



N° d'ordre 20/2013

## THESE DE DOCTORAT

Présentée par

Mlle : ZAHIR Ilham

**Spécialité : BIOTECHNOLOGIE MICROBIENNE**

**Sujet de la thèse :**

**Isolement, identification des microorganismes producteurs de substances à effet antimycobactérien et caractérisation partielle des principes actifs.**

**Thèse présentée et soutenue le 28 Décembre 2013 devant le jury composé de :**

<i>Nom Prénom</i>	<i>Titre</i>	<i>Etablissement</i>	
<b>Pr IRAQUI Houssaini Mohamed</b>	<b>PES</b>	<b>FST - Fès</b>	<b>Président</b>
<b>Pr EL GACHTOULI Naïma</b>	<b>PH</b>	<b>FST - Fès</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr BEL HAJ Abdelhak</b>	<b>PES</b>	<b>Faculté des sciences- Meknès</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr BENCHEKROUN Mohamed Nabil</b>	<b>PES</b>	<b>FST - Mohammedia</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr AARAB Lotfi</b>	<b>PES</b>	<b>FST - Fès</b>	<b>Examineur</b>
<b>Pr IBNSOUDA Koraichi Saad</b>	<b>PES</b>	<b>FST - Fès</b>	<b>Examineur</b>
<b>Pr HOUARI Abdellah</b>	<b>PH</b>	<b>FST - Fès</b>	<b>Directeur de thèse</b>

**Laboratoire d'accueil : Laboratoire de Biotechnologie Microbienne**

**Etablissement : Faculté des Sciences et Techniques de Fès**



## Résumé de la thèse

La tuberculose demeure, parmi les maladies infectieuses guérissables, celle qui fait le plus de victimes. En effet, elle atteint chaque année 8 à 9 millions de personnes et cause 1,4 million de décès. Au Maroc, elle représente un problème majeur de santé publique puisque plus de 27000 nouveaux cas sont enregistrés chaque année.

Ces dernières décennies, le risque de contracter la tuberculose et d'en subir les graves conséquences s'est sensiblement accru en raison de la propagation inexorable de la pandémie du VIH/SIDA qui a favorisé également les infections par les mycobactéries atypiques et a accentué l'émergence, dans de nombreux pays, de bacilles multi-résistants, ce qui rend le problème encore plus préoccupant.

De ce fait, de nombreuses recherches sont canalisées sur la découverte de nouvelles substances à effet antimycobactérien. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre thématique de recherche qui consiste à isoler et identifier des microorganismes sécrétant des substances à effet antimycobactérien et de caractériser partiellement leurs principes actifs. Nous avons isolé, à partir des différentes niches écologiques, dix isolats bactériens capables d'inhiber la croissance mycobactérienne et/ou d'autres bactéries à Gram positif et à Gram négatif. L'identification taxonomique par la méthode moléculaire (amplification du gène *ARNr 16 S* et son séquençage) a permis de déterminer que six souches appartiennent au genre *Bacillus*.

Notre étude s'est focalisée sur quatre souches (*Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus amyloliquefaciens* et *Aerococcus sp.*) que nous avons jugé intéressantes. Ainsi nous avons remarqué que les extraits de ces bactéries obtenus par précipitation au sulfate d'ammonium et / ou les solvants organiques inhibent la prolifération de *Mycobacterium smegmatis*. Cet effet n'est pas aboli après traitement des extraits de *Pseudomonas aeruginosa* et *Alcaligenes faecalis* à la protéinase K, à la pepsine et à la chaleur ce qui montre que les principes actifs de ces extraits sont de nature non protéique. L'analyse des extraits par chromatographie sur couche mince et élution des bandes, nous ont permis de localiser la ou les bande (s) responsable (s) de l'activité antimycobactérienne pour ces deux souches. Nous avons également déterminé que *Bacillus amyloliquefaciens* et *Aerococcus sp.* possèdent des métabolites de nature protéique. Ceci est confirmé par l'analyse des précipités par électrophorèse sur gel de polyacrylamide qui montre un nombre variable de protéines d'une souche à l'autre, et par conséquent, l'activité antimycobactérienne observée serait due à l'une ou à plusieurs protéines détectées. Effectivement, l'élution des protéines d'*Aerococcus sp.* a mis en évidence la protéine responsable de l'effet recherché.

D'autre part, l'étude de la cinétique de la production des principes actifs de ces souches a montré que la synthèse commence au début de la phase exponentielle avec un maximum de synthèse au cours de la phase stationnaire. Néanmoins, le premier halo d'inhibition coïncide avec le début de la phase stationnaire de la croissance de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Finalement, la troisième partie de ce travail a concerné l'étude de l'influence de certains paramètres biotiques et abiotiques sur l'extrait d'*Alcaligenes faecalis*. Ainsi nous avons constaté que les métabolites antimycobactériens résistent à l'action de pH gastrique, la bile et le peroxyde d'hydrogène. En outre, ils ne sont pas affectés par les enzymes pancréatiques et lysozymes. Plus curieusement encore, ils ne sont pas toxiques vis-à-vis des globules rouges humains et présentent un effet synergétique avec la rifampicine contre *M. smegmatis*.

**Mots clés :** Tuberculose, mycobactéries, principes actifs antimycobactériens.

# SOMMAIRE

## PREMIERE SECTION: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>A. Caractères généraux des mycobactéries</b>	<b>3</b>
<b>B. Classification des mycobactéries</b>	<b>8</b>
<b>1. Classification selon Bergey's</b>	<b>8</b>
<b>2. Classification selon l'importance clinique</b>	<b>8</b>
<b>a. Les mycobactéries typiques</b>	<b>8</b>
<b>(i) La tuberculose</b>	<b>8</b>
<b>(i.1) L'agent pathogène : le complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b>	<b>9</b>
<b>(i.1.1) <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b>	<b>10</b>
<b>(i.1.2) <i>Mycobacterium bovis</i></b>	<b>11</b>
<b>(i.1.3) <i>Mycobacterium africanum</i></b>	<b>12</b>
<b>(i.1.4) <i>Mycobacterium microti</i></b>	<b>12</b>
<b>(i.1.5) <i>Mycobacterium canettii</i></b>	<b>13</b>
<b>(i.1.6) <i>Mycobacterium pinnipedii</i></b>	<b>13</b>
<b>(i.2) Pouvoir pathogène</b>	<b>14</b>
<b>(i.2.1) Transmission</b>	<b>14</b>
<b>(i.2.2) Evolution de la maladie dans l'organisme</b>	<b>15</b>
<b>(i.2.3) Clinique</b>	<b>16</b>
<b>(i.2.3.1) La tuberculose pulmonaire</b>	<b>16</b>
<b>(i.2.3.2) La tuberculose extra pulmonaire</b>	<b>16</b>
<b>(i.2.4) Physiopathologie</b>	<b>17</b>
<b>(i.3) Détermination de la sensibilité aux antibiotiques</b>	<b>21</b>
<b>(i.4) Traitement curatif et problème de résistance</b>	<b>23</b>
<b>(i.4.1) Traitement curatif</b>	<b>23</b>
<b>(i.4.1.1) Traitement standard de la tuberculose</b>	<b>23</b>
<b>(i.4.1.2) Traitement de la tuberculose par les antibiotiques de deuxième intention</b>	<b>26</b>
<b>(i.4.1.3) Traitement pour les formes extra-pulmonaires</b>	<b>27</b>
<b>(i.4.1.4) Traitement de la tuberculose chez les sujets infectés par le VIH</b>	<b>27</b>

(i.4.2) Résistance aux antituberculeux	27
(i.4.2.1) Mécanismes moléculaires de la résistance aux antituberculeux	29
(i.4.2.2) Types de la résistance aux antituberculeux	33
(i.4.2.3) Formes de la résistance aux antituberculeux	33
(i.5) Traitement préventif	33
(i.6) Incidence de la tuberculose	34
(i.6.1) Répartition mondiale de la tuberculose	34
(i.6.2) Répartition national de la tuberculose	36
(ii) La lèpre	37
<b>b. Les mycobactéries non tuberculeuses ou atypiques</b>	<b>38</b>
(i) Classification	39
(i.1) Vitesse de croissance	39
(i.2) Caractéristiques de pigmentation des colonies	39
(ii) Ecologie	39
(iii) Pouvoir pathogène	40
(iii.1) Mode de contamination humaine	40
(iii.2) Clinique	40
(iii.2.1) Les infections pulmonaires	40
(iii.2.2) Les adénites	40
(iii.2.3) Les lésions cutanées	40
(iii.2.4) Les infections généralisées ou disséminées	41
(iv) Identification	41
(iv.1) Antibiogramme	43
(v) Traitement	44
<b>C. Impact de VIH sur les infections mycobactériennes</b>	<b>44</b>
<b>D. Recherche de nouvelles molécules à effet anti mycobactérien</b>	<b>45</b>
1. Apports de la génomique des mycobactéries	45
2. Criblage d'une banque de composés chimiques	45
3. Synthèse de molécules chimiques	47

<b>4. Activité des extraits de plantes</b>	<b>48</b>
<b>5. Activité des principes actifs synthétisés à partir des invertébrés</b>	<b>48</b>
<b>6. Activité des principes actifs produit par les microorganismes</b>	<b>49</b>

## **DEUXIEME SECTION: PARTIE EXPERIMENTALE**

<b>Chapitre I : Isolement et identification de microorganismes sécrétant des substances à effet antimycobactérien</b>	<b>51</b>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

### **Matériel et méthodes**

<b>I. Matériel</b>	<b>52</b>
1. Echantillons	52
2. Souches bactériennes utilisées	53
3. Milieux de culture	54
<b>II. Méthodes</b>	<b>54</b>
<b>A. Isolement de microorganismes à effet antimycobactérien</b>	<b>54</b>
1. Isolement des microorganismes à croissance rapide susceptibles d'inhiber les mycobactéries	54
2. Activité antimycobactérienne des isolats	54
a. Test de l'activité sur support solide	54
b. Test de l'activité par la méthode des puits	55
3. Isolement des microorganismes à croissance lente susceptibles d'inhiber les mycobactéries	55
4. Spectre d'action des isolats	55
<b>B. Identification des isolats producteurs de substances à effet antimycobactérien</b>	<b>56</b>
1. Tests préliminaires	56

<b>a. Coloration de Gram</b>	<b>56</b>
<b>b. Test de croissance à 50°C</b>	<b>57</b>
<b>2. Identification moléculaire des isolats</b>	<b>57</b>
<b>a. Extraction de l'ADN génomique</b>	<b>57</b>
<b>(i) Lyse bactérienne par choc thermique</b>	<b>57</b>
<b>(ii) Extraction directe sur colonies</b>	<b>58</b>
<b>(iii) Extraction par la méthode classique</b>	<b>58</b>
<b>b. Amplification de l'ADNr 16 S par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)</b>	<b>58</b>
<b>(i) Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)</b>	<b>58</b>
<b>(i.1) Amorces utilisées</b>	<b>58</b>
<b>(i.2) Mélange réactionnel</b>	<b>59</b>
<b>(i.3) Amplification</b>	<b>59</b>
<b>(ii) Electrophorèse sur gel d'agarose</b>	<b>60</b>
<b>(ii.1) Préparation du gel</b>	<b>60</b>
<b>(ii.2) Dépôt des produits d'amplification</b>	<b>60</b>
<b>(ii.3) Migration</b>	<b>60</b>
<b>c. Séquençage</b>	<b>60</b>
<b>(i) Purification des produits PCR</b>	<b>60</b>
<b>(i.1) Elimination des amorces</b>	<b>60</b>
<b>(i.1.1) Fixation d'ADN</b>	<b>60</b>
<b>(i.1.2) Lavage</b>	<b>61</b>
<b>(i.1.3) Elution d'ADN</b>	<b>61</b>
<b>(ii) Séquençage</b>	<b>61</b>
<b>(ii.1) PCR de séquençage</b>	<b>62</b>
<b>(ii.1.1) Préparation du mélange réactionnel</b>	<b>62</b>
<b>(ii.1.2) Amplification</b>	<b>62</b>
<b>(ii.1.3) Purification des produits de PCR de séquençage</b>	<b>62</b>
<b>d. Analyse informatique des séquences</b>	<b>63</b>
<b>3. Tests biochimiques</b>	<b>63</b>

a. Activité amylasique	63
b. Réaction de VP (Voges-Proskauer)	64
c. Utilisation de citrate	64
d. Croissance à 6.5% de NaCl	65
e. Test de croissance à 55°C	65
f. Recherche de la pectinase	65
g. Mise en évidence de la production de pigments par le genre <i>Pseudomonas</i>	65
h. Mise en évidence de la fermentation de glucose et de lactose	66
i. Test de mannitol mobilité nitrate	66
j. Détection de l'oxydation et la fermentation des sucres	67
k. Test catalase	68
l. Galerie Api 20 E	68
(i) Application de la méthode	68
(i.1) Préparation de la galerie API	68
(i.2) Préparation de l'inoculum	68
(i.3) Inoculation de la galerie API	69
(i.4) Lecture	69
(ii) Interprétation	69
4. Test de confrontation	70

## **Résultats et discussions**

<b>A. Isolement de microorganismes à effet antimycobactérien</b>	<b>71</b>
1. Isolement des microorganismes à croissance rapide susceptibles d'inhiber les mycobactéries	71
2. Activité antimycobactérienne des isolats	71

3. Isolement des microorganismes à croissance lente susceptibles d'inhiber les mycobactéries	73
4. Spectre d'action des isolats	73
<b>B. Identification des isolats producteurs de substances à effet antimycobactérien</b>	74
1. Tests préliminaires	74
a. Coloration de Gram	74
b. Test de croissance à 50°C	76
2. Identification moléculaire des isolats	76
a. Amplification de l'ADNr 16 S par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	76
b. Purification des produits PCR	77
c. Séquençage	77
d. Analyse informatique des séquences	78
3. Tests biochimiques	84
4. Test de confrontation	90

<b>Chapitre II : Caractérisation et purification partielle des métabolites sécrétés par les souches: <i>Alcaligenes faecalis</i> ; <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Aerococcus sp.</i></b>	94
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## Matériel et méthodes

<b>A. Nature des principes actifs sécrétés par les souches</b>	95
1. Précipitation des principes actifs par le sulfate d'ammonium	95
2. Extraction des principes actifs par les solvants organiques	95
3. Cinétique de croissance et de production des métabolites antimycobactériens	96



4. Sensibilité des principes actifs aux protéases	96
5. Sensibilité des métabolites antimycoabctériens au traitement thermique	97
<b>B. Purification partielle des métabolites antimycoabactériens</b>	<b>97</b>
1. Dosage protéique	97
2. Electrophorèse des protéines précipitées sur gel de polyacrylamide	98
a. Préparation des gels	98
b. Dénaturation des échantillons	99
c. Migration électrophorétique	99
d. Coloration du gel	99
e. Décoloration du gel	99
3. Test d'élution des protéines	100
4. Chromatographie sur couche mince (CCM)	100
5. Test d'élution des bandes	101
6. Deuxième purification par CCM et test d'élution	101
7. Test de synergisme	101

## **Résultats et discussions**

<b>A. Nature des principes actifs sécrétés par les souches</b>	<b>103</b>
1. Extraction des principes actifs par le sulfate d'ammonium et par les solvants organiques	103
2. Cinétique de croissance et de production des métabolites antimycobactériens	105

a. Cinétique de croissance et de production des métabolites bioactifs chez <i>Aerococcus sp.</i>	105
b. Cinétique de croissance et de production des métabolites bioactifs chez <i>Alcaligenes faecalis</i>	106
c. Cinétique de croissance et de production du métabolite bioactif chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	107
d. Cinétique de croissance et de production du métabolite bioactif chez <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	108
3. Sensibilité des principes actifs aux protéases et au traitement thermique	109
<b>B. Purification partielle des métabolites antimycoobactériens</b>	113
1. Dosage protéique	113
2. Analyse des métabolites antimycoobactériens par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant	114
3. Test d'élution des protéines	115
4. Chromatographie sur couche mince (CCM)	116
5. Test d'élution des bandes	116
6. Deuxième purification par CCM et test d'élution	119
7. Test de synergisme	124



<b>Chapitre III : Etude préliminaire de l'impact de certains facteurs biotiques et abiotiques sur l'activité antimycoobactérienne de l'extrait d'<i>Alcaligenes faecalis</i></b>	126
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

### Matériel et méthodes

<b>A. Impact de lysozyme</b>	127
<b>B. Effet de pH</b>	127
<b>C. Effet de la bile</b>	128
<b>D. Influence des enzymes pancréatiques</b>	128
<b>E. Influence du peroxyde d'hydrogène</b>	129
<b>F. Interaction avec la rifampicine</b>	129

### **Résultats et discussions**

<b>A. Impact de lysozyme</b>	131
<b>B. Effet de pH</b>	131
<b>C. Effet de la bile</b>	132
<b>D. Influence des enzymes pancréatiques</b>	133
<b>E. Influence de peroxyde d'hydrogène</b>	134
<b>F. Interaction avec la rifampicine</b>	136

<b>Chapitre IV : Etude de mode d'action des principes bioactifs d'<i>Alcaligenes faecalis</i> sur les globules rouges humains, la paroi et la croissance mycobactérienne</b>	139
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

### **Matériel et méthodes**

<b>A. Etude de la toxicité de l'extrait sur les érythrocytes humains</b>	<b>140</b>
<b>B. Etude de l'effet des métabolites bioactifs sur la paroi mycobactérienne</b>	<b>140</b>
<b>C. Etude de mode d'action des métabolites</b>	<b>141</b>

## **Résultats et discussions**

<b>A. Etude de la toxicité de l'extrait sur les érythrocytes humains</b>	<b>142</b>
<b>B. Etude de l'effet des métabolites bioactifs sur la paroi mycobactérienne</b>	<b>143</b>
<b>C. Etude de mode d'action des métabolites</b>	<b>144</b>

<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>147</b>
--------------------------------------------	------------

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## **ANNEXES**

## **LEXIQUE**