliers de substances chimiques actives. Souvent, déterminer en détail l'action d'une plante est très difficile, sinon impossible, même si son effet médical est, en revanche, bien connu. L'étude pharmacologique des plantes entières indique qu'elles fonctionnent comme un puzzle incomplet.

La recherche des principes actifs extraits des plantes est d'une importance capitale car elle peut permettre la mise au point de nouveaux médicaments.



2- Quelques éléments actifs des plantes (Iserin 2001)

2.1- Les phénols

Il existe une très grande variété de phénols, des composés simples comme l'acide salicylique molécule donnant par synthèse l'aspirine, à des substances plus complexes comme les composés phénoliques auxquels sont rattachés les glucosides. Les phénols sont anti-inflammatoires et antiseptiques. On suppose que les plantes, en les produisant, cherchent à se protéger contre les infections et les insectes phytophages. Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales. La gaulthène (*Gaulthera pincumbens*) et le saule blanc (*Salix alba*) contiennent des acides glucosides phénoliques qui donnent, par distillation, des dérivés de salicylique et salicylate de méthyle.

2.2- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes, présents dans la plupart des plantes, sont des pigments polyphénoliques qui contribuent, entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaune ou en blanc. Ils ont un important champ d'action et possèdent de nombreuses vertus médicinales. Antioxydants, ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation. Certains flavonoïdes ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et antivirales, et des effets protecteurs sur le foie. Des flavonoïdes comme l'hespéridine et la rutine, présentes dans plusieurs plantes, dont le sarrasin (*Fagopyrum esculentum*) et le citronnier (*Citrus limon*), renforcent les parois des capillaires et préviennent l'infiltration dans les tissus voisins. Les isoflavones, que l'on trouve par exemple dans le trèfle rouge (*Trifolium pratense*), le citron (*Citrus limon*) à effets oestrogéniques, sont efficaces dans le traitement des troubles liés à la ménopause.

2.3- Les tanins

Toutes les plantes contiennent des tanins à un degré plus ou moins élevé. Ceux-ci donnent un goût amer à l'écorce ou aux feuilles et les rendent impropres à la consommation pour les insectes ou bêtes. Les tanins sont des composants polyphénoliques qui contractent les tissus en liant les protéines et en les précipitant, d'où leur emploi pour « tanner » les peaux. Ils permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections. Les plantes riches en tanins sont utilisées pour retendre les tissus souples, comme dans le cas des veines variqueuses, pour drainer les sécrétions excessives, comme dans la diarrhée, et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure. Les écorces de chêne et d'acacia sont riches en tanins.

2.4- Les huiles essentielles



Les huiles essentielles extraites des plantes par distillation comptent parmi les plus importants principes actifs des plantes. Elles sont largement employées en parfumerie, en industrie pharmaceutiques et en agroalimentaires. La composition chimique des huiles essentielles est caractérisée par la présence des mono- et sesquiterpènes. Dans ces deux familles, on peut rencontrer des sous familles à savoir les mono-terpènes, les mono-terpénols, les aldéhydes terpéniques, les phénols, les esters, les sesquiterpènes, et les sesquiterpénols.

Les huiles essentielles contenues telles quelles dans les plantes sont des composés oxygénés, parfois d'origine terpénoïde et possédant un noyau aromatique. Les huiles essentielles ont de multiples propriétés. L'arbre à thé (*Melaleuca altemifolia*), par exemple, est fortement antiseptique. Les huiles essentielles sont à différencier des huiles fixes ou des huiles obtenues par l'hydrolyse des glucosides, comme la chamazulène de la camomille allemande (*Chamomilla recutita*) formée lors de la distillation mais absente de la plante à l'origine. Les résines, substances huileuses collantes qui suintent des plantes, notamment de l'écorce de pin sylvestre (*Pinus sylvestris*), sont souvent liées aux huiles essentielles (oléorésines) et aux gommés (*voir* Polysaccharides).

2.5- Les anthocyanes

Les anthocyanes sont issus de l'hydrolyse des anthocyanidines (flavonoïdes proches des flavones), qui donnent aux fleurs et aux fruits leurs teintes bleue, rouge ou pourpre. Ces puissants antioxydants nettoient l'organisme des radicaux libres. Ils maintiennent une bonne circulation, notamment dans les régions du cœur, des mains, des pieds et des yeux. La mûre sauvage (*Rubus fruticosus*), la vigne rouge (*Vitis vinifera*) et l'aubépine (*Crataegus oxyacantha*) en contiennent toutes des quantités appréciables.

2.6- Les anthraquinones

Ce sont les principaux constituants de plantes comme le séné (*Cassia senna*) et la rhubarbe de Chine (*Rheum palmatum*), qui, toutes deux, agissent sur la constipation. Elles ont un effet irritant et laxatif sur le gros intestin, provoquent des contractions des parois intestinales et stimulent les évacuations environ dix heures après la prise. Elles rendent les selles plus liquides, facilitant ainsi le transit intestinal.

2.7- Les coumarines

Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Les coumarines du mélilot (*Melilotus officinalis*) et du marronnier d'Inde (*Aesculus hippocastanum*) contribuent à fluidifier le sang alors que les furanocoumarines comme le bergaptène, contenu dans le cèleri (*Apium graveolens*), soignent



les affections cutanées et que la khelline de la khella (*Ammi visnaga*) est un puissant vasodilatateur coronarien.

2.8- Les saponines

Principaux constituants de nombreuses plantes médicinales, les saponines doivent leur nom au fait que, comme le savon, elles produisent de la mousse quand on les plonge dans l'eau. Les saponines existent sous deux formes, les stéroïdes et les terpenoïdes. La structure chimique des stéroïdes est similaire à celle de nombreuses hormones humaines (œstrogène, cortisone), et de nombreuses plantes qui en contiennent ont un effet sur l'activité hormonale. L'igname sauvage (*Dioscorea villosa*) contient des saponines stéroïdes à partir desquels on synthétisa la pilule contraceptive. Les saponines terpenoïdes, contenues dans la réglisse (*Glycyrrhiza glabra*) et la primevère (*Primula veris*), ont une activité hormonale moindre. Elles sont souvent expectorantes et facilitent l'absorption des aliments.

2.9- Les polysaccharides

Ce sont des unités complexes de molécules de sucre liées ensemble que l'on trouve dans toutes les plantes. Du point de vue de la phytothérapie, les polysaccharides les plus importants sont les mucilages « visqueux » et les gommages, présents dans les racines, les feuilles et les graines. Le mucilage et la gomme absorbent de grandes quantités d'eau, produisant une masse gélatineuse qui peut être utilisée pour calmer et protéger les tissus enflammés, par exemple quand la peau est sèche et irritée ou la paroi des intestins enflammée et douloureuse. La meilleure façon de préparer les herbes mucilagineuses comme l'orme rouge (*Ulmus rubra*) et le lin (*Linum usitatissimum*) est de les gorger d'eau froide (de les faire macérer). Certains polysaccharides, comme les glucomannanes et les pectines, sont utilisés en cosmétologie.

2.10- Les alcaloïdes

Formant un groupe très large, les alcaloïdes possèdent presque tous une molécule d'azote (-N) qui les rend pharmaceutiquement très actifs. Certains sont des médicaments connus qui ont des vertus thérapeutiques avérées.

C'est le cas d'un dérivé de la pervenche de Madagascar (*Vinca rosea* syn. *Catharanthus roseus*) employé pour traiter certains types de cancer. D'autres alcaloïdes, comme l'atropine, présente dans la belladone (*Atropa belladonna*), ont une action directe sur le corps : activité sédatrice, effets sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson).

Comme nous l'avons vu plus haut, une plante n'est pas une « recette magique » dotée d'une action unique, mais un ensemble complexe pourvu de principes actifs qui ont une influence sur les différents systèmes de régulation du corps. En associant la recherche



scientifique sur les constituants actifs, l'observation clinique et la connaissance traditionnelle des plantes, il est possible de dresser un inventaire de leurs usages thérapeutiques.

3- Utilisations des plantes médicinales

3.1- Utilisation pour leurs propriétés odorantes

Les huiles essentielles sont employées dans le secteur de la cosmétique, notamment pour la fabrication des parfums ; dans les compositions parfumantes des détergents et des produits de parfumerie fonctionnelle ; mais aussi dans le domaine alimentaire. L'utilisation des huiles essentielles pour l'élaboration des parfums est évidente. Dans le secteur de la parfumerie fonctionnelle, les huiles essentielles sont sélectionnées pour renforcer l'impression de propreté ; de même, dans le domaine alimentaire, les huiles essentielles ont pour objectif de développer les arômes, le plus souvent dans des plats préparés.

3.2- Utilisation pour leurs propriétés médicinales

L'utilisation historique des plantes en raison de leurs propriétés thérapeutiques, a avec les avancées techniques et scientifiques, mené à l'isolement de principes actifs. Il faut alors distinguer phytothérapie et aromathérapie : la phytothérapie est la médecine par les plantes, utilisés en partie ou en totalité, sous différentes formes (teintures mères, extraits fluides ou secs, poudres, infusions, décoctions, ...) ; l'aromathérapie n'utilise que les principes actifs d'une partie de la plante, où ils sont extrêmement concentrés.

4- Quelques plantes à activité antimycobactérienne

Tableau 2 : Quelques espèces de plantes reportées comme ayant des activités antimycobactériennes (Bull. soc., 2007)

Famille, Ordre	Genre et espèce
<i>Cupressaceae</i>	<i>Chamaecyparis nootkatensis</i> <i>Juniperus communis</i>
<i>Asparagales</i>	<i>Allium cepa</i> <i>Aloe chinensis</i> <i>Chlorophytum inornatum</i> <i>Pancratium maritimum</i>
<i>anacardiaceae</i>	<i>Pistacia lentiscus</i> <i>Mangifera indica</i>

	<i>Shinus molle</i>
<i>Cistaceae</i>	<i>Cistus albidus</i> <i>Cistus salvifolus</i>
<i>Lamiaceae</i>	<i>Thymus pallidus</i> <i>Vitex agnus-castus</i> <i>Hyssopus officinalis</i>
<i>Rutaceae</i>	<i>Ruta montana</i> <i>Aegle marmelos</i>

V- LES DIFFERENTES TECHNIQUES D'EXTRACTION

Parmi de nombreuses techniques d'extraction des huiles essentielles, la distillation est la méthode la plus ancienne et, également, la plus utilisée.

D'autres techniques plus récentes restent d'un emploi très limité. Nous présenterons successivement la distillation et ses diverses évolutions, l'enfleurage, l'extraction par solvant, les ultrasons, les fluides subcritiques ou supercritiques, les micro-ondes, les fluides sous pression et enfin le flash détente.

1- La distillation

Dans un premier temps, l'extraction des huiles essentielles s'est faite en plongeant la matière première dans l'eau qu'on porte ensuite à ébullition, c'est l'hydrodistillation. Par la suite, la matière première et l'eau ont été séparées : soit l'eau est placée au fond de la cuve avant d'être portée à ébullition pour qu'un courant de vapeur d'eau traverse la matière première, c'est la « vapo-hydrodistillation » ; soit la vapeur d'eau est générée dans une chaudière à l'extérieur de l'alambic, technique dite « vapodistillation ». Dans ces divers cas, la vapeur d'eau chargée d'huile essentielle est dirigée vers un condenseur formé généralement d'un serpentin, à tubes parallèles, dans lequel circule de l'eau fraîche. Une fois condensées, eau et huile essentielle sont acheminées vers un essencier ou vase florentin. Dans ce dernier, nous obtenons deux liquides, plus ou moins non miscibles : l'eau et l'huile essentielle. Dans la plupart des cas, ces deux liquides se séparent par décantation. Le produit est parfois retiré de l'essencier au fur et à mesure de la distillation en donnant dans l'ordre une « tête », un « cœur » et une « queue ».

De nos jours, les alambics sont construits en acier inoxydable. Autrefois ces alambics étaient fabriqués en cuivre, mais cette matière provoquait souvent une coloration de l'huile



essentielle. La distillation, quelle qu'en soit la forme, engendre des réactions d'isomérisation, de saponification, ou de polymérisation. Après élimination de la phase aqueuse, les huiles essentielles brutes peuvent subir divers traitements :

La rectification est une distillation sous vide éliminant les traces d'eau, les matières solubles ou résineuses et les colorants. La déterpénation s'effectue par distillation fractionnée, par extraction sélective, par une combinaison de ces deux techniques ou par chromatographie. Cette opération augmente la solubilité en milieu aqueux. Elle concentre l'arôme, dans la mesure où nous considérons que les hydrocarbures terpéniques ne jouent qu'un rôle mineur dans l'arôme. Enfin, elle augmente la stabilité des huiles en évitant l'apparition des notes de rance ou la formation de résines.

La sesquidéterpénation est réalisée par extraction sélective ou par chromatographie. La concentration consiste à déterpéner partiellement les huiles essentielles par distillation (J. Crouzet, 2004).

1.1- L'hydrodistillation

La matière première est en contact direct avec l'eau. Elle peut flotter à la surface ou être immergée, en fonction de sa densité et de la quantité traitée. Le chauffage de l'ensemble est effectué à la base de l'alambic, à l'aide de combustibles divers comme le bois, (alambic à feu nu) ; ou par de la vapeur surchauffée injectée dans une double enveloppe entourant l'alambic. La présence de l'eau engendre notamment des phénomènes d'hydrolyse. Ils seront d'autant plus importants que la durée d'hydrodistillation sera longue. Par ailleurs, dans le cas de l'alambic à feu nu, la matière première située à la surface peut connaître une certaine surchauffe, ce qui est négatif pour l'huile essentielle ainsi obtenue. Etant gorgée d'eau, le produit solide résiduel n'est pas utilisable comme combustible.

1.2- La vapo-hydrodistillation

La matière première n'est plus en contact avec l'eau ; elle en est séparée grâce à une tôle perforée. Cette séparation permet l'emploi ultérieur du produit solide résiduel comme combustible. La matière première se situe donc dans la partie supérieure de l'alambic. Dans la partie inférieure, une certaine quantité d'eau qui n'atteint pas la matière première, assure la formation de vapeur saturée avec une faible pression par chauffage direct à l'aide de différents combustibles (alambic à feu nu) ou par injection de vapeur surchauffée dans la double enveloppe limitée à la partie inférieure de l'alambic.

Les phénomènes d'hydrolyse sont limités du fait de l'absence d'un contact direct avec l'eau. Par contre, dans le cas d'un alambic à feu nu, les risques de surchauffer la matière première existent toujours. Enfin, l'eau n'étant plus présente pour assurer l'homogénéité et la

répartition uniforme de la matière première lors du changement dans l'alambic, seul un brassage devra permettre d'éviter la création de chemins préférentiels de la vapeur d'eau, lors de son passage au sein de la matière première. Un mouillage excessif de la matière première tend à provoquer le compactage de cette dernière, ralentissant le cheminement de la vapeur d'eau au sein de la matière première.

1.3- La vapo-distillation

La vapo-distillation a les mêmes avantages que la vapo-hydrodistillation, mais s'en distingue par le fait que la génération de la vapeur s'effectue dans un générateur de vapeur à l'extérieur de l'alambic de distillation. La vapeur peut ainsi être saturée ou surchauffée ; à pression légèrement supérieure à la pression atmosphérique, cette vapeur est introduite dans la partie basse de l'alambic et traverse donc la charge de matière première.

2- La technique de l'enfleurage

B. M. Lawrence donne des indications précises sur cette technique (B.M. Lawrence, 1980). Cette technique est employée en parfumerie. Elle est fondée sur l'affinité qui peut exister entre les corps gras et les huiles essentielles. En effet les huiles essentielles sont absorbées par les corps gras, souvent à froid (enfleurage à froid) ou à l'état liquide par chauffage (enfleurage à chaud).

2.1- L'enfleurage a froid ou extraction dans la graisse froide

Cette technique est particulièrement adaptée aux fleurs fragiles (jasmin, tubéreuse, ...). Ces dernières conservent leur odeur après la cueillette, mais elles la perdent sous l'action de la chaleur. Des surfaces planes en verre, supportées par un châssis en bois, sont recouvertes, sur leurs deux faces, d'une couche de graisse inodore, souvent de la graisse animale raffinée. Après cette opération, les fleurs sont réparties sur ce « lit » de graisse. Grâce à son pouvoir d'absorption, la graisse capture les constituants du parfum exhalés par la matière première. Les châssis sont retournés régulièrement afin d'éliminer les fleurs « vidées » de leur parfum. Au terme de cette étape, la graisse est recueillie à l'aide d'une spatule en bois par raclage, le produit obtenu est appelé « pommade florale », qui peut subir, par la suite, une extraction par l'alcool afin d'avoir une « absolue ».

2.2- L'enfleurage a chaud ou extraction dans la graisse chaude

Il s'agit d'une variante de la technique précédente, réservée aux fleurs un peu moins fragiles, comme la rose *centifolia*, la violette, la fleur d'oranger et la cassie. L'enfleurage à chaud est aussi appelé digestion ou macération. Cette technique consiste à faire fondre de la graisse dans de grandes marmites, chauffées au bain-marie, dans lesquelles est plongée la



matière première. Le mélange est laissé à refroidir pendant une à deux heures, puis à nouveau chauffé afin d'être filtré par un tamis métallique pour séparer la graisse parfumée de la matière première épuisée. La même charge de graisse est employée jusqu'à sa saturation en molécules odorantes. Le produit final est, comme précédemment, une «pommade florale ». Il est également possible d'obtenir « l'absolue » par extraction éthylique.

3- L'extraction par solvant organique

Cette dénomination est employée dès lors que le solvant n'est pas de l'eau. Il est possible d'utiliser des solvants de natures différentes. Mais le solvant choisi doit répondre à de très nombreuses exigences : être non miscible dans l'eau, avoir une température d'ébullition basse afin d'être facilement et rapidement éliminé après l'opération d'extraction, par évaporation sans l'application d'une température élevée qui pourrait altérer la qualité du produit final; être non réactif avec les composants du produit final ; être peu cher.

L'inconvénient de cette technique réside dans la nature même de ce procédé. Les solvants employés sont en effet dangereux pour l'homme et/ou pour l'environnement.

4- L'extraction par ultrasons ou sonication

Cette technique est apparue en 1950, avec des équipements de taille laboratoire (M. Vinatoru, 2001). Elle représente une adaptation de l'hydrodistillation ou de l'extraction par solvant organique. En effet, la matière première est immergée dans l'eau ou dans le solvant, et dans le même temps elle est soumise à l'action des ultrasons. Cette technique peut être utilisée pour l'extraction des huiles essentielles, mais elle a surtout été développée pour l'extraction de certaines molécules ayant un intérêt thérapeutique (M. Vinatoru, 2001 et Z. Hchoromadokova et al., 1999). Les ondes sonores utilisées ont une fréquence de 20kHz à 1MH induisant des vibrations mécaniques dans le solide, le liquide ou le gaz, à travers une succession de phases d'expansion et de compression, comme au cours d'un phénomène de cavitation. Les bulles, formées par l'expansion, vont se développer puis dégonfler. Si ces bulles se situent près d'une surface solide, alors le dégonflement sera asymétrique, ce qui produira des jets de liquide ultra-rapides. Les mécanismes d'extraction impliquent deux phénomènes physiques : les molécules peuvent parfois traverser la paroi cellulaire par simple diffusion; après destruction des parois cellulaires, le contenu de ces cellules peut être « lessivé» afin de récupérer l'ensemble des molécules emprisonnées jusqu'alors.

Les ultra-sons permettent d'améliorer ces deux phénomènes. Ils pourraient augmenter le rendement, diminuer la quantité de solvant nécessaire et/ou le temps de traitement.



5- L'extraction par fluide subcritique (eau, CO₂)

5.1- L'extraction par eau subcritique (Subcritical Water Extraction SWE)

Les points critiques de l'eau sont 1 MPa et 374 °C. Pour être conditionnée comme liquide subcritique, l'eau est maintenue entre 100 et 374 °C et à une pression assez haute afin qu'elle reste à l'état liquide malgré son niveau de température.

Y. Yang et al. ont étudié l'extraction par l'eau subcritique. Ils ont observé l'élution de différents solutés organiques fixés sur des matrices diverses par l'eau subcritique. Ils ont montré que l'évolution de la constante diélectrique de l'eau avec l'élévation de la température de cette dernière est comparable à celle d'un mélange méthanol/eau ou acétonitrile/eau (mélanges utilisés couramment en HPLC) pour lequel le pourcentage en méthanol ou en acétonitrile augmente pour atteindre 100%.

5.2- L'extraction par CO₂ subcritique

Afin que le CO₂ se trouve à l'état subcritique, la température doit être comprise entre 31 °C et 55 °C et la pression entre 0,5 et 7,4 MPa. Le CO₂ subcritique se comporte alors comme un solvant apolaire (D.A. Moyler, 1993). Cette méthode permet de supprimer les dégradations observées lors de l'hydrodistillation ou de l'entraînement à la vapeur, dues aux températures élevées et à la présence de l'eau. D'après Chen et al., les extraits obtenus par cette technique présentent des arômes très proches de ceux des matières premières végétales fraîches. Venskutonis a effectué une étude de cette technique sur 46 matières premières différentes.

6- L'extraction par fluide supercritique (supercritical fluid Extraction SFE)

Les fluides supercritiques sont obtenus à une pression et une température supérieures respectivement à la pression et la température critiques.

Le solvant le plus couramment utilisé pour cette technique est le CO₂, en raison des faibles valeurs de pression et de température requises pour obtenir l'état supercritique. Par ailleurs le CO₂ a d'autres particularités intéressantes : il est chimiquement inerte, naturel et non toxique.

7- L'extraction assistée par micro-ondes

Cette technique a notamment été explicitée par Anizon et al. Les microondes sont des ondes électromagnétiques, dont la fréquence est comprise entre 300 MHz et 30 GHz, soit une longueur d'onde entre 1 m et 1 cm. La fréquence généralement employée est de 2450 MHz, soit une longueur d'onde de 12,2 cm. Les matériaux capables de s'échauffer sous l'action des



micro-ondes sont des matériaux composés de molécules formant des dipôles électriques (des matériaux électriquement neutres, mais ayant une répartition dissymétrique de leurs charges ioniques partielles). Ces dipôles de répartition généralement aléatoire, s'orientent dans le sens du champ électrique extérieur imposé. Dans le cas d'un champ électrique alternatif, les dipôles changent «rapidement» de sens et la haute fréquence génère un mouvement aléatoire traduisant ainsi une haute température du système.

Dans le cas des produits naturels, c'est la teneur en eau qui déterminera la capacité de ces produits à être chauffé par micro-ondes : si la teneur en eau est supérieure à 20% en masse, le produit s'échauffera facilement ; et si la teneur est inférieure, le chauffage par les micro-ondes nécessitera une mise en œuvre particulière.

7.1- Extraction par micro-ondes sans solvant (Solvent Free Microwave Extraction, SFME)

Deux cas sont à considérer : les plantes à huile essentielle superficielle et celles à huile essentielle non superficielle. Dans le premier cas, les micro-ondes sont en mesure de chauffer la matière première et d'extraire l'huile essentielle, seulement à l'aide de l'eau de constitution du végétal. Dans la deuxième situation, les micro-ondes sont capables de générer un gradient thermique inversé par rapport à celui obtenu lors d'une extraction par la vapeur. Cette inversion a pour conséquence de faciliter la diffusion des molécules constitutives de l'huile essentielle. Dans tous les cas, la matière première doit présenter une teneur en eau suffisamment élevée.

7.2-Hydrodistillation par micro-ondes sous vide pulse (vacuum Microwave hydrodistillation)

Ce procédé a été breveté et développé par la société Archimex (Mengal et al., 1994). Il repose sur l'application simultanée des micro-ondes et d'un vide pulsé. La puissance des microondes (fixée au début du traitement, généralement entre 0, 2 et 1 kW/kg de matière première) est maintenue constante tout au long du traitement.

Ces micro-ondes ont pour effet d'accélérer le transfert des molécules vers le milieu extérieur. Le vide pulsé, quant à lui, permet de réaliser l'entraînement azéotropique de l'huile essentielle à une température inférieure à 100°C.

7.3- Extraction par solvant assistée par micro-ondes, ESAM

Cette technique diffère de la précédente par la présence d'un solvant ; deux cas distincts se présentent : le solvant est absorbant ou transparent aux microondes. Dans le cas d'un solvant absorbant la totalité de l'énergie micro-ondes, la chaleur est transférée par convection avec le solvant puis conduction au sein de la matière première. Le mécanisme d'extraction est

similaire à l'extraction solide-liquide conventionnelle. Les micro-ondes se distinguent cependant par une bonne inertie thermique meilleure que celle de la conduction et la convection, et par un chauffage diffus et non limité à une seule surface ; la température de consigne peut être plus forte sans avoir de risques de dégradation thermique. L'opération n'est donc que légèrement accélérée.

8- L'extraction par fluide sous pression (ASE)

Dans l'opération d'extraction par fluide sous pression, la matière première est mise en contact avec un solvant d'extraction, préalablement conditionné avec une certaine température et une certaine pression. En 1997, Popp et al. ont utilisé la technique ASE pour l'extraction de contaminants présents dans des huiles. Par comparaison avec les méthodes d'extraction traditionnelle par solvants, l'ASE nécessite un temps de traitement plus court et une quantité de solvant plus faible. De même, Pallaroni et von Holst ont employé cette technique afin d'éliminer des toxines présentes dans des céréales. Dans ce cas, les résultats ont été comparables à ceux obtenus par les méthodes classiques. L'avantage de la méthode ASE résidait dans sa capacité à être automatisée. Ils ont démontré que cette technique avait une efficacité comparable à celle des méthodes classiques. Mais elle nécessite moitié moins de solvant, moins de temps, préserve les molécules thermosensibles et est en mesure d'extraire des composés polaires comme non polaires. La méthode ASE a aussi été testée pour l'extraction des composés des huiles essentielles à partir de plantes aromatiques (Wolff et al., 2007).

9- Le flash détente

Ce procédé a été conçu par la société réunionnaise, Aurore Développement. Description du procédé : 1ère étape : Etuvage du matériel végétal à 85-90°C, assurée par l'utilisation d'une vis à injection de vapeur. Cette étape de blanchiment, nécessaire à la mise en œuvre du procédé, permet d'inhiber l'activité enzymatique endogène et de détruire la flore bactérienne. 2ème étape : La détente avec l'introduction brutale sous vide (environ 30 mBar) du matériel végétal. La température d'ébullition de l'eau dans ces conditions de vide se situe entre 27 et 30°C. Cette mise sous vide provoque donc l'évaporation brutale d'une partie de l'eau de constitution du matériel végétal étuvé (environ 10% de la masse humide initiale) et une chute brutale de la température du milieu. Cette perte d'eau engendre un broyage fin dû à la création



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
Faculté des Sciences et Techniques



de micro-canaux intercellulaires. Ce bouleversement et cette explosion cellulaire confèrent aux produits des qualités physico-chimiques, rhéologiques et organoleptiques bien particulières. Les eaux d'évaporation sont récupérées par condensation : ces eaux, particulièrement riches en composés volatils aromatiques, sont appelées eaux aromatiques et pourront être réintroduites dans les produits après Flash-Détente.

Nous avons tenté au cours de ce chapitre de mettre en évidence les points forts et points faibles des méthodes traditionnelles et des procédés plus récents d'obtention des huiles essentielles et de différents extraits de plantes.



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
Faculté des Sciences et Techniques



PARTIE II- MATERIEL ET METHODES



I- SOUCHES MYCOBACTERIENNES UTILISEES

Les souches bactériennes utilisées dans ce travail sont :

Mycobactérium smegmatis : bacille de 3 à 5 µm de long, du phylum des *Actinobacteria*. Cette espèce partage plusieurs homologues avec *M. tuberculosis*. Cette mycobactérie est non pathogène et possède un temps de génération d'environ 3h. De ce fait, *M. smegmatis* est très utilisé pour étudier les mycobactéries.

Mycobactérium aurum : *Mycobacterium aurum* est également une espèce non pathogène à croissance rapide, avec un temps de génération de 6 h.

II- CULTURE DES SOUCHES BACTERIENNES

Le milieu de culture utilisé pour les souches bactériennes est le milieu Luria-Bertoni (LB), dont la composition est donnée ci-dessous.

LB liquide (1 L) :

- Peptone 10 g/L
- Chlorure de Sodium (NaCl) 10 g/L
- Extrait de levure 5 g/L

LB solide (1 L) :

- Peptone 10 g/L
- Chlorure de Sodium (NaCl) 10 g/L
- Extrait de levure 5 g/L
- Agar 15 g/L

Les milieux de culture sont ensuite stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 30 min.

Les boîtes de culture des mycobactéries sont incubées à 37°C. Après croissance les cultures sont conservées à 4°C.

III- TEST MICROBIOLOGIQUE

La méthode des disques

Les extraits des plantes ont été testés sur les souches mycobactériennes par la méthode des disques. C'est la méthode de diffusion sur gélose la plus utilisée par les laboratoires.

Principe général



Elle consiste à ensemercer, en surface d'un milieu solide par inondation, les souches bactériennes à tester. Après dépôt d'un disque en papier buvard, on ajoute l'antibiotique et on laisse diffuser. L'antibiotique diffuse à partir du disque en créant un gradient de concentration. La détermination du diamètre de la zone d'inhibition permet une estimation de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne en seront déduits.

A la limite des zones d'inhibition, il existe dans la gélose des concentrations d'antibiotiques égales aux CMI. Les méthodes de diffusion ne permettent pas de chiffrer directement ces valeurs. Toutefois, il existe une relation simple entre les diamètres des zones d'inhibition et les \log_2 des CMI mesurées par les techniques de dilution. Ces relations, appelées droites de concordance ou droites de régression, ont été établies par des laboratoires spécialisés travaillant dans des conditions standardisées (Euzéby J.P., 2006). A condition de respecter un protocole identique, ces courbes sont utilisables par tout laboratoire.

Technique

On étale 100 μ l d'une culture de *M. smegmatis* ou *M. aurum* (titre : environ 10^6 UFC/ml) sur le milieu LB-agar. On applique des disques à l'aide d'une pince stérile, en les posant à environ 2 cm de la périphérie de la boîte, tout en appuyant légèrement afin d'assurer le contact avec le milieu de culture. A l'aide d'une micropipette, un volume de 20 μ l de l'extrait est déposé sur le disque et on laisse la boîte 30 minutes sur la paillasse.

La boîte ainsi préparée est incubée pendant une nuit à 37°C. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture.

Pour chaque extrait, un minimum de trois répétitions ont été effectuées pour tester l'activité antimycobactérienne par la méthode des disques.

IV- MATERIEL VEGETAL

Après une étude bibliographique, quatre plantes ont été choisies, en se basant sur le fait que leur extrait n'a jamais été testé sur les mycobactéries, bien que certains de ces extraits sont connus pour leurs activités sur d'autres bactéries autres que les mycobactéries.

Ces plantes ont été récoltées en Août 2010, dans la sous-région du sud du Togo (Afrique de l'Ouest). Elles ont été séchées à l'ombre, avant d'être empaquetées. Les plantes utilisées dans cette étude sont :

1- *Acanthospermum hispidum*.



Figure 1 : Photo d'*Acanthospermum hispidum*

1.1- Systématique

- Règne: végétal
- Sous-règne: Eucaryote
- Embranchement: Spermaphyte
- Sous-embranchement: Angiosperme
- Classe: Dicotylédone
- Sous-classe: Gamopétales
- Série Epigynes
- Ordre: Astéales
- Famille: Asteraceae
- Genre: *Acanthospermum*
- Espèce: *hispidum*

1.2- Description botanique

Acanthospermum hispidum est une herbe suffrutescente annuelle à tige poilue, parfois vivace, formant des petits buissons de 50 cm de haut ou plus, très ramifié à cime en boule étalée. Les feuilles de 4,5 cm sur 2 cm, sont sessiles, ovales, obtuses ou courtement et largement acuminées au sommet. Les inflorescences axillaires, solitaires et sessiles, sont formées de plusieurs fleurs jaune-pâles. Son fruit est composé de cinq akènes rayonnant terminés par un crochet épineux (Kerharo et Adams, 1974; Burkill, 1985 et Dokosi, 1998).

1.3- Choix de *Acanthospermum hispidum*

Cette plante a été sélectionnée car elle est utilisée en médecine traditionnelle. En effet, on l'utilise traditionnellement dans le traitement des maux de tête sévère, la dysenterie, la filariose, les angines, l'épilepsie, la jaunisse, la malaria,... (Adjahonou et al. 1986).

2- *Cymbopogon winterianus*



Figure 2 : Photo de *Cymbopogon winterianus*

2.1- Systématique

- Règne: *Plantae*
- Sous-règne: *Viridaeplantae*
- Embranchement: *Tracheophyta*
- Sous-embranchement: *Euphyllophytina*
- Classe: *Liliopsida*
- Sous-classe: *Commelinidae*
- Super-ordre : *Poanae*
- Ordre: *Poales*
- Famille: *Poaceae*
- Genre: *Cymbopogon*
- Espèce: *winterianus*

2.2- Description

Comme tous les cymbopogons, la citronnelle de Java est une herbe originaire d'Indonésie qui présente de longues feuilles étroites, des tiges et des inflorescences également linéaires. Les citronnelles sont des grandes herbes vivaces, sauvages ou cultivées des régions tropicales : Java, Sri Lanka... Son odeur fraîche, verte, citronnée se rapproche de celle de la mélisse à laquelle elle est parfois substituée.

2.3- Choix de la plante

Elle est utilisée dans le traitement des arthrites, les rhumatismes, la transpiration excessive, contre les piqûres de moustique et pour chasser ces derniers.

3- *Fagara xanthoxyloides*



Figure 3 : Photo de *Fagara zanthoxyloïdes*

Fagara zanthoxyloïdes, connu sous le nom vernaculaire de Heti au Togo, appartient à la famille des *Rutacées*.

Les Rutacées sont des plantes souvent ligneuses possédant des poches sécrétrices. Cette famille compte plus de 700 espèces en grande partie, arborescentes et appartenant aux pays tropicaux.

Suivant les variations de l'ovaire et du fruit, les Rutacées se divisent en 3 sous-familles :

- Les Rutoïdées
- Les Toddalioidées
- Les Aurantinoïdées

Le genre *Zanthoxyloïdes* appartient à la sous famille des Rutoïdées.

3.1- Systématique

- Règne : Végétal
- Embranchement : Spermatophytes
- Sous-embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Sous-classe : Dialypétales
- Ordre : Rutalées
- Famille : *Rutacées*
- Genre : *Fagara* ou *Xanthozylum*
- Espèce : *zanthoxyloïdes*

SYNONYMES.

- *Zanthoxylum polyganum*
- *Zanthoxylum zanthoxyloïdes*

3.2- Description botanique

Fagara zanthoxyloides Lam. est un petit arbre de 5 à 6 m de hauteur.

Les rameaux sont très armés avec des aiguillons très recourbés et aigus, en forme de griffes, petits ou atteignant jusqu'à 1 mètre de longueur. Le rachis et parfois la nervure médiane portent de grosses épines recourbées.

Les feuilles sont alternes, composées et imparipennées avec un pétiole de 2 à 5 cm de rachis plus ou moins cylindriques ou aplatis, garnis d'aiguillons. Elles comprennent 5 à 9 paires de folioles glabres opposées, sub-opposée ou alternes atteignant 6 cm ; un limbe aiguë à la base, de consistance coriace avec marge rebordée au dessus; nervure médiane déprimée au dessus, fortement saillante au dessous, garnie très souvent d'aiguillons sur les 2 faces.

Le bois est jaune clair (d'où le nom de *Xanthoxylum*) et très dur. L'écorce, relativement mince de 2 à 3 mm, d'un brun légèrement violacé, est assez lisse et de saveur amère ; sa mastication entraîne un picotement de la langue et un accroissement de la salivation.

Les racines mesurent 2 à 4 cm de diamètre ; le bois jaune, a une texture compacte et l'écorce peu épaisse (1 à 2 mm) se détache facilement ; la surface externe, brun clair, striée longitudinalement, sillonnée transversalement, présente des taches de couleur "jaune vif". La saveur, plus intense que celle de la tige, est aromatique, amère et poivrée.

3.3- Choix de la plante

Cette plante est utilisée traditionnellement pour traiter l'angine pharyngite, les hémorroïdes, la diarrhée, les douleurs abdominales, les gastroentérites, l'ictère, la leucorrhée, l'aménorrhée, l'urétrite, les courbatures, la carie dentaire, la gingivite, les plaies chroniques et la drépanocytose.

4- *Nauclea latifolia* Sm.



Figure 4 : Photo de *Nauclea latifolia*



4.1- Systématique

Règne : Végétal

Sous règne : Eucaryotes

Embranchement : Spermaphytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Gamopétales

Série : Epigynes

Sous série : Isostémones

Ordre : Rubiales

Famille : Rubiaceae

Genre : *Nauclea*

Espèce : *latifolia*

4.2- Description botanique

C'est un arbuste sarmenteux pouvant atteindre une hauteur de 9 m et un diamètre de tronc de 30 cm. L'écorce est crevassée, fibreuse à tranche rougeâtre. Les feuilles sont elliptiques ou sub-orbiculaires.

Les petites fleurs blanches parfumées constituent les glomérules terminaux de 3 à 4 cm de diamètre. Les fruits sont composés, sphériques, charnus, rouges à maturité, à chair rosée à l'intérieur (Kerharo et Adam, 1974).

4.3- Choix de la plante

Elle entre dans la catégorie des grands médicaments africains (Kerharo et Adam, 1974).

Le décocté des feuilles et des racines utilisé comme antientéralgique (colique), vermifuge, diurétique, feuilles et racines pour les aménorrhées, la stérilité, en cataplasme pour les enflures (Kerharo et Adam, 1974).

Sève des tiges feuillées légèrement chauffée : conjonctivites, plaie du globe oculaire, taie de l'œil (Malgras, 1992).

Fruits : réduits en poudre sont efficaces contre le paludisme, la constipation, les insuffisances rénales et la blennorragie (Malgras, 1992), utilisés dans le traitement des troubles gynécologiques (Burkill, 1997).

Le décocté d'écorce de tronc est employé fréquemment dans le paludisme et les états fébriles, seul, ou en association synergique avec d'autres végétaux (*Khaya senegalensis*) (Kerharo et Adam, 1974).

V- EXTRACTIONS PAR SOLVANT UTILISES

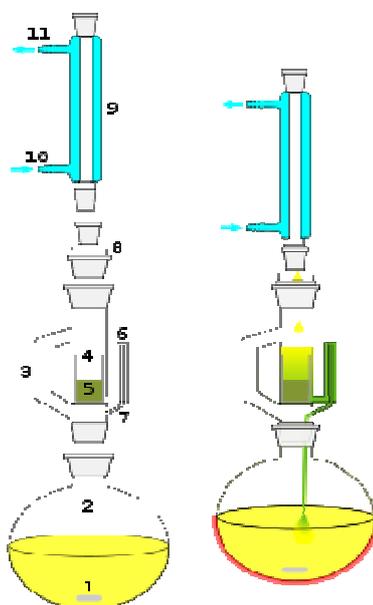
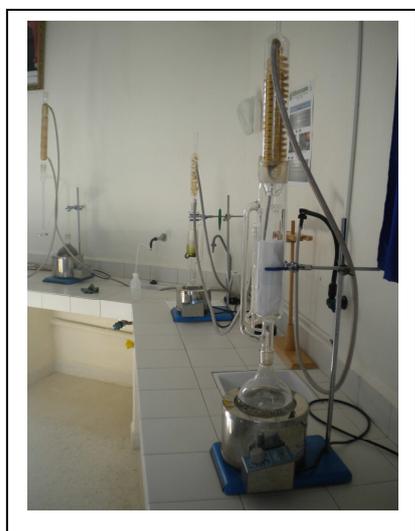
1- Méthodologie

Extraction avec des solvants à polarité croissante par soxhlet:

Un extracteur de Soxhlet (Figure 5) (ou appareil de Soxhlet) est une pièce en verre très utilisée comme technique conventionnelle d'extraction. Il est spécialement conçu par Franz von Soxhlet, pour l'extraction continue solide liquide. Il a été souvent considéré comme une méthode de référence. Quand le ballon est chauffé, les vapeurs du solvant passent par le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'extracteur, faisant ainsi macérer le solide (matière végétale) dans le solvant (chauffé par les vapeurs se trouvant en dessous). Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube-siphon, ce qui provoque alors le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites, et le solvant contenu dans le ballon, s'enrichit donc progressivement en composés solubles. Le contact entre le solvant et le produit à extraire dure pendant l'accumulation de solvant dans le réservoir où se situe la cartouche, puis quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant les substances dissoutes. Ce cycle peut être répété plusieurs fois, selon la facilité avec laquelle le produit diffuse dans le solvant.

Les extractions ont été réalisées avec un système de quatre solvants à polarité croissante :

- Hexane permettant d'extraire en général les lipides des plantes
- acétate d'éthyle permet d'extraire certains flavonoïdes et les composés les moins polaires
- dichlorométhane pour l'extraction des composés plus polaires
- et enfin le méthanol pour toutes les autres molécules



1. Agitateur magnétique
2. Ballon à col rodé
3. Retour de distillation (tube d'adduction)
4. Corps en verre
5. une cartouche en papier-filtre épais
6. Haut du tube siphon

7. Sortie du tube siphon
8. Adaptateur d'expansion
9. Condensateur
10. Entrée de l'eau de refroidissement
11. Sortie de l'eau de refroidissement.

Figure 5 : Photo de l'appareil d'extraction par solvant de type Soxhlet

Le passage au rotavapor permet d'éliminer les solvants et d'avoir des extraits bruts.

2- Calcul des rendements

La formule suivante nous a permis de calculer les rendements des extractions.

$$\text{Rdt} = (\text{EB}/\text{MS}) \times 100$$

Avec : Rdt= Rendement ; EB= Extrait brut obtenu après l'extraction ; MS = Masse de matière sèche à partir de laquelle l'extraction a été réalisée.

VI- FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM) ET IDENTIFICATION DES FRACTIONS ACTIVES

Cette méthode permet d'isoler et de caractériser la ou les molécules responsables de l'activité des différents extraits.

1- Principe de la chromatographie sur couche mince

La CCM est une méthode à la fois physico-chimique et analytique qui permet de séparer les différents constituants d'un extrait.

Dans la CCM, l'adsorbant est constitué d'une couche mince et uniforme, environ 0,25 mm d'épaisseur, appliquée sur un support approprié comme une plaque de verre ou une feuille d'aluminium ou de plastique. Dans notre cas, nous avons utilisé la feuille d'aluminium.

On laisse la phase mobile se propager à la surface de la plaque par capillarité. Au cours du processus chromatographique, la plaque est placée dans une cuve à chromatographie en verre dans laquelle l'atmosphère est habituellement saturée de vapeur de solvants.

Comme support solide on utilise souvent un gel de silice, de l'alumine ou de la cellulose.



La CCM permet, non seulement, de vérifier l'efficacité des extractions avec plusieurs solvants, mais aussi de pouvoir identifier les différentes fractions et constituants obtenus au cours des séparations.

2- Technique

a) Solution à analyser

Nous avons dissout 20 mg de chaque extrait dans 80 µl d'acétate d'éthyle.

b) Dépôt

Les dépôts ont été faits avec une micropipette sur une plaque de CCM en aluminium. 10 µl de chaque extrait ont été déposés sur la plaque.

c) Migration

La migration se fait dans un système de solvants approprié pour chaque extrait.

Nous avons ensuite calculé pour chaque tâche le coefficient de migration ou rapport frontal (Rf):

$$R_f = \text{Distance parcourue par la substance} / \text{Distance parcourue par le solvant}$$

3- Identification des bandes actives

Après fractionnement des extraits par CCM, une culture de *M. smegmatis* est ensuite coulée sur la plaque de chromatographie puis incubée à 37°C pendant 24 h. Les zones d'inhibition obtenues sont ensuite grattées, éluées dans le solvant d'extraction correspondant et centrifugées. Le surnageant est ensuite récupéré, concentré par évaporation, puis le concentré est testé par méthode de disque pour confirmer la présence effective des molécules inhibitrices.

VII- TESTS PHYTOCHIMIQUES

Les tests phytochimiques ont porté sur la révélation et le dosage de quelques composants majeurs des extraits végétaux, pouvant être responsables des activités, tels que les tanins, les flavonoïdes, les alcaloïdes et les polyphénols totaux.

1- Tanins

Nous avons introduit dans un tube 5 ml d'extrait dilué à 5% dans le solvant d'extraction et 1ml de solution aqueuse de FeCl₃ à 1%.



Le développement d'une coloration verdâtre ou bleu noirâtre indique la présence de tanins.

2- Les flavonoïdes libres

Nous avons introduit dans un tube à essai 5 ml d'extrait à 5%, 5 ml d'alcool chlorhydrique, quelques copeaux de zinc et 1 ml d'alcool isoamylique : c'est la réaction de la Cyanidine.

L'apparition d'une coloration :

- rose orangée indique la présence de flavones
- rose violacée caractérise les flavanones
- rouge indique la présence de flavonols et de flavanonols.

3- Les alcaloïdes

Pour mettre en évidence la présence d'alcaloïdes, le réactif de Dragendorff est pulvérisé directement sur la plaque CCM. La présence d'alcaloïdes est révélée par l'apparition d'une coloration orangée vive.

4- Les polyphénols totaux

On réalise une gamme étalon en milieu aqueux avec un polyphénol témoin, en général de l'acide gallique. Pour réaliser le dosage, 100 μL de réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma, dilué 10 fois dans de l'eau ultra pure) sont ajoutés à 20 μL d'extrait dilué à 1 mg/ml. On ajoute ensuite 300 μL de Na_2CO_3 (75 g.L⁻¹). Le mélange est agité, puis incubé 5 min à 40°C, et la densité optique est mesurée à 735nm.

VIII- EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES

On a utilisé l'appareil de type Clevenger pour l'hydrodistillation des feuilles de *Cymbopogon winterianus*. Pour cette technique classique d'hydrodistillation, on introduit les feuilles de la plante dans un ballon de 1 L, puis l'ensemble est porté à ébullition pendant 2 à 3 heures. Les vapeurs chargées d'huiles traverse le réfrigérant et Les produits condensés sont récupérés dans une ampoule à décanter. L'eau et l'huile se séparent par différence de densité (Figure 6).



Figure 6 : Système de distillation en laboratoire

Le rendement en huile essentielle est calculé en se basant sur la relation suivante :

$$\text{Rdt}(\%) = \left[\frac{V}{ms} \times 100 \right]$$

Avec :

Rdt(%) : rendement en huiles essentielles (ml/100 g)

V : volume d'huiles essentielles recueilli,

ms : masse sèche

La masse sèche est déterminée grâce à l'estimation de l'humidité après séchage des échantillons (Température de séchage 104°C, pendant 24h). Le taux de l'humidité est calculé en se basant sur la relation suivante :

$$H(\%) = \left[\frac{mf - ms}{mf} \right] \times 100$$

mf et ms sont respectivement les masses des feuilles et des rameaux à l'état frais et à l'état anhydre.

IX- ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES

1- Analyse des huiles essentielles par Chromatographie en Phase Gazeuse

Les analyses chromatographiques ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse à régulation électronique de pression de type Hewlett Packard (série HP 6890), équipé d'une colonne capillaire HP-5 à 5% phényl méthyl siloxane (30 m x 0,25 mm). La détection est assurée par un détecteur à ionisation de flamme (FID) alimenté par un mélange



de gaz H₂/Air. Le gaz vecteur utilisé est l'azote avec un débit de 1,7 ml/min. l'appareil est équipé d'un injecteur PVT (Température de Vaporisation Programmée) de type split – splitless. Le mode d'injection est split (fuite : 1/50, débit : 66 ml/min). Au début de l'injection, la température est à 50°C, la fuite est fermée. La température reste constante jusqu'à l'élimination du solvant qui accompagne l'échantillon injecté. L'injecteur est porté en quelques minutes à 275°C à raison de 4°C/min avec un plateau de 5 min pour la température initiale et de 10 min pour la température finale. L'appareil est piloté par un système informatique de type "HP ChemStation", gérant le fonctionnement de l'appareil et permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques.

2- Identification des constituants des huiles essentielles

2.1 Indices Kováts

Ce système d'indice est basé sur une notion de rétention relative. Il compare la rétention d'un produit quelconque à celle d'un alcane linéaire. Ce système est applicable en chromatographie en phase gazeuse à tout composé sur toute colonne. Par définition, il attribue un indice de 800 à l'alcane linéaire en C₈ (n-octane), 1000 à l'alcane linéaire en C₁₀ (n-décane), et ce, quelles que soient la phase stationnaire, la longueur de la colonne, la température ou le débit.

Les indices de Kováts (IK) sont déterminés en injectant un mélange d'alcane de C₉ à C₂₄ dans les mêmes conditions opératoires que celles des huiles essentielles. Ils sont calculés à partir de la relation suivante :

$$Ik = \left[\frac{TR_x - TR_n}{TR_{n+1} - TR_n} + n \right] \times 100$$

Avec n nombre d'atomes de carbone de l'alcane qui sort juste avant le composé A, (n+1) nombre d'atomes de carbone de l'alcane qui sort juste après le composé A, TR_x : temps de rétention réduit du composé A, TR_n : temps de rétention réduit de l'alcane à n atomes de carbone qui sort juste avant le composé A et TR_{n+1} temps de rétention réduit de l'alcane à (n+1) atomes de carbone qui sort juste après le composé A.

La technique des indices de Kováts (IK) est largement employée pour identifier les composés habituels des huiles essentielles.

Des tables d'indices de Kováts (IK) spécifiques à chaque produit sont proposées dans la littérature. Ils ont été élaborés en utilisant des analyses sur différents types de colonnes. Ces indices de références sont comparés à ceux calculés à partir de nos échantillons.

2.2. Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

En plus des indices de Kováts, l'identification des constituants a été réalisée en se basant sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Cette dernière est réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse de type Hewlett-Packard (série HP 6890) couplé avec un spectromètre de masse (série HP 5973). La fragmentation est effectuée par impact électronique sous un champ de 70 eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire HP-5MS (30 m x 0,25 mm), l'épaisseur du film est de 0,25 μm . La température de la colonne est programmée de 50 à 250°C à raison de 4°C/min. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1,5 ml/min. Le mode d'injection est split (rapport de fuite : 1/70, débit 112 ml/min). L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectres de masse NIST 98.



Figure 7 : Photo des appareils chromatographiques utilisés au cours de cette étude



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
Faculté des Sciences et Techniques



PARTIE III-

RESULTATS ET DISCUSSION

I- PREPARATION DES EXTRAITS

1- Préparation de l'huile essentielle de *Cymbopogon winterianus*

L'hydrodistillation de 150 g des feuilles de la citronnelle (*Cymbopogon winterianus*) a permis d'obtenir 2,7 ml d'huile essentielle, soit un rendement moyen de 1,8%. L'huile essentielle obtenue présente les propriétés organoleptiques suivantes :

- ✓ Aspect : liquide mobile
- ✓ Couleur : transparente à jaune pâle
- ✓ Odeur : citronnée et caractéristique de la citronnelle

1.1- Composition chimique de l'huile essentielle de *Cymbopogon winterianus*

Les résultats de l'analyse chimique des huiles essentielles, obtenues par Chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par couplage de chromatographie à phase gazeuse et de spectrométrie de masse (GC-MS), sont représentés dans le tableau 2 et la figure 8. Les constituants de l'huile essentielle analysée sont : les monoterpènes, les phénols, les sesquiterpénols, les monoterpénols, les esters, les aldéhydes terpéniques et les sesquiterpènes.

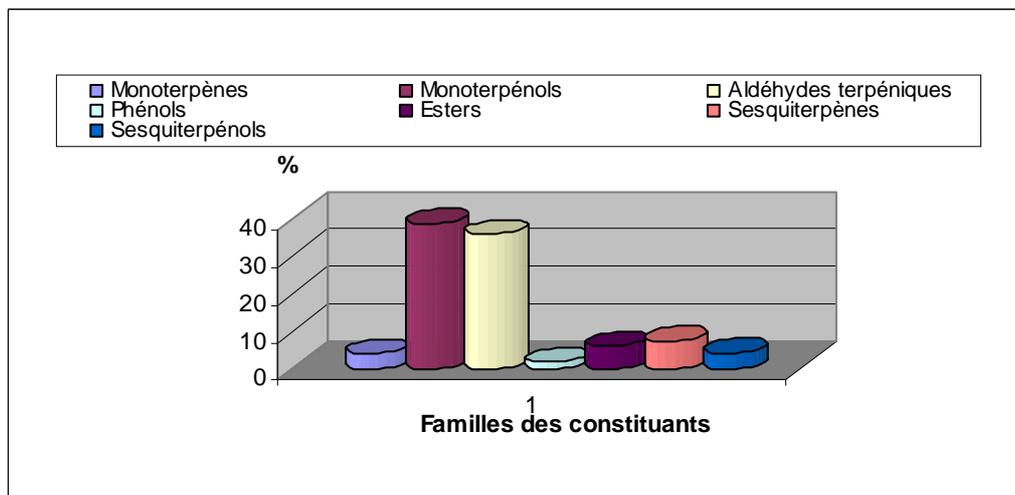


Figure 8 : Familles chimiques de l'huile essentielle de *Cymbopogon winterianus*

Les résultats de la composition chimique ont montré que l'huile essentielle de *Cymbopogon winterianus* est majoritairement constituée de citronnellol (9,67%), de géraniol (26,13%) et de citronellal (34,77%). Ces constituants constituent 70,57% de la totalité de notre produit. D'autres constituants ont été détectés avec des taux relativement importants tels que le limonène (3,21%), l'acétate de citronellyl (3,08%) et l'acétate de géranyl (2,87%).

Tableau 3 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Cymbopogon winterianus*

Indices de Kovàts	Constituants	Pourcentages
	Monoterpènes	3,97
930	Tricyclène	0,04
936	α -thujène	0,09
940	α -pinène	0,22
975	β -pinène	0,09
991	β -myrcène	0,32
1023	limonène	3,21
	Monoterpénols	38,62
1098	Linalol	0,92
1146	Isopulégol	0,81
1165	Bornéol	0,12
1171	Terpinèn-4-ol	0,43
1192	α -terpinéol	0,54
1228	Citronellol	9,67
1255	Géraniol	26,13
	Aldéhydes terpéniques	35,59
1153	Citronellal	34,77
1240	Néral	0,44
1270	Géranial	0,38
	Phénols	1,72
1298	Carvacrol	0,13
1356	Eugénol	1,59
	Esters	5,95
1354	acétate de citronellyl	3,08
1383	acétate de géranyl	2,87
	Sesquiterpènes	7,31
1391	β -élémente	2,30
1480	Germacrène D	1,86
1513	γ -cadinène	0,32
1524	δ -cadinène	2,83
	Sesquiterpénols	4,34
1549	Elémol	2,92
1649	β -eudesmol	0,34
1653	α -cadinol	1,08
	Total	95,78

La composition chimique de notre échantillon est très complexe (figure 8). Les familles chimiques les plus abondantes sont les monoterpénols et les aldéhydes terpéniques avec des pourcentages respectifs de 38,62% et 35,59%. Les autres familles sont moins représentées (Figure 8, tableau 2).

Les résultats de la composition chimique de notre huile essentielle sont en accord avec ceux de la bibliographie ; cependant on note des petites variations quantitatives (Marco et al. 2007, Rocha et al. 2000, Quintans-Junior et al. 2008). Ces variations peuvent être liées aux

conditions climatiques et édaphiques de chaque région, ainsi qu'aux conditions de culture et la période de récolte.

2- Préparation des extraits de *Acanthospermum hispidum*

109 g de feuilles de *Acanthospermum hispidum* ont été traitées avec différents solvants par soxhlet. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Rendements des extractions par différents solvants

Rendement en extraits			
Hexane	Acétate d'éthyle	dichlorométhane	méthanol
2,87%	6,42%	0,14%	2,6%

On peut noter que le meilleur rendement est obtenu avec l'acétate d'éthyle, avec un pourcentage de 6,42%. Ceci peut être attribué au fait que la grande majorité des composés de cette plante sont solubles dans l'acétate d'éthyle.

3- Préparation des extraits de *Fagara zanthoxyloides*

100 g de poudres des écorces de racines, de *Fagara zanthoxyloides*, ont été traités par différents solvants. Les rendements obtenus sont regroupés dans le tableau 4 suivant :

Tableau 5 : Rendements des extractions par différents solvants

Rendements			
Hexane	Acétate d'éthyle	dichlorométhane	méthanol
2,45%	2,39%	0,74%	2,5%

Pour cette plante, tous les solvants ont donné un rendement presque similaire, sauf le dichlorométhane qui a donné un faible rendement. Ceci suggère que les molécules extractibles sont très peu solubles dans le dichlorométhane, comparativement aux autres solvants utilisés.

4- Préparation de l'extrait de *Nauclea latifolia*

L'extraction par ultrasons de 100 g des racines de *Nauclea latifolia*, en utilisant le méthanol comme solvant, a donné un extrait solide, d'aspect jaunâtre, avec un rendement de 3,96%.

II- ETUDE DU POUVOIR ANTIMYCOBACTERIEN DES EXTRAITS DES PLANTES

Les différents extraits (hexane, acétate d'éthyle, dichlorométhane et méthanol) ont été testés sur les deux souches de mycobactéries, à raison d'un dépôt d'une préparation de 20 µl par disque.

Un test témoin, constitué par le dépôt de 20 µl du solvant, permet de comparer l'effet de chaque extrait sur les mycobactéries.

1- *Acanthospermum hispidum*

Les résultats de l'activité des extraits de *Acanthospermum hispidum* sur les souches bactériennes sont montrés dans le tableau 5 suivant :

Tableau 6 : Effet des extraits de *Acanthospermum hispidum* sur les souches mycobactériennes

Diamètre d'inhibition (cm)	Extraits			
	Hexane	Acétate d'éthyle	Dichlorométhane	Méthanol
<i>M. smegmatis</i>	0,1	2,5	0,5	0,4
Témoin	0,2	0,1	0,4	0,5
<i>M. aurum</i>	0	2,7	2,4	0,4
Témoin	0	0,7	0,1	0,5

L'extrait à l'acétate d'éthyle a donné le meilleur résultat avec une zone d'inhibition moyenne de 2,5 cm pour *M. smegmatis* et de 2,7 cm pour *M. aurum*. Ceci montre que les molécules responsables de l'activité sont plus extractibles par l'acétate d'éthyle que par les autres solvants. L'extrait à l'acétate de cette plante a donc été retenu pour la suite des tests.

2- *Fagara zanthoxyloïdes*

Les extraits de *Fagara zanthoxyloïdes*, ont été testés comme précédemment sur *M. smegmatis* et *M. aurum*. Les résultats de ces tests sont montrés dans le tableau 6 :

Tableau 7 : Effet des extraits de *Fagara zanthoxyloïdes* sur les souches mycobactériennes

Diamètre d'inhibition (cm)	Extraits			
	Hexane	Acétate d'éthyle	Dichlorométhane	Méthanol
<i>M. smegmatis</i>	1,3	3,0	2,6	2,0
Témoin	0,6	0,6	0,5	0,5
<i>M. aurum</i>	1,5	3,5	3,8	2,7
Témoin	0,1	0,5	0,5	0,5

Tous les extraits de cette plante se sont révélés actifs sur les mycobactéries. Néanmoins, comme précédemment, l'extrait à l'acétate d'éthyle fut celui qui a donné la plus grande zone d'inhibition allant d'un diamètre de 3 cm pour *M. smegmatis* jusqu'à 3,8 cm pour *M. aurum*. Ainsi, pour la suite de nos tests, nous avons utilisé l'extrait à l'acétate pour le fractionnement par CCM et l'étude phytochimique.

3- *Cymbopogon winterianus*

L'huile essentielle de cette plante, obtenue par hydrodistillation de la matière sèche, a été testée comme précédemment sur *M. smegmatis* et *M. aurum*. A une concentration de 20 μ l par disque et par boîte de culture, cette huile s'est révélée capable d'inhiber totalement la croissance des mycobactéries.

Nous avons ensuite déterminé l'effet de la variation de la quantité de cette huile essentielle sur la croissance des mycobactéries. Les résultats sont montrés dans la figure 9 :

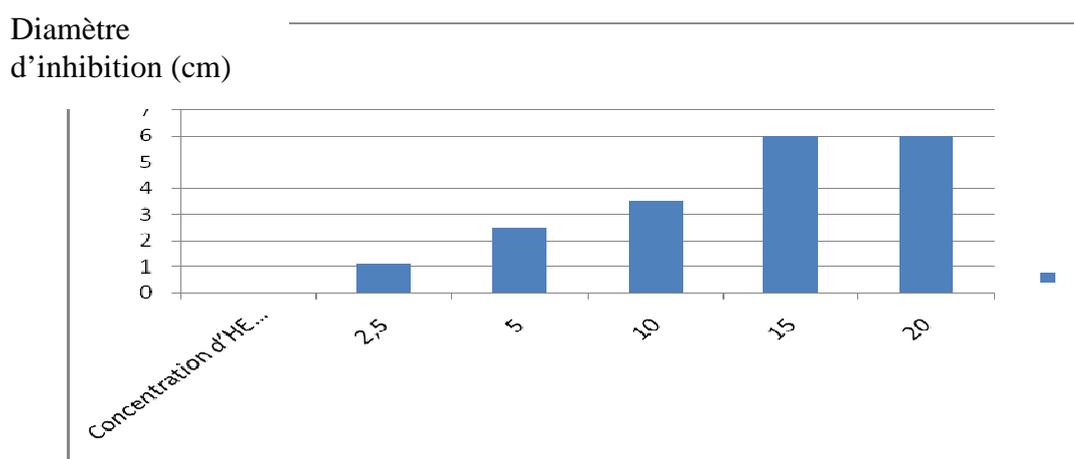


Figure 9 : Effet de la variation de la quantité d'huile essentielle de *Cymbopogon winterianus* sur la croissance de *M. smegmatis*

A un volume déposé de 2,5 μ l, l'huile essentielle de cette plante a donné un effet inhibiteur avec un diamètre d'inhibition de 1,1 cm, tandis que les volumes de 5 μ l et 10 μ l ont

donné des diamètres respectifs de 2,5 cm et 3,5 cm. Les volumes de 15 et 20 µl inhibent totalement la croissance des mycobactéries. Cette activité peut être liée à la composition chimique de l'huile essentielle riche en phénols et monoterpénols, connus pour leurs activités antimicrobiennes.

4- *Nauclea latifolia*

L'extrait de *Nauclea latifolia* a été obtenu par sonication, en utilisant le méthanol comme solvant d'extraction. L'extrait solide obtenu n'a eu aucun effet sur les mycobactéries. Ceci suggère que la sonication ne serait pas idéale pour extraire les molécules actives de cette plante ou que l'extrait de cette plante n'est pas actif sur les mycobactéries.

III- FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS

En se basant sur les résultats des expériences précédentes, les extraits à l'acétate de *Acanthospermum hispidum* et de *Fagara zanthoxyloides* ont été retenus sur la base de leur effet plus important dans l'inhibition de la croissance des mycobactéries. Ces extraits ont été fractionnés par chromatographie afin d'isoler les composés actifs.

1- *Acanthospermum hispidum*

Plusieurs systèmes de solvants de séparation ont été testés pour le fractionnement de l'extrait de *Acanthospermum hispidum*. Les résultats de ces tests sont décrits dans le tableau 7 qui suit :

Tableau 8 : Résultats des différents systèmes de fractionnement

Système de fractionnement	Hexane-Acétate d'éthyle (3 :7)	Hexane-Acétate d'éthyle (4 :6)	Hexane-Acétate d'éthyle (5 :5)	Butanol-Acétate-Eau (60-15-25)	Hexane-Acétate d'éthyle (7 :3)
Résultat	-	-	-	-	+

+ : Fractionnement ; - : Absence de fractionnement

Le système de solvant Hexane-Acétate (7 : 3) fut celui qui a donné le meilleur fractionnement. Les résultats, obtenus après avoir coulé le milieu de culture sur la plaque, montrent qu'effectivement il y'a possibilité de séparer les constituants de la plante en plusieurs fractions actives.

Ces différentes fractions ont été grattées, concentrées comme décrit précédemment et déposées sur disque. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 8 suivant :

Tableau 9 : Evaluation de l'effet après fractionnement de

Acanthospermum hispidum sur *M. smegmatis*

Fractions	Rf	Diamètre d'inhibition (cm) après purification
AH1	0,19	1,5
AH5	0,57	2,5
AH 7	0,80	0

Le système de séparation Hexane-Acétate (7 :3) a permis d'obtenir deux fractions actives AH1 et AH5, de Rf respectifs 0,19 et 0,57. La bande AH5 est celle qui a donné le meilleur résultat avec un diamètre d'inhibition de 2,5 cm sur *M. smegmatis*. La fraction AH7, prise comme témoin, est inactive sur les mycobactéries.

2- *Fagara zanthoxyloïdes*

L'extrait à l'acétate d'éthyle de *Fagara zanthoxyloïdes* a été également séparé par chromatographie sur couche mince. Les résultats sont représentés dans le tableau 9 suivant :

Tableau 10 : Résultats des différents systèmes de fractionnement

Système de fractionnement	Hexane-Acétate d'éthyle (3 :7)	Hexane-Acétate d'éthyle (4 :6)	Hexane-Acétate d'éthyle (5 :5)	Chloroforme-Méthanol (5 :1)	Hexane-Acétate d'éthyle (7 :3)
Résultat	-	-	-	+	-

+ : Fractionnement ; - : Absence de fractionnement

Le système Chloroforme : méthanol (5 :1), a permis d'obtenir plusieurs bandes bien séparées. Ces fractions ont été isolées, purifiées puis déposées sur disque pour tester leur effet antimycobactérien. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 10 suivant :

Tableau 11 : Effet des fractions purifiées de *Fagara zanthoxyloïdes* sur *M. smegmatis*

Fractions	Rf	Diamètre d'inhibition (cm)
FX2	0,52	2,5
FX3	0,65	2,3
FX5	0,34	0

Parmi les fractions obtenues, deux étaient actives sur les mycobactéries. Les autres fractions purifiées et déposées sur disque n'ont eu aucun effet sur la croissance de ces bactéries. Ces résultats suggèrent que les molécules bioactives de cette plante sont concentrées au niveau des deux bandes FX2 et FX3 de Rf respectifs 0,52 et 0,65. La bande FX5, utilisée comme témoin, est non active.

IV- RESULTATS DES TESTS PHYTOCHIMIQUES

Après le fractionnement des extraits et l'isolement des bandes actives, des tests phytochimiques ont été réalisés.

1- Acanthospermum hispidum

Le tableau 11 suivant montre les résultats des différents tests phytochimiques.

Tableau 12 : Tests de révélation phytochimique réalisés sur l'extrait de *Acanthospermum hispidum*

Extrait	Flavonoïdes	Tanins	Alcaloïdes	Polyphénols totaux
Brut	+	+	-	+
AH1	+	NR	NR	NR
AH5	-	NR	NR	NR

NR : Non Réalisé ; + : Présence du produit ; - : Absence du produit

Au niveau de l'extrait brut de *Acanthospermum hispidum*, nous avons révélé la présence de flavonoïdes (les flavonones), de tanins et de polyphénols. Par contre, cet extrait ne contient pas d'alcaloïdes

La fraction AH1 est constituée de flavonoïdes, ce qui suggère que l'effet antimycobactérien de cette fraction est dû aux flavonoïdes.

La fraction AH5 est dépourvue de flavonoïdes, ce qui montre que cette fraction agit sur les mycobactéries par d'autres types de molécules.

2- Fagara zanthoxyloïdes

Le tableau 12 suivant montre les résultats des tests phytochimiques effectués sur l'extrait à l'acétate d'éthyle de *Fagara zanthoxyloïdes*.

Tableau 13 : Tests phytochimiques effectués sur l'extrait de *Fagara zanthoxyloïdes*

Extrait	Flavonoïdes	Tanins	Alcaloïdes	Polyphénols totaux
----------------	--------------------	---------------	-------------------	---------------------------

Brut	+	+	+	+
FX2	-	-	+	+
FX3	-	-	-	+

NR : Non Réalisé ; + : Présence du produit ; - : Absence du produit

Au niveau de l'extrait brut de *Fagara zanthoxyloïdes*, les tests se sont révélés positifs pour l'ensemble des composés testés (flavonoïdes, tanins, alcaloïdes et polyphénols).

L'extrait purifié FX2 de *Fagara zanthoxyloïdes* contient les alcaloïdes et les polyphénols totaux, ce qui suggère que l'activité antimycobactérienne de cette fraction est due à l'un ou à l'ensemble de ces deux produits.

Pour la fraction FX3, l'effet antimycobactérien observé serait dû aux polyphénols totaux.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Malgré les avancées dans la détection et la prise en charge de la tuberculose, cette maladie reste à l'heure actuelle un problème de santé majeur dans de nombreux pays. L'avènement du Syndrome de l'Immunodéficience Acquisée (SIDA) a rendu la lutte contre cette maladie encore plus difficile. De plus, le développement de la résistance des souches bactériennes vis-à-vis des différentes thérapies rend la tâche vraiment difficile dans la lutte contre la tuberculose.

La recherche de nouvelles molécules actives contre les souches de *M. tuberculosis* est un impératif de santé publique, que l'Organisation mondiale de la Santé prône au travers de plusieurs de ses actions.

Ce travail a pour perspective d'isoler et de caractériser de nouvelles cibles thérapeutiques contre les mycobactéries pathogènes. Les plantes représentent un matériel de choix dans la découverte de nouveaux médicaments contre les mycobactéries car elles sont généralement un réservoir naturel de molécules pouvant avoir des effets thérapeutiques très intéressants. Notre étude a porté sur quatre plantes provenant de la sous-région sub-saharienne, dont certaines sont déjà connues pour leur activité sur diverses bactéries pathogènes, autres que les mycobactéries. Les plantes étudiées sont : *Acanthospermum hispidum*, *Fagara zanthoxyloïdes*, *Cymbopogon winterianus* et *Nauclea latifolia*.

Les extraits de ces plantes ont été testés par la méthode de disque sur *M. smegmatis* et *M. aurum*, deux souches de mycobactéries partageant beaucoup d'homologie avec *M. tuberculosis* et les autres mycobactéries pathogènes. Par ailleurs, les extraits de *Acanthospermum hispidum* et de *Fagara zanthoxyloïdes*, obtenus par extraction par solvant au



soxhlet, se sont révélés capables d'inhiber la croissance des mycobactéries. L'extrait de *Nauclea latifolia*, obtenu par sonication, n'a eu aucun effet sur les mycobactéries testées, montrant que cette plante est dépourvue d'activité ou que cette méthode ne permet pas l'extraction des molécules actives. Enfin l'huile essentielle de *Cymbopogon winterianus*, obtenue par distillation des feuilles de cette plante, s'est également révélée très efficace contre les mycobactéries.

Les extraits à l'acétate de *Acanthospermum hispidum* et de *Fagara zanthoxyloïdes* ont ensuite subi un fractionnement par chromatographie sur couche mince (CCM), ce qui nous a permis d'isoler, pour chacun des deux extraits, deux fractions actives. Des tests phytochimiques ultérieures ont permis de mettre en évidence au niveau de ces fractions les composés suivants : des flavonoïdes, des alcaloïdes et d'autres composés de la famille des polyphénols totaux.

En perspective, nous espérons :

- Etudier la toxicité des fractions purifiées
- Caractériser les molécules actives responsables de l'activité antimycobactérienne observée (RMN...)
- Etudier l'effet des extraits actifs de ces plantes sur des macrophages infectés par les mycobactéries



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ **Adjanooun E.J. , Adjakidjè , Ahji M.R.A., Ake Assi L., Akoegninou A. , d'Almeido J., Apovo F. , Boukef K., Chadare M., Cusset G., Dramane K., Eyme J., Gassita JN., Gbaguidi N., Goudote ED., Mussampa Nseyya A., Saadou M., Sodogaudjth S., De Souza , Tchabi A. , Zinsou Doussa C., Zohoun Th. (1989):** Médecine Traditionnelle et Pharmacopée .Contribution aux études ethnobotaniques et floristiques en République populaire du Bénin. ACCT Paris, 895p.
- ❖ **Ainsa, J. A., E. Perez, V. Pelicic, F. X. Berthet, B. Gicquel & C. Martin, (1997)** Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase genes are universally present in mycobacteria: characterization of the *aac(2')-Ic* gene from *Mycobacterium tuberculosis* and the *aac(2')-Id* gene from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **24**: 431-441.
- ❖ **Al-Orainey, I. O., (2009)** Diagnosis of latent tuberculosis: Can we do better? *Ann Thorac Med* **4**: 5-9.
- ❖ **Baydur, A., (1977)** The spectrum of extrapulmonary tuberculosis. *West J Med* **126**: 253-262.
- ❖ **Bifani, P. J., B. B. Plikaytis, V. Kapur, K. Stockbauer, X. Pan, M. L. Lutfey, S. L Moghazeh, W. Eisner, T. M. Daniel, M. H. Kaplan, J. T. Crawford, J. M. Musser & B. N. Kreiswirth, (1996)** Origin and interstate spread of a New York City multidrugresistant *Mycobacterium tuberculosis* clone family. *JAMA* **275**: 452-457.
- ❖ **B.M. Lawrence, 1980** Essential oils. Perfumer and flavorist,.
- ❖ **Bocchino, M., B. Bellofiore, A. Matarese, D. Galati & A. Sanduzzi, (2009)** IFN-gamma release assays in tuberculosis management in selected high-risk populations. *Expert Rev Mol Diagn* **9**: 165-177.
- ❖ **Bouvet, E., D. Abiteboul, F. Antoun, Z. Bessa, C. Billy, B. Dautzenberg, B. Decludt, J. Gaudelus, V. Jarlier, S. Lerasle, O. Siruguet & V. Vincent, (2003)** Synthèse et recommandations du groupe de travail du conseil supérieur d'hygiène publique de France Prévention et prise en charge de la tuberculose en France. *Maladies respiratoires* **20**.
- ❖ **Bradford, W. Z., J. N. Martin, A. L. Reingold, G. F. Schecter, P. C. Hopewell & P. M. Small, (1996)** The changing epidemiology of acquired drug-resistant tuberculosis in San Francisco, USA. *Lancet* **348**: 928-931.
- ❖ **Bull. Soc. Pharma. Bordeaux 2007** 146, 271-288



❖ Burgos, M., K. DeRiemer, P. M. Small, P. C. Hopewell & C. L.

Daley, (2003) Effect of drug resistance on the generation of secondary cases of tuberculosis. *J Infect Dis* **188**: 1878-1884.

- ❖ **Burkill (1985)** The Useful Plants of West Tropical Africa – **Vol 1, Families A-D** – Ed Royal Botanic Gardens, 960p.
- ❖ **Burkill, H.M., (1997)** The Useful Plants of West Tropical Africa. Vol. 4, Whitefriars Press Ltd., Great Britain,.
- ❖ **Cambau, E., N. Lemaitre, W. Sougakoff & V. Jarlier, (2003)** Résistance aux antituberculeux. *Antibiotiques* **5**: 29-37.
- ❖ **Canetti, G. & J. Grosset, (1961)** Teneur des souches sauvages de *Mycobacterium tuberculosis* en variants résistants à l'isoniazide et en variants résistant à la streptomycine sur milieu de Loewenstein-Jensen. . *Ann Inst Pasteur* **101:28**.
- ❖ **CDC, (2006)** Revised definition of extensively drug-resistant tuberculosis. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)* **55:1176**.
- ❖ **Chan, E. D., V. Laurel, M. J. Strand, J. F. Chan, M. L. Huynh, M. Goble & M. D. Iseman, (2004)** Treatment and outcome analysis of 205 patients with multidrug-resistant tuberculosis *Am J Respir Crit Care Med* **169**: 1103-1109.
- ❖ **Chan, E. D. & M. D. Iseman, (2008)** Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a review. *Curr Opin Infect Dis* **21**: 587-595.
- ❖ **Chen, M.C. Kuo, C.M. Wu, C.T. Ho, (1986)** Pungent compounds of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracted by liquid carbone dioxide, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 34, 322-328,.
- ❖ **Cohn, D. L., (2003)** Treatment of latent tuberculosis infection. *Semin Respir Infect* **18**: 249- 262.
- ❖ **Colangeli, R., D. Helb, S. Sridharan, J. Sun, M. Varma-Basil, M. H. Hazbon, R. Harbacheuski, N. J. Megjugorac, W. R. Jacobs, Jr., A. Holzenburg, J. C. Sacchettini & D. Alland, (2005)** The *Mycobacterium tuberculosis iniA* gene is essential for activity of an efflux pump that confers drug tolerance to both isoniazid and ethambutol. *Mol Microbiol* **55**: 1829-1840.
- ❖ **Council, E. A. B. M. R., (1972)** Controlled clinical trial of short-course (6-months) regimens of chemotherapy for treatment of pulmonary tuberculosis. *Lancet* **1**: 1079-1085.



❖ Crofton, J., P. Chaulet, D. Maher, J. Grosset, W. Harris, N.

Horne, M. Iseman & B. Watt, (1997) Guidelines for the management of drug-resistant tuberculosis. *WHO/TB/96.210*.

- ❖ D.A. Moyler, (1993) Extraction of essential oil with carbon dioxide, *Flavour and Fragrance Journal*, 8 235-247,.
- ❖ David, H. L., (1971) Resistance to D-cycloserine in the tubercle bacilli: mutation rate and transport of alanine in parental cells and drug-resistant mutants. *Appl Microbiol* 21: 888-892.
- ❖ Davies, J., (1998) Antibiotic resistance in mycobacteria. In: *Genetics and Tuberculosis*. D. J. Chadwick & G. Cardew (eds). Chichester: John Wiley, pp. 195-208.
- ❖ Dokosi (1998) *Herbs of Ghana*; Ghanana universities press, Accra.
- ❖ Dye, C., S. Scheele, P. Dolin, V. Pathania & M. C. Raviglione, (1999) Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA* 282: 677-686.
- ❖ Euzéby Jean Paul, (2006) *Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale*
- ❖ Espinal, M. A., A. Laszlo, L. Simonsen, F. Boulahbal, S. J. Kim, A. Reniero, S. Hoffner, H. L. Rieder, N. Binkin, C. Dye, R. Williams & M. C. Raviglione, (2001) Global trends in resistance to antituberculosis drugs. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *N Engl J Med* 344: 1294-1303.
- ❖ FARES, (2006a) Guide théorique à l'intention des intervenants. http://www.fares.be/documents/guide_theorique2006.pdf.
- ❖ Frothingham, R., J. E. Stout & C. D. Hamilton, (2005) Current issues in global tuberculosis control. *Int J Infect Dis* 9: 297-311.
- ❖ Golden, M. P. & H. R. Vikram, (2005) Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *Am Fam Physician* 72: 1761-1768.
- ❖ Goldman, R. C., K. V. Plumley & B. E. Laughon, (2007) The evolution of extensively drug resistant tuberculosis (XDR-TB): history, status and issues for global control. *Infect Disord Drug Targets* 7: 73-91.
- ❖ Hadj, M., A. Fissah & S. Nafti, (2006) Les nouveaux tests de diagnostic de la tuberculose. *Rev Mal Respir* 23: 10S85-10S87.



- ❖ **Halimatou DIOP, Souleymane MBOUP, (1999)** Identification et sensibilité des souches de mycobactéries isolées au laboratoire de bactériologie-virologie du CHU Aristide le Dantec de Dakar
- ❖ **Heifets, L. & E. Desmond, (2005)** Clinical mycobacteriology (tuberculosis) laboratory: services and methods. In: Tuberculosis and the Tubercule Bacillus. S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray & W. R. Jacobs (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 49-69.
- ❖ **Herbert, D., C. N. Paramasivan, P. Venkatesan, G. Kubendiran, R. Prabhakar & D. A. Mitchison, (1996)** Bactericidal action of ofloxacin, sulbactam-ampicillin, rifampin, and isoniazid on logarithmic- and stationary-phase cultures of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 2296-2299.
- ❖ **Hopewell, P. C. & R. M. Jasmer, (2005)** Overview of clinical tuberculosis. In: Tuberculosis and the tubercle bacillus. S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray & W. R. Jacobs (eds) Washington, D.C.: ASM Press, pp. 15-31.
- ❖ **Inderlieds, C. & K. Nash, (2005)** Antimycobacterial agents: in vitro susceptibility testing and mechanisms of action and resistance. In: Antibiotics in laboratory medicine. V. Lorian (ed) pp. 155-225.
- ❖ **Iseman, M. D. & L. A. Madsen, (1989)** Drug-resistant tuberculosis. *Clin Chest Med* **10**: 341-353.
- ❖ **Iserin Paul, (2001)** Larousse des plantes médicinales et aromatiques
- ❖ **Jain, A. & P. Dixit, (2008)** Multidrug-resistant to extensively drug resistant tuberculosis: what is next? *J Biosci* **33**: 605-616.
- ❖ **Jarlier, V. & H. Nikaido, (1994)** Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* **123**: 11-18.
- ❖ **Jassal, M. & W. R. Bishai, (2009)** Extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis* **9**: 19-30.
- ❖ **J.Crouzet, (2004)** Arômes alimentaires. Techniques de l'ingénieur, F 4 100.
- ❖ **Jonsson, B. E., M. Gilljam, A. Lindblad, M. Ridell, A. E. Wold & C. Welinder-Olsson, (2007)** Molecular epidemiology of *Mycobacterium abscessus*, with focus on cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **45**: 1497-1504.
- ❖ **Kaufmann, S. H., (2002)** Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages *Ann Rheum Dis* **61 Suppl 2**: ii54-58.

- ❖ **Kaufmann, S. H., (2001)** How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol* **1**: 20-30.
- ❖ **Kerharo J. et Adams J.G. (1974)** : La pharmacopée sénégalaise traditionnelle : plante médicinales et toxiques. Edition Vigot et Frères, Paris, 1011p.
- ❖ **Kim, S. J., (2005)** Drug-susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results. *Eur Respir J* **25**: 564-569.
- ❖ **Kim, S. J., (2005)** Drug-susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results. *Eur Respir J* **25**: 564-569.
- ❖ **Kirihara, J. M., S. L. Hillier & M. B. Coyle, (1985)** Improved detection times for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* with the BACTEC radiometric system. *J Clin Microbiol* **22**: 841-845.
- ❖ **Lalvani, A., (2007)** Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: new tools to tackle an old enemy. *Chest* **131**: 1898-1906.
- ❖ **Landry, J. & D. Menzies, (2008)** Preventive chemotherapy. Where has it got us? Where to go next? *Int J Tuberc Lung Dis* **12**: 1352-1364.
- ❖ **LoBue, P., (2009)** Extensively drug-resistant tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis* **22**: 167-173.
- ❖ **Mahmoudi, A. & M. D. Iseman, (1993)** Pitfalls in the care of patients with tuberculosis. Common errors and their association with the acquisition of drug resistance. *JAMA* **270**: 6 68.
- ❖ **Malgras D. (1992)**. Arbres et arbustes guérisseurs des savanes maliennes. Karthala ed. et ACCT, Paris, 478.
- ❖ **Marco, C.A., Innecco, R., Mattos, S.H., Borges, N.S.S., Nagao, E.O., 2007**. Essential oi characteristics from citronella grass depending on planting space, cutting height an harvestin time. *Horticultura Brasileira* **25**, 429–432.
- ❖ **Mc Dermott, W., (1947)** Streptomycin in the treatment of tuberculosis in humans; pulmonary tuberculosis. *Ann Intern Med* **27**: 989-1027.
- ❖ **Mengal et B. Mompon, (1994)** Procédé et installation d'extraction sans solvant de produits naturels par micro-ondes. Brevet international, WO 94/26853,.
- ❖ **Mitchison, D. A. & J. B. Selkon, (1956)** The bactericidal activities of antituberculous drugs. *Am Rev Tuberc* **74**: 109-116; discussion, 116-123.
- ❖ **Murray, C. J. & J. A. Salomon, (1998)** Modeling the impact of global tuberculosis control strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13881-13886.



- ❖ **M. Vinatoru, (2001)** An overview of ultrasonically assisted extraction of bioactive principle from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 303-313.
- ❖ **Nathanson, E., R. Gupta, P. Huamani, V. Leimane, A. D. Pasechnikov, T. E. Tupasi, K. Vink, E. Jaramillo & M. A. Espinal, (2004)** Adverse events in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: results from the DOTS-Plus initiative. *Int J Tuberc Lung Dis* 8: 1382-1384.
- ❖ **Nava-Aguilera, E., N. Andersson, E. Harris, S. Mitchell, C. Hamel, B. Shea, Y. Lopez Vidal, A. Villegas-Arrizon & A. Morales-Perez, (2009)** Risk factors associated with recent transmission of tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 13: 17-26.
- ❖ **Nikaido, H., S. H. Kim & E. Y. Rosenberg, (1993)** Physical organization of lipids in the cell wall of *Mycobacterium chelonae*. *Mol Microbiol* 8: 1025-1030.
- ❖ **Ojha, A. K., A. D. Baughn, D. Sambandan, T. Hsu, X. Trivelli, Y. Guerardel, A. Alahari L. Kremer, W. R. Jacobs, Jr. & G. F. Hatfull, (2008)** Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol Microbiol* 69: 164-174.
- ❖ **Organisation mondiale de la Santé, Plan mondial Halte à la tuberculose 2006–2015**
- ❖ **Pallaroni, C. Von Holst, (2003)** Determination of zearalenone from wheat and corn by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 993, 39-45.
- ❖ **Palomino, J. C., S. C. Leao & V. Ritacco, (2007)** Tuberculosis 2007: from basic science to patient care. <http://www.tuberculosisistextbook.com/>.
- ❖ **Peyron, P., J. Vaubourgeix, Y. Poquet, F. Levillain, C. Botanch, F. Bardou, M. Daffe, J. F. Emile, B. Marchou, P. J. Cardona, C. de Chastellier & F. Altare, (2008)** Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog* 4: e1000204.
- ❖ **Pheiffer, C., N. M. Carroll, N. Beyers, P. Donald, K. Duncan, P. Uys & P. van Helden, (2008)** Time to detection of *Mycobacterium tuberculosis* in BACTEC systems as a viable alternative to colony counting. *Int J Tuberc Lung Dis* 12: 792-798.
- ❖ **Popp, P. Keil, M. Möder, A. Paschke, (1997)** U. Thuss, Application of accelerated solvent extraction followed by gas chromatography, highperformance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of



polycyclic aromatic hydrocarbons, chlorinated pesticides and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in solid wastes. *Journal of Chromatography A*, 774, 203-211,

- ❖ **Quintans-Junior, L.J.; Souza, T.T.; Leite, B.S.; Lessa, N.M.N.; Bonjardim, L.R.; Santos, M.R.V.; Alves, P.B.; Blank, A.F.; Antonioli, A.R. 2008.** Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil i rodents. *Phytomedicine*, 15, 619-624.
- ❖ **Rabarijaona, L., P. Boisier, O. Ratsirahonana, J. Razafinimanana, F. Rakotomanana, M.**
- ❖ **Ratsitorahina, H. Ramarokoto, B. Cauchoix & G. Auregan, (1999)** Replacement of streptomycin by ethambutol in the intensive phase of tuberculosis treatment: no effect o compliance. *Int J Tuberc Lung Dis* 3: 42-46.
- ❖ **Rajbhandary, S. S., S. M. Marks & N. N. Bock, (2004)** Costs of patients hospitalized for multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 8: 1012-1016.
- ❖ **Ramaswamy, S. & J. M. Musser, (1998)** Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis* 79: 3-29.
- ❖ **Richeldi, L., (2006)** An update on the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 174: 736-742.
- ❖ **Rocha, S.F.R., Ming, L.C., Marques, M.O.M., 2000.** The influence of drying temperature o the yield composition of citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) essential oil. *Revist Brasileira Plantas Medicinai*s 3, 73–78.
- ❖ **Saltini, C., (2006)** Chemotherapy and diagnosis of tuberculosis. *Respir Med* 100: 2085-2097.
- ❖ **Shah, N. S., A. Wright, G. H. Bai, L. Barrera, F. Boulahbal, N. Martin-Casabona, F. Drobniowski, C. Gilpin, M. Havelkova, R. Lepe, R. Lumb, B. Metchock, F. Portaels, M. F. Rodrigues, S. Rusch-Gerdes, A. Van Deun, V. Vincent, K. Laserson, C. Wells & J. P. Cegielski, (2007)** Worldwide emergence of extensively drug-resistant tuberculosis. *Emerg Infect Dis* 13: 380-387.
- ❖ **Smith, I., (2003)** *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* 16: 463-496.



- ❖ Somoskovi, A., L. M. Parsons & M. Salfinger, (2001) The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res* **2**: 164-168.
- ❖ Takiff, H. E., M. Cimino, M. C. Musso, T. Weisbrod, R. Martinez, M. B. Delgado, L. Salazar, B. R. Bloom & W. R. Jacobs, Jr., (1996) Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 362-366.
- ❖ Tattevin, P., (2007) Tuberculosis treatment in 2007. *Med Mal Infect* **37**: 617-628.
- ❖ Union Africaine, Point sur la lutte contre la tuberculose en Afrique, 2006, Sp/Ex.CL/ATM/4
- ❖ Varelzdis, B. P., J. Grosset, I. de Kantor, J. Crofton, A. Laszlo, M. Felten, M. C Raviglione & A. Kochi, (1994) Drug-resistant tuberculosis: laboratory issues. World Health Organization recommendations. *Tuber Lung Dis* **75**: 1-7.
- ❖ Venskutonis, (2007) Application of Liquid Carbon Dioxide for the isolation of Essential Oi from Various Botanical Species. Proceedings 38th International Symposium on Essential Oils, p. 51, Graz (Autriche).
- ❖ Veziris, N., E. Cambau, W. Sougakoff, J. Robert & V. Jarlier, (2005) Resistance to antituberculous drugs. *Arch Pediatr* **12 Suppl 2**: S102-109.
- ❖ Voladri, R. K., D. L. Lakey, S. H. Hennigan, B. E. Menzies, K. M. Edwards & D. S Kernodle, (1998) Recombinant expression and characterization of the major betalactamase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 1375- 1381.
- ❖ Wallis, R. S., S. Patil, S. H. Cheon, K. Edmonds, M. Phillips, M. D. Perkins, M. Joloba, A. Namale, J. L. Johnson, L. Teixeira, R. Dietze, S. Siddiqi, R. D. Mugerwa, K. Eisenach & J. J. Ellner, (1999) Drug tolerance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 2600-2606.
- ❖ Werngren, J., L. Klintz & S. E. Hoffner, (2006) Evaluation of a novel kit for use with the BacT/ALERT 3D system for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **44**: 2130-2132.
- ❖ WHO, (1997) Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. *Global Tuberculosis Programme World Health Organisation (WHO) Geneva and 216 International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) Paris. WHO/TB/96.216.*



- ❖ **WHO, (2008a)** Anti-tuberculosis drug resistance in the world: fourth global report. *The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance*.
- ❖ **WHO, (2008b)** Global tuberculosis control 2008 - surveillance, planning, financing. *WHO Report 2008. WHO/HTM/TB/2008.393*.
- ❖ **Wladimir Sougakoff, Brossier F, Veziris N, Truffot-Pernot C, Jarlier V, (2008)** Molecular investigation of resistance to the antituberculous drug ethionamide in multidrug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*.
- ❖ **Wolff, I. Schellenberg, D. Ulrich, (2007)** Pressurized Liquid Extraction (PLE) for the Extraction of Essential Oil Compounds of Aromatic Herbs. *Proceedings 38th International Symposium on Essential Oils*, p. 48, Graz (Autriche),.
- ❖ **Youmans, G. P., G. W. Raleigh & A. S. Youmans, (1947)** The tuberculostatic action of paraaminosalicylic acid. *J Bacteriol* **54**: 409-416.
- ❖ **Yang, M. Belghazi, A. Lagadec, D. J. Miller, S. B. Hawthorne, (1998)** Elution of organic solutes from different polarities sorbents using subcritical water. *Journal of Chromatograph A*, 810, 149-159,
- ❖ **Zhang, Y., C. Vilcheze & W. R. Jacobs, (2005)** Mechanisms of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*. S. T. Cole, K. D. Eisenach, D. N. McMurray & W. R. Jacobs Jr (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 11-140.
- ❖ **Z. Hromadkova, A. Ebringerova, P. Valachovic, (1999)** Comparison of classical and ultrasound-assisted extractions of *Salvia officinalis* L. *Ultrasonics Sonochemistry*, 5, 163-168,
- ❖ **Zignol, M., M. S. Hosseini, A. Wright, C. L. Weezenbeek, P. Nunn, C. J. Watt, B. G. Williams & C. Dye, (2006)** Global incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *Infect Dis* **194**: 479-485.