



N° d'ordre : 06/2014

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

Mme : **CHERIF HAOUAT Amina**

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Evaluation de l'activité antimycobactérienne *in vitro*, fractionnement et identification des molécules responsables de cette activité de plantes d'origine marocaine.

Thèse présentée et soutenue le 01/02/2014 devant le jury composé de

Nom Prénom	Titre	Etablissement	
HAGGOUD Abdellatif	PES	FST de Fès	Président
AMIRI Saïd	PES	ENA de Meknès	Rapporteur
ELLOUALI Mostafa	PES	FST de Beni Mellal	Rapporteur
MERZOUKI Mohammed	PES	Faculté des Sciences Dhar El Mahraz	Rapporteur
SQALLI HOUSSAINI Hakima	PH	FST de Fès	Examineur
IBNSOUDA KOURAICHI Saad	PES	FST de Fès	Examineur
IRAQUI HOUSSAINI Mohamed	PES	FST de Fès	Directeur de thèse

Laboratoire d'accueil : Laboratoire de Biotechnologie Microbienne.

Etablissement : Faculté des Sciences et Techniques de Fès.



Résumé de la thèse

Malgré la disponibilité des antituberculeux et du vaccin BCG, la tuberculose, due particulièrement à *Mycobacterium tuberculosis*, demeure l'une des principales causes de mortalité par infection dans le monde. L'OMS estime que pour la période 2000-2020, un milliard de personnes seront nouvellement infectées par *M. tuberculosis* dont 35 millions mourront de la tuberculose si aucune amélioration n'est apportée dans le traitement et le contrôle de cette infection. D'où, un besoin s'impose pour la recherche de nouvelles substances antimycobactériennes pour vaincre cette maladie dont le contrôle est de plus en plus compliqué par l'émergence de souches résistantes aux antituberculeux et des mycobactéries atypiques.

La recherche de nouveaux métabolites antimycobactériens à partir des plantes connaît actuellement un intérêt croissant. Dans cette optique, et dans le but de valoriser les plantes aromatiques et médicinales marocaines, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude de l'activité antimycobactérienne de certaines plantes d'origine marocaine et à la recherche des molécules impliquées dans cette activité. Ces plantes sont: *Cistus salvifolius*, *Cistus albidus*, *Populus alba*, *Tamarix africana*, *Tamarix gallica*, *Arbutus unedo* et *Berberis hispanica*.

La méthode de l'incorporation des extraits dans le milieu gélosé nous a permis de montrer que les extraits aqueux et éthanologiques de *Cistus salvifolius*, *Cistus albidus*, *Populus alba*, *Tamarix africana* et *Tamarix gallica* sont dotés d'un effet antimycobactérien vis-à-vis de *Mycobacterium smegmatis* MC2, *Mycobacterium aurum* A+ et *Mycobacterium bovis* IPP.

L'activité antimycobactérienne des extraits des cinq plantes a été évaluée par la méthode de disque. Par cette méthode, nous avons pu démontrer qu'il existe une corrélation positive entre la concentration en matière sèche des extraits éthanologiques de *C. salvifolius*, *C. albidus*, *T. africana* et *T. gallica* et l'intensité du pouvoir antimycobactérien de ces derniers. Pour *P. alba*, les résultats de la méthode de disque ont montré que l'extrait de l'acétate d'éthyle possède l'effet inhibiteur le plus élevé. Confirmant les résultats obtenus avec la méthode de disque, l'étude de la CMI a montré que les extraits éthanologiques de *C. salvifolius*, *C. albidus*, *T. africana* et *T. gallica* inhibent la croissance de *M. smegmatis* en milieu liquide. Cette étude a montré que *C. salvifolius* est doté du meilleur effet inhibiteur avec une CMI de 32, 1 mg de MS/ml et *T. africana* est doté de l'effet le plus faible avec une CMI de 54,8 mg de MS/ml.

Les extraits éthanologiques de *C. salvifolius*, *C. albidus* et la fraction d'acétate d'éthyle de *P. alba* en plus des extraits éthanologiques de *A. unedo* et *B. hispanica*, ont été fractionnés et les fractions responsables de l'activité antimycobactérienne ont été identifiées par bioautographie. Les résultats ont révélé la présence de deux bandes actives pour *C. salvifolius*, une pour *C. albidus*, une pour *P. alba*, une pour *A. unedo* et trois pour *B. hispanica*. Une étude phytochimique a permis de mettre en évidence la présence des principales classes de métabolites secondaires dans les extraits bruts et dans les bandes actives. Plusieurs molécules se sont révélées responsables de l'activité antimycobactérienne de ces plantes. Les polyphénols et les flavonoïdes sont responsables de l'activité antimycobactérienne d'*A. unedo* et de la fraction d'acétate d'éthyle de *P. alba*; les polyphénols seuls sont responsables de cette activité pour *C. salvifolius* et *C. albidus* alors que pour *B. hispanica* les trois classes de composés sont impliquées dans l'activité de cette plante, il s'agit des polyphénols, des flavonoïdes et des alcaloïdes.

L'étude de l'effet des extraits éthanologiques de *C. albidus*, *C. salvifolius*, *A. unedo* et *B. hispanica* sur la paroi de *M. smegmatis*, en utilisant *T. vulgaris* comme témoin positif, a permis de montrer que ces extraits sont incapables d'extraire ni l'ADN ni l'ARN et n'agissent donc pas au niveau de la paroi.

L'extrait éthanologique de *C. salvifolius* et la fraction purifiée de la bande la plus active de l'extrait éthanologique de *B. hispanica* ont été évalués pour leur effet sur les macrophages péritonéaux du rat. Les résultats ont montré que ces extraits n'ont pas d'effet toxique sur ces macrophages et peuvent de ce fait être utilisés pour le développement de nouvelles substances antimycobactériennes.

Mots clés : Tuberculose, Mycobactéries, Activité antimycobactérienne, *Cistus salvifolius*, *Cistus albidus*, *Populus alba*, *Tamarix africana*, *Tamarix gallica*, *Arbutus unedo*, *Berberis hispanica*, Bioautographie.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
I- GENERALITES SUR LES MYCOBACTERIES	4
1- Définition et caractères généraux.....	4
2- Classification	5
3- Paroi des mycobactéries	6
4- Résistance aux agents physiques et chimiques	8
II- LA TUBERCULOSE	8
1- Historique de la maladie	8
2- Epidémiologie	11
3- Physiopathologie.....	14
3-1- Pouvoir pathogène du complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	14
3-2- Transmission.....	16
3-3- Cycle infectieux de la tuberculose.....	17
4- VIH et tuberculose	19
5- Prévention et lutte contre la tuberculose	20
5-1- Vaccination	20
5-2- Stratégies de lutte contre la tuberculose	22
5-2-1- Stratégie DOTS	22
5-2-2- Stratégie halte à la tuberculose.....	23
5-2-3- Stratégies de lutte contre la tuberculose au Maroc.....	24
III- MYCOBACTERIOSES DUES AUX MYCOBACTERIES NON TUBERCULEUSES (MNT)	25
1- Définition et classification des MNT	25
2- Ecologie	27
3- Epidémiologie	28
4- Physiopathologie	29
4-1- Transmission.....	29
4-2- Pouvoir pathogène	29
IV- DIAGNOSTIC DES MYCOBACTERIES	33
1- Diagnostic radiologique	34
2- Diagnostic bactériologique	34
2-1- Prélèvements.....	34
2-2- Examen microscopique.....	35
2-3- Mise en culture	35
2-3-1- Procédé classique	35
2-3-2- Méthodes de culture en milieu liquide	37

2-4- Identification.....	37
2-4-1- Identification classique.....	37
2-4-2- Nouvelles techniques d'identification.....	38
2-4-2-1- Techniques chromatographiques.....	38
2-4-2-2- Techniques de biologie moléculaire.....	39
2-5- Etude de sensibilité aux antibiotiques.....	40
V- TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE ET PHENOMENES DE RESISTANCE ..	41
1-Traitement de la tuberculeuse latente.....	41
2-Traitement de la tuberculose maladie.....	42
2-1- Antituberculeux.....	42
2-1-1- Antituberculeux essentiels.....	42
2-1-2- Antituberculeux de seconde ligne.....	43
2-2- Traitement standard de la tuberculose.....	44
3- Résistance aux antituberculeux.....	44
3-1- Résistance naturelle et résistance acquise.....	44
3-2- Résistance primaire et résistance secondaire.....	45
3-3- Formes de résistance.....	45
4- Traitement des tuberculoses MR et UR.....	46
5- Traitement des mycobactérioses.....	47
VI- IMPORTANCE DES PLANTES AROMATIQUES ET MEDICINALES (PAM) EN PHYTOTHERAPIE.....	47
1- Historique.....	47
2- Situation des PAM au niveau mondial et national.....	48
3- Activités biologiques des produits dérivés des PAM.....	50
3-1- Activités antimicrobiennes.....	50
3-2- Activités antimycobactériennes.....	52
3-3- Autres activités biologiques.....	55
4- Valorisation des composés bioactifs à partir des PAM.....	56
CHAPITRE 2 : ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIMYCOBACTERIENNE IN VITRO DES PLANTES DU GENRE <i>CISTUS</i> , <i>POPULUS</i> ET <i>TAMARIX</i>	
I- INTRODUCTION.....	57
II- MATERIELS ET METHODES.....	60
1- Matériel végétal.....	60
1-1- Origine géographique et description des plantes.....	60
1-2- Identification botanique.....	62
1-3- Préparation des échantillons.....	62
2- Souches mycobactériennes.....	64
3- Préparation des extraits.....	65
3-1- Préparation des extraits pour la mise en évidence de l'effet antimycobactérien.....	65

3-2- Préparation des extraits pour la méthode de disque.....	65
3-2-1- Préparation des extraits éthanoliques à partir des plantes du genre <i>Cistus</i> et <i>Tamarix</i>	65
3-2-2- Préparation des extraits à partir de <i>Populus alba</i>	66
3-3- Préparation des extraits éthanoliques pour la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	68
4- Etude de l'activité antimycobactérienne <i>in-vitro</i> des extraits de plantes.....	68
4-1- Incorporation des extraits dans le milieu gélosé.....	68
4-2- Evaluation de l'effet antimycobactérien par la méthode de disque pour <i>Cistus salvifolius</i> , <i>Cistus albidus</i> , <i>Tamarix africana</i> et <i>Tamarix Gallica</i>	69
4-3- Evaluation de l'effet antimycobactérien de <i>Populus alba</i> par la méthode de disque	69
4-4- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des extraits éthanoliques	70
5- Analyse statistique des résultats.....	71
 III- RESULTATS ET DISCUSSION	71
1- Incorporation des extraits dans le milieu gélosé	71
2- Evaluation de l'effet antimycobactérien par la méthode de disque pour <i>C. salvifolius</i> , <i>C. albidus</i> , <i>T. africana</i> et <i>T. gallica</i>	75
3- Comparaison entre les effets antimycobactériens de <i>C. salvifolius</i> , <i>C. albidus</i> , <i>T. africana</i> et <i>T. gallica</i>	81
4- Evaluation de l'activité antimycobactérienne, par la méthode de disque, pour <i>Populus alba</i>	83
5- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits éthanoliques.....	88
 IV- CONCLUSION	90
 CHAPITRE 3 : FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS DE PLANTES, IDENTIFICATION DES FRACTIONS RESPONSABLES DE L'ACTIVITE ANTIMYCOBACTERIENNE ET ETUDE PHYTOCHIMIQUE	
 I- INTRODUCTION	92
 II- MATERIELS ET METHODES	94
1- Matériel végétal	94
1-1-Origine géographique et description des plantes	94
1-2- Identification botanique	95
1-3- Préparation des échantillons	95
2- Souche mycobactérienne	96
3- Méthode bioautographique	96
3-1- Préparation des extraits.....	97
3-1-1- Préparation des extraits des plantes du genre <i>Cistus</i>	97
3-1-2- Préparation des extraits de <i>B. hispanica</i> et <i>A. unedo</i>	97

3-1-3- Préparation de l'extrait de <i>P. alba</i>	97
3-2- Fractionnement des extraits par chromatographie sur couche mince (CCM) .	97
3-3- Localisation des bandes actives responsables de l'activité antimycobactérienne des extraits de plantes étudiées	99
3-4- Purification des fractions actives	100
4- Etude phytochimique	100
4-1- Mise en évidence des flavonoïdes	101
4-2- Mise en évidence des tanins	101
4-3- Mise en évidence des polyphénols	101
4-4- Mise en évidence des alcaloïdes	101
III- RESULTATS ET DISCUSSION	102
1- Fractionnement des extraits de plantes par chromatographie sur couche mince (CCM)	102
1-1- choix du solvant.....	102
1-2- Séparation des composés présents dans les extraits de plantes	103
2- Caractérisation des métabolites bioactifs des plantes étudiées	106
2-1- Identification des principes actifs des deux plantes du genre <i>Cistus</i>	107
2-1-1-Localisation des bandes actives responsables de l'activité antimycobactérienne des extraits éthanoliques de <i>C. salvifolius</i> et <i>C. albidus</i> par bioautographie	107
2-1-2- Purification des bandes actives	109
2-1-3- Etude phytochimique.....	110
2-2- Identification des principes actifs de <i>P. alba</i>	113
2-2-1- Localisation des bandes actives responsables de l'activité antimycobactérienne de l'extrait de l'acétate d'éthyle de <i>P. alba</i> par bioautographie	113
2-2-2- Purification de la bande active	114
2-2-3- Etude phytochimique.....	114
2-3- Identification des principes actifs d' <i>A. unedo</i>	115
2-3-1- Localisation des bandes actives responsables de l'activité antimycobactérienne de l'extrait éthanolique d' <i>A. unedo</i> par bioautographie	115
2-3-2- Purification de la bande active	116
2-3-3- Etude phytochimique.....	116
2-4- Identification des principes actifs de <i>B. hispanica</i>	118
2-4-1- Localisation des bandes actives responsables de l'activité antimycobactérienne de l'extrait éthanolique de <i>B. hispanica</i> par bioautographie.....	118
2-4-2- Purification des bandes actives	119
2-4-3- Etude phytochimique.....	120
3- Comparaison de l'effet antimycobactérien des plantes étudiées	122
IV- CONCLUSION.....	123

CHAPITRE 4 : ETUDE DE L'EFFET DES EXTRAITS DES PLANTES SUR LA PAROI DE *M.SMEGMATIS* ET SUR LES MACROPHAGES PERITONEAUX DU RAT

I- INTRODUCTION	125
II- MATERIELS ET METHODES	126
1- Etude de l'effet des extraits de plantes sur la paroi des mycobactéries	126
1-1- Matériel végétal	126
1-2- Préparation des extraits.....	127
1-3- Extraction de l'ADN.....	127
1-4- Electrophorèse sur gel d'agarose	128
2- Etude de l'effet des extraits de plantes sur les macrophages (cytotoxicité).....	128
2-1- Préparation des extraits.....	129
2-2- Isolement des macrophages péritonéaux du rat.....	129
2-3- Etude de la cytotoxicité des extraits de plantes	130
2-4- Analyse statistique des résultats	131
III- RESULTATS ET DISCUSSION	131
1- Etude de l'effet des extraits de plantes sur la paroi des mycobactéries	131
2- Etude de l'effet des extraits de plantes sur les macrophages (cytotoxicité).....	135
IV- CONCLUSION.....	138
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	139
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	144
ANNEXES	174