



N° d'ordre 04/2014

## THESE DE DOCTORAT

Présentée par

Mme : **EL GUENDOUDI Souraya**

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

### **Isolement et identification de bactéries sécrétant des substances à effet antimycobactérien, caractérisation partielle des métabolites bioactifs et étude préliminaire de leur mode d'action**

Thèse présentée et soutenue le 25 Janvier 2014 devant le jury composé de :

Nom Prénom	Titre	Etablissement	
Pr. IBN SOUDA KORAICHI Saad	PES	FST de Fès	Président
Pr. BENCHEKROUN Mohammed Nabil	PES	ENCG de Casablanca	Rapporteur
Pr. LATRACHE Hassan	PES	FST de Béni Mellal	Rapporteur
Pr. REMMAL Adnane	PES	Faculté des Sciences Dhar El Mehraz	Rapporteur
Pr. FIKRI BEN BRAHIM Kawtar	PES	FST de Fès	Examinatrice
Pr. HAGGOU Abdellatif	PES	FST de Fès	Examineur
Pr. IRAQUI HOUSSAINI Mohammed	PES	FST de Fès	Directeur de thèse

Laboratoire d'accueil : Laboratoire de Biotechnologie Microbienne

Etablissement : Faculté des Sciences et Techniques - Fès



### Résumé de la thèse

Les efforts dans ce travail sont focalisés sur la recherche de microorganismes producteurs de substances à effet antimycobactérien. A partir de plusieurs biotopes de la région de Fès (sol, eau), nous avons isolé huit isolats qui présentent une activité antimycobactérienne. Nous avons travaillé aussi sur une souche de *Bacillus pumilus* et un isolat nommé IL<sub>5</sub> qui sont disponibles au laboratoire.

Afin de confirmer que l'effet antimycobactérien des isolats d'intérêt est dû à des substances secrétées, les cultures de ces microorganismes sont filtrées. Les filtrats obtenus sont capables d'inhiber la prolifération des mycobactéries, ce qui confirme que l'effet observé est dû à des substances secrétées qui diffusent dans le milieu gélosé.

L'ensemble des isolats étudiés sont capables d'inhiber la croissance de *Mycobacterium smegmatis*, de *Mycobacterium aurum*, d'*Escherichia coli*, de *Bacillus subtilis* et de *Staphylococcus haemolyticus*.

Les isolats secrétant des substances à effet antimycobactérien sont identifiés. A l'issue des résultats obtenus, on constate que, six isolats appartiennent au genre *Bacillus*, l'un des trois isolats qui restent correspond à *Staphylococcus epidermidis*, le deuxième est un *Staphylococcus warneri*, et le troisième est une souche de *Pseudomonas aeruginosa*.

La dernière souche est déjà identifiée dans des travaux antérieurs comme étant une souche de *Bacillus pumilus*.

Le travail est poursuivi sur les souches suivantes : *S. epidermidis*, *S. warneri* et *P. aeruginosa*, qui ne sont pas connues dans la littérature comme productrices de substances à effet antimycobactérien, ainsi que sur la souche *Bacillus sp.* qui présente une activité antimycobactérienne très importante par rapport aux autres souches du même genre.

La souche *B. pumilus* ayant une activité antimycobactérienne par l'action d'un principe actif de nature protéique, est étudiée afin de déterminer la bande protéique responsable de cette activité antimycobactérienne. En plus, l'effet cytotoxique de ce métabolite sur les macrophages péritonéaux de la souris est étudié afin de déterminer la possibilité de son utilisation dans le traitement de la tuberculose et des autres mycobactérioses.

Les extraits protéiques de trois souches (*B. pumilus*, *S. warneri*, et *Bacillus sp.*) sont précipitées par le sulfate d'ammonium, et se sont avérées capables d'inhiber la croissance des mycobactéries. Ces précipités protéiques, traités par la protéinase K, deviennent inactifs. Ainsi, les principes actifs de ces souches sont de nature protéique.

L'analyse de ces métabolites par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10%, montre la présence de plusieurs bandes de différentes tailles, qui correspondent aux protéines secrétées par les souches étudiées. Pour les deux souches *S. warneri* et *Bacillus sp.*, l'une ou plusieurs des protéine (s) obtenues serait (seraient) responsable (s) de l'activité antimycobactérienne observée.

Le profil protéique de la souche *B. pumilus* est constitué de six bandes. La bande ayant le plus faible poids moléculaire, correspond à la protéine responsable de l'activité antimycobactérienne observée. Cette dernière est également active sur *E. coli*, sur *B. subtilis* et sur *Staphylococcus sp.*

Les principes actifs secrétés par les deux souches *S. epidermidis* et *P. aeruginosa* sont extraits par l'acétate d'éthyle, et sont avérés non sensibles à la protéinase K, ils sont de ce fait de nature non protéique.

La séparation de l'extrait de *S. epidermidis* par chromatographie sur couche mince a permis d'identifier la fraction responsable de l'activité antimycobactérienne.

Une étude phytochimique est réalisée pour l'extrait brut de cette souche, ainsi que pour la fraction active purifiée et concerne la recherche des flavonoïdes et des polyphénols. La présence des polyphénols dans la fraction responsable de l'inhibition permet de conclure que l'activité antimycobactérienne de la souche étudiée est due à ces composés.

De plus, les métabolites bioactifs produits par *S. warneri* et *Bacillus sp.*, induisent une lyse de la paroi de *M. smegmatis* et permettent l'extraction de son ADN génomique. Ce qui suggère que ces agents agissent au niveau de l'enveloppe cellulaire des mycobactéries.

Les métabolites secrétés par les deux souches *S. epidermidis* et *P. aeruginosa*, ainsi que la protéine active de *B. pumilus*, n'ont pas abouti à l'extraction de l'ADN mycobactérien, il est possible que ces agents agissent au niveau de la paroi mais les pores qu'ils créent sont petits et ne permettent pas le passage de l'ADN génomique, comme ils peuvent avoir un autre site d'action.

Les principes actifs des cinq souches étudiées ne montrent aucune activité sur la paroi des globules blancs du sang humain, ce qui suggère que ces métabolites n'agissent pas sur l'enveloppe cellulaire des macrophages.

L'étude de l'effet cytotoxique du métabolite bioactif secrété par la souche *S. epidermidis*, ainsi que celui du dialysat de la protéine active de *B. pumilus*, permet de conclure que ces derniers n'exercent aucune activité cytotoxique sur les macrophages péritonéaux qui gardent leur aptitude à fixer le rouge neutre après 72 h de contact avec les extraits actifs.

**Mots clés :** Tuberculose, Mycobactéries, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, antituberculeux

Introduction générale .....	1
<b><u>Revue bibliographique</u></b>	
<b>I- Taxonomie des mycobactéries.....</b>	<b>4</b>
1- Classification .....	4
1-1-Critères phénotypiques d'identification .....	5
1-2-Critères génotypiques d'identification .....	5
2- Paroi cellulaire des mycobactéries .....	7
2-1-Structure du peptidoglycane .....	8
2-2-Structure du mycolate d'arabinogalactane .....	9
2-3-Cord-factor .....	10
2-4-Mycosides.....	10
2-5-Cires D.....	10
2-6-Couche externe .....	10
<b>II- Tuberculose .....</b>	<b>12</b>
1- Histoire de la tuberculose .....	12
2- Les bactéries du complexe <i>M. tuberculosis</i> .....	13
3- Epidémiologie .....	14
3-1-La tuberculose dans le monde .....	14
3-2-Répartition nationale de la tuberculose .....	16
4- Physiopathologie .....	16
4-1-Transmission .....	16
4-2-Infection tuberculose latente .....	18
4-3-Tuberculose maladie.....	21
5- Mécanismes et facteurs de virulence .....	21
6- La co-infection Tuberculose-SIDA .....	23
<b>III- Mycobactéries atypiques.....</b>	<b>24</b>
1- Classification .....	25
2- Ecologie.....	25
3- Physiopathologie .....	26
3-1-Transmission .....	26
3-2-Pouvoir pathogène.....	26
<b>IV- Diagnostic des mycobactéries .....</b>	<b>28</b>
1- Diagnostic bactériologiques .....	28
1-1-Examen microscopique .....	29
1-2-Culture.....	31
1-3-Test de susceptibilité aux antibiotiques.....	32
2- Diagnostic immunologique .....	32
3- Diagnostic moléculaire.....	33
3-1-Utilisation de sondes sans amplification préalable.....	34
3-2-Utilisation de la PCR.....	34
<b>V- Traitement de la tuberculose .....</b>	<b>35</b>
1- Traitement standard de la tuberculose.....	35
2- Situations cliniques particulières.....	36
2-1-Traitement des formes extra-pulmonaires .....	36

2-2-Traitement de la tuberculose à bacilles multi- et ultra-résistants .....	37
2-3-Traitement de la tuberculose chez les sujets infectés par le VIH .....	38
3- Traitement des mycobactérioses.....	38
4- La résistance aux antituberculeux.....	38
4-1-Formes de résistance .....	38
a- <i>Résistance naturelle</i> .....	38
b- <i>Résistance acquise</i> .....	39
4-2-Mécanismes moléculaires de la résistance aux antituberculeux.....	39
a- <i>Résistance aux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique :</i> <i>streptomycine et les antibiotiques apparentés</i> .....	39
b- <i>Résistance aux antibiotiques inhibiteurs des acides nucléiques :</i> <i>rifampicine et fluoroquinolones</i> .....	40
c- <i>Résistance aux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire :</i> <i>isoniazide, éthambutol et pyrazinamide</i> .....	41
5- Les facteurs favorisant la résistance aux antituberculeux.....	43
6- BCG et mise au point de nouveaux vaccins .....	43
7- Recherche de nouvelles molécules à effet antimycobactérien .....	44
7-1-Synthèse de molécules chimiques .....	45
7-2-Activité des extraits de plantes.....	45
7-3-Production des agents antimicrobiens par les microorganismes .....	47

## Chapitre I : Isolement et identification de bactéries sécrétant des substances à effet antimycobactérien

Introduction.....	51
-------------------	----

### Matériel et Méthodes

<b>I- Isolement de bactéries sécrétant des substances à effet antimycobactérien.....</b>	<b>52</b>
1- Matériel .....	52
1-1-Souches bactériennes.....	52
1-2-Milieus de culture .....	52
1-3-Echantillonnage.....	53
2- Méthodes .....	54
2-1-Isolement de microorganismes susceptibles d'inhiber les mycobactéries.....	54
a- <i>Isolement de microorganismes inhibiteurs des mycobactéries</i> <i>à partir du milieu LB</i> .....	54
b- <i>Isolement de microorganismes inhibiteurs des mycobactéries</i> <i>à partir des autres milieux de culture</i> .....	55
2-2-Confirmation de l'activité antimycobactérienne des isolats.....	55
2-3- Etude de microorganismes susceptibles d'inhiber les mycobactéries .....	56
<b>II- Etude du spectre d'action des isolats .....</b>	<b>57</b>
<b>III- Identification des isolats producteurs de substances à effet antimycobactérien .....</b>	<b>57</b>
1- Tests préliminaires.....	57
1-1-Coloration de Gram .....	57
1-2-Test de croissance à 50°C.....	58
1-3-Test de confrontation.....	59
2- Séquençage du gène de l'ARNr 16S .....	59
2-1-Extraction de l'ADN génomique.....	59

<i>a- Extraction de l'ADN génomique par choc thermique</i> .....	59
<i>b- Extraction de l'ADN génomique par la méthode classique</i> .....	60
2-2-Amplification de l'ADNr 16S par PCR.....	60
<i>a- Principe de la technique PCR</i> .....	60
<i>b- Protocole de la technique PCR</i> .....	61
<i>b-1- Amorces utilisées</i> .....	61
<i>b-2- Mélange réactionnel</i> .....	62
<i>b-3- Amplification</i> .....	62
<i>c- Electrophorèse sur gel d'agarose</i> .....	62
<i>c-1- Principe de l'électrophorèse sur gel d'agarose</i> .....	62
<i>c-2- Protocole de l'électrophorèse sur gel d'agarose</i> .....	63
2-3-Purification des produits PCR .....	64
<i>a- Elimination du Triton-X</i> .....	64
<i>b- Elimination des amorces</i> .....	64
2-4-Séquençage de l'ADNr 16S des isolats.....	65
<i>a- Principe du séquençage</i> .....	65
<i>b- PCR de séquence</i> .....	66
<i>b-1- Mélange réactionnel</i> .....	66
<i>b-2- Amplification</i> .....	66
<i>c- Purification des produits de séquence</i> .....	67
<i>d- Séquençage des produits de séquence purifiés</i> .....	67
<i>e- Analyse informatique des séquences</i> .....	68

## Résultats et Discussions

<b>I- Isolement de bactéries sécrétant des substances à effet antimycobactérien</b> .....	69
1- Confirmation de l'activité antimycobactérienne des isolats.....	71
<b>II- Etude du spectre d'action des isolats</b> .....	74
<b>III- Identification des isolats producteurs de substances à effet antimycobactérien</b> .....	76
1- Tests préliminaires.....	76
1-1-Coloration de Gram .....	76
1-2-Test de croissance à 50°C.....	77
1-3-Test de confrontation.....	77
2- Séquençage du gène de l'ARNr 16S .....	78
2-1-Amplification de l'ADNr 16S par PCR.....	78
2-2-Purification des produits PCR .....	79
2-3-Séquençage de l'ADNr 16S et analyse informatique des séquences.....	81
<i>a- Séquençage de l'ADNr 16S</i> .....	81
<i>b- Analyse informatique des séquences</i> .....	81
<b>Conclusions</b> .....	88