

Liste des abréviations

AcOEt	Acétate d'éthyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BAAR	acido-alcool-résistants
BAW	n-Butanol/Acide acétique/eau
BCG	Vaccin Bilié de Calmette et Guérin
C.	Cistus
CCI	Chloroforme
CCM	chromatographie sur couche mince
cm	centimètre
DCM	Dichlorométhane
EMB	Ethambutol
ETH	Ethionamide
FQ	fluoroquinolone
g	gramme
HOAc	acide acétique
INH	isoniazide
ETH	éthionamide
M.	Mycobacterium
MDR	multi-drug resistances
MDR-TB	Tuberculose multi-résistante aux antibiotiques
MeOH	Méthanol
mg	Milligramme
min	Minute
mm	Millimètre
MS	Matière sèche
OMS	Organisation mondiale de la santé Réaction de
PCR	polymérisation en chaîne
PZA	Pyrazinamide
R _f	Rapport frontal
RIF	Rifampicine
rpm	Tour par minute
SNP	Single-Nucleotide Polymorphisms
TB	Tuberculose
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
XDR-TB	Tuberculose à résistance étendue aux antibiotiques
%	Pourcentage
µl	Microlitre

Liste des figures

Figure 1 :	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> colorées à la fuschine de Ziehl-Neelsen (1000x)	6
Figure 2 :	Image de <i>M. tuberculosis</i> par microscopie électronique à balayage (21228x)	8
Figure 3 :	Taxonomie des mycobactéries	10
Figure 4 :	Physiopathologie de l'infection par <i>M. tuberculosis</i> .	15
Figure 5 :	Radiographie d'un tuberculeux pulmonaire	18
Figure 6 :	Traitement de la tuberculose de l'adulte	20
Figure 7 :	Structure de la paroi des mycobactéries	21
Figure 8 :	<i>Cistus salvifolius</i>	27
Figure 9 :	<i>Cistus albidus</i>	28
Figure 10 :	<i>Populus alba</i>	29
Figure 11:	Partie aérienne des plantes étudiées	31
Figure12 :	Préparation des extraits aqueux et éthanoliqes	33
Figure 13 :	Système d'extraction au Soxhlet	36
Figure 14 :	Fractionnement de l'extrait de <i>Cistus salvifolius</i> par CCM	38
Figure 15 :	Purification de la fraction active de l'extrait de <i>Populus alba</i>	39
Figure16 :	Mise en évidence de l'activité antimycobactérienne de l'extrait de <i>Cistus salvifolius</i>	41
Figure 17 :	Evolution des diamètres d'inhibition en fonction du volume déposé de l'extrait éthanolique de <i>Populus alba</i> .	42
Figure 18 :	Evolution des diamètres d'inhibition en fonction du volume déposé de l'extrait éthanolique de <i>Cistus salvifolius</i> .	42
Figure19 :	Evolution des diamètres d'inhibition en fonction du volume déposé de l'extrait éthanolique de <i>Cistus albidus</i> .	43
Figure 20 :	Effets de la variation du volume d'extrait éthanolique de <i>Cistus salvifolius</i> sur la croissance de <i>M. aurum</i>	44
Figure 21 :	Variation des zones d'inhibition de <i>M. smegmatis</i> en fonction des solvants utilisés pour l'extraction de <i>Cistus salvifolius</i>	45
Figure 22 :	Localisation de la fraction active de l'extrait de <i>Populus alba</i>	46
Figure 23 :	Localisation des fractions actives de l'extrait de <i>Cistus salvifolius</i>	47
Figure 24 :	Localisation de la fraction active de l'extrait de <i>Cistus albidus</i>	48

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Estimation de la mortalité, la prévalence et l'incidence de la tuberculose (2009)	12
Tableau 2 :	Mécanismes de résistance aux antituberculeux de première ligne	23
Tableau 3 :	Espèces du genre <i>Cistus</i> ayant une activité antimicrobienne	26
Tableau 4 :	Etude de l'effet des différents extraits sur la croissance des mycobactéries	41
Tableau 5 :	Evaluation de l'effet antimycobactérien des plantes étudiées en fonction du solvant d'extraction utilisé	44
Tableau 6 :	Les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM de gel de silice	46
Tableau 7 :	Effet antimycobactérien de la fraction active de <i>Populus alba</i> .	47
Tableau 8 :	Effet antimycobactérien des fractions actives de l'extrait de <i>C. salvifolius</i> .	48
Tableau 9 :	Evaluation de l'effet antimycobactérien de la fraction active obtenue pour l'extrait de <i>C. albidus</i> .	49
Tableau 10 :	Mise en évidence des flavonoïdes et des tanins dans l'extrait brut et la fraction active de <i>Populus alba</i>	49
Tableau 11 :	Mise en évidence des flavonoïdes et tanins dans l'extrait brut et les fractions actives de <i>Cistus salvifolius</i>	50
Tableau 12 :	Mise en évidence des flavonoïdes et tanins dans l'extrait brut et la fraction active de <i>Cistus albidus</i> .	50
Tableau 1 :	Estimation de la mortalité, la prévalence et l'incidence de la tuberculose (2009)	12
Tableau 2 :	Mécanismes de résistance aux antituberculeux de première ligne	23
Tableau 3 :	Espèces du genre <i>Cistus</i> ayant une activité antimicrobienne	26
Tableau 4 :	Etude de l'effet des différents extraits sur la croissance des mycobactéries	41
Tableau 5 :	Evaluation de l'effet antimycobactérien des plantes étudiées en fonction du solvant d'extraction utilisé	44
Tableau 6 :	Les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM de gel de silice	46
Tableau 7 :	Effet antimycobactérien de la fraction active de <i>Populus alba</i> .	47
Tableau 8 :	Effet antimycobactérien des fractions actives de l'extrait de <i>C. salvifolius</i> .	48
Tableau 9 :	Evaluation de l'effet antimycobactérien de la fraction active obtenue pour l'extrait de <i>C. albidus</i> .	49
Tableau 10 :	Mise en évidence des flavonoïdes et des tanins dans l'extrait brut et la fraction active de <i>Populus alba</i>	49
Tableau 11 :	Mise en évidence des flavonoïdes et tanins dans l'extrait brut et les fractions actives de <i>Cistus salvifolius</i>	50
Tableau 12 :	Mise en évidence des flavonoïdes et tanins dans l'extrait brut et la fraction active de <i>Cistus albidus</i> .	50

Résumé

Evaluation de l'effet antimycobactérien des extraits de plantes d'origine Marocaine

La tuberculose est un problème majeur de santé publique dans le monde. C'est la principale cause de mortalité par maladie infectieuse. Avec un tiers de la population mondiale infecté, une personne meurt toutes les 15 secondes. La recrudescence de ce fléau est due principalement à l'apparition du SIDA et à l'émergence des souches multirésistantes et ultrarésistantes de *Mycobacterium tuberculosis*, d'où la nécessité de d'accentuer les efforts pour la recherche de nouvelles substances à effet antimycobactérien.

L'utilisation des plantes à des fins thérapeutiques est une pratique courante depuis des millénaires. Ce phénomène a eu un regain d'intérêt avec les premières recherches sur leurs propriétés antibactériennes. Notre travail consiste à mettre en évidence l'activité antimycobactérienne des plantes suivantes :

- *Populus alba*,
- *Cistus salvifolius*
- *Cistus albidus*.

Nous avons montré que les extraits aqueux et éthanolique des plantes étudiées possèdent une activité antimycobactérienne. Les résultats, obtenus par la méthode de disque, ont montré que cette activité est proportionnelle à la concentration des principes actifs.

La chromatographie sur couche mince a permis le fractionnement des extraits et l'identification des fractions actives.

L'étude phytochimique a montré que l'extrait de *Populus alba* contient les flavonoïdes mais non les tanins ; alors que les extraits des cistes contiennent ces deux produits.

Mots clés : *M. tuberculosis*, *Cistus salvifolius*, *Cistus albidus*, *Populus alba*, effet antimycobactérien, Antibiotique.

Sommaire

Introduction générale.....	4
Revue bibliographique	
I. Le genre Mycobacterium.....	5
1. Caractéristiques bactériologiques.....	5
2. Classification.....	6
3. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
a. Réservoir.....	7
b. Caractéristiques morphologiques.....	7
c. Caractéristiques culturaux.....	8
d. Autres mycobactéries tuberculeux.....	8
4. Mycobactéries atypiques.....	9
a. <i>Mycobacterium aurum</i>	10
b. <i>Mycobacterium smegmatis</i>	11
II. La tuberculose.....	12
1. Données épidémiologiques.....	13
a. Incidence mondiale.....	13
b. Incidence nationale.....	14
c. Causes majeurs de recrudescence de la tuberculose.....	15
2. Infection par <i>M. tuberculosis</i>	15
a. Tuberculose pulmonaire.....	15
b. Tuberculose extrapulmonaire.....	15
3. Diagnostic de la tuberculose pulmonaire active.....	16
a. Bactériologie.....	17
a-1. L'examen microscopique.....	17
a-2. Culture.....	17
b. Identification directe par méthode moléculaire.....	17
c. Examen radiologique	17
4. La prévention vaccinale de la tuberculose.....	18
a. Vaccination par le BCG.....	18
b. Nouvelles stratégies vaccinales.....	18
5. Traitement de la tuberculose.....	19
6. Résistance de <i>M. tuberculosis</i> aux antibiotiques.....	21

a. Résistance naturelle.....	21
b. Résistance acquise.....	22
c. Multirésistante et ultrarésistante.....	23
III. Plantes médicinales étudiées pour leur effet antimycobactérien.....	25
1. Le genre <i>Cistus</i>	25
a. Activité antimicrobienne du genre <i>Cistus</i>	26
b. <i>Cistus salvifolius</i>	27
c. <i>Cistus albidus</i>	27
2. Le genre <i>Populus</i>	28
a. Caractéristiques générales.....	28
b. Utilisation industrielle de <i>Populus</i>	28
c. <i>Populus alba</i>	29
d. Caractéristiques botaniques de <i>Populus alba</i>	29
e. Propriétés thérapeutiques de <i>Populus alba</i>	30
Matériel et méthodes	
I. Mycobactéries testées.....	31
II. Culture des souches mycobactérienne.....	31
III. Matériel végétal.....	31
IV. Screening de l'activité antimycobactérienne des extraits de plantes.....	32
1. Préparation des extraits aqueux et éthanoliques.....	32
2. Mise en évidence de l'activité antimycobactérienne.....	33
3. Etude du pouvoir antimycobactérien des extraits par la méthode de disque.....	34
V. Méthode bioautographique.....	35
1. Préparation des extraits avec différents solvants organiques.....	35
2. Extractions de <i>Populus alba</i> par des solvants à polarité croissante.....	35
3. Extraction de <i>Cistus salvifolius</i> et <i>Cistus albidus</i> par macération.....	36
4. Sélection des extraits qui possèdent la meilleure activité.....	37
5. Fractionnement des extraits par CCM.....	37
6. Localisation des fractions actives.....	38
VI. Purification des fractions actives.....	38
VII. Tests phytochimiques.....	39
1. Mise en évidence des flavonoïdes.....	39

2. Mise en évidence des tanins.....	40
-------------------------------------	----

Résultats et discussion

I. Screening de l'activité antimycobactérienne des extraits de plantes.....	41
1. Mise en évidence de l'activité antimycobactérienne.....	41
2. Etude du pouvoir antimycobactérien des extraits par la méthode de disque.....	42
II. Méthode bioautographique.....	44
1- Sélection des extraits qui possèdent la meilleure activité.....	44
2- Chromatographie sur couche mince (CCM).....	46
3- Localisation des fractions actives.....	46
4- Purification des fractions actives.....	46
III. Tests phytochimiques.....	49
1. <i>Populus alba</i>	49
2. <i>Cistus salvifolius</i>	50
3. <i>Cistus albidus</i>	50

Introduction Générale

La tuberculose constitue encore un problème grave et même de gravité croissante dans beaucoup de pays économiquement faible ; elle affecte la santé et le bien-être social de millions de personnes.

Avec la mise en place de moyens préventifs comme le vaccin BCG (1921), et la découverte de nombreux antibiotiques efficaces (1944-1965), l'éradication de la tuberculose était envisageable pour la fin du 20ème siècle. Malheureusement, force est de constater que cette maladie demeure toujours d'actualité, avec près de 9,2 millions de personnes touchées à travers le monde en 2006 selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

L'OMS considère la tuberculose comme une priorité de santé publique à l'échelle mondiale. Les statistiques et les estimations sont alarmantes. C'est la première cause de mortalité par maladie infectieuse. Dans le tiers de la population mondiale infecté, une personne meurt toutes les 15 secondes. En faisant une projection sur une décennie, 30 millions de personnes risquent d'en mourir.

L'aggravation de cette situation est étroitement liée à l'émergence de souches multirésistantes (MDR-TB) et ultrarésistantes (XDR-TB) aux antibiotiques. En outre, la recrudescence de cette maladie ces dernières années, pourrait s'expliquer par le mouvement des populations, leur appauvrissement, par la propagation du VIH et par un traitement non accessible à la majorité (OMS, 2008).

Par conséquent, face à ce problème international de santé publique, il est indispensable de s'orienter vers de nouveaux moyens préventifs et thérapeutiques afin de lutter contre cette maladie. C'est dans ce contexte que s'inscrit le présent travail qui vise à mettre en évidence de nouvelles substances d'origine végétale actives contre les mycobactéries.

Revue Bibliographique

1. Le genre *Mycobacterium*

1. Caractéristiques bactériologiques

Les mycobactéries appartiennent au genre *Mycobacterium*, de la famille des Mycobacteriaceae, de l'ordre des Actinomycétales et de la classe des Actinobactéries (Shinnick et al.,1994). Morphologiquement les mycobactéries sont des bacilles qui mesurent de 2 à 5µM de longueur et de 0.2 à 0.5µM de largeur. Ces bacilles sont immobiles, non sporulés, ni capsulés, parfois ramifiés. Suivant l'espèce mycobactérienne, les colonies, isolées sur un milieu de culture donné, sont dysgoniques (petite taille) ou eugoniques (grande taille), lisse ou rigoureuses, pigmentées ou pas. Elles survivent en milieu aérobie ou micro-aérobie (mais pas anaérobie). Les mycobactéries sont des bacilles dits acido-alcool-résistants (BAAR) car ils sont mis en évidence par la coloration à la fuschine de Ziehl-Neelsen, où ils apparaissent rouges sur fond bleu (Figure 1). Elles sont mal colorées par la coloration de Gram mais elles ont été classées parmi les bactéries Gram-positives (Coetzer J.A.W. et al.,2004).

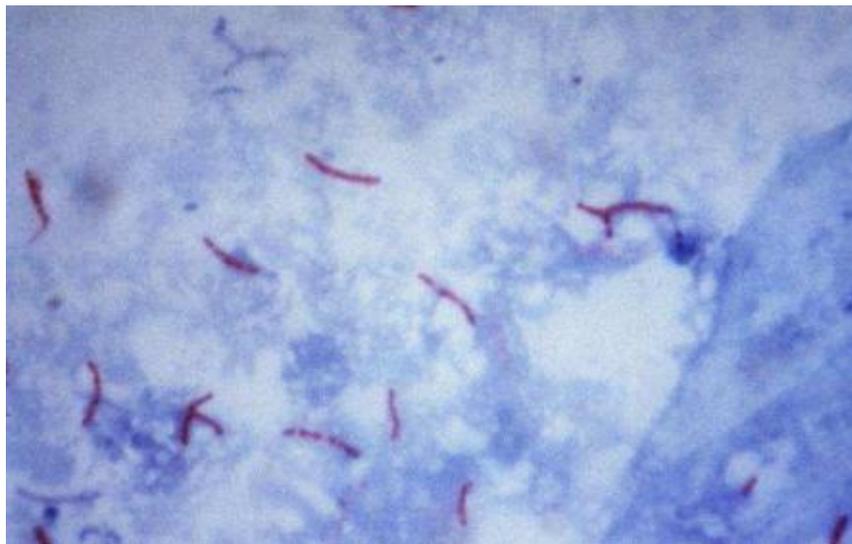


Figure 1 : *Mycobacterium tuberculosis* colorées à la fuschine de Ziehl-Neelsen (1000x)¹

2. Classification

Actuellement le genre *Mycobacterium* comporte 148 espèces. Selon leur importance clinique elles sont réparties en trois groupes:

- ☞ Les mycobactéries pathogènes strictes (*M.tuberculosis*, *M.Leprae*, *M.ulcerans* ou *M.marinum*...).
- ☞ Les mycobactéries opportunistes (*M.avium*, *M.marinum*, *M.Kansasii*,...)
- ☞ Les mycobactéries saprophytes ou commensales (*M.smegmatis*, *M.phlei*, *M.gastri*, *M.gordonae*,...).

Les deux dernières catégories sont qualifiées de mycobactéries atypiques (Coetzer J.AW. et al., 2004) ; (Bénet J.J, 2008). Un classement peut aussi être réalisé en fonction de leur vitesse de croissance. Ainsi, on distingue :

- ☞ Les mycobactéries à croissance rapide comme *M.smegmatis* (2 à 3 heures de temps de génération) ;
- ☞ Les mycobactéries à croissance lente comme *M.tuberculosis* ou *M.bovis* (de 24h à 2 semaines de temps de génération).

L'énorme intérêt suscité par le bacille de koch a favorisé une subdivision taxonomique des mycobactéries basée uniquement sur le rapport de ces bactéries avec *M. tuberculosis*. De ce fait on distingue : *M. tuberculosis* et *M. atypiques*.

3. *Mycobacterium tuberculosis*

a. Réservoir

M. tuberculosis, l'agent étiologique de la tuberculose humaine a été découvert en 1882 par Robert Koch d'où son nom "bacille de koch" ou (BK). C'est une bactérie stricte de l'homme, mais il est capable d'infecter certaines espèces animales proches de l'homme (chien et plus rarement chat). Généralement on ne le trouve pas dans la nature en dehors des produits contaminés par l'homme infecté. (Grosset *et al.*, 1989).

b. Caractéristiques morphologiques

M. tuberculosis est un bacille fin, légèrement incurvé, de 2 à 5µm de longueur sur 0,2 à 0,4µm de largeur. Ses extrémités sont arrondies (Figure 2). Il est immobile, non capsulé, asporulé et se présente en petits amas ou sous forme isolée.

Les bacilles tuberculeux sont très sensibles à certains agents physiques : chaleur, lumière solaire, rayons X ou UV, résistent bien au froid et à la dessiccation et peuvent demeurer vivants plusieurs jours dans des produits contaminés tels que des produits d'expectoration. Ils sont peu sensibles à des nombreux agents tels que les acides et bases dilués, en revanche, peuvent être tués rapidement par l'alcool dilué. (Pichard. D. et al 2002) ; (Flandrois. JP, 1997)

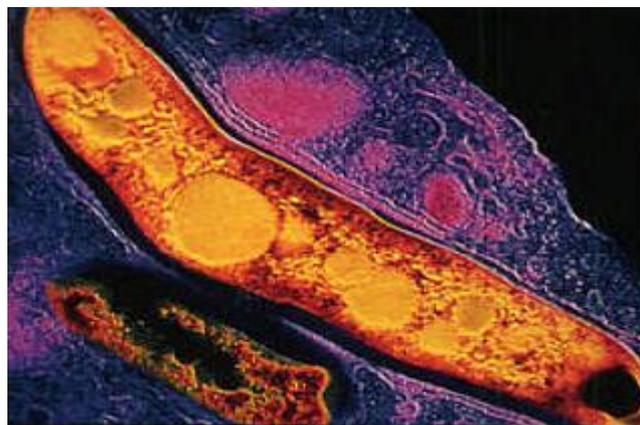


Figure 2 : Image *M. tuberculosis* par microscopie électronique à balayage (21228x)²

c. Caractéristiques culturaux

M. tuberculosis se caractérisent par son exigence de culture et leur lenteur de croissance (temps de division, 20 heures en moyenne). La température optimale de croissance est de 35 à 37°C. Le pH optimum est de 6,8 à 7. L'aspect des colonies est rugueux.

M. tuberculosis est une bactérie aérobie stricte ; de ce fait elle se multiplie mieux dans les tissus pulmonaires (en particulier au niveau de l'apex où les concentrations en oxygène sont élevées) que dans les organes plus profonds. (Harshey et al., 1977).

d. Autres mycobactéries tuberculeux

Dans certains cas, la tuberculose humaine peut être causée par d'autres mycobactéries :

- ☞ ☐ *Mycobacterium africanum* : agent responsable, le plus souvent, de la tuberculose en Afrique de l'ouest (Bonard *et al.*, 2000).
- ☞ *Mycobacterium bovis* : agent responsable de la tuberculose chez les bovins et parfois chez l'homme (O'Reilly et Daborn, 1995).
- ☞ *Mycobacterium microti*, *caprae* et *pinnipedii* : agents responsables de la tuberculose chez les rongeurs, les chèvres et les mammifères marins (Prodinge *et al.*, 2002).
- ☞ *Mycobacterium canetti* : agent responsable de tuberculose humaine (en particulier à Djibouti) (V. Soolingen *et al.*, 1997, Koeck *et al.*, 2005).

Toutes ces mycobactéries, capables de causer la tuberculose, sont regroupées sous la dénomination « mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* » (Figure 3). L'homologie entre leurs ADN est très élevée (>99,9%) (Garnier *et al.*, 2003) ; (Smith *et al.*, 2009).

4. Mycobactéries atypiques

Les mycobactéries non tuberculeuses sont appelées mycobactéries atypiques. Ces mycobactéries sont omniprésentes dans l'environnement. Dans des circonstances particulières (immunodépression, lésion, maladie préexistante...), certaines d'entre elles peuvent devenir pathogènes pour l'homme. On parle dans ce cas d'infection opportuniste appelée aussi mycobactériose. Notons par exemple :

- ☞ *Mycobacterium avium-intracellulare* : agent responsable de maladies respiratoires
- ☞ *Mycobacterium ulcerans* : agent responsable de l'ulcère de Buruli (nécroses chroniques de la peau)
- ☞ *Mycobacterium marinum* : agent responsable d'infections cutanées torpides (maladie des aquariums)
- ☞ *Mycobacterium abscessus* : agent responsable d'infections cutanées et pulmonaires (notamment chez les patients mucoviscidosiques) (Jonsson *et al.*, 2007)

En général, on classe dans une troisième catégorie, *M. leprae* et *M. lepraemurium*, les agents de la lèpre chez l'homme et le rat, caractérisés par leur incapacité à être cultivés *in vitro* (Figure 3).

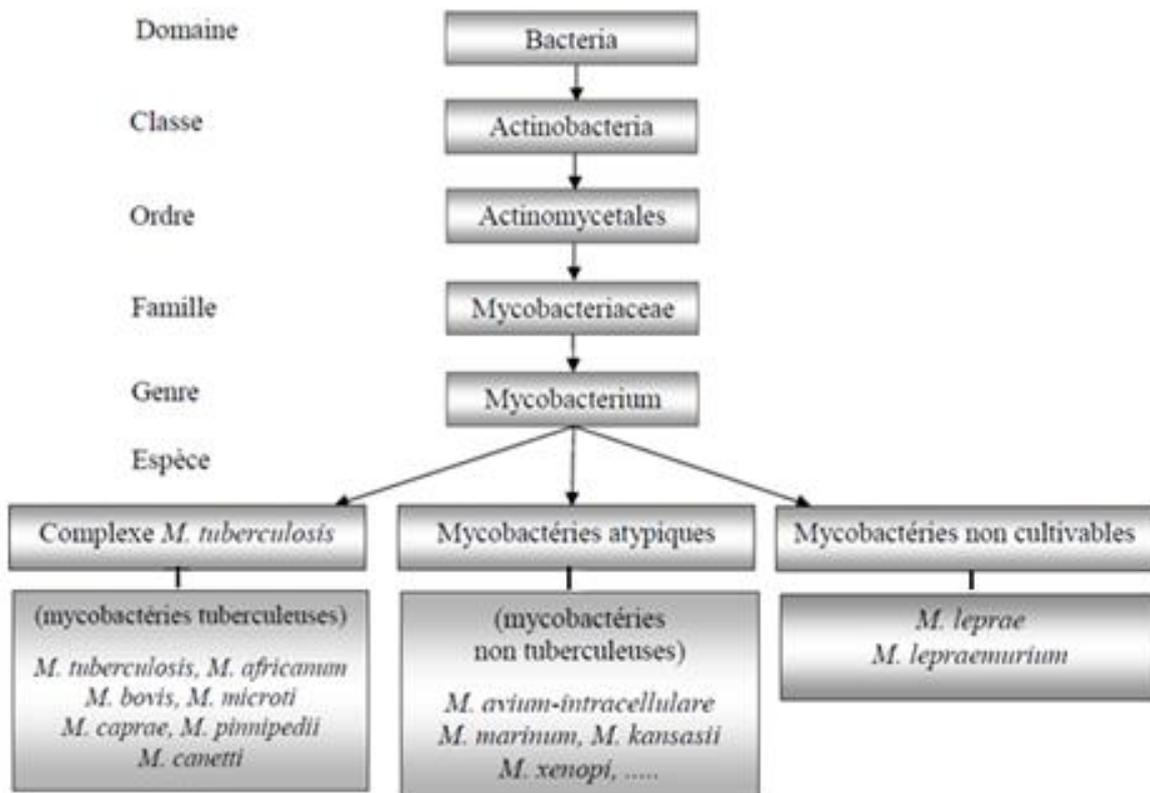


Figure 3 : Taxonomie des mycobactéries (Shinnick et Good, 1994)

Dans le présent travail, les études se sont menées sur deux mycobactéries atypiques : *Mycobacterium smegmatis* et *Mycobacterium aurum*.

a. *Mycobacterium aurum*

M. aurum est une mycobactérie à croissance rapide, de réservoir tellurique. Forme des colonies scotochromogènes (pigmentées), de couleur orange remarquable. *M. aurum* pousse à 37°C mais pas à la 45 °C. (Tsukamura.M.,1966)

M. aurum présente la même sensibilité aux antibiotiques que *M. tuberculosis* ; c'est pour cette raison qu'il est préférable de l'utiliser pour le criblage de nouvelles molécules antituberculeuses. (Grosset J *et al.*, 1989)

b. Mycobacterium smegmatis

M. smegmatis a été la seconde mycobactérie identifiée après *M. tuberculosis*. C'est un bacille à croissance rapide, de réservoir essentiellement hydro-tellurique, où il survit dans des conditions de privation nutritive et de température extrêmes.

M. smegmatis est une bactérie de l'environnement ; non pathogène pour l'homme. C'est ce qui amène les microbiologistes spécialisés dans l'étude des mycobactéries à l'utiliser lors de travaux expérimentaux, afin de diminuer le risque de transmission au personnel des laboratoires et de surmonter la contrainte du temps qui s'oppose au cours de l'étude des mycobactéries à croissance lente. Ce microorganisme a été largement utilisé comme modèle pour étudier la biologie des autres mycobactéries pathogènes comme *M. tuberculosis*

Généralement, les antituberculeux de première ligne (isoniazide, rifampicine, pyrazinamide) sont inactifs sur les mycobactéries à croissance rapide. Néanmoins *M. smegmatis* est sensible à l'éthambutol (Wallace RJ et al.,1991). Donc de point de vue sensibilité/résistance *M. smegmatis* peut être considéré comme un modèle représentatif pour l'évaluation de l'effet antituberculeux de certaines molécules d'origine naturel ou chimique.

II. La tuberculose

1. Données épidémiologiques

La tuberculose (TB) est une maladie très ancienne dont les premières traces furent mises en évidence sur des momies égyptiennes. Le déclin progressif de la tuberculose dans les pays industrialisés ne survient qu'à la moitié du XX^{ème} siècle grâce à l'amélioration de l'hygiène de vie associée à la vaccination par le BCG (vaccin mis au point par Calmette et Guérin en 1921) ainsi qu'à l'utilisation des antibiotiques (streptomycine en 1944, isoniazide en 1952, pyrazinamide en 1954, et enfin l'éthambutol et la rifampicine en 1962 et 1963, respectivement).

Actuellement, la tuberculose reste la première cause de mortalité due à un agent infectieux unique *Mycobacterium tuberculosis*. Avec encore en 2007, plus de 9 millions de nouveaux cas et près de 2 millions de décès, soit un décès toutes les 15 secondes en moyenne (OMS, rapport 2009).

a. Incidence mondiale

L'OMS estime que nombre de cas tuberculeux le plus important s'enregistre dans la région de l'Asie-Est (2008), avec 35% de l'incidence mondiale.

En Afrique, le taux estimatif d'incidence par habitant est presque deux fois plus élevé qu'en Asie du Sud-est avec près de 340 cas pour 100 000 habitants. Cette région compte le nombre le plus important de décès (1,7 million en 2009). (Tableau 1)

Tableau 1 : Estimation de la mortalité, la prévalence et l'incidence de la tuberculose (2009)

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

¹Incidence: nouveaux cas survenant pendant une période déterminée.

²Prévalence: nombre de cas existant dans la population à un moment déterminé.

En 2008, l'incidence estimative de la tuberculose par habitant était stable ou en régression dans les six Régions de l'OMS. Cependant, la diminution du nombre de cas est compensée par la croissance démographique. Par conséquent le nombre de nouveaux cas survenant chaque année continue d'augmenter au niveau mondial et en particulier dans les régions OMS de l'Afrique, de la Méditerranée orientale et de l'Asie du Sud-est.

Au cours de la dernière décennie, le nombre de tuberculeux dans le monde a augmenté de 20%. L'OMS estime que le nombre de décès causés par la tuberculose va croître pour atteindre les 5 millions en 2050. (3)

b. Incidence nationale

La tuberculose constitue un problème majeur de santé publique au Maroc. En 2007, **25 562** nouveaux cas ont été dépistés, soit une incidence de l'ordre de 82 nouveaux cas pour 100.000 habitants. 12.739 sont des cas de tuberculose pulmonaire à microscopie positive, soit une incidence annuelle de 38 nouveaux cas pour 100 000 habitants.

- ☞ 70% des cas sont identifiés dans ces zones les plus urbanisées et les Plus peuplées. Les données de la surveillance montrent que 70% des cas de tuberculose ont un âge compris entre 15 et 45 ans,
- ☞ 80% ont un âge inférieur à 45. L'âge moyen des cas notifiés est de l'ordre de 34 ans.
- ☞ 59 % des cas enregistrés sont du genre masculin et 41% du genre féminin.
- ☞ Le taux de létalité chez les malades tuberculeux en cours du traitement est actuellement de 2%, avec des variations de 1 à 4% selon les régions. (4)

2. Causes de la recrudescence de la tuberculose dans le monde

Cette recrudescence de la tuberculose que l'OMS observe depuis les années 1990 est le résultat d'un nombre important d'effets combinés (Koumba, 2010):

☞ *Les changements démographiques* : Les régions du globe les plus touchées sont également celles où la croissance démographique est la plus élevée. Dans ces populations on estime à 75% l'augmentation du nombre de cas dans la décennie à venir.

☞ *L'expansion de l'épidémie du SIDA* : Le VIH ; porte ouverte à la tuberculose, accélère sa progression et sa propagation, et tous deux forment une association meurtrière.

☞ **L'appauvrissement de certaines populations** : La plus grande majorité des personnes souffrant de tuberculose ne dispose pas d'infrastructures sanitaires accessibles à tous. Il en résulte un mauvais suivi du traitement d'où l'apparition de l'émergence de bacilles résistants cause de certains échecs thérapeutiques.

☞ **Les mouvements de population** Dans les pays développés où l'incidence de la tuberculose est faible ; le risque de l'augmentation du nombre de cas de tuberculose est lié entre autres à l'immigration.

☞ **La résistance multi-drogues** L'une des causes majeures de cette nouvelle avancée de l'épidémie de tuberculose est l'émergence de souches multirésistantes de *M. tuberculosis* (MDR-TB).

L'incidence d'une souche résistante peut s'effectuer de deux manières :

- ✓ **Multirésistante primaire** : à la suite d'une infection par un bacille de Koch multirésistant chez un patient n'ayant jamais reçu d'antibiotique auparavant.
- ✓ **Multirésistance acquise ou secondaire** : lorsqu'un traitement inadéquat ou mal suivi entraîne chez un patient initialement infecté par une souche sensible, une sélection de mutants résistants.

☞ **L'inefficacité croissante du vaccin BCG** :

Le BCG est un vaccin paradoxal dans la mesure où il se trouve être à la fois le plus répandu au niveau mondial et celui dont l'efficacité est la plus controversée. Il reste l'un des plus mal connus, quant à son mode d'action dans la prévention des infections à mycobactéries, essentiellement tuberculeuse.

3. Infection par *M. tuberculosis*

a- Tuberculose pulmonaire

La tuberculose est principalement une infection pulmonaire qui débute généralement par l'inhalation d'aérosols contenant des bacilles tuberculeux.

L'agent infectieux *M. tuberculosis* parvient jusqu'aux alvéoles pulmonaires où les cellules immunitaires de l'individu infecté, notamment les macrophages, vont le phagocyter. Néanmoins, *M. tuberculosis*, possède de nombreux dispositifs pour échapper aux agressions du macrophage et survivre au sein même des cellules immunitaires. Ainsi, un individu réagira de trois manières différentes face à une infection de germes tuberculeux, en fonction de son âge et de l'état de son système immunitaire (Figure 4) (Kaufmann et McMichael, 2005) :

☞ Premier cas : le système immunitaire attaque l'infection et le bacille tuberculeux est éradiqué, il s'agit d'un cas rare, voire inexistant.

☞ Deuxième cas: le système immunitaire est débordé par l'infection, la tuberculose se déclare chez l'individu infecté. Il s'agit du cas typique pour les sujets immunodéficients, séropositifs ou soumis à certains traitements médicaux.

☞ Troisième cas: l'infection est ici comprise par le système immunitaire dans des structures complexes multicellulaires « les granulomes ». L'individu ne développe pas la maladie immédiatement, on parle ici de « primo-infection » et de « bacilles dormants ». Il s'agit du cas le plus fréquent, il survient pour environ 90% des personnes contaminées. Mais certains facteurs, comme par exemple une réinfection ou une immunodépression passagère, peuvent déstabiliser l'équilibre entre la charge bactérienne et le système immunitaire. Dans ce cas les structures de confinement mis en place par le système immunitaire ne sont plus en mesure de circonscrire l'infection, la tuberculose se déclare, c'est la phase de réactivation. Cette particularité de *M. tuberculosis* de pouvoir entrer dans une phase dite de « dormance » participe à sa large dissémination dans le monde.

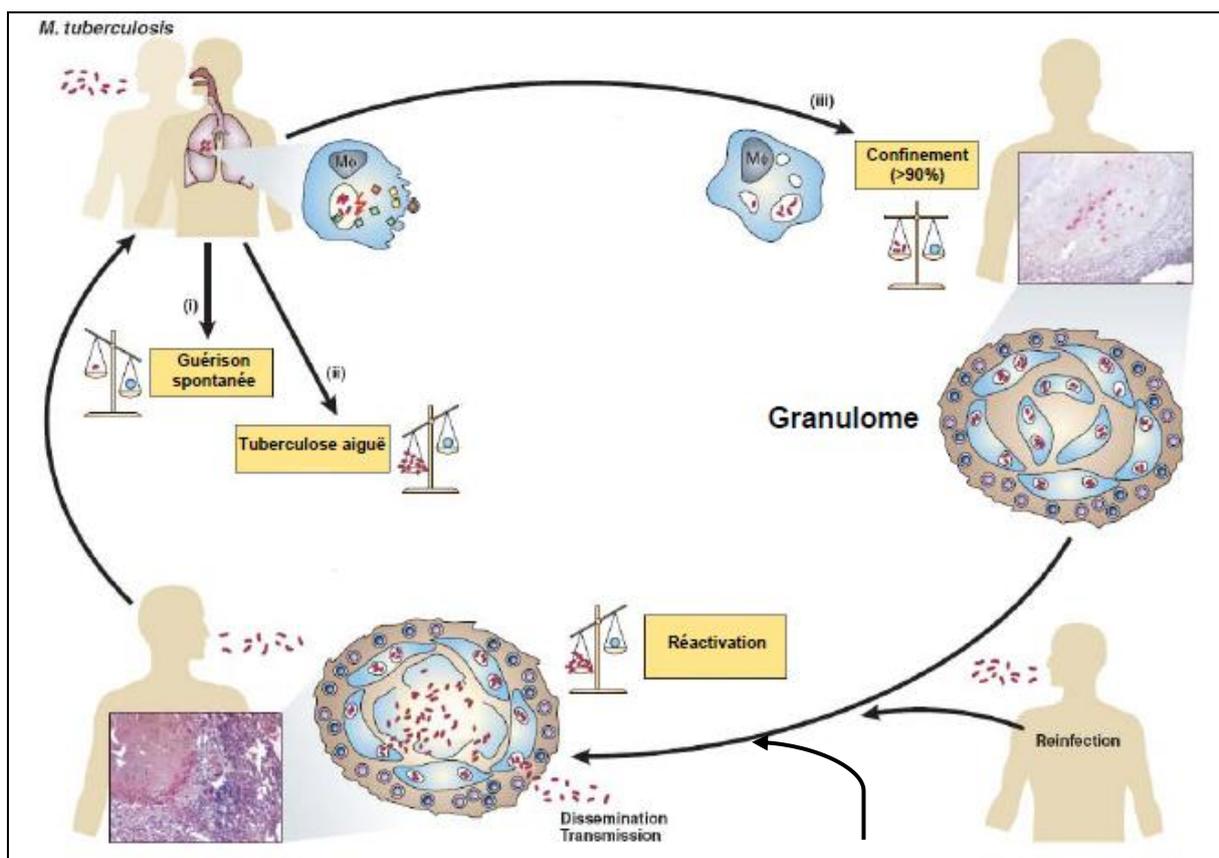


Figure 4 : Physiopathologie de l'infection par *M. tuberculosis*.
(D'après Kaufmann et Mc Michael 2005)

La tuberculose pulmonaire 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.

b- Tuberculose extrapulmonaire

Dans moins de 10% des cas de tuberculose, on peut observer des formes extra-pulmonaires provoquées par une dissémination hématogène des bacilles. Ces formes de tuberculose entraînent généralement des lésions fermées et peu riches en bacilles. Quand la tuberculose pulmonaire est accompagnée d'une atteinte hématogène et hépatique, on parle de tuberculose miliaire. La forme de tuberculose la plus dangereuse est méningée. Elle est due à la présence de *M. tuberculosis* dans le liquide céphalo-rachidien.

Les associations du VIH (Virus d'Immunodéficience Humaine) avec *M. tuberculosis*, *M. avium*, ou certaines mycobactéries opportunistes à croissance rapide forment des combinaisons extrêmement mortelles (Corti *et al.*, 2009). En affaiblissant les défenses immunitaires, le VIH multiplie par 30 le risque de développer la tuberculose (Goletti *et al.*, 1996).

4. Diagnostic de la tuberculose pulmonaire active

Le diagnostic de tuberculose repose sur des critères bactériologiques (cas confirmés) ou sur des critères cliniques et radiologiques (cas suspects ou non confirmés). Les symptômes et les signes de la tuberculose dépendent de la localisation et de l'extension de la maladie et diffèrent en fonction du stade évolutif.

La preuve de la maladie tuberculeuse est apportée par la mise en évidence des mycobactéries. La mise en évidence peut être directe, par examen microscopique de matériel coloré (expectorations, matériel de ponction), et culture (méthodes traditionnelles ou rapides), ou indirecte, par la détection de la présence d'ADN ou d'ARN mycobactérien (techniques d'amplification). (Zellweger JP., 2007)

a. Bactériologie

a-1. L'examen microscopique

L'examen microscopique peut être effectué soit directement sur le produit pathologique soit après fluidification et décontamination. Il consiste à regarder au microscope un échantillon de crachats étalé sur une lame de verre (frottis) et coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen. Si par cette méthode l'on détecte des bacilles (BAAR), on dit que le patient souffre d'une tuberculose à frottis positifs. L'examen microscopique des crachats est le seul moyen de confirmer le diagnostic de tuberculose dans la plupart des pays économiquement faibles.

a-2. Culture

Quel que soit le résultat de l'examen microscopique, les échantillons seront ensuite mis en culture, soit sur un milieu traditionnel à base d'œuf, (par exemple le milieu de Löwenstein ou d'Ogawa) ou à base d'agar, soit en milieu liquide, soit encore dans un milieu spécifique permettant le dépistage de la croissance bactérienne par la libération d'un marqueur radioactif ou coloré (technique Bactec et dérivés).

Selon la technique de culture employée, la preuve de la présence de mycobactéries viables sera apportée en deux à huit semaines. Si la culture est positive, on pourra alors procéder à la détermination du type de la mycobactérie (tuberculeuse ou non tuberculeuse). L'identification et la culture des mycobactéries doivent être obligatoirement suivies d'un test de sensibilité aux antituberculeux majeurs.

b. Identification directe par méthode moléculaire

Actuellement 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). Par contre elles ont une sensibilité et une spécificité excellentes lors de leur utilisation à partir d'une culture.

c. Examen radiologique

Permet de mettre en évidence les formes pulmonaires de la maladie. Les anomalies radiologiques peuvent être très variables. On observe en général la présence d'infiltrats (zones blanches sur la radiographie) (Figure 5).

Le diagnostic radiologique de la tuberculose n'est pas fiable, car l'aspect des images radiographiques n'est pas spécifique de la tuberculose.



Figure 5: radiographie d'un tuberculeux pulmonaire⁵

5. La prévention vaccinale de la tuberculose

a- Vaccination par le BCG

Le vaccin BCG (Bacille bilié de Calmette et Guérin) est encore à ce jour le seul moyen de prévention par vaccination disponible contre la tuberculose. Il s'agit d'un vaccin bactérien vivant qui dérive d'une souche atténuée de *M. bovis* isolée par le microbiologiste français Edmond Nocard, puis cultivée à partir de 1908 par les bactériologistes français Albert Calmette et Camille Guérin.

De façon surprenante, le degré de protection varie selon les souches, les populations et le mode d'administration de 0 à 80% (Brewer, 2000). Cependant, la protection est plus importante en ce qui concerne les formes méningées de la tuberculose chez les jeunes enfants (70 à 80%) (Trunz *et al.*, 2006) et (Walker *et al.*, 2006). Plusieurs raisons peuvent expliquer l'efficacité variable de la vaccination BCG :

→ La souche vaccinale d'origine aurait muté et ce de façon différente selon les différents pays producteurs du vaccin,

→ *M. tuberculosis* et *M. bovis* ne disposent pas strictement du même répertoire antigénique. Par exemple, le pyrazinamide, antibiotique actif sur *M. tuberculosis* est inactif sur *M. bovis* qui présente une résistance naturelle à cet antibiotique.

Dans certaines régions tropicales, les populations sont exposées à des mycobactéries environnementales non pathogènes présentant des motifs antigéniques communs avec la souche vaccinale. (Oettinger, T. *et al* ; 1999)

b- Nouvelles stratégies vaccinales

La nécessité de développer de nouveaux vaccins pour poursuivre et renforcer la prévention contre la tuberculose est primordiale. Deux principaux axes de recherche sont suivis :

a- La première stratégie serait le remplacement de la souche vaccinale BCG par des souches plus efficaces comme par exemple des souches recombinantes de *M. bovis* ou d'autres souches mycobactérienne atténuées;

b- La seconde voie serait d'améliorer la protection immunitaire du BCG conférée à l'enfant pour qu'elle persiste à l'âge adulte ; notamment par l'utilisation de sous-unités vaccinales fortement immunogènes. (Pym et al., 2003)

6. Traitement de la tuberculose

Le traitement de la tuberculose latente (bacilles intracellulaires) et celui de la tuberculose active (bacilles extracellulaires) doivent être envisagés comme deux thérapeutiques distinctes. Actuellement le protocole comporte toujours une association de plusieurs antibiotiques afin de prévenir la sélection de souches résistantes. Le traitement actuel de la tuberculose active pulmonaire ou extra-pulmonaire suit un schéma thérapeutique de 6 mois. Il comprend deux phases successives :

- Une phase initiale intensive de 2 mois avec une antibiothérapie associant isoniazide, rifampicine, éthambutol et pyrazinamide (Figure 6).
- La phase secondaire, dite de consolidation associe l'isoniazide et la rifampicine pour une durée complémentaire de 4 mois. Ces antituberculeux sont des antibiotiques dits de première ligne.

A ces antibiotiques de première ligne, sont associés d'autres antibiotiques dits de deuxième ligne parmi lesquels : l'amikacine, la capréomycine, la kanamycine, la dicyclosérine, l'éthionamide (*ETH*), l'acide p-aminosalicylique (*PAS*) et la lévofloxacine. (Leger M, 2010)

Ces antituberculeux de deuxième ligne sont utilisés pour traiter des infections causées par des souches résistantes aux antibiotiques de première ligne. Cependant ils présentent des effets secondaires assez fréquents, ce qui rend le traitement très difficile. (Koumba. G. Y, 2010)

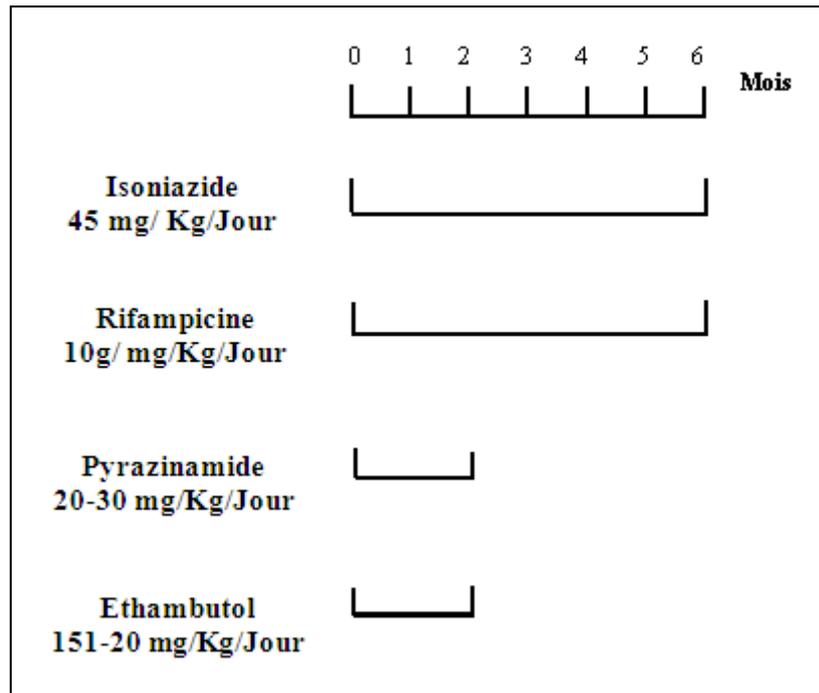


Figure 6: Traitement de la tuberculose de l'adulte⁶

7. Résistance de *M. tuberculosis* aux antibiotiques

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.

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 « antituberculeux ». De plus, pour ces antibiotiques, *M. tuberculosis* peut parfois présenter des résistances acquises (Cambau *et al.*, 2003).

a. 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. 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'éthambutol, l'acide p-aminosalicylique... (Veziris *et al.*, 2005).

Le haut niveau de résistance naturelle des mycobactéries peut être expliqué par la faible perméabilité de la paroi mycobactérienne (Jarlier et Nikaido, 1994), constituée par trois éléments majeurs associés de manière covalente : le peptidoglycane, l'arabinogalactane et les acides mycoliques (Figure7) 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.

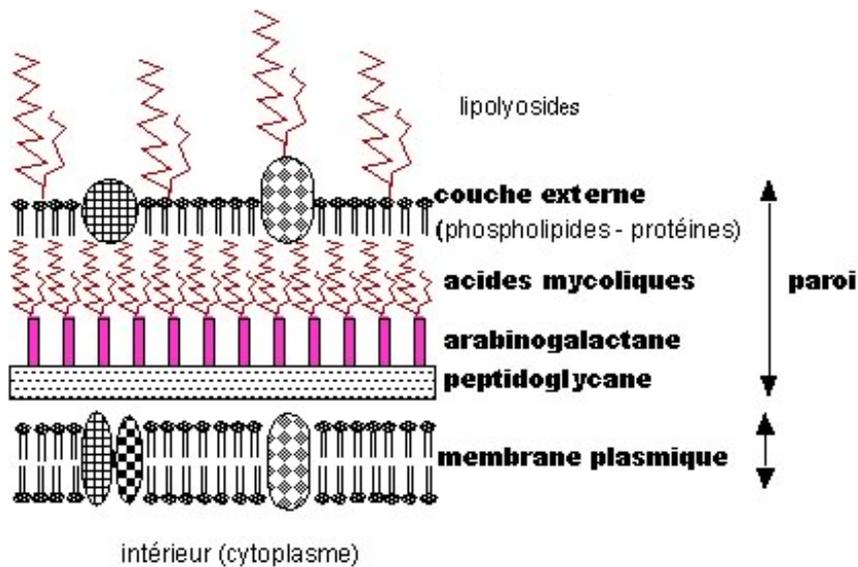


Figure 7 : structure de la paroi des mycobactéries ⁷

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).

b. 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 (SNP), 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.

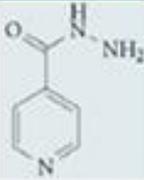
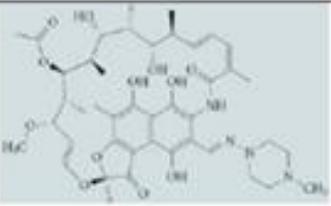
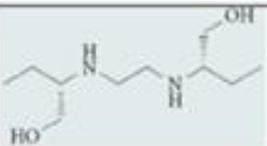
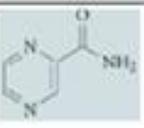
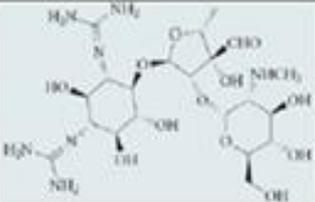
Parmi les principales mutations impliquées dans la résistance de *M. tuberculosis* aux antibiotiques (Tableau 2) on cite:

➔ Mutations dans les gènes codant pour les protéines cibles de l'antibiotique, diminuant l'affinité de la cible pour cet antibiotique (RIF, EMB, FQ,...)

➔ Mutations dans les gènes codant pour une enzyme impliquée dans l'activation de l'antibiotique, empêchant son passage de la forme pro-drogue à la forme active (INH, PZA,...) (Veziris *et al.*, 2005, Somoskovi *et al.*, 2001)

➔ Mutations dans les gènes codant pour une région génomique régulatrice provoquant la surexpression de la cible de l'antibiotique.

Tableau 2 : Mécanismes de résistance aux antituberculeux de première ligne (Sacchetti et al., 2008)

Antibiotique	Structure chimique	Mécanisme d'action et cible	Mutations associées à la résistance
Isoniazide		Inhibe la synthèse des acides mycoliques : Cible primaire InhA (énoyl-ACP réductase) Cibles secondaires : MbaA	<i>katG</i> (catalase- peroxydase requis pour l'activation de l'INH), locus <i>inhA</i>
Rifampicine		Inhibe la transcription : sous-unité β de l'ARN polymérase	<i>rpoB</i> (ARN pol β)
Ethambutol		Inhibe la synthèse de l'arabinogalactane : arabinosyltransférase (EmbB)	<i>embB</i>
Pyrazinamide		Inhibe FAS-I	<i>pncA</i> (pyrazinamidase)
Streptomycine		Inhibe la synthèse des protéines : sous-unité 30S du ribosome	<i>rpsL</i> (sous-unité 30S), <i>rrs</i> (ARNr 16S)

c. Multirésistante et ultrarésistante

Une tendance alarmante et une source croissante d'inquiétude pour la santé publique résident dans l'émergence de souches résistantes à plusieurs antibiotiques (Chan et Iseman, 2008). Une tuberculose multirésistante (MDR-TB) se définit par une résistance à au moins deux antituberculeux majeurs que sont l'isoniazide (INH) et la rifampicine (RIF). 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).

Depuis quelques années, l'apparition dans le monde entier de souches XDR (« extensively drug-resistant ») est devenue préoccupante (Shah *et al.*, 2007) ; (Jain et Dixit, 2008). Après plusieurs essais de définitions 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 et Bishai, 2009).

III- Plantes médicinales étudiées pour leur effet antimycobactérien

L'utilisation des plantes à des fins thérapeutiques est une pratique courante depuis des millénaires. Ce phénomène a eu un regain d'intérêt avec les premières recherches sur les propriétés antibactériennes des plantes pour tenter d'apporter une justification scientifique à ces pratiques empiriques.

Ces dernières années, plusieurs molécules isolées des plantes sont devenues des médicaments efficaces: citons par exemple le taxol issu de *Taxus baccata* L. (*Taxaceae*) pour ses propriétés anticancéreuses remarquables (cancer de l'ovaire et cancer du sein) et de l'artémisinine isolée de *Artemisia annua* L. (*Asteraceae*) pour ses propriétés antipaludiques (Hostettmann, 2001).

1- Le genre *Cistus*

Les Cistacées sont des plantes herbacées ou ligneuses comprenant près de cent espèces réparties sur le pourtour du bassin méditerranéen. (Roustand T, 1984).

Les espèces du genre *Cistus* sont présentes surtout dans les terrains chauds, ensoleillés, protégés des intempéries (Berthier. A, 1976). Elles possèdent des feuilles opposées, sans stipule, ovales, allongées et généralement recouvertes de poils étoilés qui créent des espaces isolants empêchant la transpiration et permettant une adaptation à une relative sécheresse. (Paolini.J, 2005)

Les *Cistes* sont des espèces pionnières des environnements dégradés en raison de perturbations humaines. Ainsi ils s'installent souvent après les incendies et constituent les premiers arbustes à émerger après le feu, permettant la germination des autres plantes. (Blanquet.B.J et Bolos O, 1950)

Il existe une corrélation étroite entre les espèces de cistes et la nature du sol. Ainsi, *Cistus albidus* est réputé calcicole (poussent facilement sur un terrain calcaire), alors que *Cistus salvifolius* sont plutôt calcifuges. (Coulouma A, 1994)

a- Activité antimicrobienne de certaines espèces du genre *Cistus*

Les espèces du genre *Cistus* ont souvent été utilisées comme plantes médicinales pour leur propriétés antimicrobiennes (Chinou et al., 1994; Demetzos et al., 1999), antifongique (Bouamama et al., 2005), antivirales, anti tumorales (Dimas et al., 2000) et anti-inflammatoires (Yesilada et al., 1997; Singh et al., 1998; Demetzos et al., 2001).

Ces résultats obtenus ont encouragé les chercheurs à mener des études sur les activités biologiques des espèces de ce genre.

Une activité antibactérienne significative a été observée pour l'extrait éthanolique des feuilles de *Cistus salvifolius* vis-à-vis *Listeria monocytogène* et d'autres microorganismes pathogènes (Bayoub et al., 2009).

Des études menées sur l'extrait des feuilles des espèces *C. villosus* et *C. monspeliensis* ont montré une activité inhibitrice de ces plantes contre des microorganismes pathogènes impliqués dans beaucoup d'infections et de dermatoses (Bouamama et al., 2005).

La mise en évidence de l'effet inhibiteur de *Cistus* contre ces microorganismes (tableau 3), fournit une base scientifique à l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle.

Tableaux 3 : Espèces du genre *Cistus* ayant une activité antimicrobienne

Plante	Partie utilisée	Effet inhibiteur contre	Références
<i>C. salvifolius</i>	Feuilles	<i>Listeria monocytogène</i> <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Acinetobacter baumannii</i>	Bayoub et al., 2010
<i>C. villosus</i> <i>C. monspeliensis</i>	Feuilles	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus hirea</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i> <i>Candida krusei</i> <i>Candida glabrata</i>	Bouamama et al., 2005

En plus de leurs propriétés médicinales et thérapeutiques le genre *Cistus* constitue une source potentielle de produits à forte valeur ajoutée. Il s'agit des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation des parties aérienne de la plante. L'étude de la composition chimiques des huiles essentielles des cistes est effectuées dans le cadre de plusieurs recherche scientifiques, et économiques en vue de son valorisation par utilisation dans divers secteurs (cosmétique, aroma-thérapeutiques, parfumerie...). (Paolini.J, 2005)

b- Cistus salvifolius

Est une plante présente dans toute la région méditerranéenne. C'est un sous-arbrisseau mesurant de 30 à 80 cm avec des rameaux verts, diffus et couverts de poils. Les feuilles opposées, ovales, velues sont courtement pétiolées, et les fleurs qui apparaissent en mai et juin sont formées de pétales blancs et mesure entre 4 et 5 cm. Le fruit est une capsule anguleuse à 5 loges (Figure 8). (Paolini.J, 2005 et Gamisans J *et al.*, 1993)

En médecine traditionnelle *Cistus salvifolius* est utilisé pour le traitement de la fièvre, la diarrhée, le rhumatisme, les dermatoses, et d'autres maladies inflammatoires. Dans certains pays méditerranéens les infusions des feuilles de *Cistus salvifolius* sont utilisées pour le traitement du cancer. (Guvenc, A. *et al.*, 2005)



Figure 8: *Cistus salvifolius*⁹

c- Cistus albidus

Couramment appelé Ciste blanc ou Ciste cotonneux. C'est un arbrisseau de 40 cm à 1 m d'hauteur. Les feuilles d'un beau gris sont sessiles (sans pédoncules), de forme allongée-ovales, opposées et très velues sur les 2 faces. Les fleurs de 4 à 6 cm de long, d'un rose lumineux. Les sépales, au nombre de 5, sont largement ovales, et velus. Les fleurs sont formées de 5 pétales à aspect chiffonné, de couleur rose et peu odorante. Le fruit quant à lui, se présente sous forme de capsule ovoïde à 5 loges (Figure 9). (Paolini.J, 2005)

En médecine traditionnelle le décocté des feuilles de *Cistus albidus* est utilisé pour apaiser les douleurs gastriques et comme hypoglycémiant. En cataplasme, on les emploie contre les abcès. Les feuilles sont également utilisées, en infusion dans du thé, comme digestif (Lahsissene .H. et al., 2009).



Figure 9: *Cistus albidus*⁹

2- Le genre *Populus*

a. Caractéristiques générale du genre *Populus*

Le peuplier appartient à la famille des salicacées qui est constituée de trois cents espèces ligneuses pionnières, se caractérise par une importante variabilité morphologique, capable de s'installer sur des milieux très perturbés. Cette capacité est assurée par une importante production de graines (Durand.T, 2009). Les peupliers sont des arbres à feuilles généralement caduques, alternes, simples et à longs pétioles. L'aire naturelle de répartition des espèces du genre *Populus* est très vaste. Dans l'hémisphère nord, elle s'étend du cercle équatorial jusqu'aux limites nordiques de croissance des arbres. Dans l'hémisphère sud, leur distribution est éparpillé principalement dans les zones de plantations d'Amérique du sud, d'Afrique du sud et de Nouvelle-Zélande. (Paul Roiron, 2004)

Au Maroc, le peuplier est représenté à l'état spontané par trois espèces :

- ☞ Le peuplier blanc (*Populus alba*)
- ☞ Le peuplier noir (*Populus nigra*)
- ☞ Le peuplier de l'Euphrate (*Populus euphratica*)

b. Utilisation industrielle de *Populus*

La vitesse de croissance particulièrement élevée de *Populus*, assure une production annuelle de près de 1,5 millions de m³ de bois d'œuvre ; faisant de lui la deuxième essence feuillue en terme de volume de bois récolté après le chêne. Près de 80 % de cette production est destinée au déroulage et au sciage pour la confection d'emballages dits légers (contreplaqués, panneaux de particules, allumettes) ou lourds (palettes, caisses, menuiserie) (Bonhomme.L, 2009).

c. *Populus alba*

Le peuplier blanc (*Populus alba*) est une espèce eurasiatique qui abonde dans les zones humides d'Europe centrale et méridionale, ainsi qu'en Afrique du Nord. Il croît également en Asie occidentale et centrale, dans l'Himalaya et dans l'ouest de la Chine. (Paul Roiron, 2004) *Populus alba* supporte les hautes températures et un certain niveau d'alcalinité du sol ou de l'eau. C'est ainsi qu'il se trouve presque dans tout le Maroc dans les vallées à sol frais et à fertilité moyenne; il existe même au Sahara et ne dépasse guère l'altitude de 2000 mètres. (Sbay.H. *et al.*, 2003).

d. Caractéristiques botaniques de *populus alba*

Les feuilles sont Caduques, cotonneux au revers (ce qui donne un aspect blanc à l'arbre), vert foncé sur la face supérieure. La formes des feuilles différent en fonction leur âge ; elles sont plus ou moins dentelées et sinueuses et plus elles sont jeunes, plus les bords sont ronds. Elles possèdent 3 à 5 lobes et mesurent de 6 à 12 cm de long.



Figure 10 : *Populus alba*¹⁰

Les rameaux de *Populus alba* sont recouverts d'un duvet blanc et cotonneux. En vieillissant, ils deviennent gris et noueux. Les fruits sont matures au mois de juin, entourés d'un duvet blanc que le vent emporte facilement. L'écorce est d'abord lisse et gris blanchâtre, puis fissurée et plus foncée en vieillissant. (Durand.T, 2009)

e. Propriétés thérapeutiques de Populus alba

Les principes actifs du genre *Populus* sont connus anciennement en médecine traditionnelle pour avoir différentes activités biologiques telles que des propriétés fongicides, anti oxydantes, anti-tumorales, antiseptiques et antivirales. (Greenaway et al., 1991)

Populus alba est utilisé traditionnellement pour ses propriétés dépuratives pour désinfecter les lésions de la peau (Adam *et al.*, 2009), traiter l'herpès et la décadence des dents (Wamidh H. *et al.*, 2010). Des activités antibactériennes et antifongiques des extraits éthanoliques des feuilles de *Populus alba*, vis-à-vis un grand nombre de germes ont été clairement mise en évidence (Al-Hussaini .R.*et al.*, 2011).

L'extrait dérivé de la fraction chloroforme des fleurs de *Populus alba* a montré une activité antiprolifératives contre des lignées de cellules cancéreuses (Wamidh .H. *et al.*,2010).

Matériel et Méthodes

I. Mycobactéries testées

- *Mycobacterium smegmatis* MC² 155, mycobactérie atypique non pathogène et à temps de génération d'environ 3 h.

- *Mycobacterium aurum* A+, mycobactérie non pathogène à temps de génération d'environ 6h. (Grosset *et al.*, 1989)

II. Culture des souches mycobactériennes

Le milieu LB (Pour Lysogeny broth ou Milieu Luria-Bertani) est le milieu de culture utilisé pour la croissance des souches mycobactériennes.

La composition du milieu de culture LB liquide est la suivante :

- 10 g de peptone
- 5 g d'extrait de levures
- 10 g de NaCl
- 1000 ml d'eau distillée

Pour préparer le milieu LB solide on ajoute 15 g d'agar par litre. Les milieux sont autoclavés à 120°C pendant 20min.

Matériel végétal

Notre étude expérimentale s'est effectuée sur des extraits de *Populus alba*, *Cistus salvifolius* et *Cistus albidus*. Le matériel végétal est constitué uniquement de la partie aérienne de la plante (Figure 11). La récolte des plantes est faite dans la région "d'ourdzarh", près de Tawnat. Après séchage, les feuilles ont été broyées pour obtenir une poudre fine, prête pour la préparation des extraits.



Figure 11 : Partie aérienne des plantes étudiées

III. Screening de l'activité antimycobactérienne des extraits de plantes

La mise en évidence du pouvoir antimycobactérien des extraits aqueux et éthanoliques des plantes a été effectuée par deux méthodes :

- ☞ Culture des mycobactéries sur le milieu LB agar, préparé avec les extraits de chacune des plantes.
- ☞ Evaluation de l'effet antimycobactérien en fonction de la concentration de l'extrait par méthode de diffusion sur gélose ou méthode de disque. (SQALLI .H.H *et al.*, 2007)

1. Préparation des extraits aqueux et éthanoliques

Différents types d'extraits ont été préparés à partir de la poudre des feuilles des plantes (Figure 2): *Populus alba*, *Cistus salvifolius* et *Cistus albidus*.

➤ **L'infusion** est une méthode d'extraction des principes actifs ou des arômes d'un végétal par dissolution dans l'eau initialement bouillant que l'on laisse refroidir. Le terme désigne aussi les boissons préparées par cette méthode, comme les tisanes, le thé par exemple. Les infusées des trois plantes étudiées ont été réalisées par macération aqueuse de 8 g de poudre des feuilles des plantes dans 50 ml d'eau pendant une heure. Puis cette solution a été filtrée.

➤ **La décoction** consiste à réaliser l'extraction à température d'ébullition du solvant. Cette opération s'oppose à la macération dans laquelle le solvant d'extraction est froid. Les décoctés des trois plantes ont été préparés par ébullition de 8 g de poudre des feuilles dans 50 ml d'eau distillé pendant 15 min, ensuite des décoctés refroidis ont été filtrés.

➤ **La macération** est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante.

Une macération à l'éthanol a été effectuée en utilisant 8 g de poudre des feuilles des plantes étudiées. L'extrait a été incubé pendant 24 h à l'ombre. Après filtration, le solvant a été évaporé sous vide au Rotavapor à 38°C. L'extrait a été ensuite récupéré dans 5 ml d'eau distillée stérile pour les extraits de *Cistus salvifolius* et *Cistus albidus*. Pour *Populus alba* l'extrait a été récupéré dans 5ml d'éthanol.

Ces extraits ont été ensuite centrifugés (10 min à 3000 rpm) puis les surnageants ont été récupérés.

Remarque : Le pH de tous les extraits a été neutralisé avant l'évaporation.

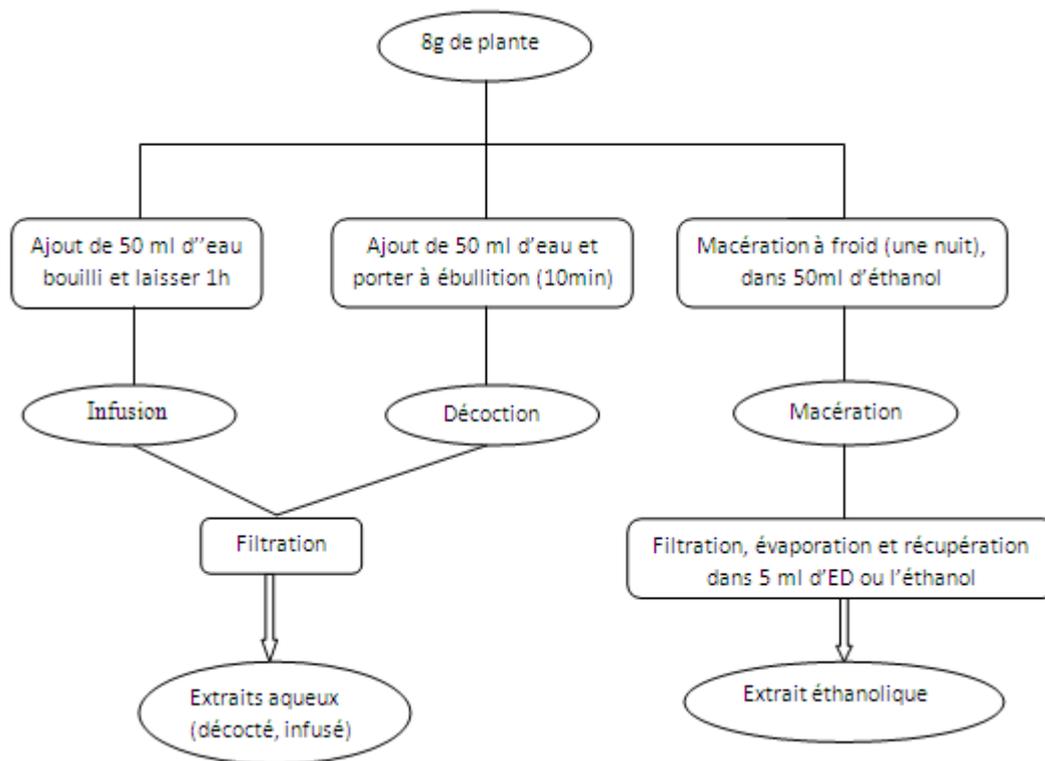


Figure 12 : Préparation des extraits aqueux et éthanoliques

2. Mise en évidence de l'activité antimycobactérienne

Les mélanges extraits de plantes- LB agar ont été préparés comme suit :

- Préparation de 50 ml d'un milieu de culture LB-agar ;
- Incorporation de l'extrait aqueux ou éthanolique dans le milieu LB de façon à obtenir une concentration finale de 160 mg/ml ;
- Ecoulement du mélange extrait-LB agar dans les boîtes de pétri stériles (quatre répétitions) ;
- Préparation d'un témoin (LB dépourvu d'extrait) ;
- Préincubation des boîtes à 37 °C, pendant une nuit ;
- Etalement de 100 µl d'une culture de *M. smegmatis* ou de *M. aurum* (environ 10^6 UFC/ml) sur des boîtes contenant le milieu LB-agar ;
- Incubation à 37°C ;
- Lecture des résultats de façon journalière, pendant 6 jours.

3. Étude du pouvoir antimycobactérien des extraits par la méthode de disque

La méthode de disque ou méthode de diffusion sur gélose, est une méthode qualitative qui permet d'identifier l'existence ou non d'une éventuelle propriété antibiotique. Elle consiste à déposer sur des disques de papier Wathman des volumes bien déterminés des substances à tester. L'effet antimycobactérien se traduit par la présence d'une zone ou auréole d'inhibition autour de la zone de dépôt.

Au cours de cette étude, cette méthode a été utilisée pour :

- ☞ Évaluer l'effet antimycobactérien des plantes en fonction du volume d'extrait déposé ;
- ☞ Sélectionner l'extrait qui possède la meilleure activité.

Les étapes de la méthode de disque sont :

- Préparation des disques : des disques de 6mm de diamètre préparés à partir du papier wathman, ont été autoclavés pendant 30 min à 120°C ;
- Dépôts des disques : quatre disques stériles, ont été déposés par boîte de Pétri.

Les boîtes utilisées contiennent le milieu LB-agar, préalablement inoculées avec les mycobactéries testées ;

- Dépôts de l'extrait : les extraits éthanolique de différents volumes (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, et 40 µl) ont été déposés indépendamment sur les disques ;
- Incubation des boîtes préparées à 37°C ;
- Lecture des résultats après 24h et 48h.

Les témoins utilisés correspondent à deux disques : un imbibé avec 40 µl d'eau distillé stérile, (pour les *Cistes*) et un autre imbibé avec 40 µl d'éthanol (pour *Populus alba*).

IV. Méthode bioautographique

La méthode bioautographique est une méthode d'analyse qualitative (Valgas *et al.*, 2007).

Elle consiste à localiser la fraction active de l'extrait de plante séparé par CCM. Cette méthode se divise en quatre étapes principales :

- ☞ Préparation des extraits des plantes ;
- ☞ Sélection de l'extrait qui possède la meilleure activité ;
- ☞ Réalisation d'une CCM pour la séparation des extraits ;
- ☞ Application de la suspension de *M. smegmatis* sur la plaque CCM, pour localiser la fraction active.

1- Préparation des extraits avec différents solvants organiques

a. Extractions de *Populus alba* par des solvants à polarité croissante

Nous avons utilisé cette méthode pour réaliser différents extraits de *populus alba*. Le corps de l'extracteur, contient une cartouche en cellulose remplie de matériel végétal. Cette cartouche est fixée sur un réservoir de solvant (ballon) et est surmonté d'un réfrigérant (Figure 13). Le solvant est vaporisé puis condensé tout en restant en contact avec le matériel végétal. La solution collectée dans le ballon s'enrichit de plus en plus en soluté à chaque cycle d'extraction et le matériel végétal est toujours en contact avec du solvant fraîchement distillé. L'extraction est terminée lorsque le solvant d'extraction devient clair (Houghton *et al.*, 1998).

Pour cette méthode les conditions opératoires utilisées sont :

- Quantité de matériel végétal : 60 g de poudre de plante
- Volume de solvant : 650 ml
- Température: 38 °C
- Solvants utilisés :
 - ✓ Premier solvant : l'hexane (délipidation)
 - ✓ Deuxième solvant : le dichlorométhane (extraction des composés les moins polaires)
 - ✓ Troisième solvant : l'acétate d'éthyle (extraction des composés moyennement polaires)
 - ✓ Quatrième solvant : méthanol (extraction des composés très polaires)

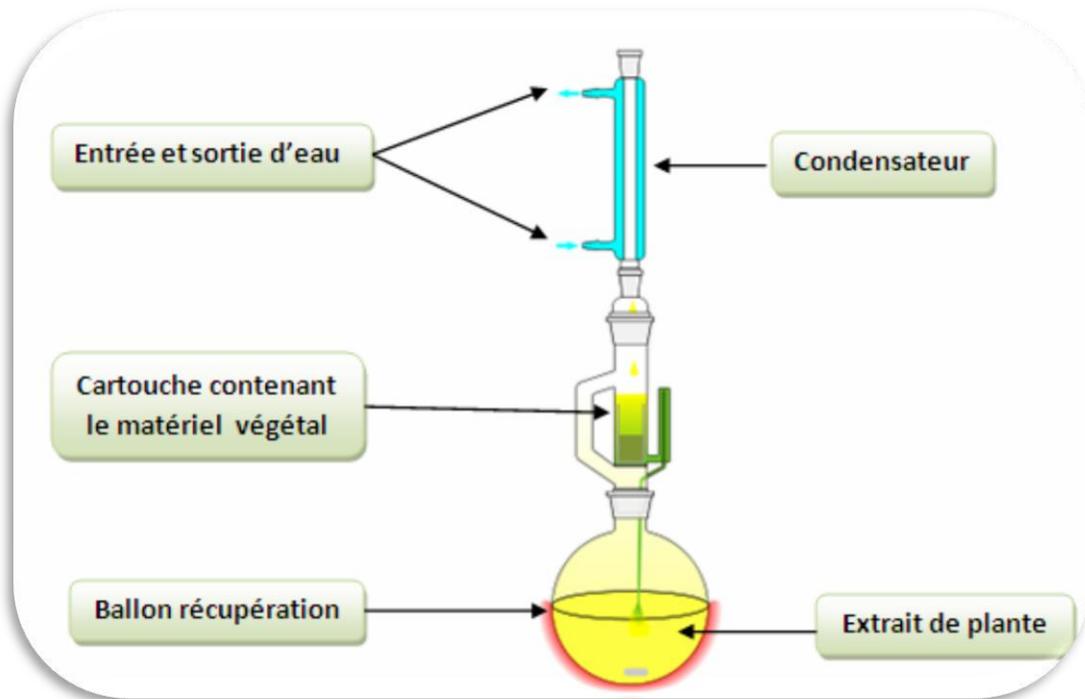


Figure 13 : Système d'extraction au Soxhlet

b. Extraction de *Cistus salvifolius* et *Cistus albidus* par macération

L'extraction des *Cistes* par macération s'effectue selon les étapes suivantes :

- 8 g de poudre plante est macéré dans 100 ml d'hexane (macération une nuit) ;
- Filtration sous vide avec une pompe à eau en utilisant un filtre de papier wattman ;
- Récupération du résidu dans 50 ml du solvant d'extraction (macération une nuit) ;
- Filtration sous vide ;
- Récupération du filtrat ;
- Evaporation du solvant aux rotavapor ;
- Récupération du résidu dans le minimum du solvant d'extraction.

Les solvants d'extraction utilisés sont :

- ✓ L'éthanol
- ✓ Le méthanol
- ✓ L'acétate d'éthyle

2- Sélection des extraits qui possèdent la meilleure activité

Les extraits précédemment préparés ont été testés pour leur activité antimycobactérienne. Un volume de 10 μ l de chaque extrait a été déposé sur disque. Le test a été effectué sur *M. smegmatis*. Le témoin correspond à un disque imbibé de 10 μ l du solvant d'extraction.

3- Fractionnement des extraits par chromatographie sur couche mince

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée pour la séparation et de l'identification des métabolites. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption et s'applique aux molécules pures, aux extraits (mélange complexes de métabolites) et aux échantillons biologiques (Figure 14).

La mise en œuvre d'une CCM nécessite la préparation du matériel suivant :

✓ **Cuve chromatographique** : c'est un récipient en verre fermé par un couvercle maintenu étanche.

✓ **Phase stationnaire** : c'est une couche d'absorbant étalé uniformément sur un support en aluminium ou en plastique. L'absorbant que nous avons utilisé est le gel de silice. Les plaques utilisées, ont des dimensions de 12 cm sur 6 cm.

✓ **Phase mobile** : constituée par un mélange de solvants organiques. Pour cela, différents systèmes de solvants ont été essayés pour définir ceux qui donnent les meilleures séparations.

✓ **Echantillons à analyser** : Les échantillons à analyser ont été appliqués en petits spots sous forme de points sur l'absorbant. Pour chaque spot un volume de 14 μ l d'extrait a été déposé.

La plaque a été déposée verticalement dans la phase mobile. Une fois le développement du chromatogramme effectué, les plaques ont été séchées près de la flamme pour éliminer toute trace de solvant.

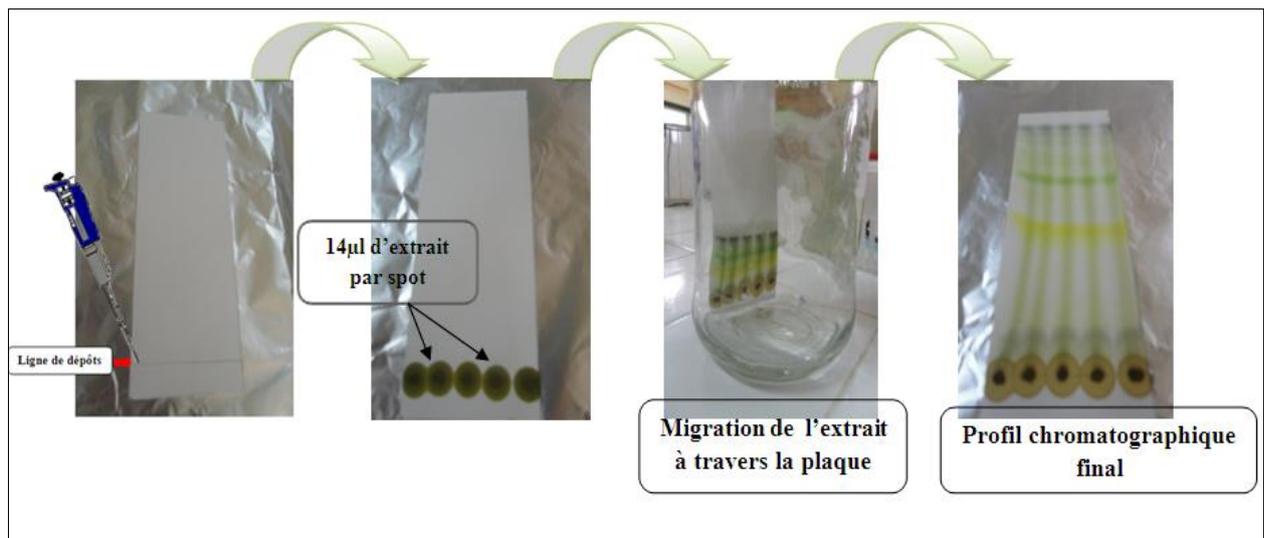


Figure 14 : Fractionnement de l'extrait de *Cistus salvifolius* par CCM

4- Localisation des fractions actives responsables de l'effet antimycobactérien

La méthode utilisée est la suivante :

- On transfère aseptiquement la plaque CCM précédemment préparée dans une boîte stérile.
- On ajoute l'inoculum de *M. smegmatis* à 50 ml de milieu LB solide (température d'environ 45°C), et on mélange doucement.
- On verse aseptiquement la suspension préparée de façon à couvrir le chromatogramme d'une fine couche de gélose.
- On incube les boîtes à 37°C pendant 24 h.

La lecture des résultats consiste en la détection des zones d'inhibition de *M. smegmatis*. Pour chaque zone, on détermine le coefficient de migration (Rf) de la bande correspondante.

V. Purification des fractions actives

Cette étape consiste à vérifier et déterminer exactement la bande du chromatogramme responsable de l'inhibition (Figure 15). La purification est réalisée de la façon suivante :

- La silice se trouvant dans la zone d'inhibition est grattée, mise dans un tube eppendorf, puis éluée dans un 1ml du solvant d'extraction initial ;
- Le mélange précédent est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min ;
- Le surnageant récupéré et concentré par évaporation du solvant ;
- L'extrait obtenu, ayant un volume d'environ 20 µl, a été testé pour sa capacité à inhiber *M.smegmatis*.

Le témoin correspondant a été réalisé de la même façon à partir d'une bande inactive.

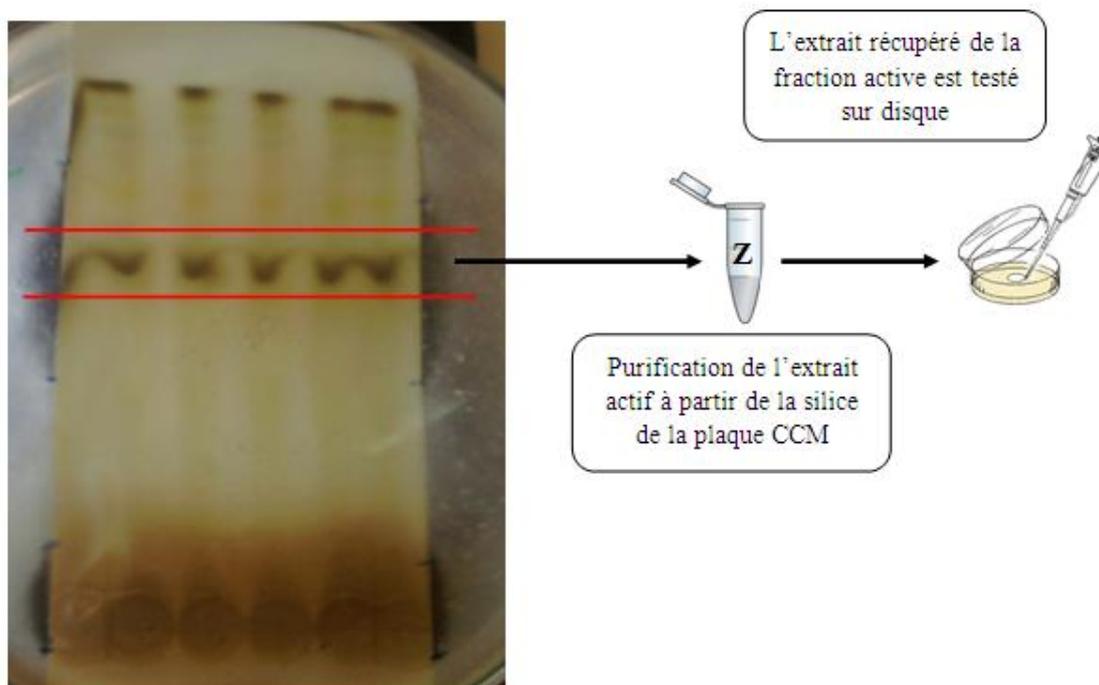


Figure 15 : Purification de la fraction active de l'extrait de *populus alba*

VI. Tests phytochimiques

Les réactions de mise en évidence des flavonoïdes et des tanins ont été effectuées pour les extraits bruts des plantes étudiées ainsi que pour les bandes actives purifiées. Ces dernières ont été purifiées de la même façon que précédemment.

1. Mise en évidence des flavonoïdes

La méthode utilisée est la suivante :

- Introduire dans un tube à essai 1 ml de l'extrait de plante ;
- Ajouter 1 ml d'alcool chlorhydrique (l'éthanol, l'acide chlorhydrique et l'eau à volume égal), puis quelques copeaux de zinc.
- Ajouter 1 ml d'alcool isoamylique.

L'apparition d'une coloration jaune-orangée (flavones) ou rose violacée (flavonones) ou rouge (flavonols, flavanonols), indique la présence des flavonoïdes.

2. Mise en évidence des tanins

Les tanins peuvent être détectés à l'aide de la réaction suivante :

À 5ml d'extrait (dilué), on ajoute 1ml de solution FeCl_3 1%. La présence des tanins donne une coloration foncée caractéristique : bleu-noir en cas de tanins galliques, vert-noir si l'on a des tanins catétiques et noirâtre si l'on est en présence de mélange.

Résultats et Discussions

I- Screening de l'activité antimycobactérienne des extraits de plantes

3. Mise en évidence de l'activité antimycobactérienne

Les extraits des plantes, préparés comme il est décrit précédemment, ont été testés pour leur aptitude à inhiber la prolifération mycobactérienne.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4 :

Tableau4 : Etude de l'effet des différents extraits sur la croissance des mycobactéries

	Infusé		Décocté		Extrait éthanolique		Témoin	
	<i>M.smegmatis</i>	<i>M.aurum</i>	<i>M.smegmatis</i>	<i>M.aurum</i>	<i>M.smegmatis</i>	<i>M.aurum</i>	<i>M.smegmatis</i>	<i>M.aurum</i>
<i>Populus alba</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Cistus salvifolius</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Cistus albidus</i>	-	-	-	-	-	-	+	+

- : absence de croissance ; + : croissance des mycobactéries

L'absence de croissance des mycobactéries sur les milieux préparés avec les extraits des plantes (décocté, infusé et extrait éthanolique), par opposition aux boîtes témoins (Figure16) ; permet de conclure que les trois plantes sont dotées d'un effet antimycobactérien.



Figure16 : Mise en évidence de l'activité antimycobactérienne de l'extrait de *Cistus salvifolius* préparé avec LB-agar etensemencé par *M.smegmatis*

4. Etude du pouvoir antimycobactérien des extraits par la méthode de disque

Les résultats obtenus par la méthode de disque sont représentés sur les figures suivantes :

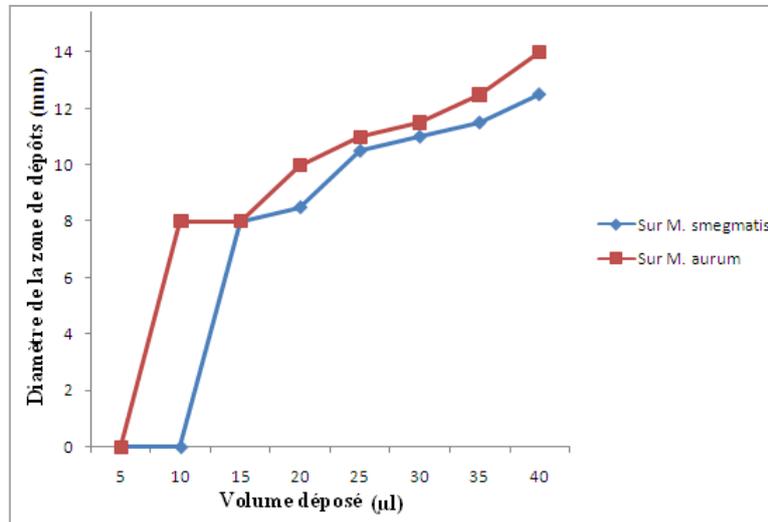


Figure 17 : Evolution des diamètres d'inhibition en fonction du volume déposé de l'extrait éthanolique de *Populus alba*.

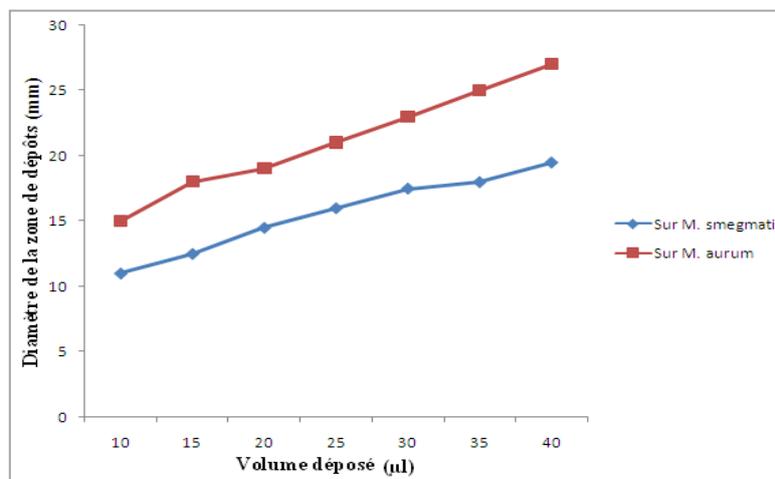


Figure 18 : Evolution des diamètres d'inhibition en fonction du volume déposé de l'extrait éthanolique de *Cistus salvifolius*.

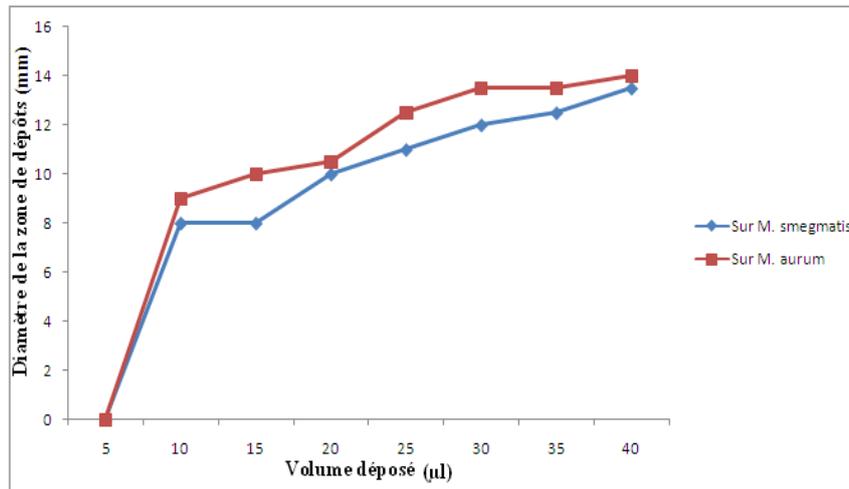


Figure 19 : Evolution des diamètres d'inhibition en fonction du volume déposé de l'extrait éthanolique de *Cistus albidus*.

Les résultats obtenus par la méthode du disque (Figures 17, 18 et 19) permettent de tirer les conclusions suivantes :

- Pour les trois plantes, le diamètre des zones d'inhibition augmente en fonction du volume déposé, ce qui montre que l'activité antimycobactérienne est proportionnelle à la quantité d'extrait utilisée (figure 20).
- *Cistus salvifolius* montre une activité inhibitrice nettement supérieure à *Cistus albidus*.
- Les extraits éthanolique de *Cistus albidus* et *Populus alba* semblent avoir un effet inhibiteur d'efficacité similaire.
- *M. aurum* est plus sensible aux différents extraits que *M. smegmatis*.

La différence des diamètres des zones d'inhibition peut être due à plusieurs facteurs, en particulier à la nature des principes actifs (solubilité ou insolubilité dans l'eau et l'éthanol), à leur concentration, et leur pouvoir de diffusion dans la gélose.

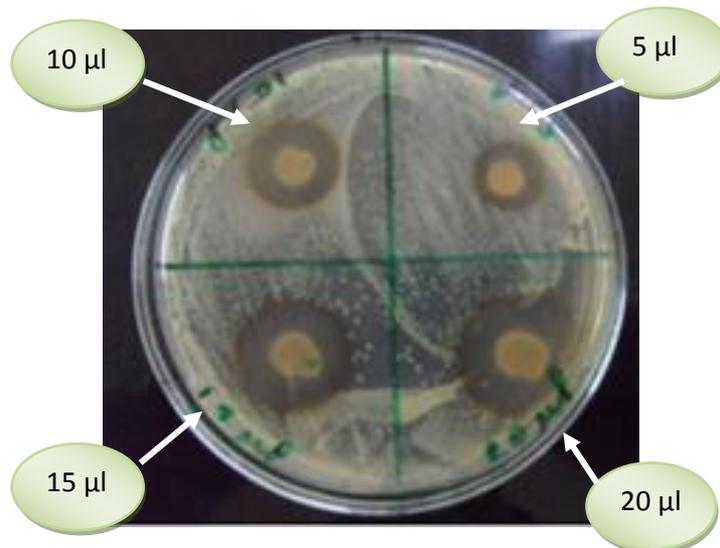


Figure 20 : Effet de la variation du volume d'extrait éthanolique de *Cistus salvifolius* sur la croissance de *M. aurum*

II- Méthode bioautographique

5- Sélection des extraits qui possèdent la meilleure activité

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Evaluation de l'effet antimycobactérien des plantes étudiées en fonction du solvant d'extraction utilisé

La plante	L'extrait (fractions/ solvants)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
		Sur <i>M. smegmatis</i>
<i>Populus alba</i>	hexane	8
	dichlorométhane	21
	Acétate d'éthyle	32
	Méthanol	23
<i>Cistus salvifolius</i>	Acétate d'éthyle	Pas d'inhibition
	Ethanol	14
	Méthanol	28
<i>Cistus albidus</i>	Acétate d'éthyle	Pas d'inhibition
	Ethanol	14
	Méthanol	18

Les résultats correspondent à la moyenne de deux répétitions

Le but de cette expérience, est la sélection de l'extrait qui possède la meilleure activité.

Selon les résultats obtenus (tableau 5), on peut conclure que :

- Pour *Populus alba* la meilleure activité est obtenue pour l'extrait à l'acétate d'éthyle. De ce fait, cet extrait a été retenu pour la séparation par CCM.
- Les extraits méthanoliques de *Cistus albidus* et *Cistus salvifolius* (figure 21) ont montré une meilleure activité. Par conséquent, ils ont été retenus pour le fractionnement bioautographique.
- L'activité antimycobactérienne de *Cistus salvifolius* est supérieure à *Cistus albidus*, ce qui confirme les résultats précédemment obtenues.

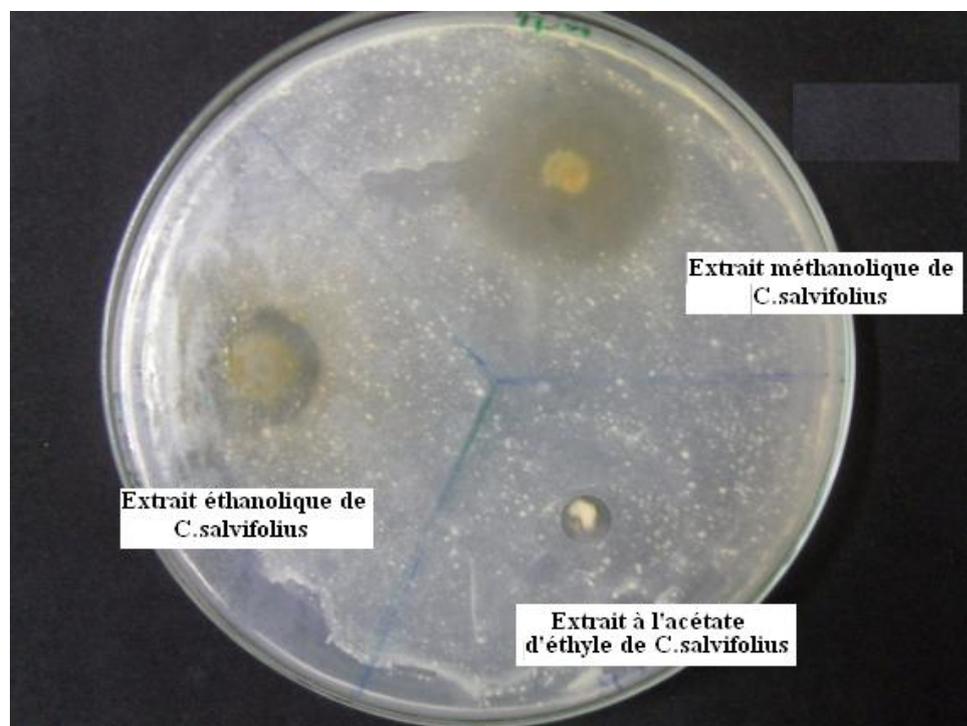


Figure 21 : Variation des zones d'inhibition de *M. smegmatis* en fonction des solvants utilisés pour l'extraction de *Cistus salvifolius*

6- Chromatographie sur couche mince (CCM)

Différents systèmes d'éluant ont été utilisés pour la séparation des extraits de plantes étudiées par CCM.

Tableau 6: Les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM de gel de silice :

Système de solvants utilisés	Hex- AcOEt					Hex-CCl	CCl/MeOH	MeOH/Hex	BAW
	V/V					V/V	V/V	V/V	V/V/V
proportions	6/4	7/3	5/5	3/7	4/6	6/4	8 /2	6/4	6/1,5/2,5
Résultats	+	-	-	-	+	-	-	-	-

(+) Meilleure séparation ; (-) pas de séparation

- ☞ L'Hex-AcOEt (6/4) est le système de solvant retenu pour la séparation de l'extrait à l'acétate d'éthyle de *Populus alba*.
- ☞ L'Hex- AcOEt (4/6) est le système de solvant retenu pour la séparation des extraits méthanoliques de *Cistus salvifolius* et *Cistus albidus*.

III- Purification des fractions actives

➤ *Populus alba*

Le fractionnement bioautographique a permis la mise en évidence d'une zone d'inhibition correspondante à la bande verte (Z) (figure22).

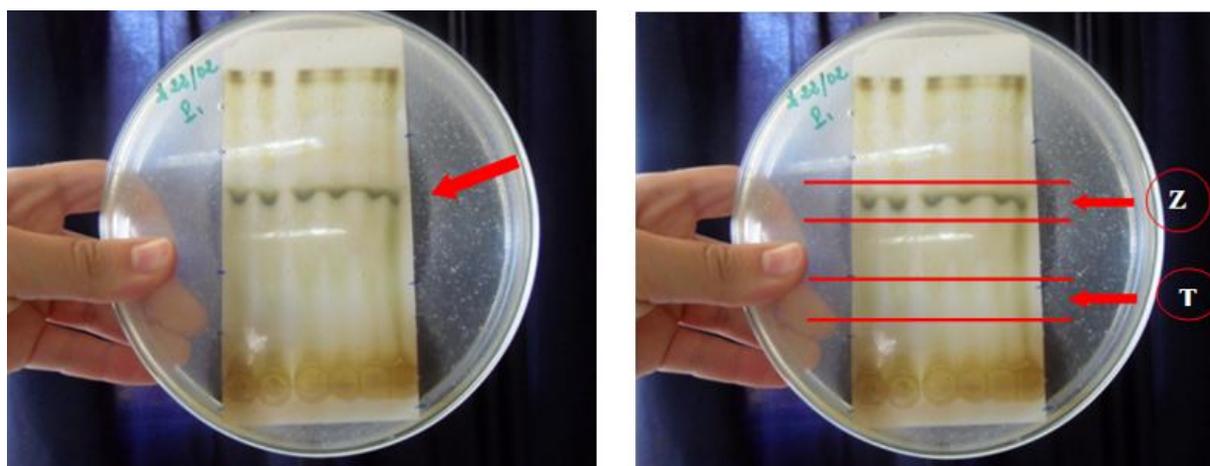


Figure 22 : Localisation de la fraction active de l'extrait de *Populus alba*

La bande active et la bande témoin ont été purifiées puis testées pour leur aptitude à inhiber *M. smegmatis*. Le témoin correspond à une bande inactive. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 7 :

Tableau 7 : Effet antimycobactérien de la bande active de *Populus alba*.

Fraction	Coefficient de migration	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
Z (bande verte)	0,56	14
T (témoin)	0,17	Pas d'inhibition

Ces résultats (tableau 7) montrent que la bande Z possède une activité antimycobactérienne, ce qui confirme les résultats précédemment obtenus.

➤ *Cistus salvifolius*

Le fractionnement bioautographique a permis la mise en évidence de deux zones d'inhibition (figure 23).

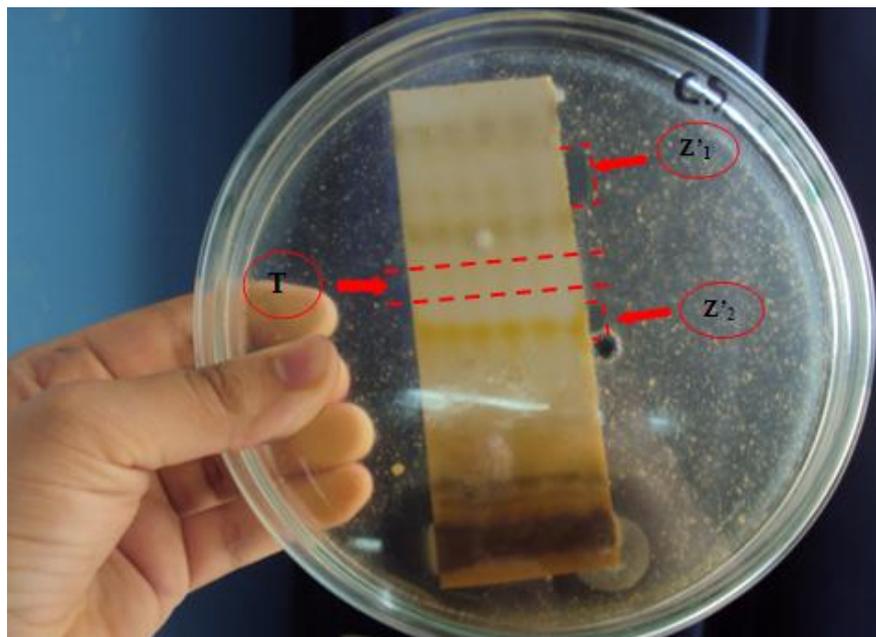


Figure 23 : Localisation des fractions actives de *Cistus salvifolius*

- Pour *Cistus salvifolius*, les zones d'inhibition obtenues et la zone témoin ont été purifiées et testées pour leur capacité à inhiber *M. smegmatis* (tableau 8).

Tableau 8 : Effet antimycobactérien des bandes actives de l'extrait de *C. salvifolius*.

Fractions de la plaque <i>Cistus salvifolius</i>	Rapport frontal (Rf)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
Z'1 (verte claire)	0,91	19
Z'2 (bande jaune)	0,58	15
Témoin (bande inactive)	0,72	Pas d'inhibition

Ces résultats indiquent que l'extrait de *C. salvifolius* contient au moins deux substances actives (bandes Z'1 et Z'2).

➤ *Cistus albidus*

Le fractionnement bioautographique a permis la mise en évidence d'une seule zone d'inhibition (Figure 24).

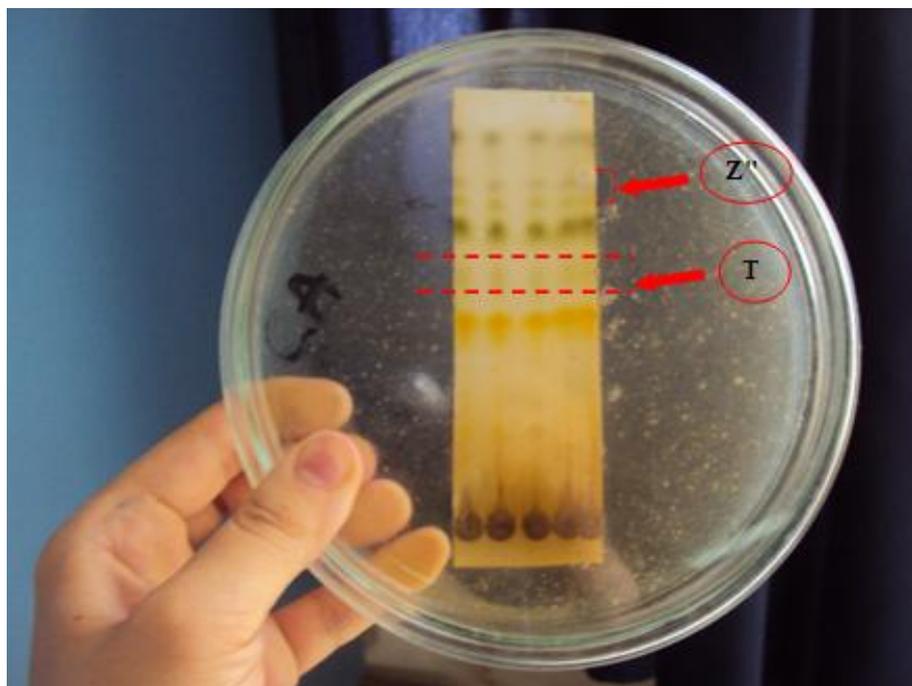


Figure 24 : Localisation de la fraction active de *Cistus albidus*

La zone d'éclaircissement (Z'') et la zone témoin (T), ont été purifiées et testées pour leur capacité à inhiber *M. smegmatis* (tableau 9).

Tableau 9 : Evaluation de l'effet antimycobactérien de la bande active obtenue pour l'extrait de *C. albidus*.

Fractions de la plaque <i>Cistus albidus</i>	Rapport frontal (Rf)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
Z"	0,91	14
T	0,62	Pas d'ihnibition

Remarque : Pour les trois plantes, les résultats obtenus correspondent à plusieurs répétitions.

Contrairement à l'extrait de *C. salvifolius*, qui possède deux substances actives, l'extrait de *C. albidus* renferme un seul principe actif. Ce résultat pourrait expliquer le résultat précédemment observé, à savoir l'extrait de *C. salvifolius* est plus actif que celui de *C. albidus*.

IV- Tests phytochimiques

➤ *Populus alba*

L'extrait de *Populus alba* a été testé pour la présence des flavonoïdes et des tanins. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Mise en évidence des flavonoïdes et des tanins dans l'extrait brut et la fraction active de *Populus alba*

<i>Populus alba</i>	Flavonoïdes	Tanins
Extrait brut	+	-
Fraction active (Z)	-	-

(+) présence et (-) absence

Ces résultats indiquent que l'activité observée n'est due aux flavonoïdes ni aux tanins.

➤ *Cistus salvifolius*

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau 11 : Mise en évidence des flavonoïdes et tanins dans l'extrait brut et les fractions actives de *Cistus salvifolius*

<i>Cistus salvifolius</i>	Flavonoïdes	Tanins
Extrait brut	+	+
Fraction active (Z' ₁)	-	-
Fraction active (Z' ₂)	-	-

(+) présence et (-) absence

Ces résultats montrent que l'effet antimycobactérien de *C. salvifolius* n'est pas dû aux flavonoïdes et aux tanins.

➤ *Cistus albidus*

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 12 : Mise en évidence des flavonoïdes et tanins dans l'extrait brut et la fraction active de *Cistus albidus*.

<i>Cistus albidus</i>	Flavonoïdes	Tanins
Extrait brut	+	+
Fraction active (Z'')	-	-

(+) présence et (-) absence

Ces résultats montrent que la fraction Z'' n'est pas constituées de flavonoïdes ou de tanins.

➔ L'ensemble de ces résultats permettent de conclure que l'effet antimycobactérien des extraits des plantes étudiées serait dû à d'autres types de molécules (alcaloïdes, polyphénol...etc.)

Conclusion

Cette étude s'inscrit dans le cadre de recherche de nouvelles substances à effet antimycobactérien. Notre travail est consacré à l'étude de l'activité antimycobactérienne de trois espèces de plantes appartenant aux genres *Populus* et *Cistus*, il s'agit de *Populus alba*, *Cistus salvifolius* et *Cistus albidus*.

L'étude du pouvoir antimycobactérien des plantes a montré que les extraits aqueux et éthanoliques de ces dernières possèdent un effet inhibiteur sur *M. smegmatis* et *M. aurum*. La vérification de l'effet antimycobactérien des plantes par la méthode des disques a mis en évidence la présence d'une corrélation positive entre la concentration en matière sèche végétale et l'efficacité du pouvoir antimycobactérien.

L'évaluation du pouvoir antimycobactérien des plantes en fonction du solvant d'extraction utilisé a montré que l'extrait d'acétate d'éthyle de *Populus alba* et les extraits méthanoliques des *Cistus* présentent un effet inhibiteur important.

La séparation des extraits par chromatographie sur couche mince a permis d'identifier la fraction responsable de l'activité antimycobactérienne.

Une étude phytochimique a été réalisée pour les extraits des plantes étudiées et a concerné la recherche des flavonoïdes et des tanins. L'absence de ces composés dans les fractions responsable de l'inhibition permet de conclure que l'activité antimycobactérienne des plantes étudiées n'est pas due à ces composés.

En perspective, nous proposons de réaliser les études suivantes:

- ☞ Etude de l'effet des extraits sur les macrophages infectés par des mycobactéries.
- ☞ Etude la cytotoxicité des plantes.
- ☞ Identification des principes actifs responsables de l'activité antimycobactérienne.

Références Bibliographiques

- Adam M., Berset C., Kessler M., Hamburger M., (2009): Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders- A survey of European herbals from the 16th and 17th century. *JEthnopharmacol* 121(3): 343-359
- Ainsa, J. A., E. Perez, V. Pelicic, F. X. Berthet, B. Gicquel et 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.
- Belisle JT, Vissa VD, Sievert T et al., *Science* (1997). Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis.; 276: 1420–2.
- Bénét, J.J ., (2008). Tuberculose Bovine. In la tuberculose animale. Ecoles Nationales Vétérinaires Françaises, Unité des maladies Contagieuses. Pp 8-39.
- Berthier A., (1976). La gomme de labdanum en Espagne, *Revista italiana*, 6, 315-317.
- Bonard, D., P. Msellati, L. Rigouts, P. Combe, D. Coulibaly, I. M. Coulibaly et F. Portaels, (2000) What is the meaning of repeated isolation of *Mycobacterium africanum*? *Int J.Tuberc Lung Dis* 4: 1176-1180.
- Bonhomme.L, 2009. Protéome Foliaire et Efficience d'Utilisation de l'Eau chez le Peuplier. Thèse doctorat
- Bothamley GH., (2005). Smoking and tuberculosis: a chance or causal association?
- Bran-Blanquet J., Bolos O., (1950). Aperçu des groupements végétaux des montagnes Tarragonaises, *Collectanea botanica*, II(3), 302-342.
- Brewer, T. F. (2000). Preventing tuberculosis with bacillus Calmette-Guerin vaccine: a metaanalysis of the literature. *Clin Infect Dis* 31 Suppl 3, S64-67.
- Cambau, E., N. Lemaitre, W. Sougakoff et V. Jarlier, (2003) Résistance aux antituberculeux. *Antibiotiques* 5: 29-37.
- Chan, E. D. et M. D. Iseman, (2008) Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a review. *Curr Opin Infect Dis* 21: 587-595.
- Chinou, I., Demetzos, C., Harvala, C., Roussakis, C., Verbist, J.F., (1994). Cytotoxic and antibacterial labdane-type diterpenes from the aerial parts of *Cistus incanus* subsp. *creticus*. *Planta Medica* 60, 34–36.

- Chung A. C., Aktar Z., Jackson S., Duncan K., (1995). A high throughput screen-for detecting novel antimycobacteriat agents. *Antimicrob agents Chemother* 39 : 2235-2238.
- Cleidson Valgas., Simone Machado de Souza., Elza F. A. Smânia., Artur Smânia Jr., (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:369-380
- Coetzer J.A.W et Tustin R.C., (2004). Infections diseases of livestock. *Chater Mycobacterie-Introduction*, Section 5 : Bacterial diseases, Volume 3, pp.1965-1972, 2nd edition, Oxford editorial.
- Colditz, G. A., T. F. Brewer, C. S. Berkey, M. E. Wilson, E. Burdick, H. V. Fineberg et F. Mosteller, (1994) Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. *Metaanalysis of the published literature. JAMA* 271: 698-702.
- Corti, M., Palmero, D., and Eiguchi, K. (2009) Respiratory infections in immunocompromised patients. *Curr Opin Pulm Med* 15: 209-217.
- Coulouma A., (1933). Contribution a l'étude chimique des Cistes, *Bull. Soc. Royale de Bot. de Belgique*, LXVII (1), 86-94.
- Davies, J., (1998). Antibiotic resistance in mycobacteria. In: *Genetics and Tuberculosis*. D. J. Chadwick et G. Cardew (eds). Chichester: John Wiley, pp. 195-208.
- Dimas, K., Demetzos, C., Angelopoulou, D., Kolokouris, A., Mavromoustakos, T., (2000). Biological activity of myricetin and its derivatives against human leukemic cell lines in vitro. *Pharmacological Research* 42, 475–478.
- Durand.T., Approche protéomique des stress abiotiques chez *Populus tremula* x *P. alba*. *Thèse doctorat* décembre 2009
- Flandrois. JP., (1997). *Mycobacterium tuberculosis : Bactériologie médicale* collection AZAY, presse universitaire de Lyon P : 152-157.
- Garnier, T., K. Eiglmeier, J. C. Camus, N. Medina, H. Mansoor, M. Pryor, S. Duthoy, S. Grondin, C. Lacroix, C. Monsempe, S. Simon, B. Harris, R. Atkin, J. Doggett, R. Mayes, L. Keating, P. R. Wheeler, J. Parkhill, B. G. Barrell, S. T. Cole, S. V. Gordon R. G. Hewinson, (2003) The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7877-7882.

- Ghosh, J., Larsson, P., Singh, B., Pettersson, B.M., Islam, N.M., Sarkar, S.N., Dasgupta, S., Grosset J., Biosvert H., et Truffot-Pernot T., 1989. mycobactéries. Dans : Bactériologie médicale. Le minor L. et Veron M., Paris, 965-1017.
- Goletti, D., Weissman, D., Jackson, R.W., Graham, N.M., Vlahov, D., Klein, R.S., Munsiff, S.S., Ortona, L., Cauda, R., and Fauci, A.S. (1996) Effect of Mycobacterium tuberculosis on HIV replication. Role of immune activation. *J Immunol* 157: 1271-1278.
- Goris A. et Liot A., 1942. Pharmacie galénique. Edition Masso et cie, Vol. 2 tome 1 pp. 937.
- Greenaway, W., English, S., May, J., Whatley, F. R., (1991). Chemotaxonomy of section Leuce poplars by GC-MS of bud exudates. *Biochem. Syst. Ecol.* 19, 507-518.
- Grondin, C. Lacroix, C. Monsempe, S. Simon, B. Harris, R. Atkin, J. Doggett, R. Mayes, L. Keating, P. R. Wheeler, J. Parkhill, B. G. Barrell, S. T. Cole, S. V. Gordon et R. G. Hewinson, (2003) The complete genome sequence of Mycobacterium bovis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7877-7882.
- Grosset J., Biosvert H., et Truffot-Pernot T., 1989. mycobactéries. Dans : Bactériologie médicale. Le minor L. et Veron M., Paris, 965-1017.
- Guvenc, A.; Yildiz, S.; Ozkan, A. M.; Erdurak, C. S.; Coskun, M.; Yilmaz, G.; Okuyama, T.; Okada, Y., 2005. *Pharm. Biol.*, 43, 178.
- H. Bouamama., T. Noel., J. Villard., A. Benharref., M. Jana., 2004. Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan Cistus L. species. *Ethnopharmacologie* 104, 1-4.
- H. SBAY and M. TAROQ., 2003. The culture of the poplar in Morocco. International Conference on the future of poplar culture. 13 - 15
- Harshey, R. M. et T. Ramakrishnan, (1977) Rate of ribonucleic acid chain growth in Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *J Bacteriol* 129: 616-622.
- Hostettmann K. (2001). Tout savoir sur les plantes médicinales des montagnes. Ed. Fabre S A, Lausanne, Suisse, 121 p
- Houghton P. J. and Raman A., 1998. Laboratory Hand book for Fractionation of Natural Extracts. Chapman et Hall, Londres, 1ère éd., 29-31.
- Jain, A. et P. Dixit, (2008) Multidrug-resistant to extensively drug resistant tuberculosis: what is next? *J Biosci* 33: 605-616.

- Jarlier, V., L. Gutmann et H. Nikaido, (1991) Interplay of cell wall barrier and betalactamase activity determines high resistance to beta-lactam antibiotics in *Mycobacterium chelonae*. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1937-1939.
- Jassal, M. et W. R. Bishai, (2009) Extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 9: 19-30.
- Jonsson, B. E., M. Gilljam, A. Lindblad, M. Ridell, A. E. Wold et C. Welinder-Olsson, (2007) Molecular epidemiology of *Mycobacterium abscessus*, with focus on cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 45: 1497-1504.
- Kaoutar Bayoub ., Tarik Baibai., Driss Mountassif., Abdelaziz Retmane., Abdelaziz Soukri., 2010. Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. *African Journal of Biotechnology* . Vol. 9 (27), pp. 4251-4258, 5 July,
- Kaufmann, S. H., and McMichael, A. J. (2005). Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nat Med* 11, S33-44.
- Kim SJ, Hong YP, Lew WJ, Yang SC, Lee EG., 1995. Incidence of pulmonary tuberculosis among diabetics. *Tubercle Lung. Dis* : 76:529 – 533.
- Koeck, J. L., M. C. Gutierrez, M. Fabre, J. J. Bernatas et Y. Buisson. Emergence de cas de tuberculose dus à *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *canetti* à Djibouti. *Comptes Rendus de Séances. Séance de la Société de pathologie exotique. Communications libres du 16 février 2005.*
- Koumba. G. Y., 2010. Synthèse d'analogues cinnamiques : inhibiteurs potentiels contre *Mycobacterium tuberculosis*. Thèse doctorat.
- Lahsissene H., Kahouadji A., Tijane M., Hseinis., 2009. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région ZAER (Maroc occidental). *Revue botanique : LEJEUNIA* ; BE ISSN 0457-4184.
- Leger. M., 2010. Caractérisation enzymatique de la protéine FadD32 de *M. tuberculosis*, impliquée dans la biosynthèse des acides mycoliques et cible potentielle d'antituberculeux, ainsi que d'autres enzymes paralogues. Thèse doctorat.
- LoBue, P., (2009) Extensively drug-resistant tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis* 22: 167-173.
- Mathys. V., 2010. thèse doctorat. Contribution à la compréhension des mécanismes moléculaires de résistance de *Mycobacterium tuberculosis* aux agents anti-tuberculeux.

- Muanda. N. F., 2010. Identification de polyphénol, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse doctorat.
- Nathanson, E., R. Gupta, P. Huamani, V. Leimane, A. D. Pasechnikov, T. E. Tupasi, K. Vink, E. Jaramillo et 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.
- OMS, aide mémoire N° 104 Mai 2008.
- O'Reilly, L. M. & C. J. Daborn, (1995) The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis* 76 Suppl 1: 1-46.
- Oettinger, T.; Jorgensen, M.; Ladefoged, A.; Haslov, K.; Andersen, P. *Tuber. Lung Dis.* 1999, 79, 243-250.
- Paolini.J., 2005. Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM-(IE et IC) et RMN) du carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux asteraceae andémiques de CORSE: *Eupatorium cannabinum* sub sp. *crticum* et *Doronicum corsicum*. thèse doctorat.
- Paul Roiron., Adam A. Ali., Jean-Louis Guendon., Christopher Carcaillet., Jean-Frédéric Terral. Preuve de l'indigénat de *Populus alba* L. dans le Bassin méditerranéen occidental. *C. R. Biologies* 327 (2004) 125–132
- Phetsuksiri B, Baulard AR, Cooper AM et al., 1999. Antimycobacterial activities of isoxyl and new derivatives through the inhibition of mycolic acid synthesis. *Antimicrob Agents Chemother*; 43: 1042–51
- Pichard. D. E et al., Tuberculose : maladies infectieuses 2002 FMPOS
- Prodingler, W. M., A. Eigentler, F. Allerberger, M. Schonbauer et W. Glawischnig, (2002). Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in western Austria. *J Clin Microbiol* 40: 2270-2272.
- Pym, A. S., Brodin, P., Majlessi, L., Brosch, R., Demangel, C., Williams, A., Griffiths, K. E., Marchal, G., Leclerc, C., and Cole, S. T. (2003). Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat Med* 9, 533-539.
- R. Al-Hussaini., M. Mahasneh. , 2011Antibacterial and Antifungal Activity of Ethanol Extract of different Parts of Medicinal Plants in Jordan *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 4, No.1.

- Rajbhandary, S. S., S. M. Marks et N. N. Bock, (2004) Costs of patients hospitalized for multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 8: 1012-1016.
- Roustand T., 1984. Contribution a l'étude botanique et phytochimique du genre *Cistus*, Thèse de doctorat, Université de Pharmacie de Montpellier.
- Sacchetti, J. C., Rubin, E. J., and Freundlich, J. S. (2008). Drugs versus bugs: in pursuit of the persistent predator *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Rev Microbiol* 6, 41-52.
- Shinnick, T. M. et R. C. Good, (1994) *Mycobacterial taxonomy*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13: 884-901.
- Shah, N. S., A. Wright, G. H. Bai, L. Barrera, F. Boulahbal, N. Martin-Casabona, F. Drobniewski, 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 et J. P. Cegielski, (2007) Worldwide emergence of extensively drug-resistant tuberculosis. *Emerg Infect Dis* 13: 380-387.
- Somoskovi, A., L. M. Parsons et M. Salfinger, (2001) The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res* 2: 164-168.
- *SQALLI .H.H et al., 2007. Evaluation de l'effet antimycobactérien de plantes du centre- nord du Maroc. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 146, 271-288*
- Trunz, B. B., Fine, P., and Dye, C. (2006). Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet* 367, 1173-1180.
- Tsukamura.M., Adansonian Classification of *Mycobacteria*. *J . gen. Microbiol.* (1966), 45, 253-273
- Van Soolingen, D., (2001). Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med* 249: 1-26.
- Veziris, N., E. Cambau, W. Sougakoff, J. Robert et 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 et D. S. Kernodle, (1998). Recombinant expression and characterization of the major beta-lactamase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1375-1381.
- Walker, R. W., Promé, J. C., and Lacave, C. (1973). Biosynthesis of mycolic acids. Formation of a C32-β-ketoester from palmitic acid in a cell-free system of *Corynebacterium diphtheriae*. *Biochem. Biophys. Acta* 326, 52-62.

- Wallace RJ, Nash DR, Tsukamura M, Blacklock ZM, Silcox VA. Human disease due to Mycobacterium smegmatis. J Infect Dis 1988; 158(1):52–9.
- Wallace RJ, O'Brien R, Glassroth R, Raleigh J, Dutt A. Diagnostis and treatment of disease caused by non tuberculosis mycobacteria. Am Rev Respir Dis 1991;142:940–53. 106: 10781-10786.
- Wamidh H.,TALIB., Adel., M. Mahasneh., 2010. Antiproliferative Activity of Plant Extracts Used Against Cancer in Traditional Medicine. Sci Pharm.; 78: 33–45
- Yesilada, E., Ustun, O., Sezik, E., Takaishi, Y., Ono, Y., Honda, G., 1997. Inhibitory effects of Turkish folk remedies on inflammatory cytokines: interleukin-1 α , interleukin-1 β and tumour necrosis factor α . Journal of Ethnopharmacology 58, 59–73.
- Zellweger JP. Diagnostic de la tuberculose: comment confirmer une suspicion clinique ou radiologique? .Med Hyg 2002.
- Zellweger JP., 2007. Manuel de la tuberculose.
- 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 et W. R. Jacobs Jr (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 115-140.

Sitographie

1. <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>
2. <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>
3. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/fr/>
4. <http://srvweb.sante.gov.ma>
5. http://www.asnom.org/fr/428_tuberculose.html
6. <http://www.invs.sante.fr/beh/1997/97janvier/page2.html>
7. <http://web.uct.ac.za/depts/mmi/lsteyn/cellwall.html>
8. http://www.herbierimages.be/index_fichiers/cistaceae.htmls
9. http://www.herbierimages.be/index_fichiers/cistaceae.htmls
10. <http://www.woodforum.be>
11. <http://www.hort.net/gallery/view/sal/popal>

Rapport-gratuit.com 
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES