كلية العلوم و التقنيات فاس
ⵜⴰⵖⵉⵡⴰⵏⵜ ⵏ ⵜⵎⴰⵙⵙⴰⵏⵉⵏ ⴷ ⵜⵙⵏⵉⴳⵉⵜⵉⵏ
Faculté des Sciences et Techniques de Fès

جامعة سيدي محمد بن عبد الله
ⵜⴰⵙⴷⴰⵡⵉⵜ ⵙⵉⴷⵉ ⵎⵓⵃⵎⵎⴰⴷ ⴱⵏ ⵄⴱⴷⵓⵍⵍⴰⵀ
Université Sidi Mohamed Ben Abdellah

Centre d'Etudes Doctorales : Sciences et Techniques de l'Ingénieur

N° d'ordre 65 / 2019

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

Mme : ELAMIN Oumaima

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES DU LYCOPENE PRODUIT PAR GENIE GENETIQUE CHEZ *Mycobacterium smegmatis,* ET ETUDE DE L'EFFET ANTIMYCOBACTERIEN ET ANTIBIOFILM DES EXTRAITS DE QUATRE PLANTES MAROCAINES : *Olea europaea, Berberis hispanica, Populus alba* ET *Arbutus unedo*

Thèse présentée et soutenue le 28/10/2019 devant le jury composé de :

Nom Prénom	Titre	Etablissement	
Pr. IBNSOUDA KORAICHI Saad	PES	FST de Fès	Président
Pr. HOUARI Abdellah	PES	FP de Taroudant	Rapporteur
Pr. BENCHEKROUN Mohammed Nabil	PES	FST de Mohammedia	Rapporteur
Pr. HAGGOUD Abdellatif	PES	FST de Fès	Rapporteur
Pr ANANOU Samir	PH	FST de Fès	Examinateur
Pr. IRAQUI HOUSSAINI Mohammed	PES	FST de Fès	Directeur de thèse

Avant de rentrer dans le vif du sujet, je souhaite adresser mes remerciements à toutes les personnes qui de près ou de loin se sont intéressés à ma recherche, m'ont soutenu, et m'ont permis de mener à bien ce travail.

Ce travail, a été effectué au sein du Laboratoire de Biotechnologie Microbienne, dirigé par Monsieur IBNSOUDA KORAICHI Saad à qui je tiens à adresser mes plus vifs remerciements d'avoir m'accueillir dans son unité de recherche, et d'avoir accepté d'être président du jury.

Je remercie vivement Monsieur HOUARI Abdellah, Monsieur BENCHEKROUN Mohammed Nabil et Monsieur HAGGOUD Abdellatif d'avoir accepté de juger et d'enrichir ce travail en tant que rapporteurs. J'associe à ces remerciements Monsieur ANANOU Samir pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Mes plus sincères remerciements vont ensuite à Monsieur IRAQUI HOUSSAINI Mohammed, mon directeur de thèse. Tout ce travail n'aurait jamais pu aboutir sans votre aide. Merci de m'avoir poussée à donner le meilleur de moi-même. J'espère avoir été à la hauteur. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté d'un point de vue professionnel et scientifique, mais aussi humainement. Vous avez toujours eu pour moi des paroles bienveillantes et avez toujours veillé à ce que tout se passe au mieux pour moi durant ces années de thèse. Enfin, je n'oublierai pas votre grande efficacité lors de la rédaction et de la correction du présent manuscrit. Nulles paroles ne peuvent exprimer ma reconnaissance, mon profond respect et ma fidèle gratitude, encore une fois, je vous remercie

Mes remerciements s'adressent également à tous les chercheurs du laboratoire de Biotechnologie Microbienne pour leur accueil, gentillesse, soutien et leur précieuse assistance. Grâce à vous, une très agréable ambiance de travail régnait au laboratoire.

A

l'ensemble des professeurs

qui ont participé à ma formation

A mes très chers parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je n'aurais rien fait de tout cela sans votre amour. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A mon mari

Je remercie mon cher époux pour son soutien quotidien indéfectible, et son enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie en général. Je te suis très reconnaissante, et je ne te remercierai jamais assez pour ton amabilité, ta générosité et ton aide précieuse. Mille merci.

A mes chers petits Marwa et Mohamed Jad

Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous, votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur. Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers.

A mes sœurs et frères

En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

A toute ma famille et ma belle famille

Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

Portée par vous tous j'ai pu achever ce travail de thèse. Merci !

ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonuclèique
BCG : Bacille de Calmette et Guérin
CCM : Chromatographie sur couche mince
CMB : concentration minimale bactéricide
CMI : concentration minimale inhibitrice
DMAPP : diméthylallyl pyrophosphate
DMSO : diméthylsulfoxyde
DO : densité optique
DOTS : Directly observed therapy, short-course
DPCA : dialyse péritonéale continue ambulatoire
EMB : ethambutol
EPS : exopolysaccharide
FPP : farnésyl pyrophosphate
GGPP : géranyl géranyl pyrophosphate
GPL : glycopeptidolipides
GPP : géranyl pyrophosphate
INH : isoniazide
IPP : isopenténYl pyrophosphate
Kan : kanamycine
KI : iodure de potassium
LAM : lipoarabinomannane
LB : luria bertoni
MCV : maladies cardiovasculaires
MDAG : mycolyl-diacylglycerols
MEP : la voie du déoxyxylulose phosphate
MNT : mycobactéries non tuberculeuses
MTC : *M. tuberculosis* complex
MVA : la voie de l'acide mévalonique
NAC : N-acétylcystéine
NTM : mycobatéries non tuberculeuses
OMS : organisation mondiale de la santé
PZA : pyrazinamide
RF : rapport frontale
RGM
RIF : Rifampicine
ROS : espèces réactifs de l’oxygène
SM : streptomycine
TAE: Tris, Acétate, EDTA
TB : tuberculose
UV : ultraviolet
VIH : virus d’immunodéficience humaine
WHO : world Human Organization

Figure 1: Structure du lycopène 5
Figure 2: Voie de biosynthèse du lycopène chez les bactéries non-photosnthétiques 7
Figure 3: Stress oxydant et sa relation avec la santé humaine 9
Figure 4: Mécanismes d'action généraux du lycopène 11
Figure 5: Marché mondial des caroténoïdes pour la période 2007-2022 15
Figure 6 : Représentation schématique de l'enveloppe de la cellule de *M. tuberculosis*. 19
Figure 7: Schéma de transmission et du développement de la tuberculose 22
Figure 8: Concepts du développement de la TB résistante aux médicaments 26
Figure 9: Processus de formation régulation du biofilm Mycobactérien.. 35
Figure 10: Carte physique du plasmide pC51 47
Figure 11: Gel d'agarose à 1% utilisé pour analyser les extraits plasmidiques d'*E. coli* 55
Figure 12: Colonies de *M. smegmatis* transformé par le plasmide pC51 (A) et *M. smegmatis* non transformé (B) 56
Figure 13: Analyse par TLC du lycopène extrait de la tomate (A) et le pigment produit par *M. smegmatis* transformé par le plasmide pC51 (B) 57
Figure 14: Spectres d'absorption du lycopène extrait de *M. smegmatis* (pC51) et de la tomate 57
Figure 15: Séparation de l'épiphase et de l'hypophase de *M. smegmatis* transformé par pC51 et de *M. aurum* 58
Figure 16: Sélection d'un mutant rouge *M. smegmatis* AI par mutagenèse en utilisant les UV 59
Figure 17: Colonies en chou-fleur du mutant rouge de *M. smegmatis* transformé par pC51 (orange) et de *M. smegmatis* non transformé 60
Figure 18: Analyse chromatographique de l'extrait du mutant, M : extrait de *M. smegmatis* AI 60
Figure 19: Spectre d'absorption du pigment de *M. smegmatis* AI 61
Figure 20: Analyse par gel d'agarose à 1% des extraits plasmidiques de *M. smegmatis* transformé avec pC51 (A) et de la souche AI (B) 61
Figure 21: Phénotypes des colonies obtenues après les transformations. *M. smegmatis* MC2 155 transformé par le plasmide pC51 (1) ; *M. smegmatis* MC2 155 transformé par le plasmide MpC51 (2) ; *M. smegmatis* MSm transformé par le plasmide pC51 (3) ; *M. smegmatis* MSm transformé par le plasmide MpC51 (4). 63
Figure 22: Effet du temps d'incubation sur la croissance et la production du lycopène de *M. smegmatis* AI 64

Figure 23: Effet du pH sur la croissance et la production du lycopène de *M. smegmatis* AI .. 65
Figure 24: Effet de la température sur la croissance et la production du lycopène de *M. smegmatis* AI 65
Figure 25: Effet de l'agitation sur la croissance et la production du lycopène de *M. smegmatis* AI 66
Figure 26: Effet de la lumière sur la croissance et la production du lycopène de *M. smegmatis* AI 67
Figure 27: Variation de l'indice de peroxyde au cours du chauffage de l'huile avec et sans lycopène 82
Figure 28: Variation de l'acidité au cours du chauffage de l'huile de soja avec et sans lycopène. 84
Figure 29: Sensibilité de diverses souches de *M. smegmatis* aux rayons UV 85
Figure 30: Effet protecteur du lycopène *in vitro* contre les rayons UV 86
Figure 31: Changements macroscopiques et résultats du score visuel pour les différents traitements. 87
Figure 32: Lésions visuelles de la peau (rougeur, rides et dessèchement) induites par les rayons UV 88
Figure 33: Effet antimycobactérien de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles fraîches et sèches de l'olivier repris séparément dans l'acétate d'éthyle (AE) et dans l'eau 107
Figure 34: Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles fraîches (A et B) et de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles sèches (C) 108
Figure 35: Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (1%) du contenu acellulaire de *M. smegmatis* traité par différents extraits 109
Figure 36: chromatogramme de l'extrait des feuilles de l'olivier 111
Figure 37: Bioautographie de l'extrait des feuilles de l'olivier 112
Figure 38: Illustration de la mesure de l'angle de contact de cellules bactériennes 124
Figure 39: Tapis de *M. aurum* (A) et de *M. smegmatis* (B) sur filtre de 0,45 µm 126
Figure 40: Cinétique de la formation du biofilm par *M. smegmatis* et *M. aurum* 133
Figure 41: Coloration du biofilm de *M. smegmatis* par le cristal violet à différents temps d'incubation 134
Figure 42: Effets des différents extraits sur l'adhésion de *M. smegmatis* et de *M. aurum* 135
Figure 43: Effets des différents extraits sur le développement des biofilms de *M. smegmatis* et de *M. aurum.* 136

Tableau 1: Différents antibiotiques antituberculeux, leurs cibles et mécanismes d'action..... 24
Tableau 2: Mécanismes de résistance aux médicaments chez *M. tuberculosis* 29
Tableau 3: Gènes impliqués dans la formation du biofilm mycobactérien..... 38
Tableau 4: Pigmentation des colonies et quantité du lycopène produite par *M. smegmatis* MC2 155 et *M. smegmatis* MSm transformées séparément par les plasmides pC51 et MpC51 62
Tableau 5: Résultats de l'analyse sensorielle des chips de pomme de terre préparés dans l'huile de soja avec et sans lycopène 84
Tableau 6: Effet antimycobactérien de l'extrait aqueux sur *M. smegmatis* et *M. aurum*..... 105
Tableau 7: Effet antimycobactérien de l'extrait des feuilles de l'olivier en fonction du solvant d'extraction..... 105
Tableau 8: Effet de l'extrait sur l'activité antimycobactérienne en milieu liquide 106
Tableau 9: CMI et CMB de l'extrait des feuilles de l'olivier 109
Tableau 10: proportions des solvants utilisés pour la CCM..... 110
Tableau 11: Bandes séparées de l'extrait des feuilles de l'olivier et leurs rapports frontaux (Rf) 111
Tableau 12: Effet antimycobactérien des fractions actives de l'extrait des feuilles de l'olivier 113
Tableau 13: Mise en évidence des flavonoïdes, des tanins et des polyphénols totaux 113
Tableau 14: Propriétés des tensions de surface de l'eau, du formamide et du diiodométhane 124
Tableau 15: CMI et CMB des différents extraits vis à vis *M. smegmatis* et *M. aurm* 129X
Tableau 16: Angles de contact de la paroi de *M. aurum* et de *M. smegmatis* 130
Tableau 17: Effet des extraits sur la physicochimie de la paroi de *M. aurum* et *M. smegmatis* 132
Tableau 18: Composition du milieu LB (Luria Bertoni)..... 176
Tableau 19: Composition du milieu Sauton..... 176
Tableau 20: Composition du milieu Mueller-Hinton..... 176
Tableau 21 :Constituants du tompon d'électrophorése (TAE)..... 177
Tableau 22: Constituants de la solution de charge 177

Le lycopène, antioxydant très puissant, suscite un intérêt croissant grâce à ces propriétés colorantes, antioxydantes et antiprolifératives. L'utilisation des microorganismes comme alternative biologique de la synthèse de ce carotène, permettra de produire ce pigment avec un rendement plus important et un coût moins onéreux. Dans cette étude, *M. smegmatis* est transformé par le plasmide pC51 contenant les gènes responsables de la biosynthèse du lycopène. Cette transformation a abouti à l'obtention d'un clone recombinant orange. L'analyse des extraits des pigments de ce clone a montré qu'il produit le lycopène avec un rendement de 1,4 mg/g et de poids sec. Dans le but d'améliorer ce rendement, un mutant (*M. smegmatis* AI) est isolé et s'est révélé capable de synthétiser 22,50 ± 2,13 mg/g de poids sec du lycopène. Dans le but d'optimiser la croissance et la production de lycopène par *M. smegmatis* AI, l'effet des paramètres physicochimiques est étudié, à savoir : la durée d'incubation, le pH, la température, l'agitation, et la lumière. Un bon rendement (25,787 mg/g) est obtenu lorsque la culture est réalisée à pH 5,5 en présence de la lumière à une température de 37°C et sous agitation de 120 rpm. Le procédé, ainsi mis au point, pourrait être utilisé comme système de production de ce carotène à intérêt médical et alimentaire. Dans le but de valoriser le lycopène, Nous avons mis en évidence son rôle antioxydant dans la préservation de la qualité de l'huile de soja durant le chauffage à des températures de friture, et également le rôle photo-protecteur du lycopène *in vivo* et *in vitro* contre les radiations UV, cette capacité du lycopène est exploitée sous forme d'une crème qui est testée sur des lapins, et s'est révélé efficace contre les radiations UV.

La tuberculose, une maladie infectieuse et contagieuse, est une menace majeure pour la santé publique mondiale à cause de l'augmentation de la résistance aux traitements courants, la co-infection avec le VIH et la formation des biofilms. Durant ces dernières années, l'intérêt des feuilles de l'olivier comme agent anti-infectieux s'est renforcé, et il est apparu de plus en plus évident. Cependant, il y'a un manque énorme de travaux menés sur leur effet antimycobactérien. À cet égard, notre travail est consacré à la détermination de l'activité antimycobactérienne des feuilles de l'olivier. Dans un premier volet, nous avons montré que l'extrait des feuilles de l'olivier inhibe la croissance de *M. smegmatis* et de *M. aurum in vitro*. Cet extrait est fractionné par CCM, puis, les fractions actives sont déterminées par bioautographie. L'analyse de la composition chimique de l'extrait et des fractions actives, a montré que les principes actifs sont des polyphénols autres que les flavonoïdes et les tanins. Dans un deuxième volet, nous avons montré, par la technique de l'angle de contact, que *M. smegmatis* et *M. aurum* sont hydrophobes avec un caractère donneur d'électrons. Le traitement

de ces deux mycobactéries par les différents extraits étudiées (*Olea europaea*, *Populus alba*, *Berberis hispanica* et *Arbutus unedo*) a permis de diminuer l'hydrophobicité, et d'accentuer le caractère donneur d'électron de ces deux souches. L'étude de l'effet des paramètres physicochimiques sur la formation du biofilm par *M. smegmatis* et *M. aurum*, a montré qu'il existe une corrélation positive entre l'hydrophobicité et l'adhésion cellulaire. Ainsi, le caractère hydrophobe des souches a favorisé leur adhésion sur la microplaque en polypropylène. Ces mêmes souches ont perdu leur capacité à s'adhérer, et à former un biofilm après traitement avec les extraits de plantes, cette inhibition est due en partie à la modification des propriétés physicochimiques des souches mycobactériennes par les extraits de plantes.

Mots clés : Lycopène, *M. smegmatis*, *M. aurum*, UV, antioxydant, tuberculose, biofilm, extrait, activité antimycobactérienne, caractérisation physico-chimique.

Introduction générale ---------- 1
Revue bibliographique
A. LES CAROTENOÏDES ---------- 4
I. Les pigments mycobactériens ---------- 5
II. Le lycopène ---------- 5
III. Biosynthèse du lycopène ---------- 6
IV. Taux quotidiens recommandés du lycopène ---------- 8
V. Le lycopène et la santé humaine ---------- 8
1. Le stress oxydatif ---------- 8
2. Les mécanismes d'action du lycopène ---------- 9
1.1. Les mécanismes oxydatifs ---------- 9
1.2. Les mécanismes non oxydatifs ---------- 10
3. L'activité anti-inflammatoire ---------- 11
4. Le cancer ---------- 12
5. Les maladies cardiovasculaires ---------- 12
6. Le diabète ---------- 12
7. Les maladies neurodégénératives ---------- 13
8. Autres avantages pour la santé ---------- 13
VI. Les applications et le marché du lycopène ---------- 13
B. LE GENRE *MYCOBACTERIUM* ET SON IMPORTANCE CLINIQUE ---------- 16
I. Définition et classification ---------- 16
II. Les facteurs de virulence ---------- 18
1. L'enveloppe de la cellule ---------- 18
2. Les protéines de sécrétion ---------- 19
III. La tuberculose ---------- 20
1. Brève historique ---------- 20
2. La prévention contre la tuberculose et le vaccin BCG ---------- 22
3. Le traitement de la tuberculose ---------- 23
4. La résistance de *M. Tuberculosis* aux antituberculeux ---------- 25
4.1. La résistance naturelle et la résistance acquise ---------- 25
4.2. La résistance primaire et la résistance secondaire ---------- 27
4.3. Les formes de la résistance ---------- 27
4.4. Mécanisme d'action et de résistance aux antibiotiques de première ligne ---------- 28
4.5. Comment minimiser l'émergence de la résistance ? ---------- 30
5. L'épidémiologie ---------- 30
C. LES BIOFILMS ---------- 31
I. Définition ---------- 31
II. Le biofilm mycobactérien ---------- 33
III. Le développement du biofilm mycobactérien ---------- 34
IV. Les molécules de surface cellulaire associées à la formation du biofilm ---------- 36
1. Les glycopeptidolipides ---------- 36
2. Le GroEL1 chaperon ---------- 36
3. Les acides mycoliques ---------- 36
V. L'ultrastructure des biofilms mycobactériens ---------- 37
VI. La régulation de la formation du biofilm mycobactérien ---------- 37
1. Les facteurs génétiques ---------- 37
2. Les paramètres environnementaux ---------- 39
2.1. Les conditions nutritionnelles ---------- 39
2.2. L'effet des ions sur la formation des biofilms mycobactériens ---------- 39

2.3. Le rôle du dioxyde de carbone dans la formation du biofilm mycobactérien ---39
2.4. La réponse au stress oxydatif----------39
3. Les implications cliniques du biofilm chez les mycobactéries non tuberculeuses ---39
4. Le rôle du biofilm dans la pathogénicité de *M. Tuberculosis* ----------41
5. La résistance des biofilms ----------41
5.1. La limitation de la diffusion ----------42
5.2. Le changement de phénotype ----------42
5.3. Le ralentissement de la croissance et l'état de la dormance ----------42
6. La lutte contre le biofilm mycobactérien----------42

Chapitre 1 : Production du lycopène par *Mycobacterium smegmatis*
Introduction----------45
Matériel et méthodes----------47
I. Souches bactériennes ----------47
II. Plasmides utilisés----------47
III. Milieux et conditions de culture----------48
IV. Amplification du plasmide pC51 chez *Escherichia coli*----------48
1. Préparation des cellules compétentes ----------48
2. Transformation par choc thermique----------48
3. Extraction de l'ADN plasmidique----------49
4. Electrophorèse sur gel d'agarose ----------49
I. Transformation de *M. smegmatis* par électroporation----------49
II. Extraction et purification des carotènes ----------50
1. Isolement des pigments caroténoïdes ----------50
2. Purification des pigments----------50
III. Analyse des carotènes par chromatographie sur couche mince (CCM) ----------50
IV. Identification du lycopène----------51
V. Quantification du lycopène ----------51
VI. Mutagenèse par les rayons UV de *M. smegmatis* (pC51) ----------51
VII.Caractérisation du mutant----------52
1. Analyse des caroténoïdes----------52
2. Détermination de la nature de la mutation ----------52
2.1. Elimination du plasmide du mutant ----------52
2.2. Extraction du plasmide à partir du mutant ----------52
2.3. Amplification du plasmide MpC51 chez *E. coli* DH5α ----------52
2.4. Transformation de *M. smegmatis* MC_2 155 et *M. smegmatis* MSm ----------53
VIII.Etude de l'effet des paramètres physico-chimiques sur la croissance et la production du lycopène par M. smegmatis AI transformé par le plasmide pC51 ----------53
1. Préparation de l'inoculum ----------53
2. Effet de la durée d'incubation ----------53
3. Effet du pH initial ----------53
4. Effet de la température----------54
5. Effet de l'agitation----------54
6. Effet de la lumière ----------54
IX. Analyse statistique ----------54
Résultats----------55
I. Transformation d'*E. coli* ----------55
II. Extraction du plasmide pC51 ----------55
III. Transformation de *M. smegmatis* par le plasmide pC51----------56
IV. Analyse des caroténoïdes----------56

V. Amélioration génétique par mutagenèse de la production du lycopène par *M. smegmatis* transformé avec le plasmide pC51 ----59
VI. Détermination de la nature de la mutation de la souche AI ----62
VII.Effet des paramètres physicochimiques ----63
1. Effet du temps d'incubation----63
2. Effet du pH initial de la culture----64
3. Effet de la température----65
4. Effet de l'agitation----66
5. Effet de la lumière----66
Discussion----68
Conclusion----73

Chapitre 2 : Applications biotechnologiques du lycopène
Introduction----74
Matériel et méthodes----77
I. Effets du lycopène sur la stabilité de l'huile de soja dans des conditions de chauffage à des températures de friture ----77
1. Protocole de chauffage de l'huile de soja ----77
2. Caractérisation de l'huile de friture ----77
2.1. Détermination de l'indice de peroxyde ----77
2.2. Mesure de l'acidité ----78
3. Evaluation sensorielle des chips de pomme de terre ----78
3.1. Test de friture ----78
3.2. Déroulement des tests d'évaluation ----78
4. Analyses statistiques ----79
II. Evaluation d'une crème à base de lycopène contre les UV ----79
1. Souches et conditions de culture ----79
2. Effet du lycopène *in vivo* vis-à-vis les radiations UV ----79
3. Effet du lycopène *in vitro* vis-à-vis les radiations UV ----80
4. Mise en évidence de l'effet protecteur d'une crème à base de lycopène vis-à-vis les radiations UV ----80
4.1. Préparation de la crème ----80
4.2. Traitement des lapins ----80
4.3. Evaluation de l'effet protecteur vis-à-vis les radiations UV de la crème préparé par aspect visuel ----81
5. Analyses statistiques ----81
Résultats----82
I. Effets du lycopène sur la stabilité de l'huile de soja dans des conditions de chauffage à des températures de friture ----82
1. Caractérisation de l'huile de friture ----82
1.1. Evolution de la valeur de l'indice de peroxyde pendant le traitement thermique----82
1.2. L'évolution de l'acidité durant le chauffage des huiles ----83
2. Evaluation sensorielle des chips de pomme de terre ----84
II. Evaluation d'une crème à base de lycopène contre les UV ----85
1. Effet du lycopène *in vivo* vis-à-vis les radiations UV ----85
2. Effet du lycopène *in vitro* vis-à-vis les radiations UV ----86
3. Mise en évidence de l'effet protecteur d'une crème à base de lycopène vis-à-vis les radiations UV ----87
Discussion----89

Conclusion----94

Chapitre 3 : Effet de l'extrait des feuilles de l'olivier (*Olea europaea*) contre *M. smegmatis et M. aurum*
Introduction----95
Matériel et méthodes----97
I. Souches et milieu de croissance----97
II. Matériel végétal----97
1. Préparation des feuilles----97
2. Préparation des extraits----97
III. Evaluation des extraits contre *M. smegmatis* et *M. aurum*----98
1. Incorporation de l'extrait aqueux dans le milieu gélosé----98
2. Evaluation de l'effet antimycobactérien par la méthode de disque----98
3. Evaluation de l'activité antimycobactérienne en milieu liquide----99
4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)----99
IV. Etude de l'effet de l'extrait sur la paroi des mycobactéries---- 100
1. Extraction de l'ADN---- 101
2. Electrophorèse sur gel d'agarose---- 101
V. Bioautographie et étude phytochimique---- 102
1. Bioautographie---- 102
1.1. Fractionnement de l'extrait par chromatographie sur couche mince (CCM)-- 102
1.2. Localisation des bandes actives responsables de l'activité antimycobactérienne 103
1.3. Purification des fractions actives---- 103
2. Etude phytochimique---- 104
2.1. Mise en évidence des flavonoïdes---- 104
2.2. Mise en évidence des tanins---- 104
2.3. Mise en évidence des polyphénols---- 104
VI. Analyse statistique des résultats---- 104
Résultats----105
I. Activité antimycobactérienne des extraits des feuilles de l'olivier---- 105
II. Evaluation et comparaison de l'effet antimycobactérienne des extraits des feuilles fraîches et sèches---- 106
III. Détermination des CMI et des CMB de l'extrait des feuilles de l'olivier---- 108
IV. Etude de l'effet de l'extrait sur la paroi des mycobactéries---- 108
V. Bioautographie et étude phytochimique---- 109
1. Bioautographie---- 109
1.1. Choix du solvant---- 109
1.2. Séparation des composés présents dans l'extrait---- 110
1.3. Localisation des bandes actives responsables de l'activité antimycobactérien 111
1.4. Purification des bandes actives---- 112
2. Etude phytochimique---- 113
Discussion----114
Conclusion----118

Chapitre 4 : Effet des extraits d'*Olea europaea*, de *Berberis hispanica*, de *Populus alba* et d'*Arbutus unedo* sur la croissance mycobactérinne à l'état planctonique et de biofilm
Introduction----119
Matériel et méthodes----121

I. Souches bactériennes ---------- 121
II. Matériel végétal---------- 121
1. Origine géographique et description des plantes---------- 121
2. Préparation des extraits ---------- 123
III. Etude de l'effet des extraits de plantes contre *M. smegmatis* et *M. aurum* : Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB)---------- 123
IV. Caractérisation physicochimique de la paroi de *M. smegmatis* et de *M. aurum* ------ 123
V. Effet des extraits sur la physicochimie de la paroi des cellules mycobactériennes --- 126
VI. Cinétique de la formation de biofilm par M. *smegmatis* et M. *aurum*---------- 126
VII. L'activité Antibiofilm des extraits de plantes ---------- 127
1. Inhibition de l'adhésion cellulaire---------- 127
2. Inhibition de la croissance du biofilm ---------- 128
Résultats----------129
I. Etude de l'effet des extraits de plantes contre *M. smegmatis* et *M. aurum* : Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB)---------- 129
II. Caractérisation physicochimique de la paroi de M. *smegmatis* et de M. *aurum* ------ 130
III. Effet des extraits sur la physicochimie de *M. smegmatis* et de *M. aurum* ---------- 131
IV. Cinétique de la formation des biofilms par *M. smegmatis* et *M. aurum*---------- 133
V. Activité Antibiofilm des extraits de plantes : inhibition de l'adhésion cellulaire et de la croissance du biofilm---------- 134
Discussion----------137
Conclusion----------144
Conclusion générale et perspectives----------145
Références bibliographiques----------149
Annexe 1 : Composition des milieux de culture---------- i
Annexe 2: Solutions ---------- ii
Annexe 3: photos des plantes étudiés ---------- iii

Le lycopène, avec 11 doubles liaisons conjuguées, est Considéré comme l'antioxydant le plus puissant parmi les caroténoïdes, son pouvoir antioxydant est 10 fois supérieur à celui de l'α-tocophérol (Lowe *et al.*, 2018). Les recherches ont montré que la consommation de lycopène est inversement corrélée à la survenue des cancers, des maladies cardiovasculaires et d'autre types de maladies (Perveen *et al.* 2015 ; Leong *et al.*, 2018). En conséquence, le lycopène est largement utilisé dans les industries : pharmaceutique, des aliments fonctionnels et des cosmétiques. Il est additionné dans de nombreuses denrées alimentaires, y compris les boissons, les produits laitiers, le surimi, les confiseries, les soupes, les barres nutritionnelles, les céréales et les sauces (Kong *et al.*, 2010). Les méthodes de production classiques du lycopène comprennent l'extraction à partir des plantes, la synthèse chimique et la fermentation microbienne (Li, Z., *et al.*, 2019). Dans la nature, le lycopène est abondamment présent dans les fruits et les légumes de couleur rouge, tels que la tomate. La tomate est une source majeure de lycopène et sa teneur totale en lycopène ne dépasse pas 30 mg/kg (Feofilova *et al.*, 2006). Cette faible teneur en lycopène dans les plantes ne répond pas aux besoins du marché. La synthèse chimique du lycopène présente de nombreux inconvénients, tels qu'un faible rendement, des variations de la qualité du produit et un coût de production élevé (Li *et al.*, 2019a). En revanche, les récents développements en génie métabolique et en biologie synthétique ont permis la surproduction du lycopène par des microorganismes (Li *et al.*, 2019a).

La première partie de ce travail de thèse s'inscrit dans cet effort d'investigation des effets bénéfiques du lycopène, et d'exploitation des microorganismes comme système pour la production du lycopène. Dans ce cadre spécifique, nous avons décidé de produire ce carotène chez *M. smegmatis*. Cette partie du travail est étudiée en deux chapitres :

Le chapitre 1, dans lequel nous avons étudié la production du lycopène par *M. smegmatis*. Ainsi, les gènes, qui codent pour la synthèse du lycopène de *M. aurum*, sont exprimés chez *M. smegmatis*. Le rendement du lycopène produit par *M. smegmatis* est génétiquement amélioré par mutation aléatoire aux UV. La production du lycopène par le mutant isolé est optimisé en jouant sur les paramètres physicochimiques du milieu de culture.

Le chapitre 2 est dédié aux applications biotechnologiques du lycopène : l'effet antioxydant du lycopène sur l'huile de soja pendant le traitement aux températures de friture est évalué, ainsi que l'effet de lycopène sur les qualités organoleptiques des chips de pommes de terre. Ensuite, l'effet photoprotecteur du lycopène est évalué *in vitro* et *in vivo* sur *M. smegmatis*. Puis sur les lapins sous forme d'une crème.

Les mycobactéries ont acquis une place particulière dans le monde bactérien en raison de leur importance clinique. À elle seule, *Mycobacterium tuberculosis* est responsable d'environ deux millions de décès par an dans le monde, faisant de la tuberculose l'une des maladies les plus influentes de l'histoire de l'humanité (Gagneux, 2018).

On pensait que la tuberculose (TB) avait été éradiquée au début de la seconde moitié du siècle dernier. Cependant, cette ancienne maladie a fait une résurgence à une vitesse alarmante aussi bien dans les pays en développement que dans les pays industrialisés. Ceci est dû en partie à la co-infection par le virus d'immunodéficience humaine (VIH), et à l'émergence des souches multi-résistantes et ultra-résistantes. Cette résistance menace le succès des différents programmes de contrôle de la TB, et entraine souvent une augmentation du taux de la mortalité. En 2017, il y avait 558 000 nouveaux cas de la tuberculose résistante, dont 457560 étaient atteints de la tuberculose multirésistante et ultrarésistance (Jiang *et al.*, 2019). L'épidémie de VIH constitue un défi majeur pour la prévention et le contrôle de la tuberculose. A l'échelle mondiale, on estime que le risque de la tuberculose est 26 à 31 fois plus élevé chez les personnes infectées par le VIH (Gelaw *et al.*, 2019).

Outre la tuberculose, différents maladies opportunistes appelées mycobactérioses sont rapportées à des mycobactéries atypiques, telles que *M. avium*, *M. intracellulare*, et *M. abscessus* (Zhang *et al.*, 2017).

Un autre problème qui se pose aujourd'hui est la formation des biofilms, qui sont des structures très résistantes aux médicaments. Ainsi, en milieu naturel, 90% des espèces bactériennes ne vivent pas individuellement en suspension, mais en communautés complexes adhérant à des surfaces appelées biofilm (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). La capacité des mycobactéries à vivre en mode biofilm est aujourd'hui bien documenté (Ojha, 2018).

Face à ces contraintes majeures, de nouveaux médicaments antituberculeux plus efficaces sont nécessaires de toute urgence pour lutter contre la menace de la tuberculose. Ces dernières années, les médicaments à base de produits naturels d'origine végétale suscitent un intérêt croissant. Les plantes constituent une source importante de métabolites secondaires biologiquement actifs qui ont un potentiel thérapeutique énorme (Oosthuizen *et al*., 2018).

C'est dans ce cadre que s'inscrit la deuxième partie de ce travail, qui vise à évaluer l'activité antimycobactérienne de certaines plantes d'origine marocaine vis-à-vis *M. smegmatis* et *M.*

aurum, à l'état planctonique et en mode biofilm. Il s'agit de : *Olea europaea, Berberis hispanica, Populus alba* et *Arbutus unedo.* Cette partie du travail est analysée en deux chapitres.

Le chapitre 3 est consacré à l'étude de l'effet antimycobactérien des extraits des feuilles d'*Olea europaea,* puis l'extrait le plus actif est fractionné par CCM, afin de réaliser un criblage phytochimique pour déterminer les différentes classes chimiques des principes actifs. L'effet de l'extrait sur la paroi mycobactérienne est aussi évalué dont l'espoir de déterminer le site d'action de l'extrait.

Le chapitre 4 consiste à déterminer l'effet antimycobactérien des extraits de *Berberis hispanica, Populus alba* et *Arbutus unedo,* et à évaluer la physicochimie de *M. smegmatis* et de *M. aurum,* afin de mettre en évidence la relation entre les propriétés de la surface et la formation du biofilm. Ensuite, l'effet des extraits de : *Olea europaea, Berberis hispanica, Populus alba* et *Arbutus unedo* sur la physicochimie et la formation du biofilm des deux souches mycobactériennes est étudié.

A. LES CAROTENOÏDES

Le mot « caroténoïde » est dérivé de "*Daucus Carota*", le nom latin de la carotte dont le β-carotène est extrait et isolé pour la première fois en 1831 par Wackenroder. Les caroténoïdes constituent la classe la plus répandue des pigments isoprénoïdes synthétisés par des organismes photosynthétiques (y compris les plantes), certaines bactéries non photosynthétiques et des champignons. Étant donné que les animaux (à l'exception de certaines espèces de pucerons), pas plus que l'homme, sont incapables de les synthétiser (Moran et Jarvik, 2010), ils doivent les obtenir à partir de la nourriture (Saini et Keum, 2018).

Les caroténoïdes sont des pigments rouge, jaune et orange largement répandus dans la nature. Ils sont par définition des tétraterpénoïdes ayant un enchaînement de huit unités isoprénoïdes, de ce fait ils possèdent un squelette carboné comprenant 40 atomes de carbone. La caractéristique la plus importante, responsable de leurs propriétés et fonctions spéciales, est la présence de plusieurs doubles liaisons conjuguées constituant le chromophore de la molécule (Srivastava et Srivastava, 2015). La structure de base des caroténoïdes est linéaire et symétrique, mais une cyclisation d'une des extrémités ou de deux est possible. D'autres transformations de la structure comme l'hydrogénation, la déshydrogénation ou l'oxydation sont responsables de la grande variété des caroténoïdes connus (Liang *et al.*, 2018).

Les caroténoïdes sont divisés en deux grandes classes :

i) Les caroténoïdes hydrocarbonés appelés carotènes, tels que l'α-carotène, le β-carotène et le lycopène.

ii) Les dérivés oxygénés des caroténoïdes hydrocarbonés, appelés xanthophylles. Dans les xanthophylles, l'atome d'oxygène peut être présent sous la forme d'un alcool (par exemple, la lutéine), d'une cétone (par exemple, la canthaxanthine), d'un mélange d'alcool et de cétone (par exemple, l'astaxanthine) ou d'esters d'alcool (par exemple, la fucoxanthine).

Les caroténoïdes sont des molécules lipidiques : ils sont insolubles dans l'eau et solubles dans les huiles végétales, les graisses animales et les membranes biologiques (Desmarchelier et Borel, 2017). À ce jour, plus de 750 caroténoïdes différents sont identifiés, les plus abondants étant le ß carotène, le lycopène, la lutéine, la ß-cryptoxanthine, l'α-carotène et le zéaxanthine. Environ 20 caroténoïdes différents sont identifiés dans le sang humain (Stephen *et al.*, 2017).

I. Les pigments mycobactériens

Plusieurs espèces mycobactériennes produisent des pigments de couleur jaune, orange ou moins fréquemment, rose-saumon soit dans l'obscurité (scotochromogènes) ou lors de l'exposition à la lumière (photochromogènes) (Runyon, 1970). *M. smegmatis* est caractérisée par un morphotype blanchâtre lorsqu'elle est cultivée sur milieu agar, et devient jaune-orange après plusieurs jours d'exposition à la lumière visible.

La grande majorité des pigments mycobactériens sont identifiées comme étant des caroténoïdes appartenant à la famille des terpénoïdes. Tarnok et Tarnok (1971) ont rapportés que les caroténoïdes sont présents chez *M. phlei, M. avium, M. intracellulare, M. aurum, M. marinum, M. kansasii, M. gordonae et M. scrofulaceum* (Tarnok et Tarnok, 1971).

L'isoneriatène (anciennement appelé léprotène), le déshydro-β-carotène et le β-carotène sont des composants constants de presque toutes les mycobactéries pigmentées en orange, y compris *M. aurum*, *M. phlei*, *M. avium* et *M. intracellulare*. *M. kansasii* et *M. marinum* présentent une composition différente en caroténoïdes, elles sont toutes les deux des accumulatrices de β-carotène **(**Viveiros *et al.*, 2000).

II. Le lycopène

Le lycopène est isolé pour la première fois par Millardet en 1876 qui l'a baptisé «solanorubine». Il est à nouveau isolé sous forme pure par Schunck en 1903, qui lui a donné son nom actuel « le lycopène » (Srivastava et Srivastava, 2015). Il est de couleur rouge foncé et de consistance cireuse. Les cristaux purs fondent à 168 ° C.

Le lycopène ($C_{40}H_{56}$) appartient à la famille des caroténoïdes, c'est un hydrocarbure aliphatique, essentiellement un polyène à chaîne ouverte à 13 doubles liaisons (Figure 1).

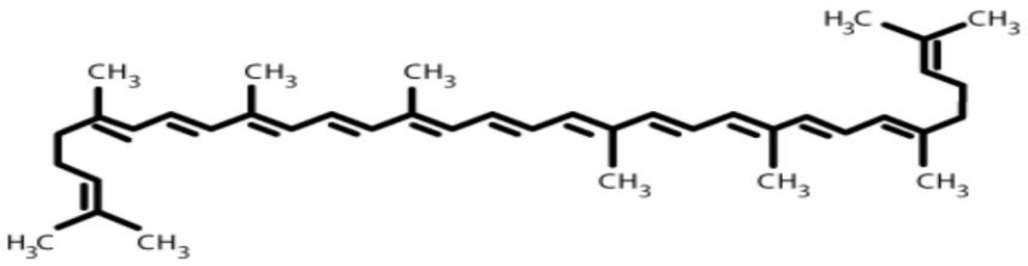

Figure 1 : Structure du lycopène

Le lycopène est le caroténoïde le plus abondant dans le sérum humain (environ 50% des 20 caroténoïdes présents), avec une concentration d'environ 0,5 µmol/l (Gerster 1997). Une fois dans le corps, le lycopène est concentré dans divers tissus : 1 nmol/g dans le tissu adipeux et jusqu'à 20 nmol/g dans les testicules, la glande surrénale et la prostate (Stahl et Sies, 1996). La persistance du lycopène dans le corps varie considérablement entre les études. Stahl et Sies, (1992) ont rapporté une durée de vie du lycopène de 2 à 3 jours (Stahl et Sies, 1992). Le degré de stress oxydatif joue évidemment un rôle important dans la persistance du lycopène dans un système animal.

III. Biosynthèse du lycopène

La biosynthèse des caroténoïdes dérive de la biosynthèse générale des isoprénoïdes, et restent communes jusqu'au niveau du phytoène (pouvant être considéré comme le premier caroténoïde). Les enzymes intervenant dans cette voie de biosynthèse sont codées par des gènes notés *crt* suivie d'une lettre. Ces gènes sont regroupés en cluster dit cluster *crt*.

De manière universelle, les caroténoïdes sont biosynthétisés à partir de l'isopentényl pyrophosphate (IPP ; C5) et de son isomère le diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP). Ces deux précurseurs sont dérivés soit de la voie du déoxyxylulose phosphate (MEP) soit de la voie de l'acide mévalonique (MVA). Les organismes photosynthétiques, y compris les micro-algues et les plantes, utilisent principalement la voie MVA, tandis que les bactéries et les champignons synthétisent le IPP et le DMAPP principalement via la voie MEP (Saini et Keum, 2018).

L'IPP et son isomère DMAPP sont condensés ensuite pour générer le géranyl pyrophosphate (GPP ; C10), ce dernier est transformé en farnésyl pyrophosphate (FPP ; C15) puis en géranylgéranyl diphosphate (GGPP ; C20) (Figure 2) :

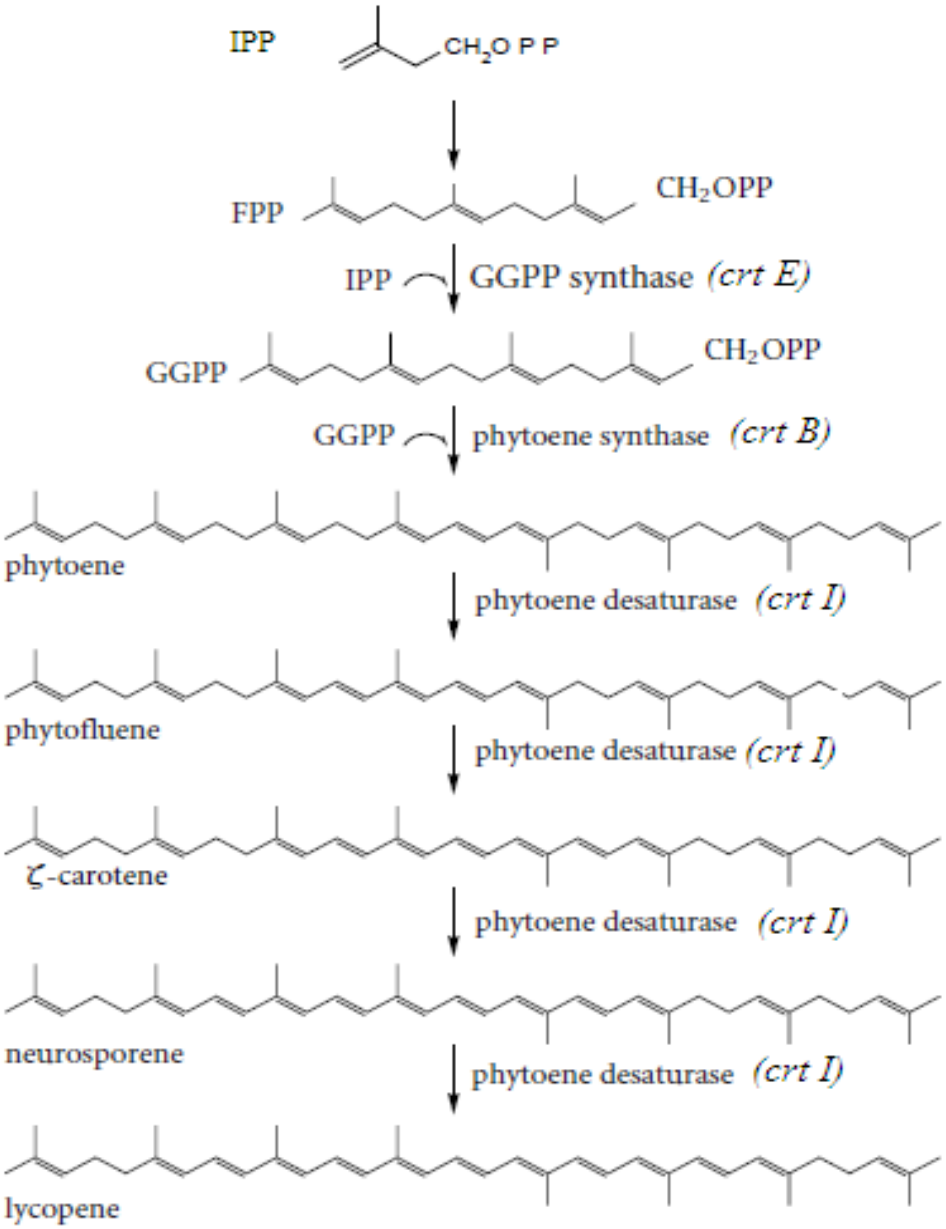

Figure 2 : Voie de biosynthèse du lycopène chez les bactéries non-photosnthétiques (Houssaini-Iraqui *et al.*, 2001)

La réaction clé pour la formation du squelette des carotènes est la condensation de deux molécules de géranyl diphosphate (20 carbones), qui conduit à la formation du phytoène (incolore) : le premier caroténoïde à 40 carbones. La formation des carotènes colorés nécessite un système d'extension de doubles liaisons par une série de réactions de désyhydrogénation. La désaturation du phytoène donne successivement le phytofluène, le ζ-carotène, le neurosporène et le lycopène (Figure 2) (Saini et Keum, 2018).

IV. Taux quotidiens recommandés du lycopène

Le lycopène n'est pas encore reconnu comme un élément nutritif essentiel. Par conséquent, aucun niveau de consommation journalière recommandé par les professionnels de la santé et les organismes de réglementation gouvernementaux n'est fixé. Les doses journalières signalées sont de 3,7 à 16,2 mg aux États-Unis d'Amérique, de 25,2 mg au Canada, de 1,3 mg en Allemagne, de 1,1 mg au Royaume-Uni et de 0,7 mg en Finlande (Petyaev *et al.*, 2018). Cependant, les études ont montré qu'un apport quotidien de 5 à 7 mg, chez un être humain sain et en bonne santé, suffit à maintenir le lycopène en circulation à des niveaux suffisants pour lutter contre le stress oxydatif et prévenir les maladies chroniques, mais, avec des maladies telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires, des niveaux plus élevés du lycopène, allant de 35 à 75 mg par jour, peuvent être nécessaires (Rao et Ali, 2007).

V. Le lycopène et la santé humaine

1. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est l'un des principaux facteurs de risque des maladies chroniques (Devaraj *et al.*, 2008 ; Daenen *et al.*, 2019). Il est principalement dû à la production accrue des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces ROS sont produites de manière endogène en tant que sous-produits des processus métaboliques normaux. Divers facteurs liés au mode de vie, tels que l'exercice, le régime alimentaire et le tabagisme, sont également identifiés comme facteurs induisant la production des ROS (Kandola *et al.*, 2015) Les ROS peuvent réagir de manière aléatoire avec les lipides, les protéines et les acides nucléiques, provoquant ainsi des lésions dans ces macromolécules, ce qui conduit au développement des maladies chroniques (Figure 3), notamment le cancer (Sies *et al.*, 2017).

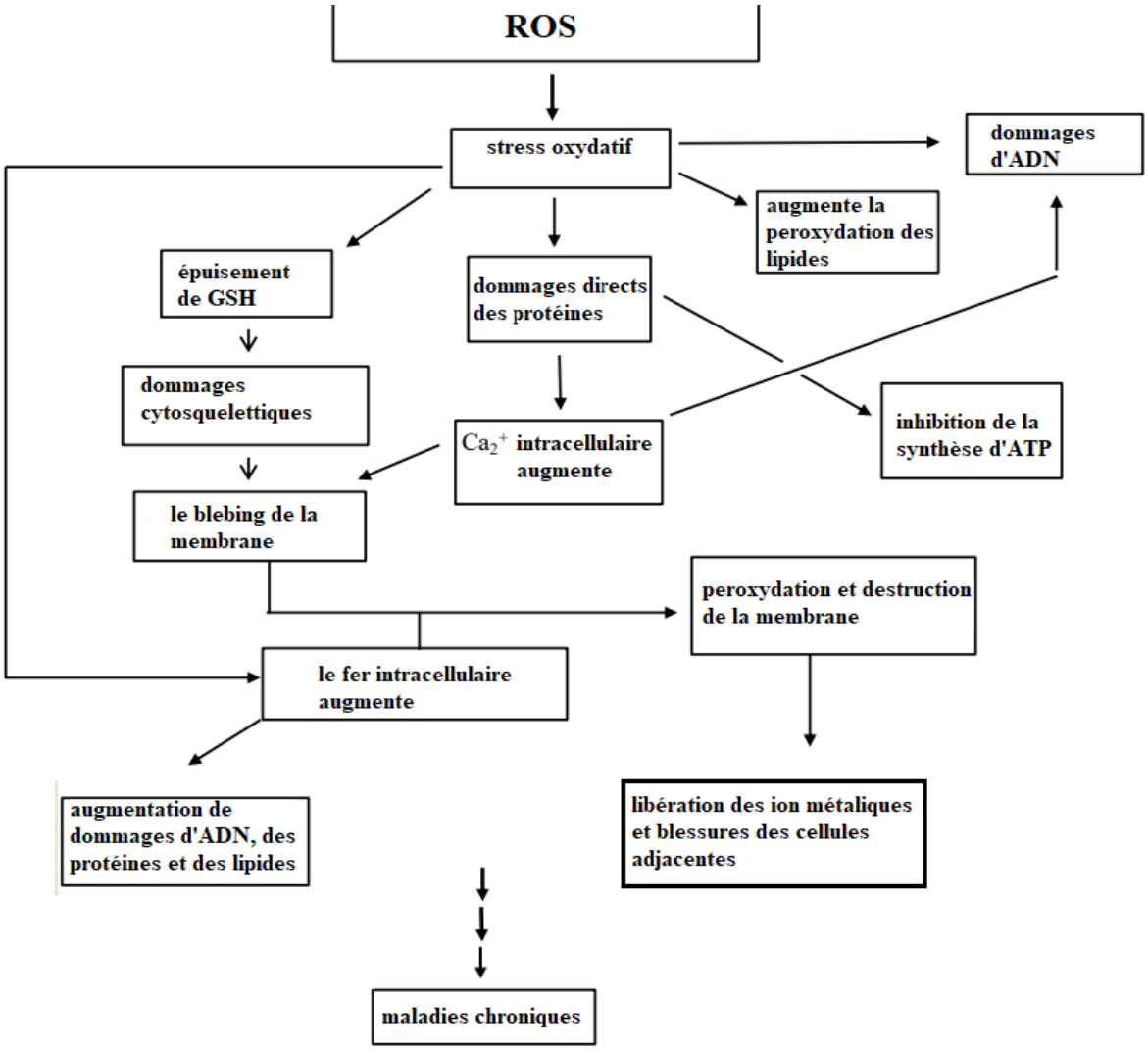

Figure 3 : Stress oxydant et sa relation avec la santé humaine (Bailey, 2015)

2. Les mécanismes d'action du lycopène

Il existe de nombreux mécanismes d'action du lycopène, qui peuvent être divisés en deux types : mécanismes oxydatifs et non oxydatifs (Figure 4) :

1.1.Les mécanismes oxydatifs

Le lycopène est l'un des antioxydants les plus puissants parmi tous les caroténoïdes, l'activité antioxydante du lycopène est deux fois plus supérieure à celle du β-carotène, et 10 fois supérieure à celle de l'α-tocophérol (Heber et Lu, 2002 ; Lowe *et al.*, 2018).

En raison de ses 11 doubles liaisons conjuguées, le lycopène contient de nombreux électrons qui peuvent être donnés aux radicaux libres, ce qui les neutralisent. De cette manière, le

lycopène agit comme un antioxydant pour piéger les radicaux libres et réduire la charge des ROS et par conséquent le stress oxydatif (Figure 4) (Palozza *et al.*, 2012).

En raison de sa nature lipophile, le lycopène est intégré dans l'environnement interne non polaire de la membrane cellulaire, où il s'associe à des lipoprotéines, ce qui permet une plus grande élimination des radicaux libres dans des environnements hydrophobes. Cet emplacement dans le composant lipophile permet au lycopène de fournir aux lipides et aux lipoprotéines une résistance puissante aux dommages oxydatifs (Durairajanayagam *et al.*, 2014).

En plus de neutraliser directement les ROS, le lycopène peut également diminuer le stress oxydatif indirectement, en activant d'autres mécanismes qui augmentent le potentiel antioxydant (Durairajanayagam *et al.*, 2014).

1.2.Les mécanismes non oxydatifs

Les mécanismes non oxydatifs par lesquels le lycopène pourrait exercer ses effets sont notamment les suivants : favoriser la communication jonction gap, moduler l'expression des gènes, réguler le cycle cellulaire et renforcer le système immunitaire (Figure 4) (Palozza *et al.*, 2012).

Il est connu que les cellules tumorales manquent de communication jonction gap et continuent donc à proliférer sans inhibition. En améliorant la communication entre les cellules, le lycopène pourrait éventuellement empêcher la formation des tumeurs et donc des cancers. Le lycopène empêche également la prolifération cellulaire indésirable en perturbant la signalisation du facteur de croissance 1 analogue à l'insuline, et en prévenant la progression du cycle cellulaire (Heber et Lu, 2002).

Il est démontré que le lycopène a des propriétés hypocholestérolémiques, car il inhibe l'hydroxy-méthyl-glutaryl coenzyme A réductase, limitant ainsi le taux de la production du cholestérol. Une diminution du cholestérol contribue également à limiter les maladies cardiovasculaires (Durairajanayagam *et al.*, 2014).

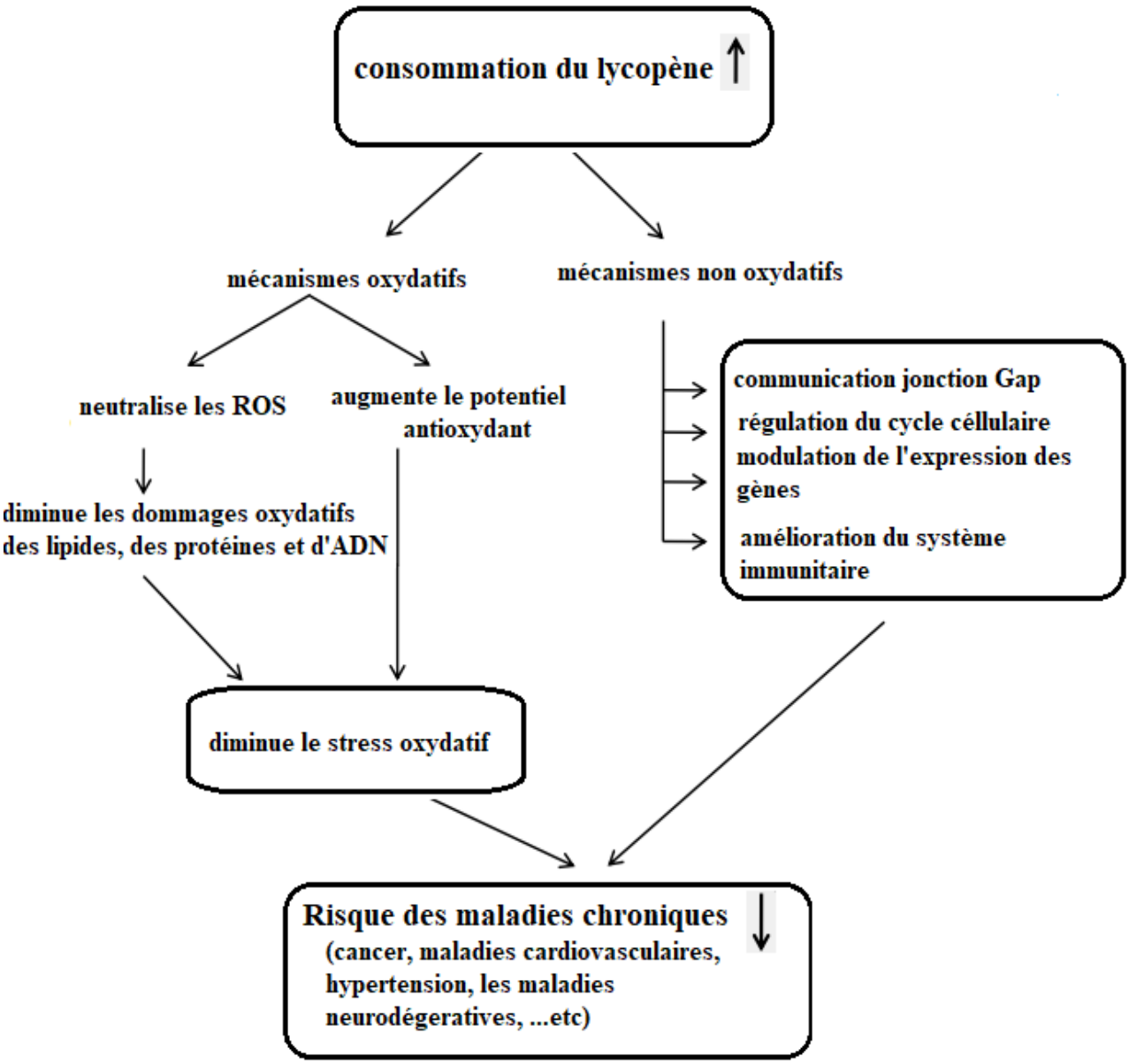

Figure 4 : Mécanismes d'action généraux du lycopène (Bailey, 2015).

3. L'activité anti-inflammatoire

Les études épidémiologiques, pharmacologiques et génétiques fournissent des preuves indiquant que l'inflammation peut augmenter le risque de cancer et peut favoriser la progression tumorale. Il existe un lien étroit entre les processus inflammatoires et le développement de la tumeur. De nombreuses cytokines inflammatoires sont des facteurs de croissance importants qui stimulent la prolifération des cellules pré malignes et activent des facteurs de transcription oncogènes, tels que le facteur nucléaire kappa B (NF-KB). Ces dernières années, l'effet anti-inflammatoire des caroténoïdes est démontré *in vitro* et *in vivo*. Il est bien établi que le lycopène

est capable d'inhiber l'activation de NF-KB, suggérant son utilité en tant que traitement contre les maladies inflammatoires. Ainsi, le potentiel de blocage de NF-KB par le lycopène offre un espoir dans le contexte de la prévention et du traitement du cancer (Ono *et al.,* 2015).

4. Le cancer

D'après Kong *et al*. (2010), l'efficacité du lycopène dans la prévention du cancer est bien établie par des études épidémiologiques, des études de culture tissulaire utilisant des lignées de cellules cancéreuses humaines, des études chez l'animal ainsi que des études réalisées chez l'homme (Kong *et al.,* 2010). Le rôle du lycopène dans la prévention du cancer de la prostate est le plus étudié. En outre, une consommation accrue du lycopène a non seulement réduit de manière significative le risque d'apparition du cancer de la prostate, mais également d'autres types de cancers, notamment le cancer du sein, le cancer du col utérin, le cancer du poumon, le cancer de l'ovaire, le cancer gastro-intestinal et le cancer du pancréas (Leong *et al.,* 2018).

5. Les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont l'une des principales causes de décès dans le monde (Leong *et al.,* 2018). Le stress oxydatif et l'inflammation sont les principaux facteurs qui contribuent à la physiopathologie de ces troubles (Morris *et al.,* 2018). Rao et Rao ont rapporté que l'ingestion du lycopène avait un impact positif sur la prévention des MCV (Rao et Rao, 2007). Des études épidémiologiques ont montré également que la consommation d'aliments à base du lycopène peut réduire les niveaux de lipoprotéines de basse densité oxydées dans le corps humain, sachant que les taux élevés de lipoprotéines de basse densité oxydées dans le sang pourraient provoquer une crise cardiaque et un accident vasculaire cérébral. En outre, la consommation du lycopène peut aider à réduire le risque de développer une hypertension (Leong *et al.,* 2018), et le mauvais cholestérol dans le corps humain (Perveen *et al.,* 2015).

6. Le diabète

L'augmentation du stress oxydatif conduit à une résistance à l'insuline, à une surcharge en glucose et en acides gras, entraînant en outre l'apparition d'un diabète. La consommation d'antioxydants alimentaires dont le lycopène pourrait potentiellement prévenir et retarder les complications du diabète (Ceriello et Testa, 2009 ; Eze *et al.,* 2018).

7. Les maladies neurodégénératives

Le stress oxydatif joue un rôle crucial dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington. Le lycopène possède des propriétés pharmacologiques uniques et, lors des études expérimentales, il a montré des effets neuroprotecteurs sur la maladie d'Alzheimer, la maladie de Huntington et l'ischémie cérébrale (Prema *et al.,* 2015 ; Chen *et al.,* 2019).

8. Autres avantages pour la santé

Le lycopène semble avoir des effets favorables contre d'autres maladies :

- Le lycopène, en raison de ses propriétés antioxydantes, peut réduire le stress oxydatif dans le foie et agir comme un médicament contre les dommages du foie. Des études ont également montré que le lycopène peut inhiber les lésions hépatiques induites par l'alcool (Sahin *et al.,* 2018 ; Dong *et al.,* 2019).
- Des études ont montré l'effet positif de lycopène sur la productivité chez les hommes et les femmes (Ranjbar Nedamani *et al.,* 2018 ; Kaya *et al.,* 2019).
- D'autres études ont montré que le lycopène protège les glandes (la thyroïde et le pancréas) du stress oxydatif grâce à son activité antioxydante (Abdul-Hamid et Salah, 2013 ; Ranjbar Nedamani *et al.,* 2018).
- La prise de lycopène (4 mg/kg, pendant trois semaines) peut atténuer et prévenir une altération de la capacité d'apprentissage et de la mémoire (Wang, Z. *et al.,* 2016).
- Une supplémentation quotidienne par le lycopène (32,5 mg) pendant huit semaines, a entraîné une réduction du poids et de la graisse corporelle (Li *et al.,* 2015).
- Le lycopène peut avoir aussi un effet positif sur le système gastrique en inhibant les ulcères de l'estomac. Le lycopène joue son rôle antiulcéreux de plusieurs manières : piégeage des radicaux libres, inhibition de la sécrétion d'acide et renforcement de la barrière muqueuse gastrique (Boyacioglu *et al.,* 2016).

VI. Les applications et le marché du lycopène

Sur le plan commercial, dans les applications les plus traditionnelles, le lycopène est utilisé comme colorants alimentaires, additifs dans l'alimentation des animaux et suppléments nutritionnels (Mussagy *et al.,* 2018).

Dans les domaines : alimentaire, pharmaceutique et nutritionnel, l'utilisation des colorants alimentaires naturels (d'origine végétale et microbienne) ne cesse de croître, en particulier en raison des préoccupations croissantes en matière de santé et de la réglementation plus restrictive des formulations alimentaires (Mussagy *et al.*, 2018).

En raison de leurs propriétés biologiques intéressantes (antioxydantes, anti-inflammatoires et antitumoraux), les sociétés pharmaceutiques et nutraceutiques ont rapidement introduit les caroténoïdes, à savoir le lycopène, améliorant à la fois la qualité du produit et la santé du consommateur (Barreiro et Barredo, 2018 ; Mussagy *et al.*, 2018).

Le lycopène en alimentation humaine est classé parmi les ingrédients fonctionnels. Il est additionné dans de nombreuses denrées alimentaires, y compris les boissons, les produits laitiers, le surimi, les confiseries, les soupes, les barres nutritionnelles, les céréales et les sauces (Kong *et al.*, 2010). Compte tenu du nombre élevé des applications, comme prévu, le marché mondial de lycopène et des caroténoïdes en général est assez impressionnant (Figure 5) : Le marché des caroténoïdes a dépassé le seuil du milliard de dollars en 2009 et les ventes du lycopène ont représenté plus de 26 millions de dollars. En 2011, le marché du lycopène s'est élevé à 60 millions de dollars au niveau mondial (BCC Research, 2011). En 2017, la valeur marchande mondiale des caroténoïdes est estimée à de 1,5 milliard USD, avec une croissance estimée à 2,0 milliards USD en 2022 et avec un taux de croissance annuel de 5,7% pour la période 2007-2022 (Saini et Keum, 2018). Le lycopène, le β-carotène, la capsanthine, l'astaxanthine, la lutéine, le rocou et la canthaxanthine partagent ensemble près de 90% de la valeur totale du marché. Les aliments pour animaux (volaille et animaux aquatiques) constituent le secteur le plus important, représentant 41% du total des secteurs, suivis des aliments et des suppléments diététiques.

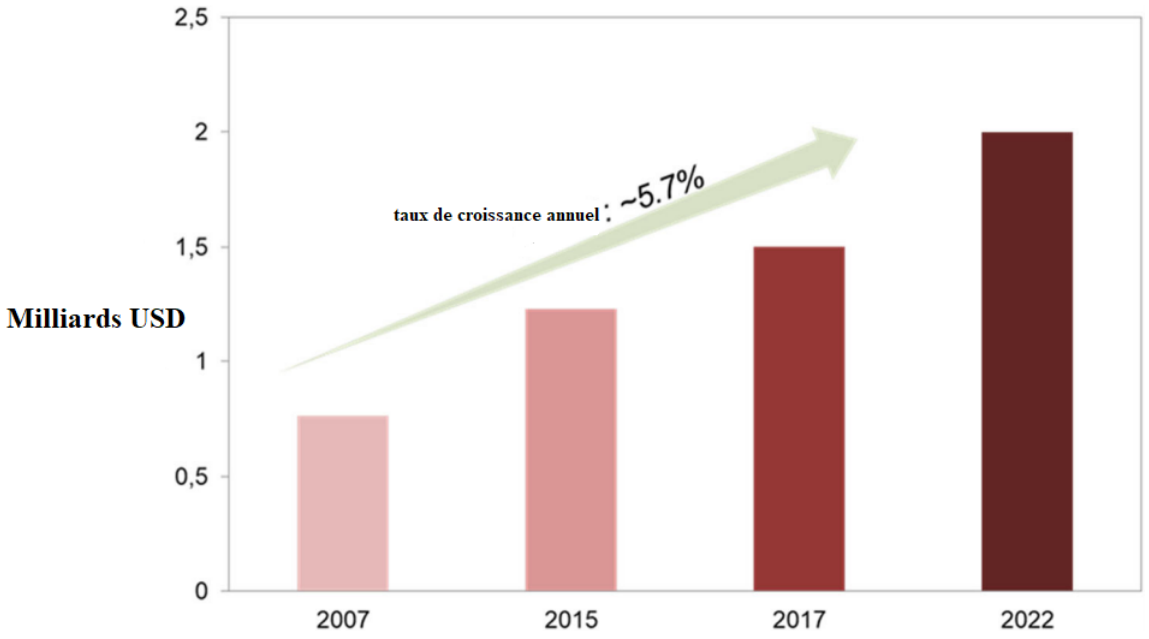

Figure 5 : Marché mondial des caroténoïdes pour la période 2007-2022 (Mussagy *et al.*, 2018)

Actuellement, la production commerciale du lycopène repose sur la synthèse chimique et l'extraction avec des solvants à partir des sources naturelles, par exemple les tomates (Zelkha *et al.*, 1997). Cependant, le coût de la production du lycopène à partir de la tomate est élevé, du fait que sa production est dépendante de la saison et du climat, et menacée par le phytopathogène *Phytophthora infestans*, qui peut détruire toute la récolte. Tous ces contraintes peuvent affecter de manière significative la qualité d lycopène (Saini et Keum, 2018). Parmi les autres facteurs qui ralentissent le processus de production : les vastes superficies nécessaires à la culture de la tomate, l'utilisation de pesticides et, surtout, le processus de purification chimique laborieux, dû à la composition particulière en caroténoïde des tomates et de la présence des pigments indésirables ressemblant au lycopène, notamment le néolycopène. En addition, la teneur des tomates en lycopène ne dépasse pas 30 mg par kg (Feofilova *et al.*, 2006).

Bien que le lycopène puisse également être synthétisé par voie chimique, le processus de synthèse est complexe et les résidus des réactifs chimiques dans le produit ont limité son utilisation (Li *et al.*, 2019a).

Pour explorer une méthode plus respectueuse de l'environnement et économique, de nombreux scientifiques se sont récemment concentrés sur la synthèse du lycopène par fermentation microbienne via des microorganismes naturels ou manipulés (Li *et al.*, 2019a).

Comparativement, les microbes ont non seulement les capacités de croissance et de reproduction rapide, mais ne peuvent pas non plus être affecter par la saison et les conditions climatiques. Les micro-organismes sont donc considérés comme une voie alternative attrayante pour la production de ce précieux composé, et sont appliqués avec succès pour produire de l'acide artémisinique, du β-carotène et de l'acide glycyrrhétinique etc (Li *et al.,* 2019a).

Sur le plan industriel, plusieurs sociétés produisent des caroténoïdes par voie biotechnologique. Des entreprises de plusieurs pays ont déjà investi dans la production microbienne des caroténoïdes naturels en utilisant différentes sources de production et en fabriquant différents types de caroténoïdes. Par exemple, l'astaxanthine est déjà produite par la culture d'*Haematococcus pluvialis*, et le β-carotène par *Dunaliella salina* (Cyanotech 2018 ; Parry Nutraceuticals, 2018).

B. LE GENRE *MYCOBACTERIUM* ET SON IMPORTANCE CLINIQUE

I. Définition et classification

Les mycobactéries appartiennent selon Bergey's au phylum des *Actinobacteria*, classe des *Schizomycetes*, ordre des *Actinomycetalee*, et famille des *Mycobacteriaceae*, cette famille contient un seul genre : *Mycobacterium*, ce genre est introduit en 1896 par Lehmann et Neumann pour y classer les mycobactéries pathogènes : *M. tuberculosis* et *M. leprae*. Les mycobactéries comptent plus de 190 espèces dont la plupart sont des saprophytes de l'environnement, mais *M. tuberculosis* répond à la définition du parasite humain, car le réservoir naturel de cette bactérie est l'homme (Kalsum, 2018).

Les mycobactéries sont des bactéries intracellulaires facultatives qui résident dans les cellules phagocytaires, en particulier les macrophages. Ce sont des bacilles droits ou légèrement incurvés aux extrémités arrondies et mesurant de 2 à 5 µm de longueur, et 0,2 à 0,3 µm de largeur, aérobies, non mobiles, non sporulants. Ces bactéries possèdent un génome riche en G + C (60 à 70 %) et de taille variable selon l'espèce avec une paroi particulière riche en acides mycoliques. Ils sont dits acido-alcoolo-résistants du fait de leur enveloppe particulière et riche en lipides, surtout les acides mycoliques. La coloration de Zielh-Neelsen permet l'identification microscopique des mycobactéries (Chiaradia, 2018).

Traditionnellement, les mycobactéries sont divisées en deux groupes : les mycobactéries à croissance lente et les mycobactéries à croissance rapide (Gutierrez Supply *et al.,* 2009).

- Les mycobactéries à croissance rapide nécessitant moins de sept jours pour former des colonies, dont la majorité (85 %) sont des saprophytes comme par exemple : *M. smegmatis, M. fortuitum, M. abscessus*.
- Les mycobactéries à croissance lente pour lesquelles une durée supérieure à sept jours est nécessaire pour former des colonies visibles, ils regroupent la majorité des espèces pathogènes (près des deux-tiers) incluant : *M. tuberculosis*, l'agent responsable de la tuberculose, et *M. leprae*, l'agent responsable de la lèpre, et *M. ulcerans*, l'agent de l'ulcère de Buruli. *M. avium, M. intracellulare, M. marinum* et *M. kansasii* sont des agents pathogènes humains opportunistes.

Selon leur importance clinique, les mycobactéries sont réparties en trois groupes :

- Les pathogènes stricts appartiennent au groupe MTC « *M. tuberculosis* complex », les espèces de ce groupe partageant une identité de séquence d'ADN d'environ 99%. Cependant, leur morphologie, leur biochimie, leur tropisme et leur pouvoir pathogène sont très différents. Ce groupe comprend *M. tuberculosis, M. africanum* (exclusivement pathogènes à l'homme), *M. microti* (un agent pathogène des rongeurs), *M. capreae* (cause de la tuberculose chez les ovins et les caprins), *M. pinnipedii* (les otaries) et *M. bovis* (large gamme d'hôtes) (Gruber *et al.*, 2008). *M. canettii* est isolé pour la première fois chez un patient atteint de la tuberculose dans les années 1960, et présente une morphologie inhabituelle avec des colonies lisses et sont connues sous le nom de bacilles tuberculeux lisses. La transmission interhumaine de maladies causées par les mycobactéries est possible par voie aérienne (tuberculose) ou par contact (lèpre).
- Les NTM pour « Non Tuberculous Mycobacteria » regroupent les mycobactéries pathogènes opportunistes généralement non pathogènes pour l'homme, mais ils peuvent provoquer des maladies chez les individus immunodéprimés. On peut citer parmi ces mycobactéries atypiques : *M. abscessus, M. fortuitum, M. avium, M. marinum, M. gordonae, M. xenopi, M. kansasii* et *M. abscessus*. Ces mycobactéries sont retrouvées chez certains animaux, dans la nourriture, sur la surface de plantes, dans l'environnement et plus particulièrement dans l'eau. Du fait de leur résistance aux décontaminants, les mycobactéries peuvent se retrouver sur le matériel médico-chirurgical ou encore dans les aquariums, piscines et systèmes de distributions

d'eau. Les maladies causées par les NTM sont appelées mycobactérioses (Chiaradia, 2018).

- *M. leprae* responsable de la lèpre chez l'homme, et *M. lepraemurium*, l'agent de la lèpre du rat. Ses deux espèces ne sont pas cultivables in-vitro (Danhaive *et al.*, 1982).

II. Les facteurs de virulence

Les facteurs de virulence de *M. tuberculosis* peuvent être divisés en deux groupes : les composants de l'enveloppe cellulaire et les protéines sécrétées :

1. L'enveloppe de la cellule

L'enveloppe cellulaire joue un rôle crucial dans l'adaptation des mycobactéries à la croissance intracellulaire, en favorisant l'adhésion des mycobactéries aux macrophages de l'hôte, en inhibant les propriétés microbicides de l'hôte et en déterminant la mort éventuelle des cellules (Rastogi *et al.*, 2001).

L'architecture et les composants de l'enveloppe cellulaire interviennent non seulement dans la survie intracellulaire et la modulation de l'immunité, mais également dans la résistance aux médicaments (Rastogi *et al.*, 2001). La composition et la complexité de l'enveloppe de la cellule mycobactérienne constituent la caractéristique la plus distinctive du genre *Mycobacterium*. Dans les mycobactéries, 30% du génome est consacré à la synthèse et au métabolisme des lipides (30 à 60% du poids sec des cellules). L'enveloppe cellulaire des mycobactéries, selon le modèle le plus récent (Figure 6), est organisée en trois compartiments superposés : une membrane plasmique phospholipidique bicouche typique, entourée d'une paroi cellulaire riche en lipides et sucres, elle-même encerclée d'une couche externe, également appelée capsule, constituée de polysaccharides, de protéines et d'une faible quantité de lipides (Kalsum, 2018). Ainsi, des agents anti-mycobactériens tels que l'Izoniazide et l'éthambutol, qui agissent en inhibant la biosynthèse ou l'assemblage des composants d'enveloppe cellulaire, se sont révélés utiles dans le traitement de la tuberculose. Ces deux médicaments, qui font partie du schéma thérapeutique de première intention de la tuberculose, inhibent la synthèse de l'acide mycolique et de l'arabinogalactane, respectivement (Kalsum, 2018).

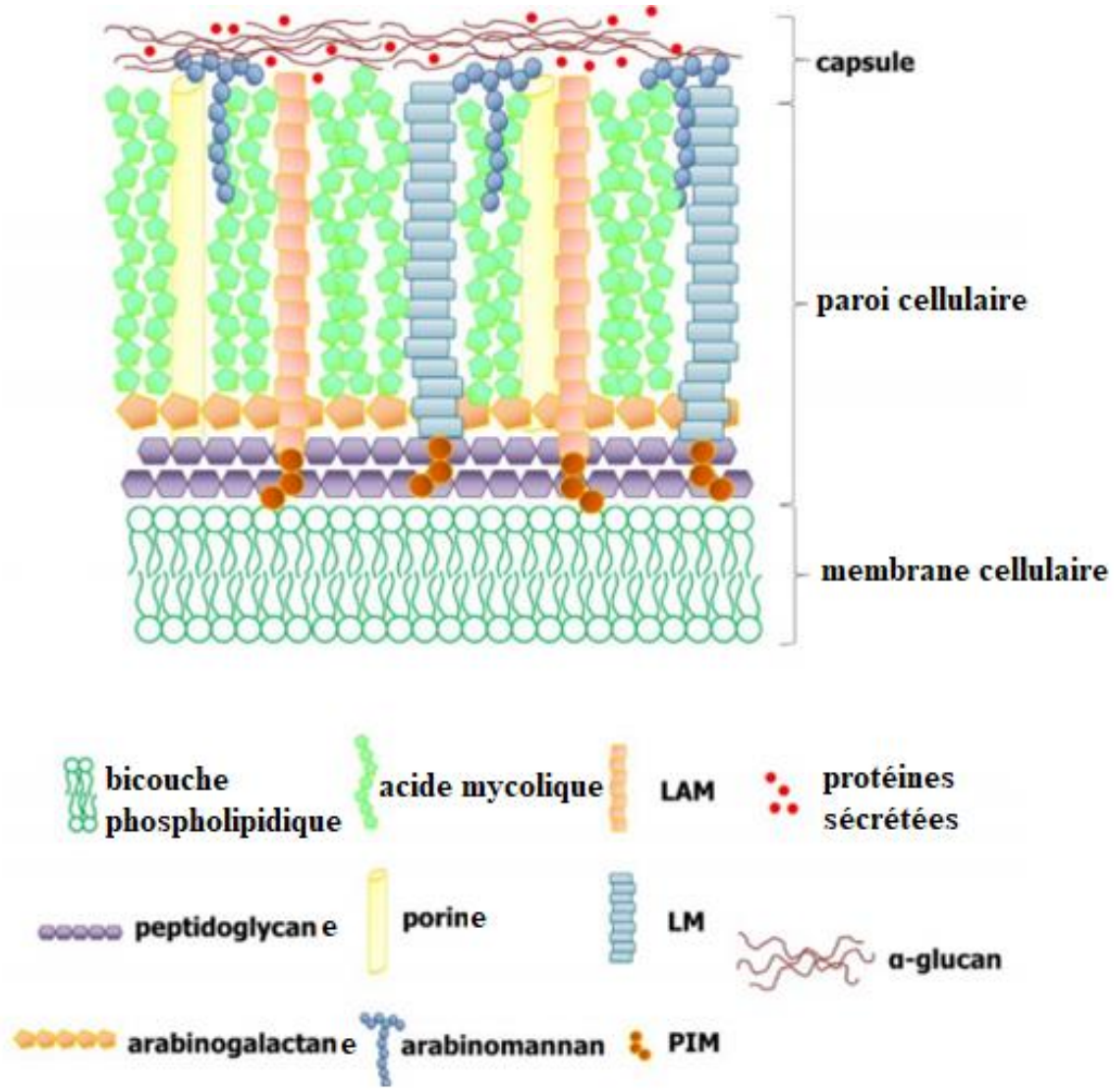

Figure 6 : Représentation schématique de l'enveloppe de la cellule de *M. tuberculosis*. LAM : lipoarabinomannane, LM : lipomannane, PIM : phosphatidyl-myo-inositol mannoside. (Kalsum, 2018)

2. Les protéines de sécrétion

Le système d'exportation des protéines est un facteur de virulence important pour les bactéries pathogènes. Les mycobactéries, comme toutes les autres bactéries, peuvent exporter les protéines cytoplasmiques vers l'environnement externe ou l'enveloppe de la cellule. Pour cela, *M. tuberculosis* possède plusieurs systèmes d'exportation de protéines :

Le Système Sec ou la voie de sécrétion générale, et le système Tat (twin arginine protein transport) ou la voie d'exportation de la double arginine translocase. Contrairement au système

Sec qui est hautement conservé parmi les bactéries, le système Tat n'est pas retrouvé dans toutes les bactéries. Ces deux systèmes transportent la majorité des protéines bactériennes du cytoplasme au travers de la membrane plasmique, et contribuent à la virulence, à la résistance aux médicaments ainsi qu'à la survie des mycobactéries. Le système de translocation Tat est absent dans les cellules de mammifères, ce qui fait de lui une bonne cible potentielle pour le développement d'antituberculeux (Chiaradia, 2018).

Il existe d'autres systèmes de sécrétion chez les mycobactéries, tels que les systèmes ESX (ESX-1 à ESX-5) qui sont impliqués dans différents processus biologiques ainsi que dans les interactions hôte-pathogène puisqu'ils possèdent diverses fonctions dans la physiologie et la virulence de la bactérie. Les cinq systèmes sont retrouvés chez la plupart des bactéries pathogènes (Chiaradia, 2018).

III. La tuberculose

1. Brève historique

La tuberculose a toujours existé, dès la préhistoire. Des hypothèses estiment que le genre *Mycobacterium* est apparu il y a environ 150 millions d'années (Barberis *et al.,* 2017). Des caractéristiques typiques de la tuberculose (des lésions de Pott, des modifications squelettiques de la colonne vertébrale) sont mises en évidence dans certaines momies égyptiennes datées de 3 000 ans, comme dans celles du Perou precolombien datées de 700 ans après JC, et dans des squelettes du moyen-Age, en Hongrie et en Angleterre. La description de la maladie est également documentée dans la littérature arabe (Sharma et Mohan, 2013).

Les textes historiques ont montré que cette maladie était reconnue sous plusieurs noms à différentes époques, telles que « phthisie » ou « consomption » par Hippocrate, « Scrofula » en Europe au Moyen-Âge, et « King's Evil » en Angleterre et en France, le nom renvoie à l'idée que la maladie ne peut être guérie que par une touche royale (Barberis *et al.,* 2017).

En 1865, le médecin militaire français, Jean-Antoine Villemin, a soupçonné la nature microbienne de la tuberculose, lorsqu'une infection ressemblant à une phthisie est reproduite avec succès chez des lapins inoculés avec des broyats de lésions tuberculeuses humaines et bovines. Également appelée « peste blanche », la tuberculose était une des principales causes de décès en Europe et aux États-Unis d'Amérique au XIXe siècle (Daniel, 2015).

La découverte de *M. tuberculosis* en tant qu'agent causal par le Dr Robert Koch en 1882, la mise au point du BCG (Bacille Calmette-Guérin) en 1921 par Calmette et Guérin, la découverte de la streptomycine en 1943 par Waksman et, plus récemment, du séquençage complet du génome de *M. tuberculosis* en 1998 ont entraîné une véritable révolution dans la chimiothérapie antituberculeuse (Nguyen, 2016).

Cependant, depuis la fin des années 1980, le nombre des cas de la tuberculose dans le monde a augmenté rapidement, Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et la propagation des cas de TB à bacilles résistants aux médicaments en sont les principaux facteurs favorisants (Nguyen, 2016). C'est dans ces circonstances qu'en 1993, l'OMS a déclaré la tuberculose « urgence mondiale », et différentes stratégies de lutte sont mises en place, comme la stratégie DOTS (Directly Observed Treatment Short course) en 1995 qui repose sur une politique mondiale visant à améliorer la détection, le traitement et le suivi des malades en contrôlant la prise en charge des traitements, « STOP TB » en 2006 et « The End TB Strategy » en 2015 qui vise à réduire de 95 % le nombre de décès et de 90 % l'incidence de la tuberculose entre 2015 et 2035. De nos jours, la tuberculose reste comme l'un des agents pathogènes les plus fréquents. Le bacille tuberculeux infecte actuellement un tiers de la population mondiale (environ deux milliards de personnes) (WHO, 2016). Outre sa capacité innée à survivre des mécanismes de défense de l'hôte, *M. tuberculosis* est capable de résister à la plupart des agents antimicrobiens actuellement disponibles (Nguyen et Pieters, 2009).

La tuberculose se manifeste majoritairement sous forme d'infection pulmonaire (70 % des cas), elle est généralement contractée par inhalation du bacille d'un patient infecté et provoque une destruction irréversible des poumons (Figure 7). Il existe par ailleurs des formes extra pulmonaires, telles que les tuberculoses osseuse, méningée ou encore ganglionnaire (Delmas, 2017).

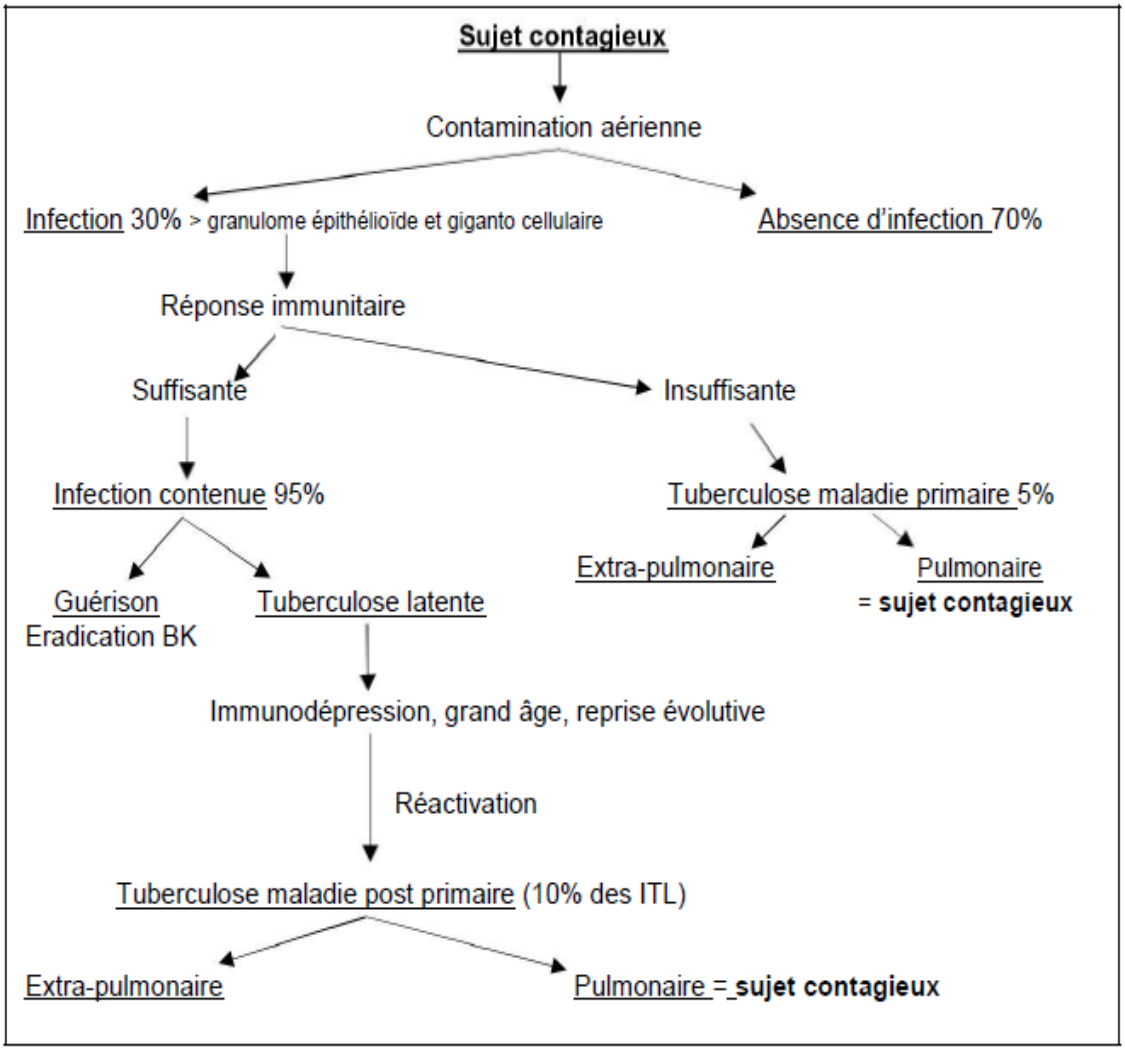

Figure 7 : Schéma de transmission et du développement de la tuberculose (Delmas, 2017)

2. La prévention contre la tuberculose et le vaccin BCG

Jusqu'à présent, le BCG est le seul vaccin antituberculeux autorisé à usage humain. Il est préparé au début du XXème siècle par Calmette et Guérin et consiste en une souche vivante atténuée de *M. bovis* qui est obtenue après 231 passages successifs de *M. bovis* sur un milieu de culture composé de tranches de pommes de terre immergées dans de la bile de bœuf additionné de glycérine. Le vaccin est administré pour la première fois par voie orale en 1921. Depuis lors, le vaccin a fait l'objet d'études approfondies au cours d'essais cliniques afin d'évaluer son efficacité dans la prévention de la tuberculose. Il est prouvé que ce vaccin est efficace pour prévenir les formes de tuberculose méningée et disséminée chez l'enfant (Russell Barry *et al.*, 2010), elle présente une efficacité variable en matière de protection contre la tuberculose pulmonaire chez l'adulte. Ce vaccin ne convient pas non plus aux patients atteints

du VIH car il contient une mycobactérie vivante. Par conséquent, un vaccin antituberculeux plus efficace est nécessaire pour un contrôle plus efficace de la tuberculose (Zhu *et al.*, 2018).

3. Le traitement de la tuberculose

Il y a environ 70 ans, il n'existait aucun médicament pour traiter la tuberculose, et les médicaments découverts dans les années 1950 et 1960 sont toujours utilisés comme médicaments antituberculeux de première ligne (Tableau 1).

Dans le cas d'une tuberculose latente, le traitement de l'infection est préventif, et vise à diminuer le risque d'évolution vers une tuberculose active. Plusieurs types de schémas sont proposés (Pai *et al.*, 2016) :

- Monothérapie par Isoniazide (5mg/kg/jour) pendant 6 à 9 mois.
- Bithérapie par Isoniazide (5mg/kg/j) et Rifampicine (10mg/kg/j) pendant 3 mois.
- Bithérapie par Rifampicine (10mg/kg/j) et Pyrazinamide (20mg/kg/j) pendant 2 mois.

Le traitement de la tuberculose maladie est une tâche difficile car il nécessite l'administration de plusieurs médicaments pendant une longue période. Le schéma thérapeutique standard pour traiter la tuberculose repose sur l'association de plusieurs antibiotiques antituberculeux (Tableau 1). Les principaux antituberculeux sont : l'isoniazide (INH), la rifampicine (RIF), la pyrazinamide (PZA), l'éthambutol (EMB), et la streptomycine (SM). Le traitement est d'une durée de six mois et comporte deux phases : La première phase de deux mois d'une quadrithérapie associant INH, RIF, PZA et EMB, elle est dite intensive, et a pour objectif de détruire rapidement les bacilles, limitant ainsi l'acquisition de résistances et la contagiosité, suivie d'une bithérapie de quatre mois associant RIF et INH, cette seconde phase est une phase d'entretien, qui permet de stériliser de façon durable les lésions pour éviter les rechutes (Zhang, 2007).

Tableau 1 : Différents antibiotiques antituberculeux, leurs cibles et mécanismes d'action (Pai *et al.*, 2016)

Molécule	Effet sur la bactérie	Cible	Mécanisme d'action
Antibiotiques de première ligne			
Isoniazide	Bactéricide	Plusieurs cibles. La principale : InhA	Inhibe la biosynthèse des acides mycoliques
Rifampicine	Bactéricide	Sous unité β de l'ARN polymérase	Inhibe la synthèse d'ARN
Pyrazinamide	Bactéricide (pH 5,5-6) / Bactériostatique	Sous unité ribosomale 30S Membrane (transport et potentiel éngergétique) PanD mas et ppsA-E	Inhibe trans-traduction des protéines Inhibe les transport et énergie membranaires Inhibe la synthèse du co-enzyme A et du pantothenate Inhibe la synthèse des DIM
Ethambutol	Bactériostatique	Arabinosyl transférases	Inhibition de la synthèse de l'arabinogalactane Biosynthèse des phospholipides Métabolisme des ARNs
Antibiotiques de seconde ligne			
Streptomycine	Bactéricide	Unité ribosomale 30S	Inhibe la synthèse protéique
Ofloxacine	Bactéricide	ADN gyrase et ADN topoisomérase	Inhibe la réplication de l'ADN
Kanamycine et amikacine	Bactéricide	Unité ribosomale 30S	Inhibe la synthèse protéique
Capréomycine	Bactéricide	Unités ribosomales 30S et 50S	Inhibe la synthèse protéique
Ethionamide	Bactériostatique	InhA	Inhibe la biosynthèse des acides mycoliques
Acide *para*-amino salicylique (PAS)	Bactériostatique	Dihydropteroate synthase	Inhibe la biosynthèse de l'acide folique
Cyclosérine	Bactériostatique	Ddl	Inhibe la synthèse du peptidoglycane

Pour des cas particuliers, des schémas thérapeutiques spécifiques sont définis en fonction des formes de la tuberculose (tuberculose maladie ou tuberculose latente), de sa localisation, de son degré de gravité, et des antécédents de traitement du patient (WHO, 2009).

Pour les cas de co-infection avec le VIH, le traitement reste difficile et compliqué grâce aux interactions médicamenteuses entre les traitements utilisés contre le VIH et la tuberculose, notamment entre la RIF, antituberculeux majeur, et de nombreux antirétroviraux (Spigelman, 2007).

Pour les gens à risque tels que les immunodéprimés, il existe un traitement préventif ou chimio-prophylaxie qui consiste en une prise quotidienne d'INH pendant six à neuf mois. Le taux de protection de ce traitement est élevé (supérieur à 90%) mais reste cependant associé aux effets indésirables de la prise à long terme de l'INH tels que l'hépatotoxicité (Silva et Ainsa, 2007).

Malgré leur efficacité, ces traitements très longs présentent des contraintes et sont parfois interrompus. Cette interruption est un problème majeur rencontré car il contribue à l'émergence de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques. Les antibiotiques de seconde ligne (Tableau 1), plus toxiques, sont utilisés pour lutter contre les souches résistantes aux antibiotiques de première ligne. Globalement, le taux de guérison de la tuberculose pharmacorésistante est faible, car les médicaments de deuxième intention (Tableau 1) utilisés pour traiter cette maladie sont non seulement coûteux et possède une efficacité limitée, mais provoque également des effets secondaires indésirables et toxiques (Seung *et al.,* 2015). Ces terribles limitations soulignent le besoin de nouvelles stratégies de traitement et de gestion de la tuberculose à la fois sensible et résistante. Une mauvaise utilisation et une mauvaise gestion des médicaments de deuxième intention peuvent conduire à l'apparition des souches ultrarésistantes, qui présentent maintenant une menace plus grave (Matteelli *et al.,* 2007).

Tous les schémas thérapeutiques de la tuberculose pharmacorésistante doivent inclure un médicament de première ligne, un des médicaments injectables de deuxième ligne (amikacine, capréomycine ou kanamycine), une fluoroquinolone (Les fluoroquinolones sont des composants essentiels du schéma thérapeutique utilisé pour la tuberculose multirésistante). Ces médicaments bactéricides inhibent l'ADN gyrase, ce qui entraîne l'échec du surenroulement de l'ADN bactérien, ainsi que la réplication de l'ADN et donc la mort bactérienne (Miotto *et al.,* 2015) et d'autres médicaments de seconde intention comme l'éthionamide et la cyclosérine (WHO, 2009).

4. La résistance de *M. Tuberculosis* aux antituberculeux

4.1.La résistance naturelle et la résistance acquise

M. tuberculosis possède plusieurs propriétés biologiques cliniquement importantes qui en font une cible difficile à traiter, d'où la nécessité de traiter la tuberculose avec un schéma thérapeutique comportant plusieurs médicaments pendant une longue durée. *M. tuberculosis* est un microorganisme résistant et résilient qui acquiert des stratégies uniques pour prolonger sa

résidence dans l'hôte. La teneur élevée en lipides dans sa paroi cellulaire et le faible nombre de pores constituent un bouclier de résistance solide à de nombreux composés antibactériens. De plus, les cellules sont hydrophobes et ont tendance à s'agglutiner (Gawad et Bonde, 2018). D'autres facteurs tels que la production d'enzymes modifiant les antibiotiques et leur activité ont également été décrits chez *M. tuberculosis* comme, 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).

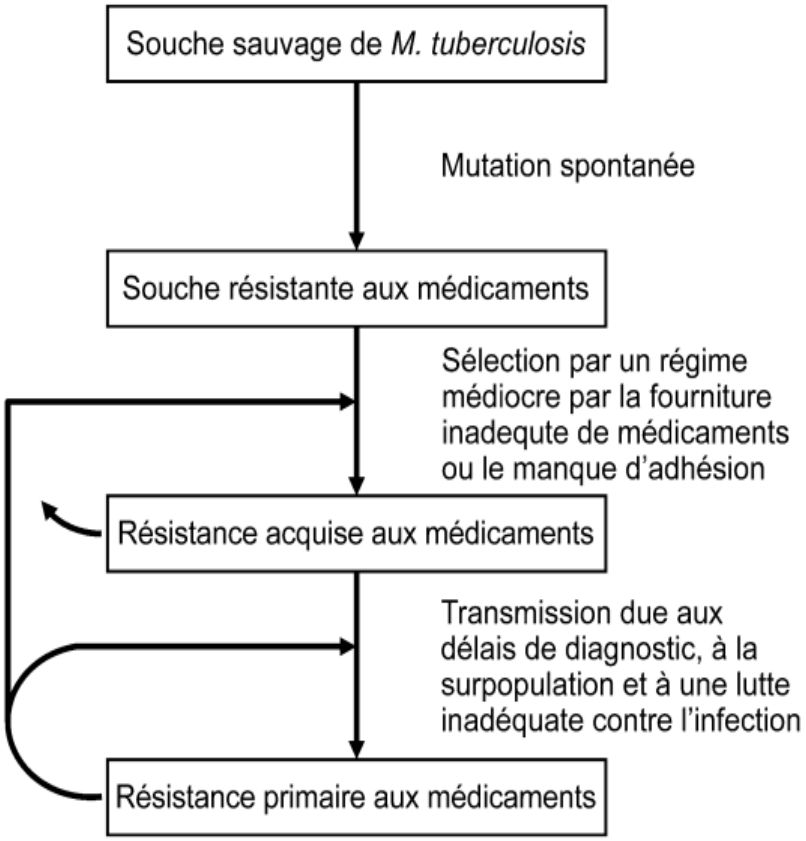

Figure 8 : Concepts du développement de la TB résistante aux médicaments (Zhang et Yew, 2009)

La résistance est un phénomène biologique observé chez *M. tuberculosis* depuis l'avènement du premier antibiotique, et les cas de la résistance accrue ont continué à se manifester parallèlement à l'évolution de la chimiothérapie antituberculeuse. L'un des principaux défis du traitement de la tuberculose est la longue durée et la complexité des combinaisons de médicaments, et les taux d'achèvement des thérapies longues sont inférieurs aux prévisions. La résistance peut résulter d'une primo-infection par une bactérie résistante aux

médicaments (résistance primaire), comme elle peut être développée au cours d'un traitement non adéquat (résistance acquise) (Figure 8) (Matteelli *et al.*, 2007). La résistance acquise chez les mycobactéries est toujours liée à des mutations au niveau des gènes chromosomiques et n'est pas transférable d'une souche à l'autre (Veziris *et al.*, 2005). Chez les patients co-infectés par le VIH, le risque d'acquérir une résistance est plus élevée en raison de la malabsorption des médicaments antituberculeux (Gurumurthy *et al.*, 2004). La situation devient particulièrement préjudiciable si la résistance n'est pas identifiée avant le début du traitement (Boritsch et Brosch, 2016). La résistance à l'INH est la forme la plus couramment rencontrée.

4.2.La résistance primaire et la résistance secondaire

Si des bacilles tuberculeux résistants sont isolés d'un patient qui n'a jamais été traité pour une tuberculose auparavant, est considérée comme une souche de « résistance primaire ». Par contre, une résistance qui se développe chez un patient traité précédemment pour une tuberculose est considérée comme une « résistance secondaire ou acquise » (Kempker *et al.*, 2015). Plutôt que ces deux termes on préfère utiliser aujourd'hui respectivement les termes de « résistance initiale » et de « résistance acquise au traitement ».

4.3.Les formes de la résistance

Troie niveaux de résistance sont différenciés :

- Les souches multirésistantes aux antibiotiques qui résistent au moins à la rifampicine et à l'isoniazide.
- Depuis 2006, une forme plus grave de la tuberculose est apparue : il s'agit de la tuberculose ultrarésistante, qui est caractérisée comme étant une résistante à la rifampicine et à l'isoniazide, et aussi à certaines molécules de deuxième intention injectables : au minimum un antibiotique de type fluoroquinolone et un des trois antibiotiques injectables (kanamycine, amikacine ou capréomycine).
- La tuberculose extrêmement résistante peut résister à tous les médicaments antituberculeux existants.

4.4.Mécanisme d'action et de résistance aux antibiotiques de première ligne

L'INH, un médicament de synthèse, connu chimiquement comme hydrazide d'acide isonicotinique, est le composé le plus efficace sur le plan clinique pour traiter la tuberculose. Il a un effet bactéricide contre les bactéries en division active. Au cours des deux premiers jours de traitement, l'INH réduit de près de 95% la charge bactérienne, mais après cette période, il limite l'émergence de la résistance à la RIF. Il est utilisé également en tant que médicament prophylactique contre l'infection tuberculeuse latente pour prévenir la réactivation de la maladie (Unissa *et al.,* 2016). C'est un médicament qui pénètre dans la cellule mycobactérienne par diffusion passive à travers la paroi cellulaire. À l'intérieur de la bactérie, il est activé par la catalase-peroxydase mycobactérienne KatG. Le métabolite généré produit différentes ROS, parmi lesquelles le radical isonicotinoyle qui inhibe l'enzyme énoyl-ACP réductase InhA, impliquée dans la biosynthèse de l'acide mycolique (Unissa *et al.,* 2016). La mutation se produit soit dans le gène *katG*, soit dans la région promotrice du gène *inhA* (Tableau 2) (Vilchèze et Jacobs 2014).

Le RIF est un dérivé semi-synthétique d'hydrazone de la rifamycine. Cette molécule complexe est bactéricide et inhibe l'initiation de la synthèse de l'ARN en altérant la sous-unité β de l'enzyme ARN polymérase bactérienne. La résistance à cet antibiotique est due à une mutation du gène *rpoB* de l'ARN polymérase codant la sous-unité bêta (Tableau 2), cette mutation modifie les résidus du site de fixation de la rifampicine à l'ARN polymérase, ce qui entraine une diminution de l'affinité pour cette antibiotique (Telenti *et al.,* 1993).

Tableau 2 : Mécanismes de résistance aux médicaments chez *M. tuberculosis* (Zhang et Yew, 2009)

Médicament (année de la découverte)	CMI µg/ml	Gène(s) impliqué(s) dans la résistance	Fonction du gène	Rôle	Mécanisme d'action	Fréquence de mutation %
Isoniazide (1952)	0,02–0,2	*katG* *inh*A	Catalase-peroxydase Enoyl ACP réductase	Transformation du prodrug Cible du médicament	Inhibition de la biosynthèse de l'acide mycolique et autres effets multiples	50–95 8–43
Rifampicine (1966)	0,05–1	*rpo*B	Sous-unité β d'ARN polymérase	Cible du médicament	Inhibition de la synthèse d'ARN	95
Pyrazinamide (1952)	16–50 (pH 5,5)	*pnc*A	Nicotinamidase/ pyrazinamidase	Transformation du prodrug	Disparition de l'énergie de membrane	72–97
Ethambutol (1961)	1–5	*emb*B	Arabinosyl transférase	Cible du médicament	Inhibition de la synthèse d'arabinigalactan	47–65
Streptomycine (1944)	2–8	*rps*L *rrs* *gid*B	Protéine ribosomiale S12 rARN 16S rARN méthyltransférase (G527 dans la boucle 530)	Cible du médicament Cible du médicament Cible du médicament	Inhibition de la synthèse des protéines	52–59 8–21 ?
Amikacine/kanamycine (1957)	2–4	*rrs*	rARN 16S rARN 16S	Cible du médicament	Inhibition de la synthèse des protéines	76
Capréomycine (1960)		*tly*A	2'-O-méthyltransférase			
Quinolones (1963)	0,5–2,5	*gyr*A *gyr*B	Sous-unité A d'ADN gyrase Sous-unité Bd'ADN gyrase	Cible du médicament	Inhibition de l'ADN gyrase	75–94
Ethionamide (1956)	2,5–10	*etaA*/*eth*A *inh*A	Flavine monooxygénase	Transformation du prodrug Cible du médicament	Inhibition de la synthèse d'acide mycolique	37 56
PAS (1946)	1–8	*thy*A	Thymidylate synthase	Activation du médicament ?	Inhibition de l'acide folique et du métabolisme du fer ?	36

PZA est l'analogue pyrazine du nicotinamide. Contrairement aux autres médicaments antituberculeux, le PZA est plus efficace contre les bactéries vieilles (non en croissance), mais il ne fonctionne que dans un pH acide de 5,5. La PZA fait partie des médicaments de première intention contre la tuberculose pharmacosensible, mais est également fréquemment utilisée pour la TB pharmacorésistante. Il agit par différentes voies, telles que la perturbation du transport membranaire, la synthèse des acides gras et l'inhibition de traduction de *M. tuberculosis*. La mutation se produit dans le gène *pncA* (Tableau 2) qui code pour l'enzyme pyrazinamidase (qui convertit la PZA en molécule active : l'acide pyrazinoïque) (Kalsum, 2018).

L'EMB a une action bactériostatique et agit sur les bactéries extracellulaires. Son principal mécanisme d'action contre les mycobactéries est l'inhibition de la biosynthèse de l'arabinogalactane. Il inhibe également la biosynthèse du noyau arabinane de la lipoarabinomannan et peut également altérer le métabolisme du glucose. La résistance (Tableau 2) est trouvée dans le groupe de gènes associés à la biosynthèse de l'arabinogalactane (composé de la paroi mycobactérienne) (Kalsum, 2018).

4.5.Comment minimiser l'émergence de la résistance ?

La mauvaise observance des patients est souvent citée comme la cause de la résistance aux médicaments antituberculeux ; mais, des facteurs tels que la pharmacocinétique individuelle, et l'utilisation des schémas thérapeutiques standardisés en présence d'une pharmacorésistance non diagnostiquée, peuvent être les principaux facteurs. Des degrés d'individualisation plus élevés du traitement, basés sur les caractéristiques microbiologiques de la bactérie infectante (résistance préexistante, hétérogénéité et type de la souche), et les caractéristiques cliniques du patient, pourraient minimiser le risque d'apparition d'une nouvelle résistance, en particulier pour les nouveaux médicaments antituberculeux et ceux en développement clinique. Cependant, l'individualisation du traitement nécessite une compréhension des synergies, des antagonismes et de la résistance croisée pour un large éventail des schémas d'association possibles (Koch *et al.*, 2018).

5. L’épidémiologie

La tuberculose est l'une des 10 principales causes de décès dans le monde, et la première cause de décès dus à un seul agent infectieux, avec environ 10,4 millions de nouveaux cas et 1,7 million de décès par an (Gagneux, 2018). En outre, un quart de la population humaine mondiale est infectée de manière latente, ce qui constitue un vaste réservoir de futurs cas de tuberculose évolutive (Houben *et al.*, 2016). Chaque seconde, une nouvelle personne dans le monde est infectée par le bacille de Koch (Mouchrik *et al.*, 2018). L’épidémiologie de la tuberculose est répartie de manière hétérogène dans le monde entier, avec une forte prévalence dans les pays en développement densément peuplés. Six pays représentent 60% des nouveaux cas enregistré de la tuberculose, à savoir : l’Inde, l’Indonésie, la Chine, Nigéria, Philippines, Pakistan et l’Afrique du Sud (WHO, 2017). La tuberculose touche surtout les groupes de population les plus pauvres, les plus vulnérables et les plus marginalisés. L'OMS a également confirmé dans son rapport que 2,7% de ces nouveaux cas étaient survenus dans la région

européenne (WHO, 2017). En 2014, l'OMS a mis en place une nouvelle approche globale de la lutte antituberculeuse, baptisée « Stratégie de lutte antituberculeuse », qui doit permettre d'atteindre un taux d'incidence mondial inférieur à un par million d'habitants d'ici 2030 (Kalsum, 2018). À l'échelle mondiale, le taux d'incidence de la tuberculose a diminué de 2% par an entre 2000 et 2017 ; Cependant, une réduction estimée de 4 à 5% par an est nécessaire pour atteindre le premier jalon de la stratégie de lutte contre la tuberculose endémique d'ici 2020 (Woodman *et al.,* 2019). La lutte mondiale contre la tuberculose est entravée par le fait qu'elle continue de s'appuyer largement sur une technique de diagnostic à faible sensibilité basée sur la microscopie, vieille de 120 ans, sur un vaccin de 100 ans d'une efficacité limitée et sur des médicaments de 40 à 60 ans (Gagneux, 2018). En plus, le traitement de cette maladie dévastatrice nécessite l'administration de plusieurs médicaments (appelés médicaments de première intention) pendant 6 à 9 mois (Jiang *et al.,* 2019). La durée du traitement est trop longue et certains patients ne peuvent pas adhérer au médicament, qui est l'une des causes de l'échec de la chimiothérapie. En conséquence, la multirésistance et l'ultrarésistance aux médicaments antituberculeux, en plus de la co-infection avec le VIH et d'autres comorbidités telles que le diabète de type 2, alimentent les épidémies de tuberculose (Dheda *et al.,* 2017). La tuberculose résistante est une menace permanente. En 2017, il y avait 558 000 nouveaux cas de la tuberculose résistante, dont 457560 étaient atteints de la tuberculose multirésistante et ultrarésistance (Jiang *et al.,* 2019). L'épidémie de VIH constitue un défi majeur pour la prévention et le contrôle de la tuberculose. Selon l'Organisation mondiale de la santé, on estime à 1,2 million le nombre de nouveaux cas de tuberculose chez les personnes vivant avec le VIH en 2016, dont 71% vivaient en Afrique (WHO, 2017). A l'échelle mondiale, on estime que le risque de la tuberculose est 26 à 31 fois plus élevé chez les personnes infectées par le VIH (Gelaw *et al.,* 2019).

Au Maroc, l'incidence mondiale de la tuberculose est très élevée, avec près de 107 nouveaux cas pour 100 000 habitants par an, soit environ 28 000 nouveaux cas par an (Oudghiri *et al.,* 2018).

C. LES BIOFILMS

I. Définition

Un biofilm est un assemblage des cellules microbiennes, qui sont associées de manière irréversible (non éliminé par rinçage doux) à une surface et enfermées dans une matrice auto-produites des exopolysaccharides (EPS) sous différents types de stress, tels que la limitation

des nutriments, le choc thermique et l'exposition aux antibiotiques (Costerton *et al.,* 1999 ; Hall-Stoodley *et al.,* 2004). Les EPS consistent principalement en polysaccharides, ADN et protéines (Xiang *et al.,* 2014). Des matériaux non-cellulaires tels que des cristaux minéraux, des particules de corrosion, des particules d'argile ou de limon, ou des composants sanguins, en fonction de l'environnement dans lequel le biofilm s'est développé, peuvent également être trouvés dans la matrice de biofilm. La formation du biofilm survient en réponse à des signaux extracellulaires, soit présents dans l'environnement ou produits par les cellules bactériennes. Le mode de vie en biofilms permet aux microorganismes de s'adapter rapidement en fonction des besoins ou des stress environnementaux. La vie en biofilms est un processus programmé, dans lequel les cellules participantes doivent établir des contacts physiques et des communications chimiques entre elles, et s'adapter en permanence à l'évolution des microenvironnements au sein du biofilm (Yang *et al.,* 2017). Ainsi, les cellules en biofilms sont différentes de leurs homologues planctoniques en termes des gènes transcrits et des phénotypes (Esteban et García-Coca, 2018).

Les biofilms peuvent se former sur une grande variété des surfaces biotiques et abiotiques, y compris les tissus vivants, les dispositifs médicaux, les canalisations d'eau potable, ou les systèmes aquatiques naturels et, dans le cas des mycobactéries, ils peuvent se former sur des surfaces air-liquide (da Costa Flores *et al.,* 2016). Le mode de croissance en biofilm est avantageux pour les micro-organismes, car ils forment des communautés structurées tridimensionnellement avec des canaux fluides pour le transport du substrat, des déchets et des molécules de signalisation (Billings *et al.,* 2015).

Caldwell *et al*. (1997) ont souligné quatre caractéristiques du biofilm :

- Autopoiesis : le biofilm possède la capacité de s'autoorganiser.
- Homéostasie : le biofilm résiste aux perturbations environnementales.
- Synergie : le biofilm est plus efficace en association qu'en isolement.
- Communauté : le biofilm réagit aux changements environnementaux comme une unité.

Les biofilms formés par les mycobactéries peuvent être définis de la même manière que tout autre biofilm. Cependant, certaines mycobactéries peuvent développer ces structures non seulement sur des surfaces, mais également sur l'interface air-média (Ojha *et al.,* 2008). Ce phénomène peut s'expliquer par la composition différente de la matrice extracellulaire du

biofilm et par les caractéristiques uniques de la paroi cellulaire mycobactérienne, notamment la présence de taux élevés de lipides (Esteban et García-Coca, 2018).

De nombreuses études ont montré la capacité de plusieurs espèces de mycobactéries à former des biofilms, à savoir : *M. tuberculosis, M. bovis, M. marinum, M. avium, M. abscessus* et plusieurs autres espèces (Ojha *et al.,* 2008 ; Padhi *et al.,* 2015 ; Fennelly *et al.,* 2016 ; Ojha., 2018).

II. Le biofilm mycobactérien

Les microbes sont décrits pour la première fois en tant que communautés de cellules individuelles par Antonie van Leeuwenhoek en 1684, lorsqu'il a rapporté ses observations microscopiques des « scuff » (plaques) dentaires chez l'homme sous forme « d'animalcules ». Pendant quelque temps après cette découverte, on a pensé que les bactéries existent sous forme d'organismes unicellulaires, flottants (planctoniques). Ce paradigme a commencé à changer au début des années 1930, lorsque le Dr Arthur Henrici a noté que les bactéries isolées des environnements aquatiques s'accumulent et se développent sur des surfaces immergées (Henrici, 1933). Cette observation est confirmée par Zobell (1943) qui a observé que les bactéries colonisent préférentiellement les parois des flacons. Le phénomène des cellules mycobactériennes formant des "agrégats" ou "pellicules" est décrit dans les débuts de la mycobactériologie (Löwenstein, 1920 ; Calmette, 1936): dans un article crucial sur l'étiologie de la tuberculose, Robert Koch a décrit l'apparition des «cellules qui sont pressées ensemble et disposées en faisceaux» (Koch, 1982). Des études ultérieures ont décrit avec des images, des « pellicules » formées par *M. tuberculosis* dans un milieu liquide (Calmette, 1936) très similaires à ce que l'on qualifie aujourd'hui de biofilms (Ojha *et al.,* 2008). Des descriptions similaires pour les bacilles aviaires et autres sont également rapportées (Löwenstein, 1920). Il est donc clairement démontré que les mycobactéries se développent naturellement en biofilm. Le premier rapport sur le concept moderne de biofilm date de 1978, lorsque Costerton *et al*. (1978) ont publié leurs premières observations d'une large gamme d'échantillons, allant des liquides du rumen aux implants médicaux, montrant des populations bactériennes comme des microcolonies adhérentes encapsulées dans de l'exopolysaccharide (EPS) (Costerton *et al.,* 1978). En outre, il est montré que ces communautés sessiles se distinguent par leur résistance aux agents antimicrobiens (Richards et Ojha, 2014). Ces découvertes sont suivies d'observations microscopiques approfondies des surfaces biotiques et abiotiques, et il est apparu

par la suite que les biofilms constituent le mode de vie prédominant des microbes, et posent d'importants défis pour le traitement des infections microbiennes (Richards et Ojha, 2014).

III. Le développement du biofilm mycobactérien

Le développement du biofilm est très dynamique et complexe (Figure 4). Les bactéries planctoniques s'attachent d'abord à une surface solide, puis des microcolonies se forment et s'encapsulent dans une matrice des polymères extracellulaires. La microcolonie enveloppée par l'EPS peut ensuite devenir un biofilm. L'agrégation bactérienne et le développement des biofilms et leur maturation ultérieure peuvent être à la fois réversibles et irréversibles. La fixation réversible des bactéries leur permet de se détacher et d'adhérer à différentes surfaces, amorçant ainsi le développement d'un nouveau biofilm (Figure 9). Chaque étape du développement du biofilm bactérien est distincte. La première étape est l'initiation de l'adhésion cellulaire ; à ce stade, les bactéries sont vulnérables et l'efficacité des antibiotiques est idéale. La deuxième étape est le développement, dans lequel les bactéries adhèrent à une surface solide et sécrètent une EPS abondante, aboutissant à un biofilm mûri. L'EPS est crucial pour la formation de biofilm bactérien à ce stade. La troisième étape est la maturation du biofilm, dans laquelle les structures intégrées deviennent plus résistantes aux antibiotiques. La clarithromycine, l'azithromycine et la moxifloxacine sont efficaces contre le biofilm de *M. avium* au stade précoce mais pas au stade mature. Les mycobactéries présentes dans les biofilms peuvent résister à des concentrations d'antibiotiques beaucoup plus élevées que leurs homologues planctoniques. La communication intercellulaire se produit à travers un phénomène de quorum sensing (Esteban et García-Coca, 2018).

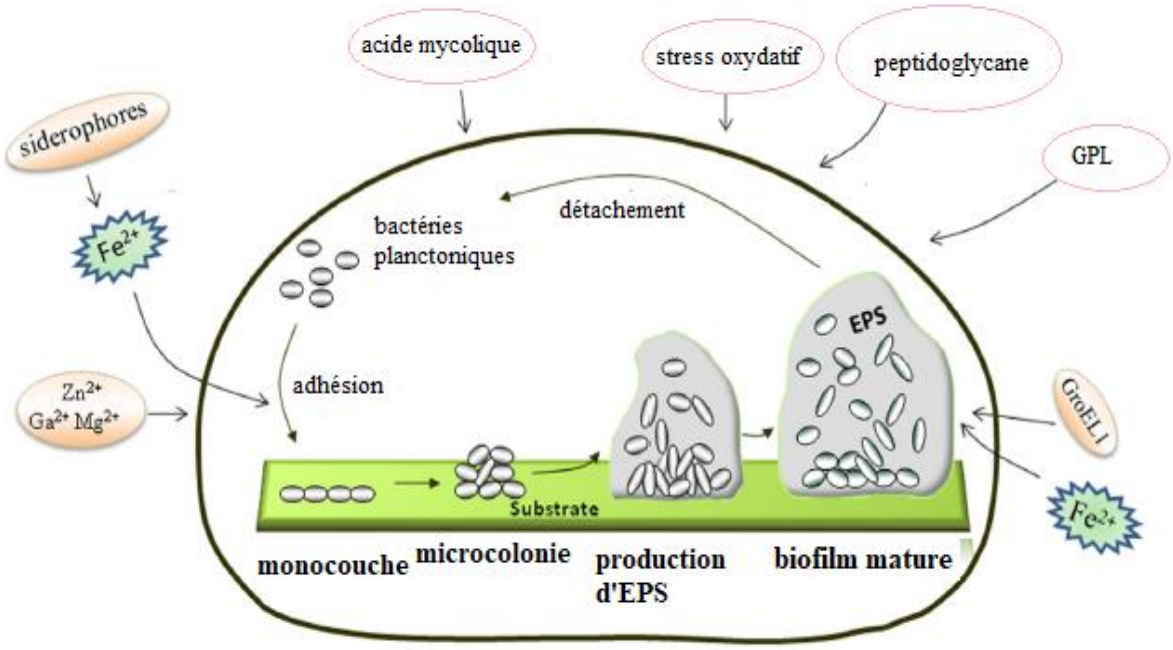

Figure 9 : Processus de formation régulation du biofilm Mycobactérien. EPS : substances polymères extracellulaires ; GPL : glycopeptidolipides (Xiang *et al.,* 2014).

L'adhésion bactérienne est la première et la plus importante étape dans le processus du biofilm. La compréhension et la gestion de cette étape permet de mieux contrôler un biofilm. Il s'agit d'un processus complexe qui est affecté par diverses propriétés physico-chimiques des substrats et des surfaces microbiennes. Ces interactions peuvent être classées en trois classes : interactions Lifshitz_van der Waals, interactions électrostatiques et interactions acide-base de Lewis (c'est-à-dire donneur d'électrons et accepteur d'électrons) (Sadiki *et al.,* 2014). Les interactions attractives de van der Waals se manifesteraient les premières à des distances au-dessus de 50 nm. Après un rapprochement à une distance comprise entre 10 et 20 nm, interviennent les interactions électrostatiques des doubles couches électroniques et finalement, à des distances inférieures à 1,5 nm, à 1,5 nm, interviennent des interactions spécifiques responsables des liaisons irréversibles (se produit par l'établissement des liaisons covalentes et d'hydrogène plus fortes, ainsi que par le biais de structures de surface cellulaires, telles que les flagelles et les fimbraie) (Goulter *et al.,* 2009).

IV. Les molécules de surface cellulaire associées à la formation du biofilm

La paroi cellulaire des mycobactéries est très riche en lipides hydrophobes, tels que les acides mycoliques, les lipopolisaccharides, les dimycocérosols de phthiocérol, les glycolipides phénoliques, le lipoarabinomannane (LAM) et les glycopeptidolipides (GPL), qui sont étroitement liés aux caractéristiques des mycobactéries, comme la morphologie des colonies, la formation de biofilm, la résistance aux antibiotiques et la virulence (Xiang *et al.*, 2014).

1. Les glycopeptidolipides

Les glycopeptidolipides (GPL), sont situés dans la couche la plus externe de la paroi cellulaire (Recht et Kolter, 2001). Recht *et al*. ont montré que les glycopeptidolipides de *M. smegmatis* sont essentiels pour la fixation initiale à la surface lors de la formation de biofilm (Recht et Kolter, 2001). Ces molécules jouent également un rôle essentiel dans la motilité coulissante, propriété de nombreuses souches de mycobactéries qui est liée à la formation du biofilm mycobactérien (Recht et Kolter, 2001). Même sans flagelles, les mycobactéries peuvent glisser sur des surfaces solides (Arora *et al.,* 2008). Les mutants de *M. avium* et de *M. abscessus* défectueux des GPL montrent une capacité de glissement plus faible et perdent la capacité de former un biofilm (Recht et Kolter, 2001, Xiang *et al.,* 2014). Cependant, et selon une autre étude, le développement de biofilms et la motilité coulissante ne sont pas toujours associés (Martin-de-Hijas *et al.*, 2009).

2. Le GroEL1 chaperon

Ojha *et al*. ont exploré le rôle de GroEL1 chaperon dans le développement du biofilm chez *M. smegmatis*, et ils ont conclu qu'il est impliqué dans la biosynthèse des acides mycoliques a courtes chaines au cours de la formation du biofilms chez les mycobactéries (Ojha *et al.*, 2005).

3. Les acides mycoliques

L'acide mycolique, un acide gras, est crucial pour la pathogenèse, la structure de la paroi cellulaire, l'évasion immunitaire et pour la formation des biofilms chez les mycobactéries. Le biofilm de *M. tuberculosis* contient de grandes quantités d'acides mycoliques libres extracellulaires, qui pourraient être les produits hydrolytiques enzymatiques du dimycolate de tréhalose (Xiang *et al.*, 2014).

Ojha *et al*. (2008) ont démontré que la protéine (GroEL1) joue un rôle dans la synthèse des acides mycoliques de courte chaine (C56-C68). Ces acides mycoliques à chaîne courte constituent une matrice extracellulaire hydrophobe riche en lipides (Ojha *et al.,* 2005 ; Ojha *et al.,* 2008), qui contribue à créer une barrière imperméable, et donc une forte résistance aux antibiotiques et aux désinfectants (Zambrano et Kolter, 2005).

V. L'ultrastructure des biofilms mycobactériens

L'ultrastructure des biofilms mycobactériens est également étudiée. Dans une étude, Muñoz-Egea *et al*. ont montré que l'épaisseur maximale du biofilm de *M. fortuitum* et de *M. chelonae* est détectée à 72 h, mais les autres mycobactéries à croissance rapide non pigmentés ont atteigné l'épaisseur maximale à 96 h. *M. chelonae* couvre une plus petite surface que *M. abscessus*, mais une plus grande surface que *M. fortuitum* et *M. mageritense* (Muñoz-Egea *et al.,* 2013). Les caractéristiques de croissance diffèrent également entre les espèces mycobactériennes : *M. chelonae* forme un biofilm à croissance verticale, tandis que *M. fortuitum* couvre toute la surface avec une croissance plus fine. Une forte extension des cordes est observée dans les cas de *M. abscessus* et de *M. chelonae* (Muñoz-Egea *et al.,* 2013).

VI. La régulation de la formation du biofilm mycobactérien

1. Les facteurs génétiques

De nombreux gènes interviennent dans le processus de développement de biofilm mycobactérien (Tableau 3) (Xiang *et al.,* 2014 ; Ojha et *al.,* 2015). Ces différents gènes peuvent affecter plusieurs fonctions clés dans la formation de biofilm : le gène *rpoZ* (codant la sous-unité oméga de l'ARN polymérase), le gène mycobactérien *Lsr2* (responsable de la biosynthèse des lipides apolaires mycolyl-diacylglycerols (MDAG), et la protéine sérine / thréonine kinase PknF influençent la motilité de glissement et la capacité de formation de biofilm mycobactérien. Les gènes *mps, Tmtp* et *atf1* interviennent dans la biosynthèse de GPL, La mutation de l'un de ces gènes entraîne un déficit de biosynthèse de la GPL et une perte de la formation de biofilm. Le gène *pstA*, codant le peptide synthétase non ribosomal, influence la formation du biofilm durant l'étape de la maturation. L'undécaprényl phosphokinase codée par le gène *upk* de *M. smegmatis* est impliquée dans la synthèse du peptidoglycane. Une mutation au niveau de ce gène modifie la morphologie des colonies et conduit à perdre la capacité de former un biofilm par *M. smegmatis*. D'autres gènes peuvent influencer la formation des biofilms par les mycobactéries (Tableau 3) :

Tableau 3 : Gènes impliqués dans la formation du biofilm mycobactérien (Xiang *et al.*, 2014)

Nom du gène	Produit	Fonction	Espèce
rpoZ	Sous-unité oméga de l'ARN polymérase	Réduction de la motilité de glissement, incapacité de produire une matrice extracellulaire et incapacité de formation de biofilm	*M. smegmatis, M. tuberculosis*
Pks1	Polycétide synthase	Synthèse des glycolipides phénoliques	*M. tuberculosis*
pks16	Acyl-CoA synthase putative	inconnu	*M. tuberculosis*
helY	Hélices d'ADN	inconnu	*M. tuberculosis*
dacB2	Protéines de liaison à la pénicilline	inconnu	*M. tuberculosis*
inhA	isozyme	Biosynthèse des acides mycoliques	*M. tuberculosis*
glnA1	Glutamine synthe-tase	Synthèse de poly-a-L-glutamine (PLG)	*M. smegmatis, M. bovis*
gap	Protéine membranaire intégrale.	Transporte les GPL à la surface de la cellule	*M. smegmatis*
pknf	Protéines kinases sérine / thréonine	Impliqué dans la motilité de glissement et la formation de biofilm	*M. tuberculosis*
atf1	Acétyltransférase	Acétylates sur le 6-désoxytalose	*M. smegmatis*
mps1	Peptide synthétase	Synthèse du dipeptide	*M. smegmatis*
mps2	Peptide synthase	Synthèse de l'alcool d'acide aminé	*M. smegmatis*
tmtpC	Protéines de transport transmembranaires	inconnu	*M. smegmatis, M. avium*
lsr2	MDAGs	Influence la morphologie des colonies et favorise la formation de bio-films	*M. smegmatis, M. tuberculosis*
upk	undécaprényl phosphokinase	Synthétise le peptidoglycane	*M. smegmatis*
pstA	Synthèse de glycopeptidolipides	Influence l'adhérence sur le plastique PVC	*M. avium*
pstB	Synthèse de glycopeptidolipides	Influence l'adhérence sur le plastique PVC	*M. avium*

2. Les paramètres environnementaux

2.1.Les conditions nutritionnelles

Les conditions nutritionnelles jouent un rôle clé dans la formation du biofilm. Par exemple, la formation du biofilm de *M. tuberculosis* nécessite des conditions hypoxiques particulières, surtout pendant les trois premières semaines d'incubation (Ojha *et al.,* 2008). Alors que *M. fortuitum* et *M. chelonae* peuvent former un biofilm indépendamment de la disponibilité des nutriments (Hall-Stoodley *et al.,* 1998).

2.2.L'effet des ions sur la formation des biofilms mycobactériens

Les cations métalliques, tels que le calcium, le zinc, le magnésium et le fer favorisent la formation du biofilm mycobactérien. Ces ions sont impliqués dans le maintien de l'intégrité de la matrice, et dans la synthèse des acides mycoliques, qui sont particulièrement importants pour la maturation des biofilms (Xiang *et al.,* 2014).

2.3.Le rôle du dioxyde de carbone dans la formation du biofilm mycobactérien

La concentration de CO_2 joue également un rôle clé dans la formation du biofilm mycobactérien. Ainsi, une condition de 5% de CO_2 a grandement stimulé la formation du biofilm de *M. tuberculosis* (Ojha *et al.,* 2008).

2.4.La réponse au stress oxydatif

Le stress oxydatif généré par l'hôte est impliqué dans l'inhibition de la croissance de *M. tuberculosis*. La réponse au stress oxydatif est cruciale pour la survie du pathogène dans l'hôte. Geier et ses collaborateurs ont montré que le stress oxydatif provoqué par l'ajout de peroxyde d'hydrogène dans le milieu améliore la formation de biofilm mycobactérien. (Geier *et al.*, 2008).

3. Les implications cliniques du biofilm chez les mycobactéries non tuberculeuses

Depuis que le concept est apparu, les biofilms sont reconnus comme un facteur pathogène particulièrement important dans les infections humaines (Hall-Stoodley et Stoodley, 2005). Bien que les infections aiguës soient principalement causées par des organismes planctoniques, la pathogénie des maladies chroniques semble être étroitement associée à la formation du biofilm. De plus, l'importance croissante des biomatériaux, tels que les cathéters ou les

prothèses, dans la médecine moderne a contribué à l'importance des biofilms et de leur gestion dans les maladies humaines (Qvist *et al.*, 2015).

Le spectre des maladies causées par les MNT est large, mais presque toutes ont une caractéristique commune : elles sont généralement chroniques. Les maladies respiratoires sont l'un des syndromes les plus courants causés par les MNT (Esteban *et al.*, 2012). Elles sont causées par des mycobactéries à croissance lente, telles que le complexe *M. avium*, ou espèces à croissance rapide, telles que *M. abscessus*. Les MNT affectent généralement les patients présentant des conditions prédisposantes, telles que les patients atteints de bronchiectasie chronique de fibrose kystique, de silicose, et des cicatrices anciennes de la tuberculose (Esteban et García-Coca, 2018). Ce biofilm colonise d'abord l'hôte, puis provoque une maladie invasive difficile à gérer. L'association entre ces infections et les biofilms est documentée (Qvist *et al.*, 2015). Les données expérimentales montrent l'importance du biofilm dans la capacité de *M. avium* à envahir les cellules épithéliales bronchiques (Esteban et García-Coca, 2018).

Un autre groupe important d'infections liées aux biofilms, est celui associées aux biomatériaux. Les MNT se comportent comme des agents pathogènes opportunistes et sont décrits dans de nombreuses infections associées aux dispositifs. Parmi celles-ci, une bactériémie liée au cathéter est rapportée dans de nombreuses populations, y compris des patients cancéreux (El Helou *et al.*, 2013b). Le diagnostic est difficile, mais dans certains cas, ces organismes peuvent se développer dans des flacons d'hémoculture classiques. Le retrait du cathéter est obligatoire pour la gestion de ces infections dans tous les cas (El Helou *et al.*, 2013a,b). Une autre maladie liée aux cathéters est la péritonite chez les patients sous dialyse péritonéale continue ambulatoire (DPCA). Ce syndrome est décrit depuis les débuts de l'utilisation de la DPCA et nécessite également le retrait du cathéter (Esteban et García-Coca, 2018). Les articulations prothétiques peuvent être aussi infectés par les MNT. Parmi les autres maladies liées aux biomatériaux, on peut citer l'infection du maillage abdominal, l'infection du stimulateur cardiaque, l'endocardite valvulaire, l'infection par mammoplastie, la kératite liée à la transplantation et autres. Presque tous ces syndromes nécessitent le retrait de l'implant car l'antibiothérapie ne permet pas d'éliminer les organismes sessiles (Esteban et García-Coca, 2018).

4. Le rôle du biofilm dans la pathogénicité de *M. Tuberculosis*

L'une des découvertes les plus intéressantes dans le domaine de la recherche sur le biofilm mycobactérien est sans doute la découverte que *M. tuberculosis* peut développer un biofilm *in vitro*. Cette découverte ouvre ainsi un nouvel axe de recherche sur le rôle du biofilm dans la pathogénese de la tuberculose. Cependant, ce rôle reste incertain (Ojha *et al.,* 2008). Le processus pathogène de *M. tuberculosis* est complexe et implique principalement des mécanismes de survie intracellulaire et d'évasion de la défense de l'hôte. Il est suggéré que l'importance des biofilms dans cette maladie est due à leur participation au processus de nécrose caséeuse et à la formation de cavitation dans le tissu pulmonaire, site dans lequel *M. tuberculosis* peut former un biofilm (Basaraba et Ojha, 2017). Ces découvertes ont suscité un intérêt pour les mécanismes de formation des biofilms en tant que cible potentiel pour de nouveaux traitements contre la tuberculose. Néanmoins, les implications cliniques de ces découvertes *in vitro* restent non résolues, et les futures recherches nous fourniront probablement une nouvelle vision de la tuberculose en tant que maladie liée au biofilm (Esteban et García-Coca, 2018).

5. La résistance des biofilms

Les biofilms sont capables de protéger les bactéries incorporées de divers stress physiques, chimiques et biologiques et de devenir une source persistante d'infections microbiennes, conduisant à des rechutes d'infections chroniques ou à un processus d'infection prolongé en empêchant ou en retardant le processus de réépithélialisation (Costerton *et al.,* 1999). L'importance des biofilms dans un processus pathologique est déjà résumée par Costerton *et al*. (1999) : a) les bactéries en biofilm sont plus résistantes aux conditions environnementales défavorables, telles que le manque d'éléments nutritifs et la concurrence d'autres espèces bactériennes, b) les cellules en biofilm sont plus résistantes au système immunitaire de l'hôte, c) les cellules en biofilms ont considérablement réduit la sensibilité aux agents antimicrobiens, et d) le détachement de cellules ou d'agrégats de biofilms peut entraîner une dissémination bactérienne active et des infections aiguës dans les tissus voisins (Costerton *et al.,* 1999).

Différents mécanismes sont impliqués dans cette résistance (perméabilité, états métaboliques, activation de gènes de résistance, cellules persistantes) (Kester et Fortune, 2014) :

5.1.La limitation de la diffusion

La matrice extracellulaire exerce un rôle protecteur pour les cellules du biofilm en limitant la diffusion des composés antimicrobiens **(**Harrison et Turner, 2005).

5.2.Le changement de phénotype

La transition de l'état planctonique à l'état biofilm aboutit à des modifications de la transcription des gènes, qui pourraient expliquer la résistance des mycobactéries. Par exemple l'expression du gène groEL1 à l'état biofilm, devient important, ce qui entraine une synthèse élevée des acides gras de courte chaîne C56-C68 impliqués dans la protection et la résistance au stress environnementale (Zhang et Mah, 2008).

5.3.Le ralentissement de la croissance et l'état de la dormance

Les cellules vivant en biofilm, ne sont pas activement engagés dans la division cellulaire, leur taux de croissance est lent par rapport aux cellules planctoniques. Sans doute les mycobactéries à croissance lente sont généralement moins sensibles aux agents antimycobacteriens, parce qu'elles sont moins actives métaboliquement (phase de dormance), et certains produits antimycobacteriens n'ont aucun effet sur les cellules qui ne sont pas en division (Reck *et al.,* 2011).

6. La lutte contre le biofilm mycobactérien

Le traitement de la tuberculose reste un défi. Le biofilm est impliqué de manière complexe dans la physiologie de *M. tuberculosis*. Les gènes associés au développement du biofilms, les processus métaboliques et les voies de transduction du signal représentent des cibles potentielles pour de nouveaux médicaments (Xiang *et al.,* 2014).

La paroi cellulaire hydrophobe et riche en lipides des mycobactéries est cruciale dans la formation de biofilm. La mutation dans les gènes *mps* et d'*atf1* (intervenant dans la biosynthèse de GPL) entraîne une perte de GPL et de la capacité de glisser sur la surface, et par conséquence, de la capacité de former un biofilm sur du chlorure de polyvinyle (Xiang *et al.,* 2014).

La matrice polymérique extracellulaire essentielle pour la formation de biofilm pourrait être une bonne cible pour diminuer la résistance aux médicaments. Par exemple, la clarithromycine

ajoutée au stade précoce de la formation de biofilm peut inhiber sa formation (Xiang *et al.*, 2014).

Muñoz-Egea *et al*. (2016b) ont étudié l'effet de la N-acétylcystéine (NAC) et du Tween 80 (deux molécules d'antiofilm potentielles), seuls et en association à des antibiotiques, contre les biofilms mycobactériens. Le Tween 80 modifie l'intégrité structurelle de la membrane, des lipides et des protéines (Teixeira *et al.*, 2007), tandis que la NAC agit sur la matrice polysaccharidique du biofilm, en rompant les ponts disulfures qui relient les fibres polysaccharidiques (Olofsson *et al.*, 2003). En raison de la teneur élevée en lipides de la paroi cellulaire mycobactérienne, et de la présence significative des lipides dans la matrice extracellulaire, le Tween 80 est plus actif que la NAC contre le biofilm mycobactérien (Muñoz-Egea *et al.*, 2016b). Une augmentation de l'activité antibactérienne est observée lorsque la NAC et le Tween 80 sont combinés à la ciprofloxacine, à la clarithromycine et à l'amikacine. L'ultrastructure des biofilms chez *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus* et *M. smegmatis* est également affectée par la ciprofloxacine, la clarithromycine et l'amikacine associées à des agents antibiofilms. En fait, le pourcentage des bactéries mortes est plus élevé avec une combinaison d'antibiotiques et d'agents antibiofilm qu'avec les antibiotiques seuls (Muñoz-Egea *et al.*, 2016b).

Une autre stratégie antibiofilm est évoquée : *Methylobacterium* sp. un *Alphaproteobacteria* à Gram négatif, que l'on trouve habituellement dans les systèmes de distribution de l'eau, lorsqu'il est isolé dans des biofilms, il est associé à une présence plus faible de *M. avium* (Falkinham *et al.*, 2016). Dans une étude ultérieure avec *M. abscessus*, Muñoz-Egea et ses collaborateurs ont montré que *Methylobacterium* sp. peut inhiber la formation de biofilm de *M. abscessus*. Cette étude a également démontré que pour inhiber un biofilm préformé de *M. abscessus*, *Methylobacterium* sp. ne doit pas obligatoirement être actif : l'addition d'un extrait brut de *Methylobacterium* sp. autoclavé inhibe le développement du biofilm (Muñoz-Egea *et al*., 2016a). Cette nouvelle approche pourrait conduire à la découverte de nouveaux agents antibiofilms à activité spécifique contre certaines espèces de mycobactéries. Cette approche présente potentiellement un grand intérêt pour le traitement des nombreuses infections au cours desquelles le biofilm ne peut être retiré que chirurgicalement.

Le trihydroxamate sidérophore cyclique, la desferrioxamine E de l'actinomycète marin MS67, est un inhibiteur de biofilm de *M. smegmatis* et de *M. bovis* BCG. L'effet inhibiteur de

biofilm de la desferrioxamine E pourrait être exercé en épuisant le fer indispensable à la formation de biofilm mycobactérien (Ishida *et al.*, 2011).

Chapitre 1 : Production du lycopène par *Mycobacterium smegmatis*

Le lycopène (formule moléculaire : $C_{40}H_{56}$) est un pigment phytochimique rouge. Il est présent avec une concentration considérable dans certains fruits et légumes, notamment les tomates. Le lycopène est le caroténoïde le plus répandu dans le corps humain. Il est classé parmi les antioxydants les plus puissants. C'est aussi l'un des caroténoïdes les plus commerciaux (Chen *et al.*, 2016).

Le lycopène suscite un grand intérêt en raison de ses excellentes performances dans l'amélioration de la réponse immunitaire et la prévention des maladies chroniques, notamment l'ostéoporose, certains types de cancer, et les maladies cardiovasculaires (Liu *et al.*, 2012). Au cours des dernières années, la demande du lycopène a augmenté en raison de son utilisation dans les aliments pour animaux et dans les industries agro-alimentaire, pharmaceutique, cosmétique (Sevgili et Erkmen, 2019). De plus, le lycopène est utilisé en tant qu'antioxydant pour réduire les dommages cellulaires ou tissulaires et en tant qu'agent colorant dans les produits alimentaires (Sevgili et Erkmen, 2019). Cela rend le lycopène très attrayant dans différents domaines : industries agro-alimentaires, ainsi que la médecine et les formulations cosmétiques.

Les besoins du marché en lycopène ne sont pas satisfaits par l'extraction à partir des plantes en raison du nombre limité des sources des plantes, du processus complexe de purification dû au mélange des caroténoïdes et du coût élevé. La synthèse chimique présente également des inconvénients, notamment le processus complexe de la synthèse chimique, les sous-produits toxiques résultant de ce processus, les faibles rendements, l'instabilité et la qualité médiocre du produit, en plus du coût élevé de la production. Tous ces inconvénients ont conduit les recherches à la production du lycopène par fermentation en utilisant des microorganismes naturels ou modifiés (Choudhari *et al.*, 2008 ; Li, Z., *et al.*, 2019).

La production biotechnologique du lycopène suscite beaucoup d'intérêt en raison de la demande des consommateurs pour des additifs alimentaires de haute qualité et « naturels ». La quantité du lycopène produite dépend du microorganisme, du milieu de culture, des substrats et des conditions de fermentation (température, pH, vitesse d'aération, etc.). La plupart des recherches visent à optimiser les conditions de culture qui affectent directement la croissance du microorganisme (Sevgili et Erkmen, 2019).

Le but de la présente étude est d'exprimer chez *Mycobacterium smegmatis* les gènes de caroténogénèse de *Mycobacterium aurum* A +. Pour augmenter la production du lycopène, *M.*

smegmatis transformé avec le plasmide pC51, contenant les gènes de production de ce pigment, est mutagénisée par les rayons UV. Les mutants obtenus sont sélectionnés en fonction de leur couleur et de leur teneur en lycopène. La production du lycopène est renforcée par l'optimisation des paramètres physicochimiques.

I. Souches bactériennes

Les différentes souches bactériennes étudiées dans ce travail sont les suivantes :

- ⇨ *Mycobacterium aurum* A+, est une mycobactérie scotochromogène, en forme de bâtonnet, immobile, non sporulante, aérobie, à croissance rapide (temps de génération d'environ 6 heures) et non pathogène (Honarvar *et al.,* 2012).
- ⇨ *Mycobacterium smegmatis* MC_2 155, il s'agit d'une mycobactérie à croissance rapide (temps de génération d'environ 3 heures), non pathogène, et non pigmenté, mais les cultures vieilles peuvent devenir pigmentées en jaune (Gordon et Smith, 1953).
- ⇨ *Escherichia coli* DH5α *(*kan^s) est utilisée comme hôte pour les plasmides.

II. Plasmides utilisés

Le plasmide utilisé durant les différentes étapes de ce travail, est le plasmide pC51 qui est précédemment isolé d'une banque génomique de *Mycobacterium aurum* A+ (Houssaini-Iraqui *et al.,* 1993a). Ce plasmide contient, en plus du vecteur pHLD69, un insert d'environ 4,42 kb contenant les gènes *crtE*, *crtB* et *crtI* contrôlant la biosynthèse du lycopène (Houssaini-Iraqui *et al.,* 1993a). Le vecteur pHLD69 (6.3 kb) est constitué du vecteur pUC19, du gène de résistance à la kanamycine et de l'origine de réplication du plasmide pAL5000 (Houssaini-Iraqui *et al.,* 1992 ; Houssaini-Iraqui *et al.,* 2001). La carte physique de ce vecteur est présentée ci-dessous (Figure 10) (Houssaini-Iraqui *et al.,* 1993b ; Houssaini-Iraqui *et al.,* 2001).

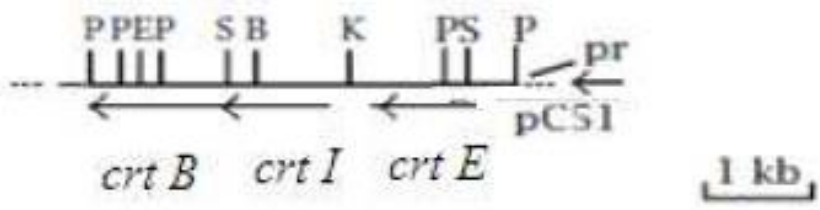

Figure 10 : Carte physique du plasmide pC51 (Houssaini-Iraqui *et al.,* 1993b ; Houssaini-Iraqui *et al.,* 2001).

Les pointillés représentent le vecteur pHLD69. Symboles ; pr : le promoteur lacZ. Les sites de restriction des endonucléases sont abrégés comme suit : B : *BamH I* ; E : *EcoR I* ; K : *Kpn I* ; P : *Pst I* ; S : *Sph I*. Les gènes *crtE, crtB et crtI* codent respectivement pour la GGPP synthase

(synthèse du GGPP), la phytoène synthase (synthèse du phytoène à partir du GGPP) et la phytoène désaturase (transformation du phytoène en lycopène) (Houssaini-Iraqui *et al.*, 2001).

III. Milieux et conditions de culture

Les cultures liquides des souches mycobactériennes sont préparées dans le bouillon sauton (Annexe 1) et incubées sous agitation à 37°C.

Les cultures liquides d'*E.coli* DH5α sont préparées dans le milieu LB liquide (Annexe 1) et incubées à 37°C jusqu'à une DO_{600} nm de 0.55.

Les cultures solides des bactéries testées au cours de ce travail, sont réalisées sur milieu LB gélosé ou milieu sauton gélosé et incubées à 37°C. La composition des milieux gélosés est identique à celle des milieux liquides sauf qu'ils sont additionnés d'un agent solidifiant, l'Agar-Agar, à raison de 15 g/L.

En cas de besoin, les milieux de cultures sont additionnés de la kanamycine à 50 µg/ml.

IV. Amplification du plasmide pC51 chez *Escherichia coli*

Cette étape a pour objectif d'amplifier le plasmide pC51 qui sera utilisé pour transformer *M. smegmatis.*

1. Préparation des cellules compétentes

E. coli DH5α est cultivée dans un bouillon LB à 37 °C jusqu'à atteindre une DO à 600 nm de 0.55, puis les cellules sont récupérées par une centrifugation à 5000 rpm pendant 5 min. Le surnageant est jeté et le culot est repris dans 1 ml d'une solution de $CaCl_2$ 100 mM; après agitation, le mélange est incubé dans la glace pendant 30 min, puis centrifugé à 5000 rpm pendant 5 min. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 100 µl de $CaCl_2$ 100 mM, puis incubé à 4 °C pendant au moins 4 heures (Maniatis *et al.*, 1982).

2. Transformation par choc thermique

Les cellules compétentes d'*E. coli* DH5α précédemment préparées sont transformées avec 2µl d'ADN plasmidique (pC51), le mélange est incubé dans la glace pendant au moins 30 min, puis transféré rapidement à 42°C pendant 90 secondes. 1ml du milieu LB liquide est ajouté sur les cellules transformées et le mélange est incubé à 37°C pendant 1 heure. A l'issu de ce temps,

les cellules transformées sont étalées sur milieu LB solide additionné à la Kanamycine (50 µg /ml). Les boites sont incubées par la suite à 37°C pendant une nuit. Des clones d'*E. coli* transformés sont ensuite repiqués dans un milieu LB liquide contenant la Kanamycine à 50 µg /ml. Ces cultures sont incubées à 37°C puis leurs plasmides sont extraits (Maniatis *et al.*, 1982).

3. Extraction de l'ADN plasmidique

1 ml de la culture d'*E. coli* transformé par l'ADN plasmidique (pC51) est centrifugé pendant 5 min à 5000 rpm, puis le surnageant est jeté et 100 µl de la solution I (Annexe 2) sont ajoutés. Ce mélange est incubé à température ambiante pendant 5 min. 200 µl de la solution II (Annexe 2), dont le rôle est de lyser les cellules et de dégrader l'ADN chromosomique, sont additionnés. Après incubation dans la glace pendant 5 min, 150 µl de la solution III (Annexe 2) sont ajoutés afin de précipiter les protéines. Après incubation dans la glace pendant 5 min, un volume de phénol-chloroforme (1 :1) est ajouté. Après centrifugation à 6000 rpm pendant 5 min, le surnageant est récupéré puis traité avec 400 µl de chloroforme. Après une nouvelle centrifugation à 6000 rpm pendant 5 min, la phase aqueuse est récupérée et traitée par 2 volumes d'éthanol absolu (800 µl). Le mélange est incubé à -20°C pendant 30 min. Les acides nucléiques sont ensuite précipités par centrifugation à 10000 rpm pendant 20 min puis lavés avec 1ml d'éthanol 70 %. Après une autre centrifugation à 10000 rpm pendant 5 min, l'éthanol 70 % est éliminé et le culot est séché. Le culot sec est repris ensuite dans 25 µl d'eau distillée stérile (Maniatis *et al.*, 1982).

4. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les plasmides extraits sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le dépôt est composé de : 10 µl des produits d'extraction mélangés à 2 µL du tampon de charge (Annexe 2). 12 µL de ce mélange sont déposés alors par puits. L'électrophorèse est effectuée en utilisant un gel d'agarose à 1%. Le tampon de migration est le TAE 1X (Annexe 2) additionné de Bromure d'éthidium (0.5 mg/ml). La migration dure 2h à 40 V, puis le gel est révélé aux UV.

I. Transformation de *M. smegmatis* par électroporation

M. smegmatis est cultivé dans le milieu Sauton liquide à 37°C pendant 2 jours (DO_{600}=0,3), 1 ml de la culture liquide est centrifugé et le culot est lavé au moins 5 fois avec de l'eau distillée stérile, les cuves d'électroporation sont lavées avec de l'alcool et rincées avec de l'eau distillée stérile. 40 µL des cellules de *M. smegmatis* sont électrotransformées par 2 µL d'ADN

plasmidique en utilisant une cuve d'électroporation de 0,2 cm. L'électroporation se fait par une impulsion électrique grâce à un électroporateur en utilisant les paramètres suivants : résistance, 200 Ω ; tension électrique, 2,5 kV ; capacité, 25 μF. Le mélange ADN-bactéries est placé immédiatement dans 960 μL de milieu LB liquide puis incubé à 37°C pendant au moins 3 heures. La culture est centrifugée à 5000 rpm pendant 5 minutes, puis le culot est repris dans 100 μL de LB liquide. Les cellules sont alors étalées sur milieu LB solide additionné à la Kanamycine à 50 μg /ml et incubées à 37°C pendant 5 jours.

II. Extraction et purification des carotènes

1. Isolement des pigments caroténoïdes

M. smegmatis transformée par pC51 est cultivée sur le milieu LB solide pendant 7 jours. Des colonies des différentes cultures sont repiquées dans un volume de chloroforme-méthanol (1:1). Après centrifugation, le surnageant est évaporé et le résidu pigmenté est solubilisé dans l'acétone, une incubation de 2 heures à 4°C est nécessaire pour l'élimination des phospholipides (Viveiros *et al.,* 2000 ; Houssaini-Iraqui *et al.,* 2001).

2. Purification des pigments

Après centrifugation à 4000 rpm pendant 10 min, le surnageant est évaporé et un mélange eau méthanol-éther de pétrole (5:45:50) est ajouté sur le résidu. Après avoir bien agité, le mélange est centrifugé à 1000 rpm pendant 5 min. A l'issu de cette centrifugation, deux phases sont obtenues, une épiphase contenant les carotènes, et une hypophase contenant les xanthophylles, l'épiphase est récupérée pour les analyses ultérieures (Viveiros *et al.,* 2000 ; Houssaini- Iraqui *et al.,* 2001).

Après extraction des caroténoïdes, le culot bactérien est séché, puis son poids sec est déterminé. Cette expérience est répétée au moins 5 fois.

III. Analyse des carotènes par chromatographie sur couche mince (CCM)

Afin de séparer les différents carotènes produits par *M. aurum* et *M. smegmatis* transformé par pC51, nous avons procédé à une analyse chromatographique sur plaque de silice en aluminium (15 x 4 cm Silica gel 60 F_{254}). L'extrait des carotènes est concentré puis déposé sur une plaque de silice, l'éluant utilisé est un mélange d'éther de pétrole-acétone (99,5 : 0,5 (V/V)) (Viveiros *et al.,* 2000 ; Houssaini-Iraqui *et al.,* 2001). Après la séparation, les Rf des bandes

sont mesurés, et la bande du lycopène est récupérée pour une analyse d'absorption : La zone correspondante au lycopène sur le chromatogramme est grattée, puis le lycopène est récupéré dans l'acétone. Après évaporation, le résidu est solubilisé dans l'hexane. Dans la mesure du possible, toutes les procédures sont effectuées dans l'obscurité. Le lycopène de la tomate est purifié puis utilisé comme témoin.

IV. Identification du lycopène

Le spectre d'absorption de la fraction purifiée contenant le pigment, est déterminé pour les longueurs d'onde comprises entre 390 nm et 525 nm. Le spectre ainsi déterminé est utilisé pour l'identification du pigment extrait. Les pigments sont identifiés en comparant leurs spectres d'absorption avec les données de la littérature (Houssaini-Iraqui *et al.,* 1992 ; Houssaini-Iraqui *et al.,* 2001 ; Britton *et al.,* 2008).

V. Quantification du lycopène

Les cellules contenant le plasmide pC51 sont cultivées sur gélose sauton pendant sept jours. Les pigments sont extraits comme décrit ci-dessus. La teneur des extraits en lycopène est déterminée à 470 nm (avec un spectrophotomètre (BK-UV1000 ; BIOBASE, Chine)) par la loi de Beer-Lambert, le coefficient d'extinction utilisé est 3400 (Houssaini-Iraqui *et al.,* 1992 ; Houssaini-Iraqui *et al.*, 2001 ; Britton *et al.,* 2008 ; Oliveira *et al.,* 2010). La teneur en lycopène est exprimée en mg/g de poids sec.

VI. Mutagenèse par les rayons UV de *M. smegmatis* (pC51)

La mutagenèse par UV est réalisée de la manière suivante : les cellules de *M. smegmatis* contenant le plasmide pC51 et cultivées sur la gélose Sauton à 37 ° C pendant 7 jours sont diluées à une concentration de 10^4 cellules / ml. 100 µL de chaque dilution sont étalées par la suite sur gélose LB. Les cultures sont ensuite exposées aux UV (boîtes ouvertes) en utilisant une lampe ultraviolette (6 W-254nm tube ; Vilber Lourmat, French) située à une distance de 57 cm. Le temps d'exposition aux UV varie de 4 min à 12 min (4 min, 6 min, 8 min, 10 min, 11 min et 12 min). Un témoin est préparé dans les mêmes conditions mais non exposé aux UV. Les boites sont ensuite incubées dans une étuve à 37°C pendant 7 jours à l'obscurité. A l'issue des 7 jours, la couleur des colonies est observée. Les clones présentant une couleur différente de celle de la souche sauvage sont repiqués. Cette manipulation est répétée plusieurs fois afin d'augmenter la chance d'obtenir un mutant rouge.

VII. Caractérisation du mutant

1. Analyse des caroténoïdes

Les pigments accumulés par le mutant AI sont extraits puis analysés par CCM et les spectres d'absorption sont établis en utilisant les protocoles décrits précédemment.

2. Détermination de la nature de la mutation

2.1.Elimination du plasmide du mutant

Le mutant (*M. smegmatis* AI) est cultivé pendant plusieurs générations sur un milieu sauton sans kanamycine afin d'éliminer le plasmide, car en absence de sélection le plasmide est instable et se perd après 100 générations chez les mycobactéries (Bourn *et al.,* 2007). La souche résultante qui a perdu son plasmide est nommée MSm.

2.2.Extraction du plasmide à partir du mutant

Le plasmide du mutant AI est extrait selon le protocole suivant : 100 ml d'une culture de *M. smegmatis* AI (DO 600= 1,0) est centrifugé à 5000 rpm pendant 20 min à 4 ° C, le culot est ensuite remis en suspension dans la solution I (Annexe 2) contenant 10 mg / ml de lysozyme, et le mélange est incubé à 37 ° C pendant une nuit. Puis, 4 ml de la solution II (Annexe 2) contenant 2 mg/ml de la protéinase K sont ajoutés et Incubés immédiatement à 65 °C pendant 20 min. 3 ml de la solution III (Annexe 2) sont ajoutés, et le mélange est incubé dans la glace pendant 20 min. puis une centrifugation a 15000 rpm à 4 °C pendant 30 min est réalisée et le culot est éliminé. Ensuite, 2 traitements phénol/chloroforme puis an traitement au chloroforme seul sont effectués. Finalement, l'ADN plasmidique est précipité par l'éthanol absolu froid, puis lavé par l'éthanol 70 % froid. Le culot est séché et repris dans 25 µl de l'eau distillée stérile. Ce plasmide est nommé MpC51 pour le distinguer du plasmide pC51.

2.3.Amplification du plasmide MpC51 chez *E. coli* DH5α

Dans le but d'amplifier le plasmide MpC51, *E. coli DH5α* est transformé par ce plasmide, et les transformants sont incubés par la suite à 37°C pendant une nuit. Des clones d'*E. coli* transformés sont ensuite repiqués dans un milieu LB liquide contenant la Kanamycine à 50 µg /ml. Ces cultures sont incubées à 37°C afin de réaliser une extraction d'ADN plasmidique. Les

procédures de transformation et d'extraction du plasmide MpC51 sont expliquées précédemment**.**

2.4.Transformation de *M. smegmatis* MC_2 155 et *M. smegmatis* MSm

Quatre transformations sont effectuées en utilisant les plasmides pC51 et MpC51 en suivant le protocole précédemment décrit : *M. smegmatis* $MC_2$155 et *M. smegmatis* MSm sont transformées par le plasmide pC51 puis par le plasmide MpC51. La couleur des colonies des transformants obtenus est observée et les taux du lycopène produits par les transformants sont quantifiés et comparés.

VIII. Etude de l'effet des paramètres physico-chimiques sur la croissance et la production du lycopène par *M. smegmatis* AI transformé par le plasmide pC51

Cette étude est réalisée en utilisant la souche *M. smegmatis* AI contenant le plasmide pC51.

1. Préparation de l'inoculum

Des colonies pures et jeunes de *M. smegmatis* AI sont inoculées dans un bouillon sauton et incubées à 37 ° C sous agitation 120 rpm. Après 24 h d'incubation, la densité optique (à 600 nm) du bouillon de culture est ajustée à 0,6 et utilisée pour les différentes expériences d'optimisation et d'analyse. Des échantillons sont prélevés toutes les 24 h jusqu'à 168 h pour déterminer la croissance microbienne et la production du lycopène. Les résultats optimaux de chaque expérience sont conservés puis reportés dans les autres expériences.

2. Effet de la durée d'incubation

Pour déterminer l'effet de la durée d'incubation sur la croissance et la caroténogenèse. Des cultures de 50 ml du milieu sauton sont incubées pendant 12 jours à 37°C sous agitation de 120 rpm.

3. Effet du pH initial

Afin d'étudier l'effet du pH initial sur la croissance et la production des caroténoïdes, des cultures de 50 ml de bouillon sauton, ayant les pH 5 ; 5,5 ; 6 ; 6,5 ou 7, sont préparées comme il est décrit précédemment. L'ajustement du pH initial est réalisé par une solution de HCl 1N ou de NaOH 1N. L'incubation est réalisée à 37°C sous agitation de 120 rpm pendant 7 jours.

4. Effet de la température

L'effet de la température est testé en utilisant des cultures de 50 ml du milieu sauton et dont le pH est ajusté à 5,5. Deux températures sont choisies : 30 et 37°C. L'incubation étant effectuée sous agitation de 120 rpm pendant 7 jours.

5. Effet de l'agitation

Pour étudier l'effet de l'agitation sur le taux de croissance et la production du lycopène ; 50 ml d'une culture de *M. smegmatis* AI est incubée à 37 ° C sous différentes vitesses d'agitation : 100, 120 ou 150 rpm et en absence d'agitation pendant 7 jours à 37°C.

6. Effet de la lumière

Pour évaluer l'influence de la lumière sur la croissance et l'induction de la production des caroténoïdes, des cultures sont réalisées dans 50 ml de bouillon sauton, et dont le pH est de 5,5. Les flacons de l'obscurité sont emballés totalement dans du papier aluminium pour empêcher tout contact avec la lumière. Tous les milieux sont incubés à 37°C sous une agitation de 150 rpm pendant 7 jours.

Remarque :

- ✓ Pour étudier l'effet de ces paramètres sur la croissance microbienne, celle-ci est suivie par la mesure de la turbidité à 600 nm. Pour cela, des aliquotes de 2 ml de chaque culture sont introduits dans une cuve, puis les absorptions sont déterminées à l'aide du spectrophotomètre (MAPADA V-1200). L'expérience est répétée trois fois.
- ✓ L'extraction et la quantification du lycopène est réalisée selon la méthode décrite précédemment.

IX. Analyse statistique

Toutes les expériences sont réalisées 3 fois et les valeurs sont données en moyenne ± écart type. Les différences dans les résultats sont analysées statistiquement en utilisant le test-t-student ($\alpha = 0.05$) (Snedecor *et al.*, 1984).

I. Transformation d'*E. coli*

Afin d'amplifier le plasmide pC51, *E. coli* DH5α est transformé par le plasmide pC51 par choc thermique. Des transformants d'*E. coli* sont obtenus. La boite témoin (LB + kanamycine) étalée par *E. coli* non transformé, ne montre aucune colonie, ce qui indique que les clones transformés par pC51 sont des transformants.

II. Extraction du plasmide pC51

Après avoir obtenu les transformants d'*E. coli*, nous avons procédé à une extraction du plasmide pC51 selon le protocole déjà décrit dans la partie « matériel et méthodes ». Les plasmides extraits sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose. Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 11 :

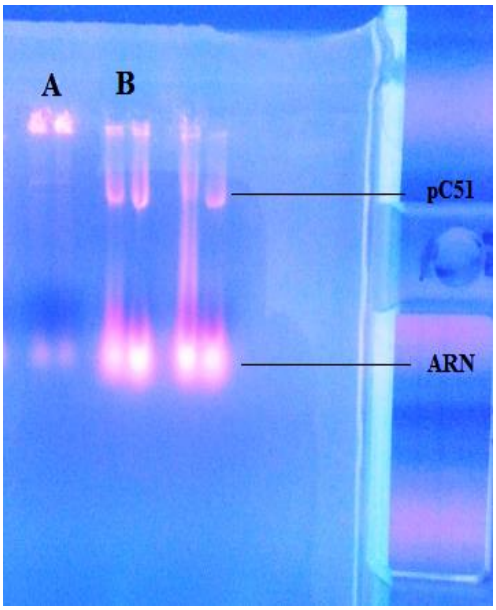

Figure 11 : Gel d'agarose à 1% utilisé pour analyser les extraits plasmidiques d'*E. coli* ; A : *E. coli* non transformé, B : *E. coli* transformé par pC51

Le gel montre deux bandes caractéristiques pour l'extrait d'*E. coli* transformé par le plasmide pC51, une correspond aux ARN de poids moléculaire faible, donc migrant plus vite, l'autre correspond au plasmide de poids moléculaire plus important, ce qui explique leur faible distance de migration sur le gel. Pour l'extrait d'*E. coli* non transformé, nous avons noté la présence d'une seule bande qui correspond aux ARN. A partir de ces résultats on peut conclure que le plasmide pC51 est bien extrait et pourrait être utilisé pour transformer *M. smegmatis*.

III. Transformation de *M. smegmatis* par le plasmide pC51

Dans la présente étude, *M. smegmatis* (une bactérie qui forme des colonies non pigmentées) est transformé avec le plasmide pC51, constitué du vecteur pHLD69 et un insert de 4,42 kb contenant les gènes nécessaires à la biosynthèse du lycopène (Houssaini-Iraqui *et al.*, 2001). Tous les transformants obtenus sont orange (Figure 12), alors que *M. smegmatis* hébergeant pHLD69 seul n'est pas pigmenté et ne forme pas de carotène, ce qui permet de conclure que l'insert de pC51 est responsable de la pigmentation de cette bactérie.

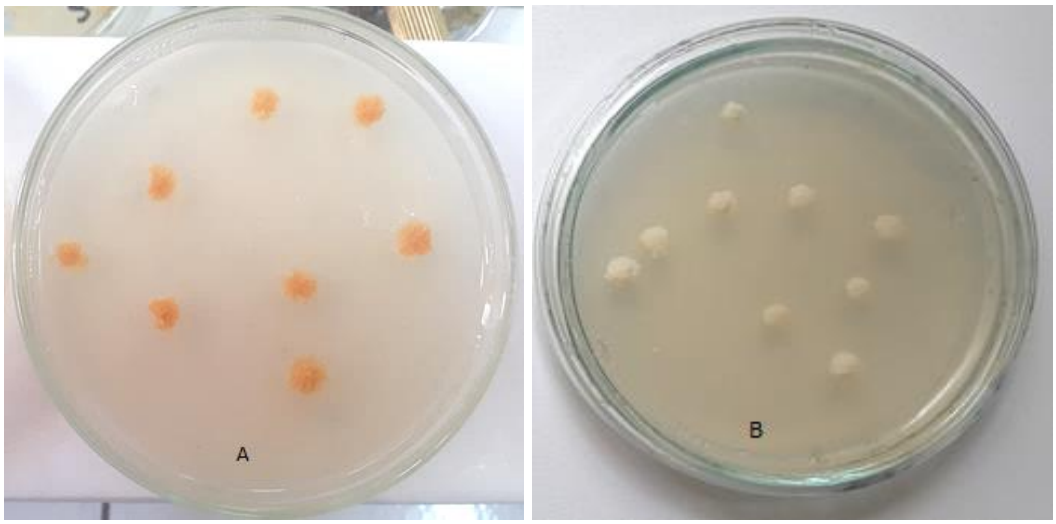

Figure 12 : Colonies de *M. smegmatis* transformé par le plasmide pC51 (A) et *M. smegmatis* non transformé (B)

L'obtention des colonies orange de *M. smegmatis* transformé par pC51 montre que cette mycobactérie exprime les gènes de ces plasmides qui sont impliqués dans la synthèse du lycopène à partir du FPP, c'est-à-dire les gènes qui codent pour les enzymes suivants : la GGPP synthase, la phytoène synthase, et la phytoène désaturase (Viveiros *et al.*, 2000), ces enzymes catalysent respectivement la synthèse du GGPP, du phytoène et du lycopène (Viveiros *et al.*, 2000).

IV. Analyse des caroténoïdes

Les pigments produits par *M. smegmatis* contenant le plasmide pC51 sont extraits, purifiés et analysés par CCM (Figure13). Les pigments caroténoïdes extraits sont identifiés comme indiqué sur la Figure 13 et la Figure 14 :

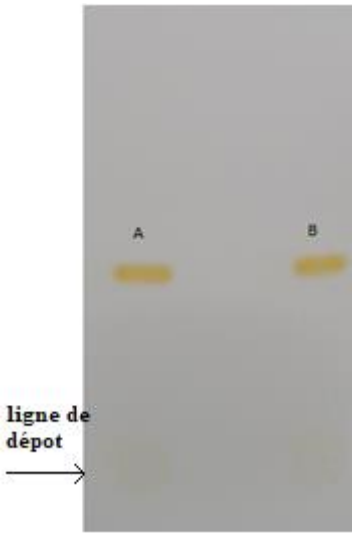

Figure 13 : Analyse par CCM du lycopène extrait de la tomate (A) et le pigment produit par *M. smegmatis* transformé par le plasmide pC51 (B)

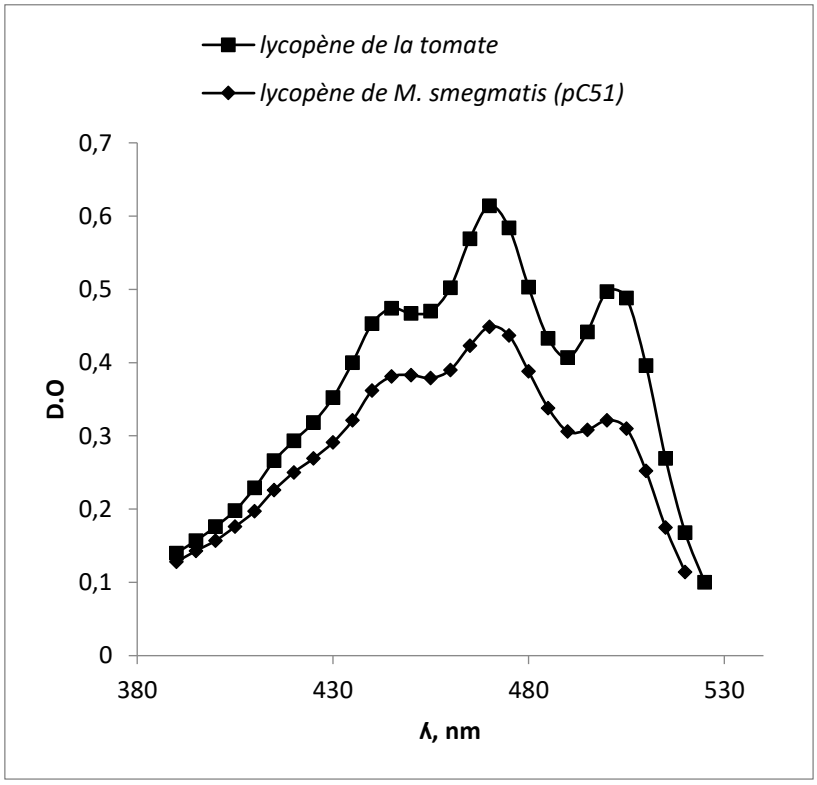

Figure 14 : Spectres d'absorption du lycopène extrait de *M. smegmatis* (pC51) et de la tomate

Le chromatogramme CCM de l'extrait des caroténoïdes de *M. smegmatis* transformé avec le plasmide pC51 montre la présence d'un composé majeur. Il montre également que le spectre d'absorption du caroténoïde purifié et élué est identique à celui du lycopène extrait de la tomate (Figure 14). Ce dernier montre trois pics d'absorption à 445 nm, 470 nm et 500 nm, le maximum

d'absorption est situé à 470 nm. Cela signifie que la couleur orange de la souche pigmentée est principalement due à l'accumulation du lycopène. Ainsi, les résultats obtenus dans cette partie montrent que le lycopène est formé par les transformants et qu'il s'agit du produit final de la caroténogénèse.

Au cours de l'étape de séparation des carotènes des xanthophyles (voir Matériel et méthodes), nous avons constaté que pour *M. smegmatis* transformé par pC51, l'hypophase est claire à l'inverse de l'extrait de *M. aurum* (Figure 15), ce qui veut dire que la souche transformée ne synthétise pas les xanthophyles.

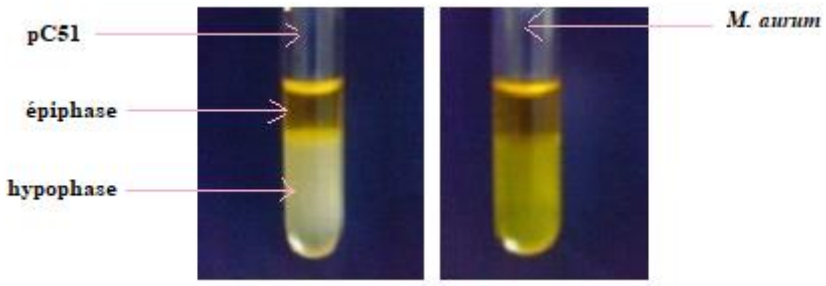

Figure 15 : Séparation de l'épiphase et de l'hypophase de *M. smegmatis* transformé par pC51 et de *M. aurum*

Nous avons mesuré également le spectre d'absorption de l'extrait total de *M. smegmatis* (pC51), et ceci sans procéder à l'élimination des xanthophyles (voir Matériel et Méthodes). Le spectre obtenu est caractéristique du lycopène (le spectre obtenu est identique à celui de la Figure 14). L'ensemble de ces résultats montrent que l'extrait de *M. smegmatis* (pC51) est constitué essentiellement du lycopène. De ce fait, et afin d'éviter les pertes au cours de la purification du lycopène, la quantification de ce pigment est réalisée à 470 nm au niveau de l'extrait brut (470 nm correspond à la longueur d'onde où le pigment absorbe au maximum).

I. Quantification de la production du lycopène

La production du lycopène par le transformant est déterminée en utilisant des cellules en phase stationnaire de croissance, par extraction puis par analyse spectrale. *M. smegmatis* transformé avec le plasmide pC51 produit le lycopène avec une concentration de 1,41 ± 0,09 mg / g (poids sec).

V. Amélioration génétique par mutagenèse de la production du lycopène par *M. smegmatis* transformé avec le plasmide pC51

L'amélioration de la souche par mutagenèse a permis de sélectionner un mutant rouge (désigné *M. smegmatis* AI) (Figure 16). Ce mutant est obtenu après exposition de *M. smegmatis* (pC51) aux UV pendant 10 min. sur la boite, nous avons obtenu deux autres types de colonies de couleur blanche et jaune qui ont le même aspect que *M. smegmatis*, il s'agit d'autres mutants, mais dans ce travail, nous nous sommes intéressés au clone rouge.

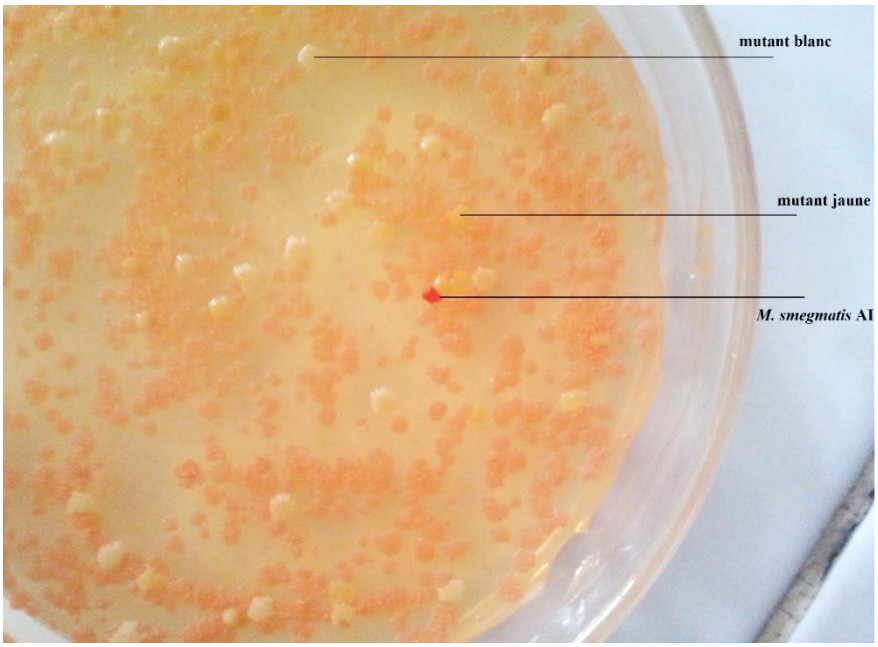

Figure 16 : Sélection d'un mutant rouge *M. smegmatis* AI par mutagenèse en utilisant les UV

Pour confirmer que le clone rouge obtenu (Figure 16) correspond à un mutant de *M. smegmatis* transformé par pC51, on s'est basé sur les critères suivants :

- ✓ ***Le temps de génération*** : nous avons constaté que le mutant rouge a le temps de génération de *M. smegmatis* ; en effet, nous avons obtenu des colonies dans les boites après deux jours d'incubation à 37°C.
- ✓ ***La forme des colonies*** : une colonie de ce mutant rouge est diluée puis étalée pour obtenir des colonies bien individualisées, l'observation de la forme de ces colonies nous a permis de conclure qu'elles ont la forme caractéristique de *M. smegmatis* dite « en chou-fleur » (Figure 17).



Figure 17 : Colonies en chou-fleur du mutant rouge de *M. smegmatis* transformé par pC51 (orange) et de *M. smegmatis* non transformé

- ✓ ***La composition en pigments*** : nous avons procédé à une extraction des pigments de ce mutant rouge, suivie d'une analyse par CCM, et nous avons remarqué qu'il synthétise un seul pigment (Figure 18).



Figure 18 : Analyse chromatographique de l'extrait du mutant, M : extrait de *M. smegmatis* AI

Le spectre d'absorption du pigment extrait est celui du lycopène (Figure 19), ce qui montre que le mutant sélectionné produit le lycopène

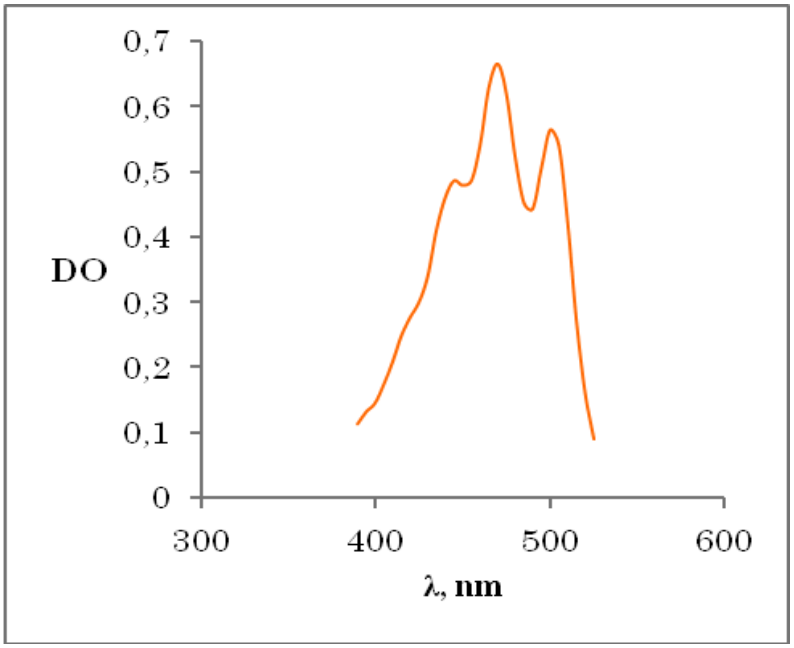

Figure 19 : Spectre d'absorption du pigment de *M. smegmatis* AI

- ✓ ***L'extraction du plasmide*** : nous avons extrait le plasmide du mutant qui est analysé par la suite sur gel d'agarose, les résultats du gel ont montré qu'il s'agit bien du plasmide pC51 (Figure 20) :

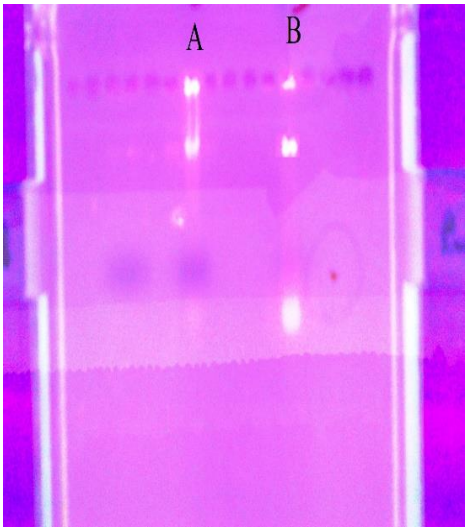

Figure 20 : Analyse par gel d'agarose à 1% des extraits plasmidiques de *M. smegmatis* transformé avec pC51 (A) et de la souche AI (B)

Ces quatre critères (temps de génération, forme des colonies, présence du lycopène et extraction du plasmide) indiquent qu'il s'agit bien d'un mutant de *M. smegmatis* transformé par pC51. Ce mutant produite le lycopène avec un rendement de 22,50 ± 2,13 mg/g de biomasse, ce qui est considérable par rapport à celui de *M. smegmatis* transformé par pC51 (1,41 ± 0,09 mg/g de poids sec).

VI. Détermination de la nature de la mutation de la souche *M. smegmatis* AI

Pour déterminer si la mutation est chromosomique ou plasmidique, quatre transformations sont effectuées en utilisant les plasmides pC51 (plasmide initial) et MpC51 (plasmide de *M. smegmatis* AI) (Tableau 4, Figure 21).

Tableau 4 : Pigmentation des colonies et quantité du lycopène produite par *M. smegmatis* MC2 155 et *M. smegmatis* MSm transformées séparément par les plasmides pC51 et MpC51

	M. smegmatis MC_2 155		*M. smegmatis* MSm (souche AI sans plasmide)	
	pC51	MpC51	pC51	MpC51
Pigmentation	Orange	Orange	Rouge	Rouge
Concentration du lycopène mg/g	1.41± 0.09	1.43± 0.13	22,50 ± 2,13	23,43 ± 3.13

Comme le montre le Tableau 4, et la Figure 21, les colonies de *M. smegmatis* transformées par le plasmide pC51, ou par le plasmide MpC51 sont orange et synthétisent le lycopène à une concentration de 1.4 mg/g. D'autre part, les colonies de la souche MSm transformée par les plasmides pC51 et MpC51 sont rouges et synthétisent le lycopène avec des rendements respectifs de 22,50 ± 2,13 mg/g et 23,43 ± 3.13 mg/g ; ces deux rendements ne diffèrent pas significativement ($\alpha = 5\%$). Ces résultats permettent de conclure que la mutation de la souche AI est chromosomique.

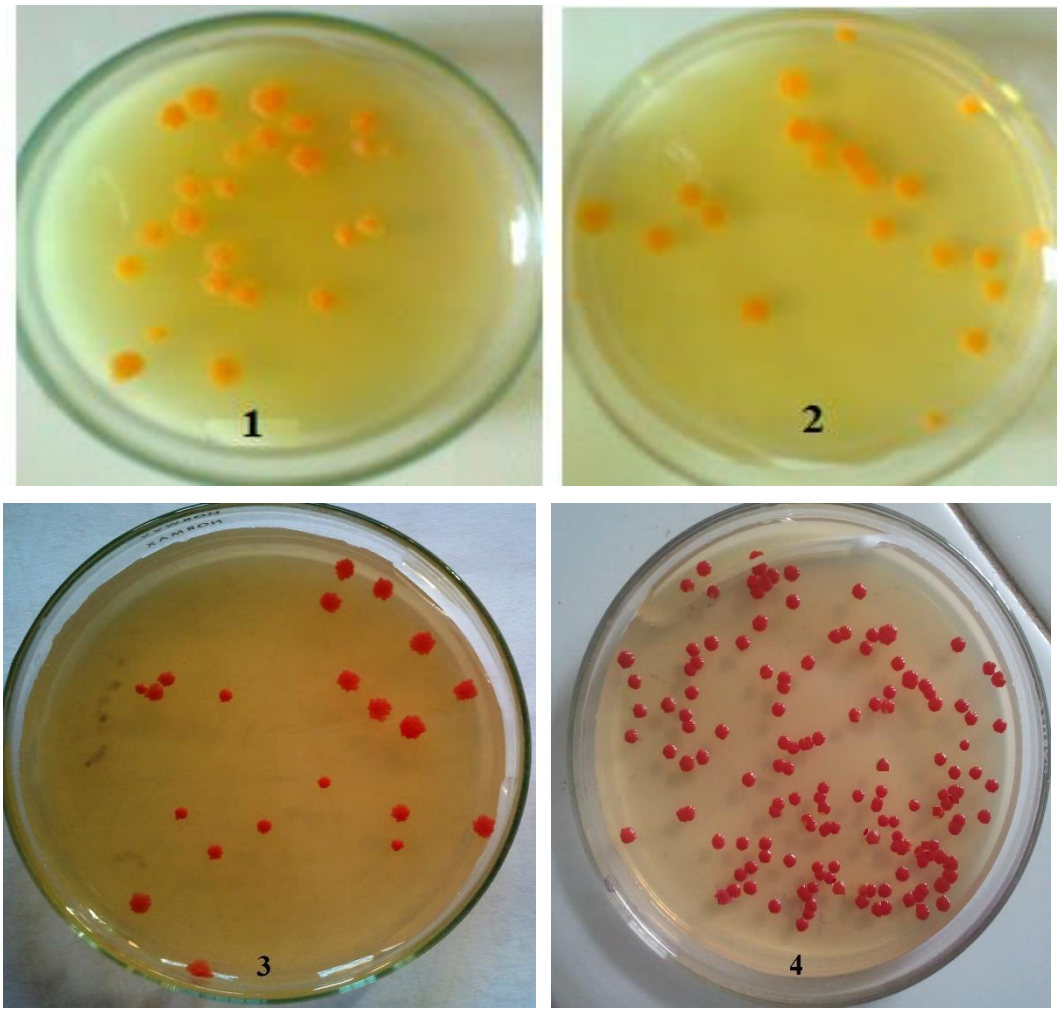

Figure 21 : Phénotypes des colonies obtenues après les transformations. *M. smegmatis* MC2 155 transformé par le plasmide pC51 (1) ; *M. smegmatis* MC2 155 transformé par le plasmide MpC51 (2) ; *M. smegmatis* MSm transformé par le plasmide pC51 (3) ; *M. smegmatis* MSm transformé par le plasmide MpC51 (4).

VII. Effet des paramètres physicochimiques

1. Effet du temps d'incubation

La variation de la concentration en lycopène et de la croissance de *M. smegmatis* AI pendant la fermentation est illustrée dans la Figure 22. Les résultats obtenus montrent que la courbe de croissance est constituée de trois phases : la première phase (0 à 3 jours) appelée « phase de latence », la deuxième phase (4 à 7 jours) appelée phase de croissance dans laquelle la croissance a augmenté et le lycopène est formé ; et la troisième phase (7 à 12 jours) appelée phase stationnaire, dans laquelle la croissance est restée constante. Ainsi, la production du lycopène a lieu au cours de la phase exponentielle avec un maximum de 25,304 mg/g de

biomasse sèche à la fin de cette phase (après 7 jours d'incubation), par la suite cette production reste constante.

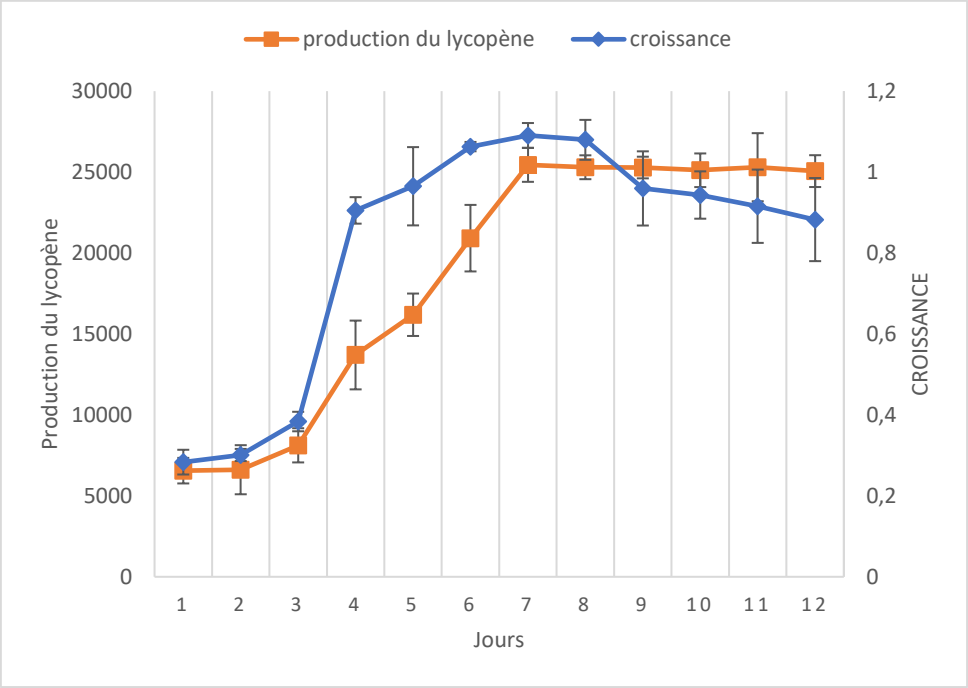

Figure 22 : Effet du temps d'incubation sur la croissance et la production du lycopène de *M. smegmatis* AI

Sur la base de ces résultats, les cultures bactériennes, réalisées dans la suite de ce travail, sont incubées pendant au moins 7 jours, ce qui permettra une production maximale du lycopène.

2. Effet du pH initial de la culture

Pour évaluer l'effet du pH sur la pigmentation et la croissance de notre souche, *M. smegmatis* AI est cultivé à 37 ° C pendant 7 jours. Le pH est ajusté à 5, 5,5, 6,0, 6,5 et 7,0 respectivement. Les résultats (Figure 23) montrent que le pH a un effet prononcé sur la production du lycopène et la croissance de *M. smegmatis* AI. Un rendement significativement élevé en lycopène (25397 µg du lycopène / g de poids sec) est obtenu à un pH de 5,5 par rapport aux autres valeurs de pH. La caroténogénèse est induite donc par une diminution du pH (pH <6,5). Cependant, une croissance maximale est observée lorsque les cellules sont cultivées au pH 6,0.

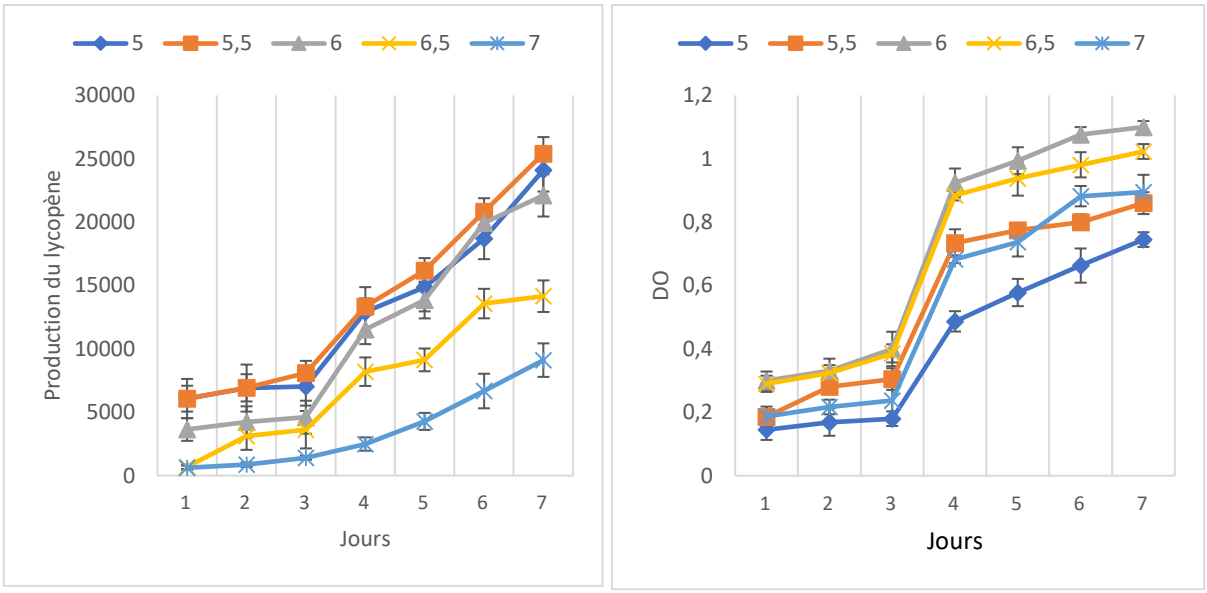

Figure 23 : Effet du pH sur la croissance et la production du lycopène de *M. smegmatis* AI

3. Effet de la température

Pour étudier l'effet de la température sur la croissance mycobactérienne et la production du lycopène, *Mycobacterium smegmatis* AI est cultivé dans le milieu sauton et incubé à 30 et 37 ºC.

Comme indiqué sur la Figure 24, la température a un effet remarquable sur la production du lycopène et la croissance bactérienne avec un taux de croissance et une production du lycopène significativement élevée à 37 ° C.

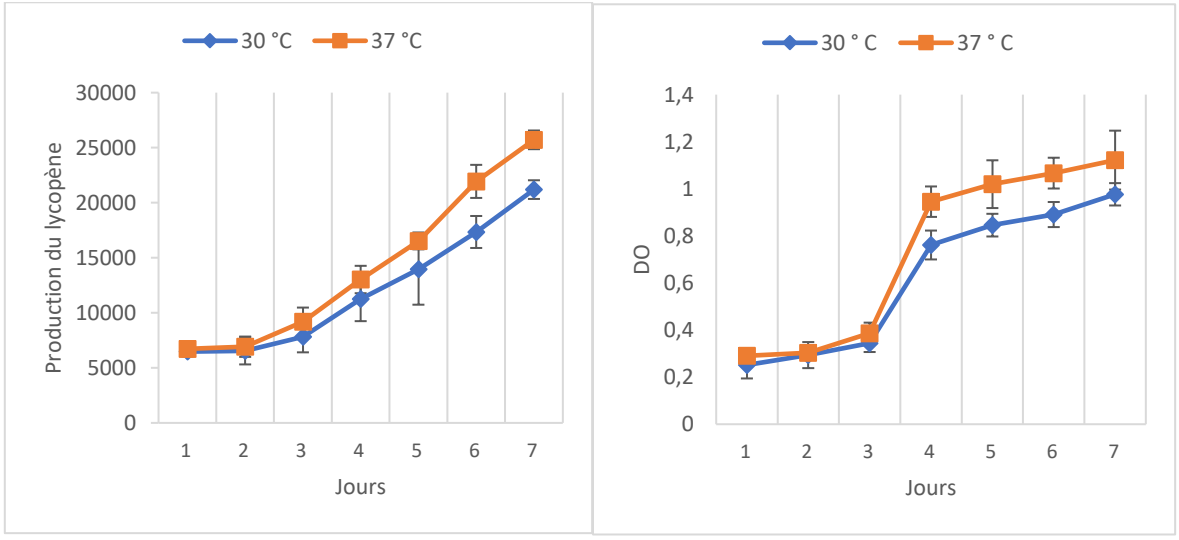

Figure 24 : Effet de la température sur la croissance et la production du lycopène de *M. smegmatis* AI

4. Effet de l'agitation

Afin d'étudier l'effet de l'agitation sur la vitesse de croissance et le rendement en lycopène, *M. smegmatis* AI est incubé sous différentes vitesses d'agitation (100, 120 et 150 tr / min) et en absence d'agitation. Les résultats obtenus (Figure 25) montrent que la teneur en lycopène et le taux de croissance sont significativement plus élevés lorsque *M. smegmatis* AI est cultivé sous agitation, et il n'y a pas de différence significative entre les résultats obtenus pour les trois vitesses d'agitation. La production de lycopène en absence d'agitation est de 15,18 mg/g, alors qu'en présence d'agitation, elle est de 25,119 mg/g de poids sec.

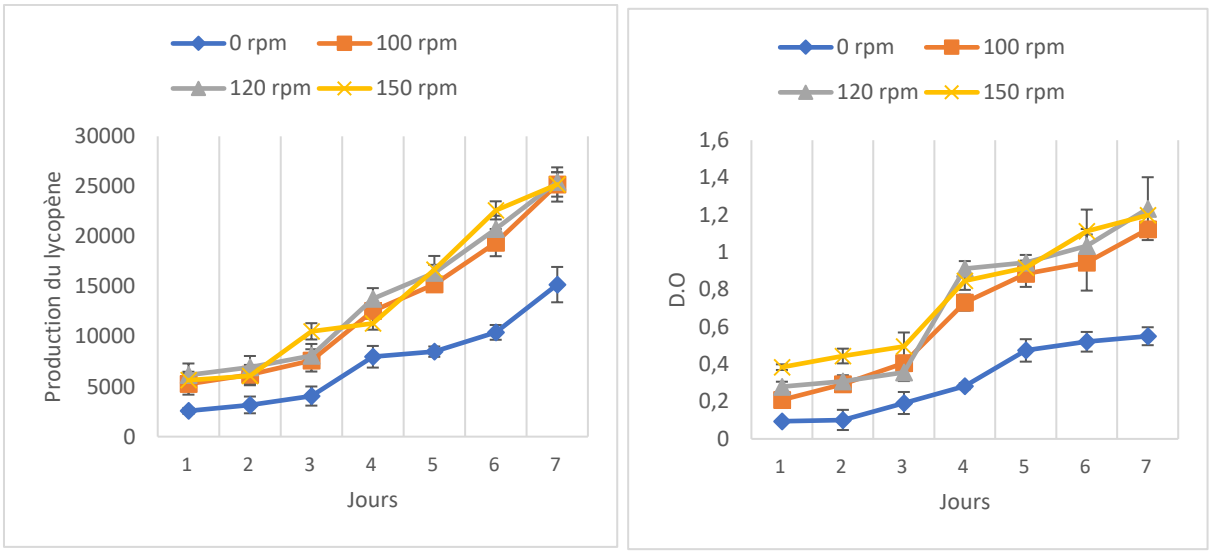

Figure 25 : Effet de l'agitation sur la croissance et la production du lycopène de *M. smegmatis* AI

5. Effet de la lumière

Comme le montre la Figure 26, le rendement en lycopène est significativement supérieur lorsque la culture est cultivée en présence de la lumière (25,787 mg/g). A l'obscurité, la production du lycopène est faible (13 mg/g). Cependant, aucune différence significative de la croissance cellulaire n'est observée en présence ou en absence de la lumière.

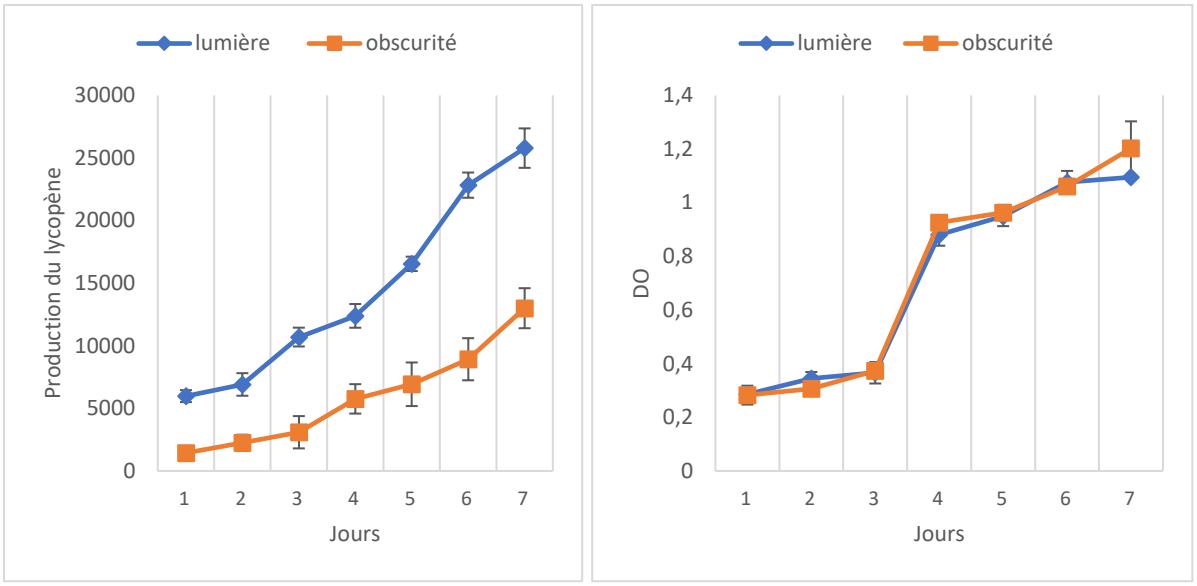

Figure 26 : Effet de la lumière sur la croissance et la production du lycopène de *M. smegmatis* AI

La production du lycopène par des microorganismes génétiquement modifiés suit une méthodologie générale : la première étape est la construction d'un plasmide portant les gènes de synthèse du lycopène. Ensuite, le plasmide est transféré dans les microorganismes hôtes. Enfin, lorsque la fermentation est terminée, le lycopène est extrait (Hernandez-Almanza *et al.,* 2016). Dans la présente étude, une production réussie du lycopène dans *M. smegmatis* MC_2-155 transformé avec des gènes mycobactériens est démontrée et validée. Ce qui indique que les gènes de caroténogenèse de *M. aurum* sont exprimés avec succès dans *M. smegmatis*. La production du lycopène à partir d'IPP nécessite les enzymes : la GGPP synthase, la phytoène synthase et la phytoène désaturase (Houssaini-Iraqui *et al.,* 2001) responsables de la synthèse des intermédiaires : le phytoène, le phytofluène, le ζ -carotène et le neurosporène, successivement (Chamovitz *et al.,* 1992). Cependant, les résultats obtenus montrent que l'extrait de *M. smegmatis* transformé par pC51 est constitué uniquement du lycopène, et aucun de ces intermédiaires n'est détecté dans cette étude. La biosynthèse du lycopène peut être divisée en deux étapes : la synthèse du phytoène et sa désaturation (déshydrogénation) (Porter *et al.,* 1967). Quatre désaturations sont nécessaires pour convertir le phytoène en lycopène par la phytoène désaturase (déshydrogénase), les précurseurs intermédiaires sont successivement le Phytoène, phytofluène, ζ-carotène, et neurosporène (Porter *et al.,* 1967 ; Chamovitz *et al.,* 1992). Ces précurseurs de biosynthèse ne sont pas détectés, suggérant que ces intermédiaires de synthèse sont rapidement convertis en lycopène.

Ces résultats sont appuyés par les données de la bibliographie qui ont montré que le Phytoène, le phytofluène, et le ζ-carotène ne sont pas détecté dans l'extrait d'*E. coli* transformé par pC51 (Houssaini-Iraqui *et al.,* 2001), et que les extraits de *M. aurum A+* et *M. aurum* NgR9 ne contiennent, parmi les précurseurs du lycopène, qu'une faible quantité de neurosporène (Levey-Frébault et David, 1979). Il est connu aujourd'hui que les produits finis de la biosynthèse des caroténoïdes apparaissent pendant les premières heures, et que les intermédiaires de biosynthèse ne s'accumulent pas, ce qui explique la difficulté de les trouver dans les extraits bactériens (Houssaini- Iraqui *et al.,* 2001).

La production du lycopène par des sources microbiennes est actuellement d'un grand intérêt (Chen *et al.,* 2016 ; Sevgili et Erkmen, 2019). *M. smegmatis* transformé avec le plasmide pC51 produit une quantité importante du lycopène. Cette production peut être améliorée en augmentant l'expression des gènes des carotènes du plasmide pC51 en utilisant un promoteur fort, et ce système pourrait éventuellement être utilisé comme source de production de ce

caroténoïde. Dans le but d'augmenter la production du lycopène par notre transformant, la souche AI est sélectionnée par un processus de mutagenèse. Les approches de mutagenèse chimique posent un problème de sécurité pour l'opérateur et l'environnement, alors que la mutagenèse UV est rapide, efficace et sans danger pour l'environnement (Sivaramakrishnan et Incharoensakdi, 2017). La mutagenèse aléatoire est utile pour obtenir des modifications génétiques et fonctionnelles d'un organisme. Le mécanisme d'auto-réparation de l'ADN nécessitant la lumière est interrompu lorsque la bactérie est incubée dans l'obscurité pendant 7 jours. Le mutant sélectionné produit exclusivement le lycopène avec un rendement très élevé (22,50 ± 2,13 mg/g).

Les radiations UV provoquent la formation d'un cycle cyclobutyle entre les résidus thymine adjacents d'un même brin d'ADN, ce qui entraîne la formation de dimère de thymine dans le même brin. Il semble les UV conduisent aussi à la formation des dimères de cytosine et de thymine-cytosine mais moins fréquemment (Friedberg *et al.,* 2006 ; Yang, 2011). Ces dimères de thymine déforment localement la double hélice d'ADN de telle façon qu'elle ne peut plus servir de matrice adéquate à la transcription. De ce fait, un simple dimère de thymine, non réparé, peut suffire à provoquer la mort d'*E. coli* (Yang, 2011). Plusieurs voies de réparation sont décrites chez les bactéries, elles varient d'une réparation spécifique des lésions UV par une seule enzyme de réparation à une réparation de plusieurs bases endommagées par des complexes multiprotéiques (Friedberg, 2011 ; Naegeli et Sugasawa, 2011). Au cours de différents processus de réparation, la probabilité d'une mutation est importante (Rochette *et al.,* 2003 ; Friedberg, 2011).

Dans cette étude, les résultats sont prometteurs, car *M. smegmatis* AI accumule principalement le lycopène avec une productivité élevée. Plusieurs rapports bibliographiques ont décrit la production du lycopène en utilisant l'ingénierie métabolique : En 1998, Shimada et ses collaborateurs ont utilisé *Candida utilis* pour la production du lycopène ; ces auteurs ont rapporté un rendement en lycopène de 7,8 mg / g (poids sec) (Shimada *et al.,* 1998). Bhataya et ses collaborateurs ont transformé *Pichia pastoris* avec deux plasmides pour produire du lycopène et ils ont obtenu un rendement de 73,9 mg/l (Bhataya *et al.,* 2009). *Saccharomyces cerevisiae* est aussi suggéré pour la production du lycopène en tant qu'hôte fiable et sûr. L'introduction de *CrtE, CrtB et CrtI* provenant d'*Erwinia uredovora* dans *S. cerevisiae* a donné lieu à 113 µg/g du lycopène (Yamano *et al.,* 1994). Le rendement en lycopène de *S. cerevisiae* est optimisé pour atteindre 115,64 mg/l (Li *et al.,* 2019a). La production, par génie

combinatoire, du lycopène à partir de la souche naturelle *B. trispora* est aussi réalisée, un rendement de 55,56 mg/g dans un bioréacteur de 5 L est obtenu (Choudhari *et al.*, 2008). Récemment, une concentration de 944.8 mg/L est obtenu avec *B. trispora* (Sevgili et Erkmen, 2019). Ce rendement est supérieur à celui de la présente étude, cependant, la production de lycopène à partir de *B. trispora* pose plusieurs contraintes à savoir la nécessité d'ajouter des inhibiteurs tels que le 2-méthylimidazole, la pipéridine, la créatinine ou la nicotine, pendant la fermentation pour inhiber l'activité lycopène cyclase d'une enzyme bifonctionnelle possédant des activités à la fois de phytoène synthase et de lycopène cyclase (Hong *et al.*, 2018). *E. coli* est largement étudié pour produire le lycopène, Yoon *et al.* (2007) ont réussi à produire le lycopène en introduisant les gènes *CrtE*, *CrtB* et *CrtI* provenant de *P. agglomerans* dans *E. coli* (Yoon *et al.*, 2007). Aujourd'hui un rendement de 40.9 mg/g est obtenu en intégrant la voie du mévalonate dans le chromosome bactérien d'*E. coli* (Li *et al.*, 2019a). Ce qui suggère que l'intégration des gènes du plasmide pC51 dans le chromosome du mutant peut améliorer la production du lycopène. Les mycobactéries sont aussi rapportées comme des producteurs possibles du lycopène, ainsi, Kerr et ses collaborateurs ont isolé un mutant de *M. aurum* produisant principalement le lycopène avec un rendement de 7.4 mg/g (Kerr *et al.*, 2004). La productivité obtenue dans notre travail est beaucoup plus élevée.

En plus du rendement important, ce mutant ne produit que le lycopène, ce qui pourrait constituer un grand avantage pour une éventuelle utilisation industrielle. En effet, dans ce cas, les étapes de purification couteuses et lourdes peuvent être évitées. Donc les micro-organismes pourraient constitués des alternatives intéressantes pour l'industrie de production du lycopène. Le contenu en lycopène peut être amélioré en optimisant les paramètres physicochimiques. Cette stratégie est utilisée pour augmenter la synthèse du lycopène par un mutant de *M. aurum* (Kerr *et al.*, 2004) ; En effet, l'optimisation des conditions de culture de ce mutant a permis d'augmenter la production de ce pigment de 1,2 mg/g de poids sec à 7,4 mg/g de poids sec.

L'effet du temps d'incubation a montré une productivité maximale de lycopène de 25,44 mg/g et une croissance maximale après sept jours d'incubation. Donc pour évaluer l'effet des autres paramètres sur la croissance cellulaire et la production du lycopène, les cultures sont incubées pendant 7 jours.

Dans notre étude, la productivité la plus élevée en lycopène (25,4 mg/g) est obtenue en cultivant les cellules à un pH de culture initial de 5,5. D'autre part, la production de biomasse est réduite dans ces conditions et atteigne son maximum à un pH de 6. Ce qui signifie que les

faibles valeurs de pH provoquent un stress cellulaire, qui se traduit par une réduction de la biomasse et une favorisation de la caroténogenèse chez *M. smegmatis* AI. Pour favoriser la croissance cellulaire et la production du lycopène, *M. smegmatis* AI doit être cultivé initialement à un pH de 6 pour stimuler la production de la biomasse bactérienne, puis il faut diminuer le pH du milieu à 5,5 pour favoriser la production du lycopène.

Plusieurs études appuient notre conclusion, Kerr et *al*. (2004) ont isolé un mutant de *M. aurum* produisant principalement le lycopène et ont démontré que le rendement en lycopène peut être augmenté en cultivant les cellules à un pH de culture initial de 6, alors que la vitesse de croissance est maximale à un pH de 7 (Kerr *et al.,* 2004). Un rendement plus élevé en bêta-carotène (99 ± 1 mg/l) est obtenu par *Blakeslea trispora* à pH 6-7 par contre le rendement maximal en biomasse est observé à pH 4-5 (Choudhari et Singhal, 2008). Dans une autre étude, le pH optimum pour la croissance et la production des caroténoïdes par *Rhodotorula* est de 5 (Zhao *et al.,* 2019). Cependant, Sowmya et Sachindra, 2015 ont signalé que la croissance de *Formosa* sp., une bactérie marine, n'est pas affectée par le pH du milieu de croissance contrairement à la production des pigments qui était meilleure à pH neutre (Sowmya et Sachindra, 2015).

L'étude de l'effet de la température sur la croissance et la production du lycopène par *M. smegmatis* AI a montré que la température optimale pour la croissance et la production du lycopène par cette souche est 37°C. La température est l'un des facteurs environnementaux les plus influençant sur la croissance et le développement des microorganismes. Elle affecte le fonctionnement de nombreuses voies de biosynthèse, y compris celle des caroténoïdes (Minhas *et al.,* 2016). L'impact de la température sur la croissance et la production de caroténoïdes par *Rhodotorula* est étudié par Zhao *et al*. (2019), ils ont montré que la culture des cellules à 28 ° C peut améliorer à la fois la croissance et la teneur en caroténoïdes (Zhao *et al.*, 2019). Tian et ses collaborateurs ont rapporté que le rendement maximal en caroténoïdes est observé à une température initiale de 30 °C par *Deinococcus xibeiensis* (Tian *et al.,* 2019). La production des caroténoïdes par les mycobactéries est aussi influencée par la température, en effet, David (1974) a signalé que la synthèse de bêta-carotène par *M. kansasii* est maximale à 36 °C (David,1974).

La croissance de *M. smegmatis* AI et la production du lycopène sont significativement importants en présence qu'en absence d'agitation, mais aucune différence n'est observée entre les différentes vitesses d'agitation testées (100, 120, 150 rpm). Les microorganismes aérobies

ont besoin d'oxygène pour la croissance et la production des métabolites. Plusieurs études ont signalé l'effet de l'agitation sur la croissance cellulaire, et la production des caroténoïdes. En effet, Borba *et al*. (2018) ont conclu que les valeurs les plus élevées en caroténoïdes totaux et en biomasse sont obtenues à 150 rpm (Borba *et al.,* 2018). Il est rapporté que l'agitation augmente de manière significative l'accumulation de zéaxanthine chez *Flavobacterium* (Masetto *et al.,* 2001). Dans une autre étude, il est observé que l'agitation a favorisé la croissance et la production des caroténoïdes par *Formosa* sp. (Sowmya et Sachindra, 2015).

Dans la présente étude, nous avons montré que la lumière a une influence remarquable sur la production du lycopène par *M. smegmatis* AI (25,787 mg/g en présence de la lumière contre 13 mg/g en absence de la lumière). Ces résultats sont appuyés par les données de la bibliographie montrant que la production et l'accumulation des caroténoïdes par les algues, les champignons et les bactéries semblent être influencées positivement par la lumière (Khodaiyan *et al.,* 2007). En effet, certaines mycobactéries ne produisent des pigments qu'en réponse à une exposition à la lumière (Saviola, 2018). Sun et *al*. (2019) ont rapporté que la lumière induit l'accumulation des caroténoïdes chez la microalgue *Crypthecodinium* (Sun *et al.,* 2019). Chez *Haematococcus pluvialis,* une forte intensité lumineuse est nécessaire pour stimuler la phytoène synthase et de la caroténoïde hydroxylase, deux enzymes impliqués dans la voie de biosynthèse des caroténoïdes (Steinbrenner et Linden, 2001). *Blakeslea trispora,* peut se développer dans l'obscurité, mais il n'accumule le β-carotène qu'en présence de la lumière (Quiles-Rosillo *et al.,* 2005). L'effet de la lumière est également étudié chez *Flavobacteruim* et *Dietzia natronolimnea*. Ces bactéries n'ont synthétisé que quelques traces des caroténoïdes dans l'obscurité, mais après une courte exposition à la lumière, une stimulation considérable de la biosynthèse des caroténoïdes est observée (Khodaiyan *et al.,* 2007). Des données bibliographiques ont discuté que même l'intensité et la longueur d'onde de la lumière influence la croissance et la production des pigments, ainsi, des concentrations maximales des pigment intracellulaire et de biomasse sont atteintes *pseudomonas aeruginosa* sous une longueur d'onde jaune. Le rendement minimum en pigment intracellulaire et le rendement en biomasse sont enregistrés sous une longueur d'onde de lumière rouge (Rehman et Dixit, 2019).

L'intérêt pour le lycopène s'est énormément accentué ces dernières années, en particulier suite à la mise en évidence de ses propriétés colorantes, antioxydantes et antiprolifératives intéressantes. La production du lycopène est dominée par la synthèse chimique et l'extraction à partir des plantes, cependant ces deux voies posent beaucoup de problèmes (toxicité, coût onéreux et disponibilité de la matière). Récemment, un grand intérêt est porté pour les microorganismes produisant le lycopène. Cette voie de biosynthèse s'avère être une alternative biologique intéressante en raison de son rendement important et son coût réduit.

Dans cette étude, Les gènes de synthèse du lycopène, *crtE*, *crtB* et *crtI*, dérivés de *M. aurum* A +, sont introduits dans *M. smegmatis* MC^2 155, entraînant une pigmentation orange, avec une production jugée relativement importante (1,41 mg/g (poids sec) du lycopène). Pour améliorer la production du lycopène par *M. smegmatis*, un protocole de mutagenèse basé sur l'irradiation ultraviolette est réalisé et un mutant rouge (*M. smegmatis* AI) est obtenu. Les maximas d'absorption des pigments et l'analyse chromatographique ont montré que la souche pigmentée accumule principalement le lycopène avec un rendement élevé dépassant 25,30 ± 2,13 mg/g poids sec. L'étude de la nature de la mutation de la souche AI a permis de conclure qu'il s'agit d'une mutation au niveau du chromosome bactérien.

Dans le but d'améliorer la croissance et la production du lycopène par *M. smegmatis* AI contenant pC51, une optimisation est réalisée en étudiant l'effet des paramètres suivants : la durée d'incubation, le pH, la température, l'agitation, la lumière et l'obscurité. Un bon rendement est obtenu (25,787 mg/g) lorsque la culture est réalisée à pH 5,5 en présence de la lumière à une température de 37°C et sous agitation.

Chapitre 2 : Applications biotechnologiques du lycopène

La friture, l'un des procédés de cuisson les plus célèbres, consiste à chauffer l'huile à haute température (entre 150 et 190°C), puis à immerger les aliments dans cette huile pendant une courte période pour obtenir les propriétés organoleptiques souhaitables et attrayantes pour les consommateurs (Tarmizi *et al.,* 2019). Malheureusement, cette procédure entraîne la formation des réactions secondaires indésirables telles que des réactions de polymérisation, d'hydrolyse et d'oxydation en raison de la présence d'oxygène et d'humidité dans les aliments (Dobarganes et Màrquez-Ruiz, 2013). Ces réactions secondaires peuvent affecter de manière significative la qualité des aliments (Zhang *et al.,* 2012). L'huile de soja est la deuxième huile la plus consommée au monde après l'huile de palme (Rodrigues *et al.,* 2012). Il est hautement recommandé pour la santé humaine en raison de sa composition polyinsaturée riche en acides gras oméga-3 (Hwang et Winkler, 2017). Cependant, cette caractéristique est également responsable de son instabilité puisque, dans des conditions de chauffage, elle conduit à une oxydation plus rapide (Saoudi *et al.,* 2016).

Afin d'améliorer la qualité et la sécurité de l'huile de friture, des antioxydants sont utilisés depuis des décennies. Cependant, des études récentes montrent que l'utilisation des antioxydants synthétiques, tels que l'hydroxy anisole butylé, l'hydroxy toluène butylé et la butyl hydroquinone présentent des risques élevés pour la santé (Sasaki *et al.,* 2002 ; Silva et Lidon, 2016). Ainsi, il est recommandé d'utiliser des antioxydants naturels, sûrs, sains et efficaces.

Plusieurs chercheurs se sont intéressés à l'utilisation de nouveaux antioxydants naturels tels que les extraits de romarin, de thym, de poivre noir, de gingembre, de curcuma, et d'origan (Chammem *et al.,* 2015 ; Saoudi *et al.,* 2016 ; Redondo-cuevas *et al.,* 2017).

Le lycopène, un caroténoïde rouge naturel, est caractérisé par des propriétés anti-oxydantes puissantes dues à son activité anti-radicalaire qui est deux fois plus élevé que celle du bêta-carotène et dix fois plus élevée que celle de l'α-tocophérol (Grether-Beck *et al.,* 2017). D'où sa capacité de prévenir le stress oxydatif (Sahin *et al.,* 2018), et plusieurs types de maladies telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires (Bruno *et al.,* 2016).

De nos jours, le lycopène est l'un des additifs naturels les plus importants. Il est autorisé en tant que colorant alimentaire sous le code E 160d. Il peut être utilisé à des concentrations jusqu'à 500 mg / kg (Anon, 1995). Certaines études ont porté sur le lycopène provenant des tomates ou des sous-produits de tomates en tant qu'additif pour prolonger la durée de conservation de plusieurs catégories d'aliments, tels que les produits à base de la viande (García

et al., 2009 ; Calvo *et al.,* 2008), la matière grasse du lait (Siwach *et al.,* 2016), les nouilles (Sahoo, 2014), les crème glacées (Rizk El-Kady et El-Bialy, 2014) et les huiles végétales. Kehili et *al*. (2018) ont étudié l'effet d'une oléorésine riche en lycopène (extrait d'un sous-produit industriel de pelures de tomates) sur les huiles raffinées d'olive et de tournesol au cours d'une conservation accélérée (sous une température de 50 °C pour favoriser les conditions de conservation accélérées). Ils ont conclu que le lycopène peut être utilisé comme un excellent additif alimentaire naturel en raison de sa stabilité et de sa résistance à la chaleur et à aux pH extrêmes (Kehili *et al.,* 2018). De plus, l'utilisation de lycopène, à faible concentration, dans les aliments n'a aucun effet sur les saveurs des aliments. Le lycopène peut également couvrir une large gamme de couleurs (jaune, orange et rouge foncé) (Kaur *et al.,* 2011), ce qui augmente sa flexibilité pour être utilisé avec plusieurs produits.

Le lycopène, a fait l'objet d'une attention particulière aussi en tant qu'agent protecteur contre les UV. En effet, Les rayons UV peuvent pénétrer profondément dans la peau, où elles induisent la génération des espèces réactives d'oxygène (ROS) provoquant ainsi le stress oxydatif. Le stress oxydatif est défini comme étant un déséquilibre entre la production des espèces réactives d'oxygène et les capacités cellulaires antioxydantes. Les espèces réactives d'oxygène générées peuvent endommager l'ADN, les protéines et les lipides, ainsi que les voies de signalisation cellulaire, conduisant éventuellement à la photocarcinogenèse (Sharma *et al.,* 2018). Tous ces changements biochimiques induisent un certain nombre de réponses biologiques, notamment le développement d'un érythème, d'un œdème, l'hyperplasie, la suppression immunitaire, les lésions de l'ADN, le photo vieillissement et la mélanogenèse. Ces altérations sont directement ou indirectement impliquées dans le développement du cancer de la peau (Martini *et al.,* 2006).

Une approche pour protéger la peau contre les effets nocifs des rayons UV consiste à utiliser des antioxydants en tant que photoprotecteurs. Au cours des dernières années, des composés naturels, tels que les caroténoïdes, les acides phénoliques, les flavonoïdes et les polyphénols, ont attiré une attention considérable en tant qu'agents protecteurs contre les UV (Svobodová *et al.,* 2003 ; Hermoni et Sharoni, 2019).

Ce travail se décompose en deux parties :

La première partie a pour objectif d'étudier l'effet du lycopène sur l'oxydation des lipides dans l'huile de soja dans des conditions de chauffage et de friture. À notre connaissance, il n'existe pas de recherche sur l'utilisation du lycopène comme additif naturel contre l'oxydation des huiles végétales dans les conditions de friture.

La deuxième partie a pour objectif d'étudier l'effet de lycopène à protéger les cellules de *M. smegmatis, in vivo* et *in vitro*, contre les radiations UV, et d'évaluer l'aptitude d'une crème à base de lycopène à protéger les lapins contre le rayonnement UV.

I. Effets du lycopène sur la stabilité de l'huile de soja dans des conditions de chauffage à des températures de friture

1. Protocole de chauffage de l'huile de soja

Afin d'évaluer l'effet de lycopène sur la conservation de la qualité de l'huile de soja pendant le chauffage à des températures de friture, l'huile contenant le lycopène à 50 mg/l est comparé avec de l'huile sans lycopène. Les expériences de chauffage sont effectuées en utilisant une friteuse électrique (Moulinex) d'une capacité maximale de 7,5 l d'huile. Dans chaque expérience, 2 l d'huile de soja sont chauffés à 180 ° C (± 2 ° C) pendant 6 jours consécutifs (6 h par jour : 3h le matin et 3h le soir). A la fin de chaque expérience, 60 ml d'huile sont prélevés et stockés à 4 ° C.

2. Caractérisation de l'huile de friture

Au cours de l'essai de chauffage, l'indice de peroxyde (PV) et l'acidité sont déterminés pour chaque échantillon.

2.1.Détermination de l'indice de peroxyde

Selon la norme ISO 3960 (1977), l'oxydation de l'huile est évaluée par sa teneur en peroxyde et ses produits immédiats d'oxydation. 5 g d'huile sont mélangés avec 10 ml de chloroforme et ensuite 15 ml d'acide acétique. Ce mélange est agité vigoureusement pendant 30 secondes avant d'ajouter 1 ml d'iodure de potassium saturé (KI). Après avoir agité, le mélange est laissé reposer dans un endroit sombre pendant 15 min, avant d'ajouter 75 ml d'eau distillée. Enfin, le mélange est agité puis titré avec une solution de thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3$) 0,01 M en présence d'une solution d'amidon servant d'indicateur de couleur (jusqu'à disparition complète de la couleur brune). Le blanc est réalisé en parallèle au premier essai, de la même façon mais cette fois ci sans huile. L'IP est exprimé en milliéquivalents d'oxygène de peroxyde par kg d'huile (mEq kg^{-1}) selon la formule suivante :

$$IP = \frac{(V1-V0)XN}{m} x100$$

Où :

V_0 : volume de la solution titrée de thiosulfate de sodium utilisé à blanc (ml)
V_1 : volume de la solution titrée de thiosulfate de sodium utilisé pour l'échantillon (ml)
N : normalité de la solution de thiosulfate de sodium utilisée (0,01 N)
m : masse de la prise d'essai (g)

2.2.Mesure de l'acidité

L'acidité de l'huile est définie comme la quantité d'acides gras libérés par les molécules de triglycérides. Il est exprimé en pourcentage de l'acide oléique dans 100 g d'huile (Waghmare *et al.*, 2018).

Dans cette étude, les acides gras libres sont détectés conformément à la (Norme ISO 660, 1996). Cette méthode consiste à mélanger 10 g d'huile avec 50 ml d'alcool neutralisé. Le mélange est ensuite titré avec KOH 0,10 N en présence de phénol phtaléine comme indicateur de couleur (le titrage est terminé lorsqu'une couleur rose apparaît et dure au moins 30 secondes).

$$Acidité(\%d'acide\ oléique) = \frac{(Véch - Vblanc) * 0.1 * 28.2}{PE}$$

Avec :

Véch : Volume de KOH versé au titrage pour l'échantillon.
Vblanc : Volume de KOH versé au titrage pour le blanc.
PE : Prise d'essai (en g).

3. Evaluation sensorielle des chips de pomme de terre

3.1.Test de friture

Les pommes de terre fraîches sont pelées, lavées et tranchées en disques d'une épaisseur de 1 mm. Les croustilles obtenues sont frites 12 fois pendant 6 jours à raison de 2 cycles par jour (un le matin et l'autre l'après-midi) à 180 ± 2 °C. Pour chaque cycle, 150 g de chips de pomme de terre sont frits pendant 3 min dans 2 l d'huile. L'huile fraîche n'est pas ajoutée entre les temps de friture.

3.2.Déroulement des tests d'évaluation

L'évaluation sensorielle des chips de pommes de terre frites est réalisée après la première, la sixième et la douzième friture par panel de dégustateurs qui est constitué d'une dizaine de personnes des deux sexes dont l'âge varie entre 20 et 60 ans. Tous les panélistes sont des consommateurs avertis des chips, et en utilisant un panel d'échelle hédonique à 7 points (où 1 représente « mauvais », et 7 représente « très bon »). Les membres du panel sont invités à se

familiariser avec la méthodologie et les conditions de dégustation. Les descripteurs sensoriels évalués dans cette étude sont l'odeur, la couleur, le croustillant et le goût (Saoudi *et al.*, 2016).

Les échantillons codés avec des numéros aléatoires sont présentés dans un ordre choisi au hasard aux dégustateurs. Chaque échantillon à un numéro distinct, et tous les échantillons sont présentés sur le même plateau aux dégustateurs, afin de leur permettre de réévaluer au besoin certains échantillons.

4. Analyses statistiques

Le test - t - de Student est utilisé pour la comparaison des moyennes (α= 5 %) (Snedecor *et al.*, 1984).

II. Evaluation d'une crème à base de lycopène contre les UV

1. Souches et conditions de culture

Afin de mettre en évidence l'effet protecteur de lycopène vis à vis les radiations UV, différentes souches de Mycobactéries sont utilisées à savoir :

- *M. smegmatis* MC^2 155 et *M. smegmatis* transformé par le plasmide pHLD69, ces deux souches sont incapables de synthétiser le lycopène. Elles sont utilisées dans ce travail comme des contrôles pour étudier l'effet des UV, en comparaison avec la souche produisant le lycopène.
- *M. smegmatis* transformé par le plasmide pC51 contenant les gènes responsables de la biosynthèse du lycopène, cette souche est utilisée pour mettre en valeur l'effet de lycopène contre les radiations UV.
- *M. smegmatis* AI qui est une souche produisant le lycopène avec une quantité importante, elle est utilisée dans cette étude pour obtenir le lycopène qui sera utilisé pour évaluer l'effet de lycopène *in vitro* contre les radiations UV.

Le milieu de culture utilisé dans les différentes expériences est le milieu sauton dont la composition est détaillée dans l'Annexe 1.

2. Effet du lycopène *in vivo* vis-à-vis les radiations UV

Des cellules de *M. smegmatis* contenant le plasmide pC51 et cultivées sur sauton-agar à 37 ° C pendant 7 jours sont diluées pour avoir 10^4 cellules / ml. 100 µl de la culture diluée sont

étalés par la suite sur le milieu Sauton-Agar puis irradiés pendant diffèrent temps (4, 6, 8, 10, 11 ou 12 min) à l'aide d'une lampe UV (tube de 6 W-254 nm ; Vilber Lourmat, Français) située à une distance de 57 cm. Le nombre de colonies bactériennes est déterminé après 7 jours d'incubation. La même procédure est suivie pour les contrôles (*M. smegmatis* et *M. smegmatis* transformés par le plasmide pHLD69). Les valeurs représentées sont les moyennes de six répétitions.

3. Effet du lycopène *in vitro* vis-à-vis les radiations UV

Cette expérience vise à évaluer la capacité de lycopène à protéger, *in vitro*, les cellules de *M. smegmatis* contre les rayons UV. Le lycopène utilisé dans cette expérience est extrait à partir de *M. smegmatis* transformé avec le plasmide pC51 selon le protocole décrit dans le chapitre 1. Le lycopène extrait est solubilisé dans l'huile d'amande douce de manière à avoir une concentration de 0,1 mg / µl d'huile. Une culture liquide de *M. smegmatis* est préparée dont la D.O est ajustée à 0,1. 900 µl de cette culture sont transférés dans chacun des tubes suivants :

- Tube 1 : contient le lycopène solubilisé dans 100 µl de l'huile d'amande. La concentration finale de lycopène est 0.01 mg/µl de l'huile.
- Tube 2 : contient 100 µl de l'huile d'amande douce (contrôle).
- Tube 3 : contient 100 µl de sauton liquide (contrôle).

100 µl de chaque tube sont étalés sur un milieu sauton agar, puis exposés à des radiations UV émises d'une lampe UV (tube de 6 W-254 nm ; Vilber Lourmat, français) située à une distance de 57 cm pendant différents temps (5, 10, 15 et 20 min).

4. Mise en évidence de l'effet protecteur d'une crème à base de lycopène vis-à-vis les radiations UV

4.1.Préparation de la crème

Une crème à 20 % de lycopène dans le beurre de karité est préparé puis testé sur des lapins pour ces propriétés protectrices contre les radiations ultraviolettes.

4.2.Traitement des lapins

12 lapins de même âge et de mêmes tailles sont achetés. Les lapins sont évalués pendant 7 jours en fonction du changement de poids et de tout signe de blessure avant le début de l'étude.

Les animaux sont logés dans des cages en plastique contenant de la sciure de bois. Les animaux sont divisés en quatre groupes différents, chacun contenant trois animaux. Initialement, la région dorsale des lapins est épilée avec une crème dépilatoire. Une lampe UV (tube de 6 W-254 nm ; Vilber Lourmat, Français) est utilisée comme source des radiations ultraviolettes. Les lapins sont maintenus dans une boite de retenu afin de limiter leur mobilité lorsqu'elles étaient exposées aux rayons UV. Le control négatif (groupe I) est exposé aux rayons UV mais il n'a pas reçu de traitement. Les animaux dans le groupe II sont traités par la crème à base de lycopène puis exposé aux rayons UV. Les animaux dans le groupe III, sont exposés aux rayons UV et puis ils ont reçu le lycopène (20%) comme traitement. Les lapins du groupe IV sont traités avec du beurre de karité seul puis exposé aux radiations UV. Les animaux sont exposés aux rayons UV pendant 7 jours consécutifs (15 minutes chaque jours).

4.3. Evaluation de l'effet protecteur vis-à-vis les radiations UV de la crème préparé par aspect visuel

L'effet protecteur de la crème contenant le lycopène contre les radiations ultraviolettes est évalué macroscopiquement en se basant sur les changements visuels de la zone exposée aux UV : degré de rougeur, degré des rides et sécheresse de la peau.

Le score visuel macroscopique de la peau est estimé selon une échelle de notation basée sur le modèle expérimental proposé par Bisset (Bisset *et al.*, 1987). La note « 0 » correspond à une peau normale (absence de rougeur, absence des rides et absence de sécheresse de la peau) et la note « 6 » à une peau gravement photo-endommagée (rougeur intense, rides profondes et permanents, et sécheresse intense de la peau).

5. Analyses statistiques

Le test statistique -t- de Student est utilisé pour comparer la résistance des souches au rayonnement UV.

I. Effets du lycopène sur la stabilité de l'huile de soja dans des conditions de chauffage à des températures de friture

1. Caractérisation de l'huile de friture

1.1. Evolution de la valeur de l'indice de peroxyde pendant le traitement thermique

L'indice de peroxyde évalue l'oxydation primaire des huiles et sa tendance à subir une réaction de rancissement. Les peroxydes résultent de la réaction entre les acides gras insaturés et l'oxygène. Une série de réactions sont enchaînées pour générer des substances volatiles responsables de l'odeur de rance. Des paramètres tels que les températures élevées, l'exposition à la lumière et des concentrations élevées en oxygène accélèrent ces réactions.

Les résultats de l'indice de peroxyde de l'huile avec et sans lycopène sont présentés à la Figure 27 :

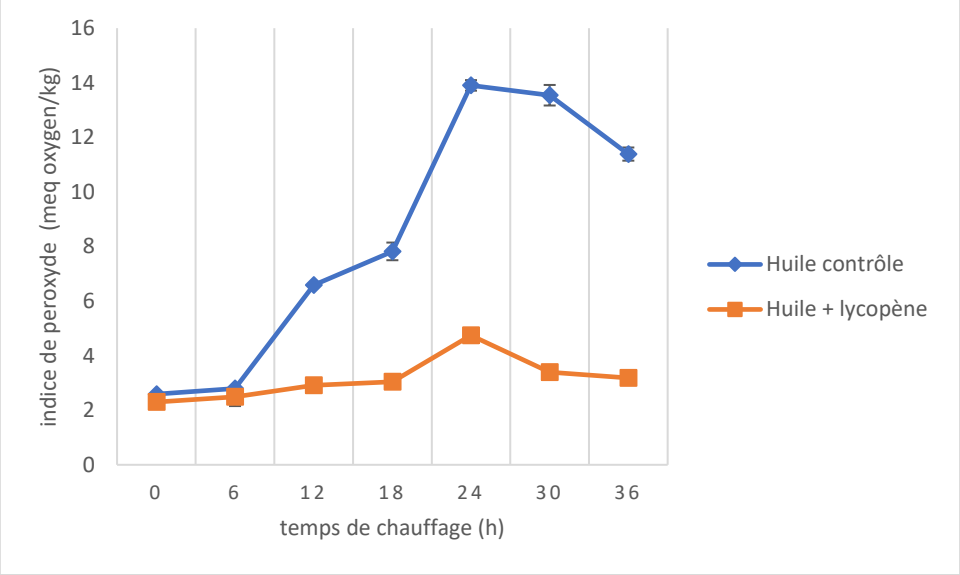

Figure 27 : Variation de l'indice de peroxyde au cours du chauffage de l'huile avec et sans lycopène

La valeur initiale de l'indice de peroxyde de l'huile mélangée avec le lycopène est de 2,30 méqoxygènes / kg, contre 2,59 méqoxygènes / kg pour l'huile sans lycopène, ce qui montre un effet de lycopène sur l'huile avant même de commencer le traitement thermique. Les valeurs maximales de l'indice de peroxyde pour le témoin et l'huile contenant le lycopène sont obtenu après 24 h de chauffage : 13,9 méqoxygènes / kg pour l'huile seul, contre seulement 4,74 méqoxygènes / kg pour l'huile addition de lycopène. Les résultats montrent également que l'IP

du contrôle augmente si rapidement qu'elle est multipliée par plus de 2,5 fois après 12 h. Ceci est dû à l'effet de la haute température qui accélère l'oxydation des acides gras polyinsaturés et la formation d'hydro peroxydes. Au-delà de 24 h du chauffage, l'IP du contrôle et du l'huile contenant le lycopène diminue pour atteindre 11.38 méqoxygènes / kg et 3.18 méqoxygènes / kg, respectivement. À la fin de l'expérience (après 36h de chauffage). L'addition de lycopène à l'huile de soja réduit l'IP de 65,89% après 36 h de chauffage par rapport au témoin.

1.2.Evolution de l'acidité durant le chauffage des huiles

L'acidité est un indicateur de la teneur en acides gras libres de l'huile. Il est considéré comme un paramètre important pour mesurer la qualité des huiles, en particulier lors de la friture (Waghmare *et al.,* 2018).

Dans la présente étude, nous avons suivi l'effet de la température de friture sur l'acidité de l'huile de soja en absence et en présence du lycopène. Les variations de l'acidité de l'huile au cours des expériences de chauffage sont illustrées dans la Figure 28 :

L'acidité initiale de l'huile est de 0,069% pour les deux huiles testées. Cette acidité augmente avec le temps de chauffage pour les deux huiles pour atteindre un maximum après 24 heures de chauffage : 0,167 % et 0,117% pour le témoin et l'huile contenant le lycopène, respectivement. Cette augmentation est significativement plus importante chez le témoin que chez l'huile test (α = 5%). Au-Delà de 24 h de chauffage, l'acidité diminue dans les deux échantillons pour atteindre 0.15 % pour le témoin, et 0.10 % pour l'huile contenant le lycopène. Ainsi, le chauffage a un effet plus prononcé sur l'huile témoin que sur l'huile additionnée de lycopène. Cela peut s'expliquer par la caractéristique antioxydante du lycopène qui rend l'huile plus résistante à l'hydrolyse des triglycérides.

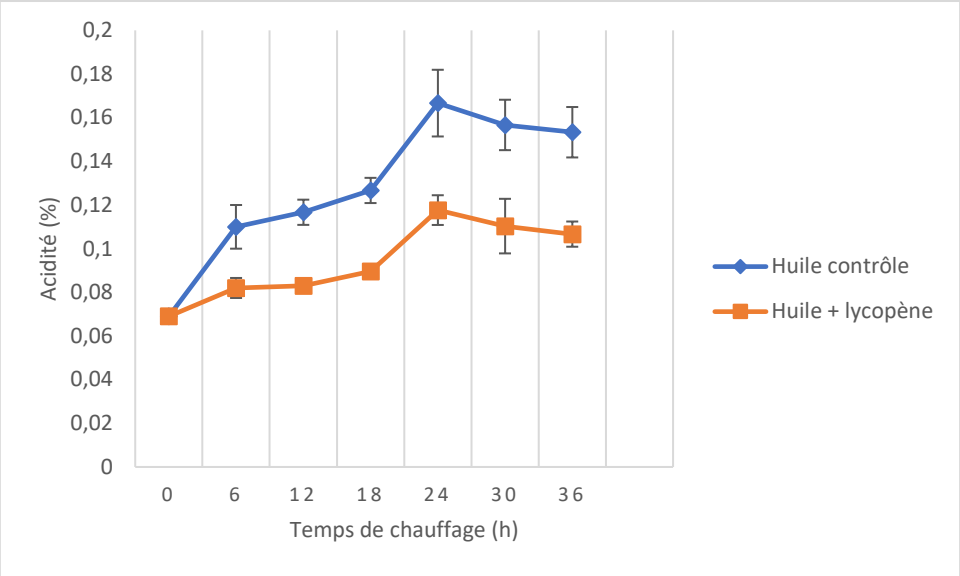

Figure 28 : Variation de l'acidité au cours du chauffage de l'huile de soja avec et sans lycopène.

2. Evaluation sensorielle des chips de pomme de terre

Le Tableau 5 montre l'effet du chauffage et du lycopène sur les propriétés sensorielles des chips au cours d'un test de friture pendant six jours. Il est évident d'après ce Tableau les pommes de terre frites dans l'huile contenant le lycopène ont les meilleures propriétés sensorielles en comparaison avec l'huile seule, même après la 12e friture, à l'exception de la couleur où aucune différence significative n'est détectée par rapport au témoin.

Tableau 5 : Résultats de l'analyse sensorielle des chips de pomme de terre préparés dans l'huile de soja avec et sans lycopène

Caractéristiques sensorielles	Nombre de friture	Contrôle	Huile avec lycopène
Odeur	1	5.58 ±0.21	5.51 ±0.33
	6	4.44 ±0.29	5.0 ±0.34
	12	3.78 ±0.32	4.68 ±0.26
Couleur	1	5.33 ±0.43	5.50 ±0.29
	6	4.58±0.56	4.41 ±0.16
	12	3.00 ±0.49	3.01 ±0.44
Croustillant	1	6.41± 0.15	6.70± 0.19
	6	5.01± 0.36	6.67± 0.26
	12	4.16± 0.46	6.5± 0.29
Goût	1	6.18± 0.19	6.25± 0.38
	6	5.45± 0.17	6.23± 0.14
	12	5.25± 0.45	6.11± 0.31

D'après les résultats du Tableau 5, à l'exception de la couleur, tous les autres paramètres testés montrent un effet positif du lycopène. En effet, le score du paramètre "odeur" des chips frites dans l'huile témoin a significativement diminué : il est passé de 5,58 le 1er jour à 3,78 le 6éme jour, tandis que pour les chips frites dans de l'huile contenant le lycopène, les valeurs ont varié de 5,51 à 4,68 pour la même période, cette variation est non significative. Le même effet du lycopène est remarqué pour le paramètre du 'croustillant'' dont le score a enregistré une diminution significative de 2.25 pour le témoin, et une variation non significative de 0.2 pour l'huile contenant le lycopène entre le 1er et le 6éme jours. Le score du 'goût'' est diminué de -0.14 pour l'huile contenant le lycopène, et de 0.93 pour le témoin, ces deux différences sont non significatives, mais une légère préférence est enregistrée pour les frites du l'huile contenant le lycopène. Pour le paramètre 'couleur'', le score a diminué significativement pour les deux échantillons testés, et aucune altération de la couleur n'est observée en présence de lycopène par rapport au témoin.

II. Evaluation d'une crème à base de lycopène contre les UV

1. Effet du lycopène *in vivo* vis-à-vis les radiations UV

Pour évaluer l'activité antioxydante du lycopène contre les UV *in vivo*, *M. smegmatis* transformé par le plasmide pC51 est exposée à la lumière ultraviolette.

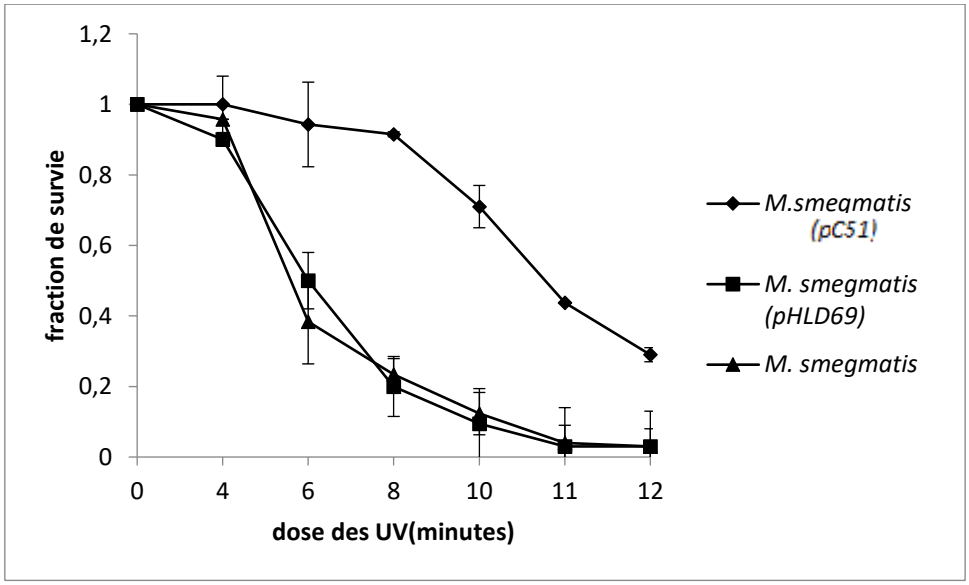

Figure 29 : Sensibilité de diverses souches de *M. smegmatis* aux rayons UV

Les résultats de la Figure 29 montrent qu'à une distance de 57 cm, les cellules de *M. smegmatis* transformées par le plasmide pC51 sont plus résistantes aux rayons UV que les témoins (*M. smegmatis* et *M. smegmatis* contenant pHLD69) :

Pour les deux témoins, nous avons noté qu'il n'y a pas une différence dans le comportement des deux souches vis-à-vis les radiations UV, les fractions de survie diminue rapidement pour atteindre une valeur minimale de 0.03 après 12 min d'exposition aux UV.

Pour la souche *M. smegmatis* transformée par le plasmide pC51, nous avons remarqué une faible variation de la fraction de survie pendant les huit premières minutes d'exposition aux UV. Après, la fraction de survie diminue mais avec une vitesse beaucoup plus faible que les témoins, et atteint 0.29 vers la fin de l'expérience.

Le test statistique montre également que les différences observées entre *M. smegmatis* contenant le plasmide pC51 et les témoins en termes de fraction de survie sont significatives.

En conclusion, le lycopène peut réduire de manière significative l'action létale du rayonnement UV, ce qui pourrait contribuer à protéger les cellules *in vivo* des rayons ultraviolets.

2. Effet du lycopène *in vitro* vis-à-vis les radiations UV

Pour évaluer l'activité antioxydante du lycopène contre les UV *in vitro*, *M. smegmatis* recouvert d'une couche de lycopène est exposée à la lumière ultraviolette.

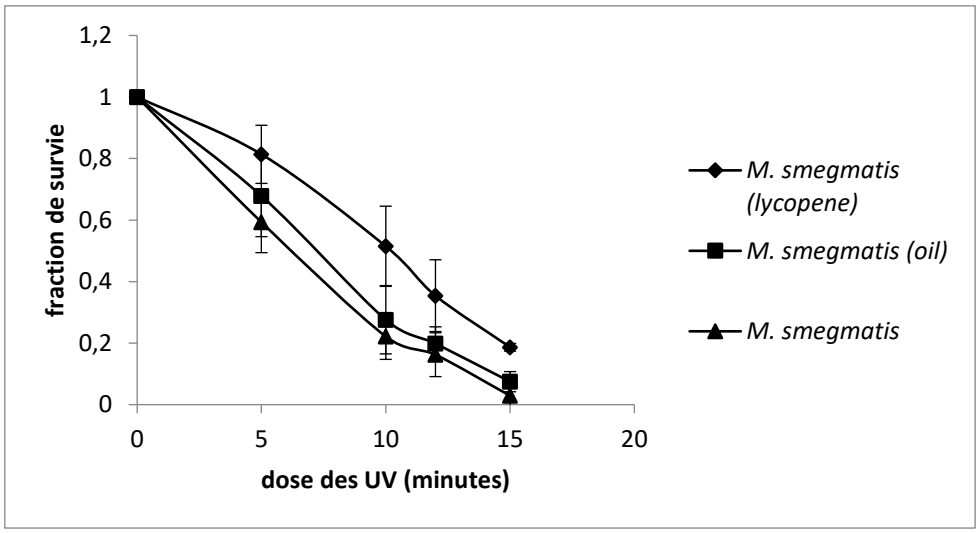

Figure 30 : Effet protecteur du lycopène *in vitro* contre les rayons UV

Les résultats de la Figure 30 montrent que les cellules de *M. smegmatis* recouvertes de lycopène (0,01 mg/µl) sont plus résistantes aux UV que celles non revêtues ou celles uniquement revêtues d'huile

Pour les deux souche témoins, aucune différence significative n'est enregistrée, les fractions de survie diminuent rapidement pour atteindre une valeur minimale de 0.029 après 15 min d'exposition. Par contre, *M. smegmatis* recouverte de lycopène, résiste statistiquement mieux aux rayons UV et atteint une valeur minimale de 0.18 en termes de fraction de survie. Ce qui montre que le lycopène joue un rôle de barrière qui protègent les cellules de *M. smegmatis* contre les UV.

3. Mise en évidence de l'effet protecteur d'une crème à base de lycopène vis-à-vis les radiations UV

Les résultats obtenus dans la Figure 28 montrent que les deux groupes témoins (groupe I et III) sont plus susceptibles aux radiations UV, et développent une sècheresse, des rides et des rougeurs importants par rapport aux animaux traités avec le lycopène (groupe II et III). D'après les résultats obtenus, aucune différence significative n'est observée entre les deux groupes traités avec le lycopène. La Figure montre aussi que le beurre de karité offre une certaine protection contre les UV, mais cette protection est significativement plus faible que celle offerte par le lycopène : le score visuel est comparativement plus important chez les animaux traités au beurre de karité seul (Figure 31, 32).

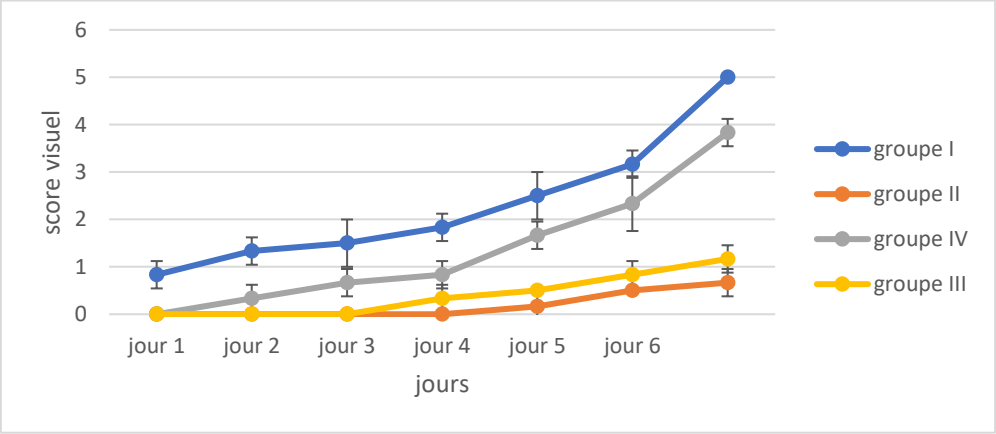

Figure 31 : Changements macroscopiques et résultats du score visuel pour les différents traitements. Groupe I : groupe non traité ; groupe II : groupe traité avec le lycopène avant exposition ; groupe III : groupe traité avec le lycopène après exposition ; groupe IV : groupe traité avec le beurre de karité seul.

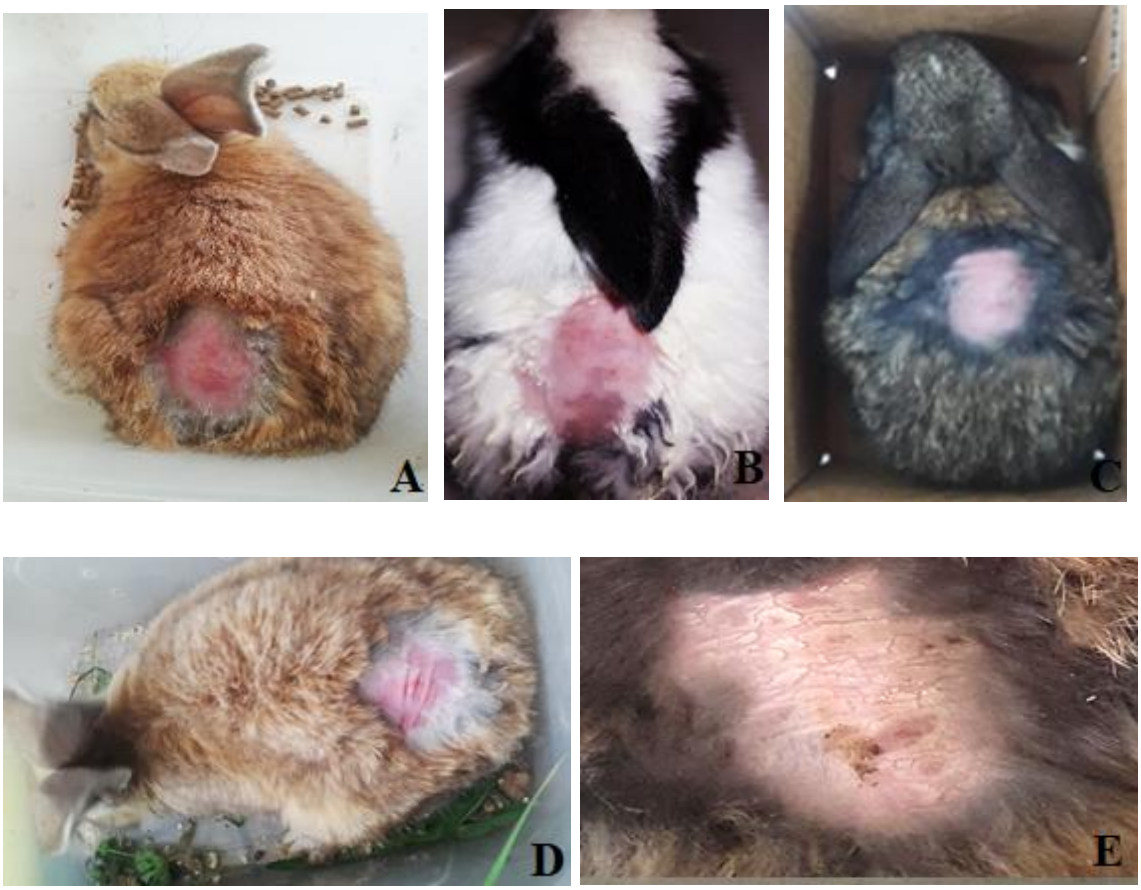

Figure 32 : Lésions visuelles de la peau (rougeur, rides et dessèchement) induites par les rayons UV ; A : lapin non traité (rougeur de la peau) ; B : lapin traité avec le beurre de karité (rougeur mais l'effet est moins important que dans A) ; C : lapin traité avec le lycopène (absence de lésions) ; D : Lapin non traité (formation de rides) ; E : Lapin non traité (sécheresse de la peau).

La mesure de l'indice de peroxyde est la méthode la plus couramment utilisée pour évaluer l'oxydation primaire des huiles. Les huiles dont l'indice de peroxyde est supérieur à 10 méq / kg sont considérées comme des huiles rances et ne doivent donc pas être utilisées dans les préparations alimentaires (Sulieman *et al.,* 2006). Dans la première partie de cette étude, les tests de chauffage sont effectués en cycles discontinus pendant 6 jours (2 cycles par jour : un le matin et l'autre le soir), le cycle discontinu est choisi car le chauffage intermittent des graisses insaturées est plus destructeur que le chauffage continu (Frankel, 2005).

Selon la Figure 27 et la Figure 28, les valeurs de l'indice de peroxyde et de l'acidité de l'huile témoin sont significativement élevées pendant les premiers 24 h de chauffage par rapport à l'huile de soja contenant le lycopène.

Au cours du processus de friture, une série des réactions chimiques sont générées telles que : les réactions d'oxydation, d'hydrolyse et de polymérisation. Les hydroperoxydes sont les principaux produits de l'oxydation des lipides. Ils ont un effet négatif sur la durée de conservation des produits riches en matières grasses (Kaleem *et al.,* 2015). En effet, L'augmentation de l'indice de peroxyde observée dans ce travail pourrait être dû à l'oxydation des acides gras polyinsaturés par l'effet de la haute température, et à la formation des hydroperoxydes (Li *et al.,* 2019b). Cependant, l'augmentation de l'acidité est le résultat des oxydations secondaires. Ainsi, les hydroperoxydes sont décomposés en : alcool, aldéhydes, cétones et composés cycliques (Damanik et Murkovic, 2019). Ces produits altèrent la qualité fonctionnelle, sensorielle et nutritionnelle des huiles (Damanik et Murkovic, 2019). Puisque l'hydrolyse de l'huile, provoquée par l'effet de l'eau des aliments pendant la friture, est un processus qui ne se produit pas dans notre étude car le chauffage est effectué en l'absence des aliments, la forte acidité de l'huile de soja est due principalement à la dégradation des produits d'oxydation secondaires formés lors du chauffage , et à la présence d'oxygène et d'humidité principalement apportée par l'air (Chammem *et al.,* 2015).

Dans le cas de l'huile contenant le lycopène, les résultats ont montré un effet faible de la température sur les propriétés de l'huile, car le lycopène agit comme un antioxydant contre la formation des hydroperoxydes.

Ces résultats sont en accord avec les données publiées par Montesano et *al*. (2006) qui ont indiqué que l'ajout de lycopène, à une concentration comprise entre 0,5 et 1 mg / 100 ml à l'huile d'olive extra vierge, a amélioré la stabilité de l'huile pendant le stockage. Ils ont ainsi

montré que l'indice de peroxyde était significativement plus élevé dans l'échantillon témoin par rapport aux huiles contenant le lycopène (Montesano *et al.,* 2006). Nos résultats sont également parfaitement compatibles avec les résultats obtenus par Kaur et *al*. (2011) qui ont mis en évidence l'effet positif du lycopène (20 ppm) sur le beurre en maintenant la stabilité de son acidité et son indice de peroxyde pendant le stockage (Kaur *et al.,* 2011).

Cependant, au-delà de 24 h (Figures 27 et 28), il semble que les valeurs de l'indice de peroxyde et de l'acidité de l'huile de soja avec et sans lycopène ont diminué en fonction du temps de chauffage. La diminution des valeurs de l'IP à la fin de la période de chauffage peut être expliquée par la décomposition des hydroperoxydes qui sont instables dans les conditions de friture en produits secondaires tels que des composés carbonyle et aldéhydiques (Abdulkarim *et al.,* 2007). Cependant, la diminution de l'acidité peut être due à l'évaporation des acides gras libres volatils sous l'effet du chauffage. Selon Ndjouenkeu et Ngassoum, (2002), la polymérisation des acides gras au cours du chauffage peut également être responsable de cette diminution en bloquant les groupes fonctionnels libres des acides (Ndjouenkeu et Ngassoum, 2002). Plusieurs études sont menées sur la stabilité de l'huile de soja en utilisant différents additifs naturels et dans des conditions de friture, notamment l'extrait de romarin (Lalas et Dourtoglou, 2003 ; Ramalho et Jorge, 2008 ; Saoudi *et al.,* 2016). Cependant, au meilleur de nos connaissances, cette étude est la première étude qui discute l'effet de lycopène sur la stabilité de l'huile de soja.

Dans cette enquête, en étudiant l'effet du processus de friture sur les propriétés organoleptiques (à savoir : l'odeur, la couleur, le croustillant et le goût) des aliments, nous avons démontré que cette technique a affecté négativement les qualités sensorielles des chips de pommes de terre. Cela est principalement dû à la production de certains produits chimiques après l'oxydation des lipides, surtout les acides gras libres qui sont à l'origine des effets néfastes sur la solubilité des protéines, des arômes désagréables, de la décoloration, de la dégradation de la texture et d'une oxydation plus rapide des lipides (Hu et Jacobsen, 2016). Lorsque les produits chimiques obtenus s'accumulent dans l'huile de friture, le transfert de chaleur entre l'huile et les aliments est réduit, ce qui entraîne une absorption plus importante de l'huile (Paul et Mitta, 1996).

Les meilleures propriétés organoleptiques (l'odeur, le croustillant et le goût) sont obtenues lorsque les chips sont frites dans l'huile supplémentée de lycopène. Cela peut s'expliquer par la capacité du lycopène à améliorer la stabilité de l'huile en empêchant ou au moins en ralentissant

l'oxydation des lipides. Ces résultats sont cohérents avec les résultats de la littérature. En effet, Calvo et *al*. (2008) ont montré que l'ajout du lycopène de la tomate sur les saucisses fermentées a permis d'obtenir un produit enrichi en lycopène de bonnes propriétés sensorielles et texturales. Siwach *et al.,* (2016) ont conclu que L'incorporation de lycopène dans le ghee de vache, a significativement réduit le développement de la rancidité et a amélioré les propriétés sensorielles par rapport au témoin. Le même effet du lycopène est rapporté par Tarón-Dunoyer *et al.,* (2018), qui ont remarqué que l'incorporation de lycopène dans le beurre a considérablement réduit le développement de la rancidité, et a conservé les propriétées organoleptiques (sauf la couleur : l'ajout de lycopène avait une incidence sur la couleur du beurre) par rapport aux échantillons témoins. Donc le lycopène avait un grand potentiel d'utilisation en tant qu'antioxydant pour prolonger la durée de conservation de l'huile et des aliments riches en lipides.

Les résultats obtenus dans la deuxième partie de ce chapitre ont montré que le lycopène a pu réduire de manière significative l'action létale de la lumière ultraviolette contre *M. smegmatis in vivo* et *in vitro* (Figures 29 et 30). Ces résultats sont en accord avec les données publiées par Houssaini-Iraqui *et al.,* 2001 et Srinivasan *et al.,* 2014 de l'effet protecteur de lycopène contre les rayons UV (Houssaini-Iraqui *et al.,* 2001 ; Srinivasan *et al.,* 2014).

Les rayons UV agissent indirectement sur les constituants cellulaires, en formant les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Shore, 2001). Ces derniers peuvent potentiellement endommager des composants cellulaires tels que : les acides nucléiques, les protéines, les lipides et les polysaccharides (Won *et al.,* 2015). Cela conduit dans la plupart des cas à des modifications irréversibles (Butnariu et Giuchici, 2011). Les ROS sont donc des acteurs importants dans l'étiologie des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, le cancer et les maladies cardiovasculaires (Bhat *et al.,* 2015 ; Mei *et al.,* 2015). Le lycopène, par ses caractéristiques et ses propriétés antioxydantes, offre la possibilité de réduire les dommages oxydatifs en raison de sa forte activité antioxydante. La présence d'un nombre important de diènes conjugués dans sa structure est responsable de la forte activité antioxydante du lycopène (qui est deux fois supérieure à celle du β-carotène et dix fois supérieure à celle de l'α-tocophérol (Di Mascio *et al.,* 1989)) et à sa capacité de piégeage des radicaux libres (Martínez et Melendez-Martínez, 2016). Le lycopène peut aussi contribuer efficacement à prévenir une gamme de dommages oxydatifs, de toxicité et de certaines maladies

chroniques telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et les maladies dégénératives (Arab et Steck, 2000 ; Lee et Foo, 2013 ; Srinivasan *et al.*, 2014 ; Prema *et al.*, 2015).

Il est démontré que les UV provoquent un vieillissement prématuré de la peau (photovieillissement), caractérisé par une pigmentation de la peau, l'apparition des rides et d'érythéme, immunosuppression et cancer de la peau à long terme (Park *et al.*, 2018).

Le lycopène, un agent bien connu pour ces activités antioxydantes et anti-inflammatoires, peut constituer un produit thérapeutique naturel, efficace et prometteur pour protéger la peau contre les rayons UV. Dans cette étude, une crème à base de lycopène est testée pour sa capacité à protéger la peau des lapins contre les rayons UV. Les lésions visuelles de la peau telles que la sévérité des rides, la rougeur et la sécheresse de la peau sont évaluées après l'exposition des lapins aux UV. Les résultats obtenus montrent que l'exposition chronique de la peau aux rayons UV a entraîné la formation des rides, l'apparition de la rougeur et la sécheresse de la peau. Ces données sont cohérentes avec des rapports précédents : Zhang *et al.,* ont observé les mêmes signes sur des souris exposées aux UV (Zhang *et al.,* 2015), une autre étude a rapporté que les UV induisent le vieillissement prématuré de la peau chez la souris (Wang, X. *et al.*, 2016). L'apparition des rides peut être expliquée par la diminution de collagène responsable de l'élasticité de la peau suite à l'exposition aux UV. Un grand nombre d'études suggèrent que les UV provoquent des altérations de la composition, de l'organisation et de la structure du collagène dans le derme de la peau, et l'apparition de l'aspect vieux et ridé. La rougeur qui apparait après l'exposition aux UV est le résultat de la génération des interleukines et d'autres médiateurs inflammatoires (Shah et Mahajan, 2014).

Notre étude a montré que le traitement par le lycopène inhibe la formation des rides, l'apparition des rougeurs et la sècheresse de la peau (Figure 31 et 32). L'effet photoprotecteur de lycopène est donc due, en plus de son activité antioxydante, à son activité anti-inflammatoire significative qui inhibent la production excessive de cytokines inflammatoires par les UV, et diminue donc l'apparitions des érythèmes et de la rougeur de la peau (Zhang *et al.*, 2015).

Plusieurs donnés bibliographiques ont prouvé que les caroténoïdes sont présents dans la peau humaine, et protègent contre les réactions photo-oxydantes et peuvent être utiles dans la prévention des maladies liées au stress photo-oxydant (Stahl *et al.*, 2000 ; Aust, *et al.*, 2005). Les études ont montré que, le lycopène est plus efficace que les autres caroténoïdes et permet d'atténuer de façon notable la survenue de l'érythème solaire : Stahl et *al.* (2001) ont démontré

que la consommation de tomate, dont le lycopène est le caroténoïde prédominant, entraîne une augmentation des taux sériques de lycopène et une protection contre les UV (Stahl *et al.*, 2001). Grether-Beck *et al.*, 2017 ont démontré également que la supplémentation avec le lycopène protège la peau humaine des radiations UV (Grether-Beck *et al.*, 2017).

Enfin, il est bien connu que de nombreux écrans solaires contiennent des substances qui ont un effet toxique sur la santé de la peau. Les recherches récentes visent l'utilisation des antioxydants naturels dans les écrans solaires comme les extraits des plantes (Priyanka *et al.*, 2018). Les résultats obtenus dans cette étude ont mis en évidence l'effet protecteur du lycopène contre les dommages dus aux UV. Par conséquent, il serait important de préparer un écran solaire commercial à base de lycopène pour maintenir une peau saine du consommateur.

Le lycopène, grâce à ces activité antioxydantes très intéressantes, peut être exploité dans différents domaines comme agent protecteur et antioxydant. Dans ce chapitre nous avons pensé à deux applications biotechnologiques du lycopène :

Dans la première partie de ce chapitre, nous rapportons la stabilisation de l'huile de soja au cours du traitement thermique par le lycopène en tant qu'antioxydant naturel et en évaluant son effet sur la qualité sensorielle des chips de pomme de terre frites. Pour cela, l'huile de soja contenant 50 mg/l de lycopène et le témoin (huile sans lycopène) sont chauffés à 180 ° C pendant 36 heures. Les échantillons sont analysés toutes les 6 h pour leur teneur en peroxyde et leur acidité. Les résultats obtenus ont montré une différence significative dans la qualité des huiles : l'addition de lycopène dans l'huile de soja réduit la teneur en peroxyde et l'acidité respectivement de 65,89% et 29,39% après 36 h de chauffage par rapport au témoin. Pour les résultats de l'évaluation sensorielle, les meilleures propriétés sont observées lors de la friture des chips de pommes de terre dans l'huile contenant le lycopène. En conclusion, le lycopène améliore la stabilité de l'huile de soja et peut donc être utilisé comme conservateur naturel dans l'industrie alimentaire, en particulier pour les produits gras tels que les huiles végétales.

La deuxième partie de ce chapitre discute le rôle protecteur du lycopène vis-à-vis les rayons UV. Dans un premier temps, nous avons montré que le lycopène protègent les cellules de *M. smegmatis in vivo* et *in vitro* contre les effets néfastes des UV. Dans un deuxième temps, nous avons élaboré une crème à base de lycopène. Cette crème est testée sur des lapins afin d'évaluer son efficacité à protéger la peau contre les rayons UV. Les résultats obtenus ont montré que le lycopène peut protéger la peau contre les UV, et donc peut être utilisé dans le domaine cosmétique comme produit naturel dans des écrans solaires par exemple.

Chapitre 3 : Effet de l'extrait des feuilles de l'olivier (*Olea europaea*) contre *M. smegmatis* et *M. aurum*

L'émergence du VIH (virus de l'immunodéficience humaine) et le développement des souches multirésistantes et ultrarésistantes de *M. tuberculosis*, sont les principaux facteurs responsables de l'incidence croissante de la tuberculose (Bhunu *et al.,* 2017). En outre, le traitement de la tuberculose nécessite une longue chimiothérapie de 6 à 9 mois avec l'association de plusieurs antibiotiques, notamment : l'isoniazide, le pyrazinamide, la rifampicine et l'éthambutol (Islam *et al.,* 2012).

Outre la tuberculose, des mycobactéries non pathogènes appelées mycobactéries atypiques, telles que *M. avium, M. intracellulare*, et *M. abscessus* (Zhang *et al.,* 2017) peuvent développer une vaste gamme d'infections opportunistes.

De nouveaux médicaments antimicrobiens sûrs et efficaces sont aujourd'hui nécessaires pour réduire l'apparition de la tuberculose. Les plantes représentent une source de principes actifs dont l'usage traditionnel et médical est connu depuis longtemps (Liu *et al.,* 2017). Au niveau mondial, on estime que près de 70000 espèces sont utilisées dans la médecine traditionnelle. L'OMS rapporte plus de 21000 taxons végétaux utilisés pour des buts médicinaux (Bhar et Balouk, 2011).

Par sa situation géographique particulière, le Maroc constitue un climat et un cadre favorable permettant une végétation riche et diverse. Le Maroc occupe ainsi la première place parmi les pays du Sud de la Méditerranée pour sa richesse en plantes endémiques. On compte 800 espèces potentiellement exploitables de Plantes Aromatiques et Médicinales (Bhar et Balouk, 2011). De nos jours, les plantes médicinales attirent de plus en plus l'attention sur leur potentiel antituberculeux et plusieurs études sont publiées dans ce sens (Haouat *et al.,* 2013 et 2014 ; Diop *et al.,* 2018 ; Gupta *et al.,* 2018).

L'olivier (*Olea europaea*), arbre de la famille des oléacées, cultivé surtout dans le bassin méditerranéen depuis au moins 3500 ans avant notre ère. Il était dans l'antiquité grecque et romaine, un emblème de fécondité et un symbole de paix et de gloire. Le nom scientifique de l'arbre "Olea" vient d'un mot qui signifiait "huile" chez les grecques de l'antiquité. L'olivier est une culture méditerranéenne par excellence, et le Maroc compte parmi les grands pays producteurs d'olive. Les feuilles de l'olivier, qui représentent pendant la récolte environ 10% du poids total des olives, sont considérées comme un sous-produit pouvant être utilisé comme source de composés bioactifs de grande valeur en raison de leurs potentiels antioxydants et bioactifs supérieurs à ceux des autres parties de l'arbre (Herrero *et al.,* 2011).

Plusieurs études prouvent que les feuilles de l'olivier sont un outil médical puissant en raison de leurs effets bénéfiques sur la santé humaine, elles ont des propriétés antioxydantes, antihypertensives, anti-inflammatoires, hypocholestérolémiantes, hypoglycémiantes et cardioprotectrices (Özcan et Matthäus, 2017). En médecine traditionnelle, la feuille de l'olivier est connue pour ses activités biologiques variées, notamment pour leur action hypotensive, et elle est infusée afin de stabiliser la glycémie et de contrôler le diabète (Özcan et Matthäus, 2017). La forme sauvage d'*Olea europea* est employée dans le traitement traditionnel du diabète et d'hypertension au sud-est du Maroc, où les feuilles sont utilisées sous forme d'une décoction (Tahraoui *et al.*, 2007).

Certains composés identifiés dans les extraits de feuilles, tels que les composés phénoliques sont doués d'activités biologiques extrêmement importantes. Ils possèdent des propriétés pharmacologiques, ils ont des effets anti-inflammatoires, hépatoprotecteur, antitumoral, antiviral, antiVIH, antimicrobien, antifongique, antidiabétique, gastroprotecteur et antihyperlipidémique. Ils ne sont pas toxiques et sont utilisés dans les produits cosmétiques et médicaux (Vogel *et al.*, 2015).

Les propriétés antivirales, antibactériennes, et antifongiques des feuilles de l'olivier contre un nombre important de micro-organismes sont clairement démontrées (Özcan et Matthäus, 2017), mais l'effet antimycobactérien des feuilles d'olivier n'est pas encore exploré, l'objet de cette étude est d'étudier l'activité antimycobactérienne des extraits des feuilles de l'olivier contre la croissance de *M. smegmatis et M. aurum.* En plus ; des analyse chromatographiques et phytochimiques sont réalisées dans le but d'identifier les produits chimiques responsables de l'activité antimycobactérienne.

I. Souches et milieu de croissance

M. smegmatis MC_2-155 et *M. aurum* A^+, deux souches de laboratoire, sont utilisées dans cette étude. Ce sont des mycobactéries non infectantes à croissance rapide et leur inhibition permet de prédire fortement l'activité contre *M. tuberculosis* (Reyrat et Kahn, 2001).

Les souches sont maintenues dans le milieu sauton (Annexe 1) à 37 ° C (Papa *et al.*, 1987). Le milieu Mueller Hinton agar (Annexe 1) est utilisé pour tester l'activité antimycobactérienne de l'extrait des feuilles de l'olivier par la méthode de diffusion sur disque. Le milieu LB est utilisé pour tester l'activité antimycobactérienne de l'extrait des feuilles de l'olivier en milieu liquide.

II. Matériel végétal

La plante utilisée dans ce travail est l'olivier (*Olea europaea*). La partie de la plante utilisée correspond aux feuilles (Annexe 3).

Des feuilles fraîches de l'olivier, sont cueillies pendant le mois de décembre 2016 dans la plaine du Saïs à la région de *Fès-Boulemane* à une altitude de 370 m du niveau de la mer. La collecte des feuilles est effectuée le matin, juste après évaporation de la rosée.

1. Préparation des feuilles

Après leur récolte, les feuilles sont transportées au laboratoire, puis intensément triées et nettoyées, puis elles sont utilisées soit directement à l'état frais, ou après séchage à l'air libre et à l'abri de la lumière pendant 21 jours.

Les feuilles sèches sont broyées en poudre et les feuilles fraîches sont découpées en morceaux très fins.

2. Préparation des extraits

Différents extraits sont préparés par décoction ou macération, à raison de 15 g de feuilles pour 50 ml d'eau ou de solvant :

Décoction : les feuilles mélangées à l'eau sont portées à ébullition pendant quinze minutes, puis l'extrait est filtré sur papier Wattman ;

Macération : les feuilles sont broyées par ultra turrax, puis macérées 24 heures dans un solvant (acétate d'éthyle, éthanol ou méthanol) à l'ombre et sous agitation. Après filtration sur papier Wattman, le solvant est évaporé à sec et sous vide au rotavapor à 37°C. L'extrait est ensuite repris soit dans l'eau distillée stérile ou dans le solvant de macération.

Ces différentes extractions ont permis d'obtenir 5 extraits (extrait aqueux, extrait éthanolique, extrait méthanolique, extrait d'acétate d'éthyle repris dans l'acétate d'éthyle et extrait d'acétate d'éthyle repris dans l'eau) qui sont récupérés dans des tubes stériles, puis conservés à 4° C jusqu'à l'évaluation de leurs activités antimycobactériennes.

III. Evaluation des extraits contre *M. smegmatis* et *M. aurum*

1. Incorporation de l'extrait aqueux dans le milieu gélosé

Afin de mettre en évidence l'activité antimycobactérienne des feuilles d'olivier, l'extrait aqueux des feuilles fraîches est incorporé dans le milieu de culture Sauton, à une concentration finale de 150 mg/ml.

Des aliquotes de 100 µl des cultures mycobactériennes (*M. smegmatis et M. aurum*), sont ensuite étalées sur les milieux préparés. Les titres de ces cultures sont d'environ 10^6 UFC/ml. Le témoin correspond au milieu de culture dépourvu de l'extrait. Toutes les boites sont incubées à 37°C. La lecture des résultats est réalisée quotidiennement durant six jours. Cette expérience est répétée trois fois.

2. Evaluation de l'effet antimycobactérien par la méthode de disque

L'activité antimycobactérienne des différents extraits est mesurée par la méthode de disque. Elle s'agit d'une méthode qualitative qui permet d'identifier l'existence ou non d'une éventuelle propriété antibiotique (Gautam *et al.,* 2007). 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 est utilisée pour :

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

Pour cela, des disques stériles de papier Wattman de 6 mm de diamètre sont déposés sur le milieu Mueller Hinton agar (Annexe 1), préalablement ensemencé par des aliquotes de 100 µl de culture de *M. smegmatis*. Le titre de cette culture est d'environ 10^6 UFC/ml.

Les disques sont ensuite imbibés de volumes variables des extraits, allant de 5 µl à 40 µl. Les témoins correspondent à des disques imbibés par de l'eau distillée stérile ou l'un des solvants de macération (acétate d'éthyle, éthanol et méthanol).

Toutes les boites sont incubées à 37°C pendant trois jours. Après cette incubation, les zones d'inhibition formées autour des disques sont mesurées. Les expériences sont répétées trois fois.

3. Evaluation de l'activité antimycobactérienne en milieu liquide

Afin d'évaluer l'efficacité de l'extrait des feuilles de l'olivier en milieu liquide, un extrait d'acétate d'éthyle est préparé comme décrit auparavant puis évaporé dans le rotavapor, le résidu est repris dans 1 ml du milieu LB liquide, cet extrait est ajouté dans un tube contenant 3 ml d'une suspension de *M. smegmatis* dont l'absorbance à 600 nm est de 0,3.

Le témoin négatif correspond à un tube dépourvu de l'extrait, alors que le témoin positif correspond à un tube contenant l'extrait de l'ail (cet extrait est préparé en broyant 3 g d'ail dans 1 ml du milieu LB), cet extrait est ajouté dans un tube contenant 3 ml d'une suspension de *M. smegmatis* dont l'absorbance à 600 nm est de 0,3.

Les tubes sont incubés à 37°C avec agitation pendant trois jours. Au terme de cette durée, 100 µl de chaque tube sont ensemencés sur le milieu LB-agar.

Les boites, ainsi préparées, sont incubées à 37°C. La lecture des résultats est réalisée quotidiennement durant six jours. Cette expérience est répétée trois fois.

4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB)

Pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) des extraits étudiés, nous avons adopté la technique de microdilution sur microplaques de polypropylène à 96 puits et ceci en utilisant la résazurine comme indicateur de viabilité (Bouhdid *et al.*, 2009). Les cellules viables réduisent la résazurine (colorant bleu) en résorufine (rose fluorescent).

Dans un premier temps, on distribue un même volume de milieu sauton liquide (100 µl) dans 10 puits de la microplaque, puis on ajoute dans le premier puits 100 µl de l'extrait, préparé à une concentration de 100 mg de MS/ml. Dans un deuxième temps on procède à une dilution de l'extrait de façon à obtenir des concentrations décroissantes selon une progression géométrique de raison 2. Pour cela, on prélève 100 µl du contenu du puits 1 et on le transfert dans le puits 2 et on procède ainsi jusqu'à le 10ème puits (100 µl de ce puits sont éliminés). Les concentrations des extraits appartiennent à l'intervalle 0,024 - 50 mg/ml. Chacun des 10 puits est ensuite ensemencé avec 100 µl de la culture de *M. smegmatis* ou *M. aurum* (0.5 McFarland).

Le témoin de croissance correspond à un puits contenant 100 µl du milieu sauton et 100 µl de la culture (*M. smegmatis* ou *M. aurum*). La microplaque est incubée à 37°C pendant 72 h.

A la fin de la période d'incubation, 5 µl de la résazurine est rajouté dans chaque puits, puis la plaque est réincubée à 37°C pendant 2 h. Le virage de la coloration du bleue au rose indique une croissance bactérienne.

La CMI correspond à la plus faible concentration de l'extrait à laquelle on n'observe pas de croissance visible (absence de coloration rose). La coloration rose est due à la réduction de la résazurine en résofurine par les bactéries vivantes (Bouhdid *et al.,* 2009).

Pour déterminer la valeur de la concentration minimale bactéricide (CMB), des aliquotes de 10 µl sont prélevés à partir des puits dont la croissance microbienne n'est pas observée, puis ils sont étalés sur milieu Sauton Agar. Les boites de Pétri, ainsi préparées, sont incubées pendant 3 jours à 37°C. La CMB est définie comme la plus faible concentration pour laquelle aucune croissance n'est obtenue (Bouhdid *et al.,* 2009). Les expériences d'évaluation de la CMI et de la CMB sont répétées trois fois.

IV. Etude de l'effet de l'extrait sur la paroi des mycobactéries

Les substances antimicrobiennes peuvent agir au niveau de la paroi, de la transcription, de la traduction ou des voies métaboliques. Plusieurs travaux montrent que les substances antimicrobiennes agissant au niveau de la paroi sont capables d'extraire les acides nucléiques (ADN et/ou ARN) (Hassi *et al.,* 2007). Ainsi, le but de cette expérience est de tester la capacité de l'extrait des feuilles de l'olivier à extraire l'ADN et l'ARN de *M. smegmatis.*

1. Extraction de l'ADN

Le protocole d'extraction est le suivant (Hassi *et al.,* 2007) :

360 µl de l'extrait d'acétate d'éthyle repris dans l'eau sont additionnés au culot bactérien obtenu après centrifugation de 1 ml d'une culture de *M. smegmatis* en phase de croissance ($D.O_{600nm}$ = 0,4). Ce mélange est incubé à 37°C pendant 3 h. Après centrifugation, le surnageant est récupéré puis additionné avec 40 µl de NaCl 5M et 800 µl de l'éthanol absolu froid ; l'ensemble est incubé à -20°C pendant 30 min.

Le culot d'acides nucléiques est récupéré après centrifugation à 10000 rpm pendant 20 min, puis lavé par l'éthanol 70%. Le culot est séché pendant 15 min à température ambiante puis récupéré dans 20 µl d'eau distillée stérile.

Deux témoins sont utilisés pour cette étude : un témoin positif qui correspond à l'extrait éthanolique de thym et un témoin négatif dans lequel l'extrait est remplacé par l'eau distillée stérile. Le même protocole d'extraction est utilisé pour ces témoins. Cette expérience est répétée trois fois.

2. Electrophorèse sur gel d'agarose

Une solution d'agarose à 1%, préparée dans du TAE 1X (Annexe 2), est chauffée jusqu'à dissolution complète puis refroidie à 50°C, 2 µl de bromure d'éthidium BET (1mg/ml) sont ensuite ajoutés au mélange. Ce colorant, fluorescent sous UV, possède la propriété de s'intercaler entre les paires de base des acides nucléiques.

La solution d'agarose est coulée dans un moule monté sur cassette munie d'un peigne à 16 cupules. Après solidification, le gel est immergé dans une solution de TAE 1X.

8 µl de la solution d'acide nucléique sont mélangés avec 2 µl d'une solution de charge (Annexe 2), puis déposés au niveau des puits du gel d'électrophorèse.

La migration est réalisée au moyen d'un générateur de courant sous un voltage de 70 Volts pendant 5 min pour permettre la sortie de l'ADN des puis, ensuite à 50 Volts pour le reste de l'électrophorèse. Celle-ci est arrêtée lorsque le bleu de bromophénol atteint les trois quarts du gel (environ une heure). Le gel est ensuite visualisé sous rayons UV afin d'observer les bandes fluorescentes.

V. Bioautographie et étude phytochimique

Pour être valorisés, les composés bioactifs doivent d'abord être séparés de leur matrice végétale (extraction), puis isolés des autres composés présents dans l'extrait (bioautographie) pour enfin être identifiés (étude phytochimique) (Earl *et al.*, 2010).

1. Bioautographie

1.1. Fractionnement de l'extrait par chromatographie sur couche mince (CCM)

Les différentes substances de l'extrait d'acétate d'éthyle sont séparées par chromatographie sur couche mince (CCM), c'est une méthode efficace et rapide qui associe la sensibilité à la simplicité.

La CCM repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile (éluant) est un solvant ou mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.

Après que l'échantillon est déposé sur la phase stationnaire, cette dernière est mise en contact avec la phase mobile. L'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. La migration est en fonction de la polarité des substances, de la polarité de l'éluant et du pouvoir d'adsorption de la phase stationnaire.

Pour chaque constituant, on détermine le coefficient de migration ou rapport frontal (R_f) qui est définie comme suit :

$$R_f = \frac{\text{Distance par le composé}}{\text{Distance par le } solvant}$$

Afin de séparer les différentes substances de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de l'olivier, un échantillon de 14 µl de l'extrait est déposé en un point repère (ligne de dépôt) à 1 cm du bord inférieur d'une plaque CCM contenant environ 0,25 mm de gel de silice fixée sur une feuille d'aluminium de 6 cm de largeur, 12 cm de hauteur et 0,5 mm d'épaisseur.

L'éluant, est un mélange de solvants qui migrent lentement de long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon. Un système de solvants est testé avec plusieurs proportions :

⇨ Hexane/ Acétate d'éthyle (V/V) : 4/6 ; 4,5/5,5 ; 5/5 ; 5,5/4,5 ; 6/4.

La plaque est ensuite introduite verticalement dans la cuve contenant le mélange de solvants. Lorsque la position du front du solvant arrive à environ 1 cm de l'extrémité supérieure, la plaque est retirée de la cuve, le niveau atteint par le solvant est marqué par un trait, puis la plaque est séchée.

1.2.Localisation des bandes actives responsables de l'activité antimycobactérienne

Dans le but de déterminer les bandes responsables de l'effet antimycobactérien de l'extrait, on procède à la deuxième étape de la bioautographie.

Les plaques préparées comme décrit précédemment, sont transférées aseptiquement dans des boites stériles. Elles sont ensuite couvertes d'une couche mince du milieu Mueller Hinton agar. Ce milieu est additionné d'une culture liquide de *M. smegmatis* dont l'absorbance à 600 nm est 0,3. Après 48 h d'incubation à 37 °C, la ou les zones d'inhibition sont localisées. Pour chaque zone d'inhibition, on détermine le rapport frontal (R_f) de la bande correspondante.

1.3.Purification des fractions actives

En plus de la séparation et l'identification des composés actifs présents dans l'extrait, la CCM est aussi réalisée dans le but de purifier les principes actifs, à partir de la silice. Les fractions purifiées sont testées, et ceci dans le but de vérifier les résultats obtenus par la bioautorgaphie.

La purification est réalisée comme suit : la couche de silice correspondante à la zone d'inhibition est grattée, puis les composés sont extraits de la silice par élution dans 1 ml d'acétate d'éthyle ; le mélange est centrifugé à 7000 rpm pendant 5 min ; le surnageant est récupéré et le solvant est évaporé.

Le résidu obtenu est récupéré dans 20 µl d'eau distillée stérile, puis il est testé pour sa capacité à inhiber *M. smegmatis* par la méthode des disques.

Le témoin correspond à la silice de la même zone d'une autre plaque traitée avec les mêmes conditions de migration, sans dépôt des extraits. L'expérience est répétée trois fois.

2. Etude phytochimique

Dans le but d'identifier la nature des molécules responsables de l'activité antimycobactérienne des extraits des feuilles de l'olivier, nous avons procédé à un criblage chimique afin de mettre en évidence les familles des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins dans l'extrait brut et dans les zones identifiées par CCM comme étant responsables de l'activité antimycobactérienne.

Les principaux constituants chimiques sont caractérisés, par des réactions qualitatives. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de coloration par des réactifs spécifiques pour chaque famille de composé : la réaction de la cyanidine pour les flavonoïdes, le chlorure ferrique pour les tanins, et le réactif de Folin ciocalteu pour les polyphénols (Haouat *et al.,* 2013).

2.1.Mise en évidence des flavonoïdes

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à ajouter à 5 ml de l'extrait, 5 ml d'alcool chlorhydrique (éthanol / eau / acide chlorhydrique ; V/V) puis quelques copeaux de magnésium et 1 ml d'alcool isoamylique. L'apparition d'une coloration rose orangée, rose violacée ou rouge indique la présence des flavonoïdes.

2.2.Mise en évidence des tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant à 5 ml de l'extrait, 1 ml d'une solution aqueuse de chlorure ferrique à 2 %. L'apparition d'une coloration bleu noire intense ou brun verdâtre indique la présence des tanins.

2.3.Mise en évidence des polyphénols

À 100 µl de l'extrait, on ajoute 500 µl du réactif de Folin ciocalteu (dilué dix fois) et 400 µl d'une solution de Na_2CO_3 (75 mg/ml d'eau distillée), on laisse incuber 2 h à une température ambiante. La présence des polyphénols se traduit par l'apparition d'une coloration bleu foncé.

VI. Analyse statistique des résultats

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. L'analyse des résultats est réalisée par le teste-t- de Student en utilisant le seuil de signification $\alpha = 0,05$ (Snedecor *et al.,* 1984).

I. Activité antimycobactérienne des extraits des feuilles de l'olivier

L'extrait aqueux est testé pour son aptitude à inhiber la prolifération mycobactérienne. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 6 :

Tableau 6 : Effet antimycobactérien de l'extrait aqueux sur *M. smegmatis* et *M. aurum*

Espèce	**Milieu Sauton + extrait aqueux**	**Sauton**
M. smegmatis	-	+
M. aurum	-	+

- : absence de croissance ; + : croissance des mycobactéries

Les résultats montrent une absence de croissance des mycobactéries sur les milieux préparés avec l'extrait aqueux, par opposition aux boites témoins. Ce qui indique que les feuilles de l'olivier contiennent un ou plusieurs substances capables d'inhiber la croissance des mycobactéries testées dans cette étude.

Ces résultats sont confirmés par la méthode conventionnelle des disques. Ainsi, divers extraits testés dans la présente étude (éthanolique, méthanolique et extrait d'acétate d'éthyle) ont montré un effet antimycobactérien (Tableau 7).

Tableau 7 : Effet antimycobactérien de l'extrait des feuilles de l'olivier en fonction du solvant d'extraction

Diamètres des zones d'inhibition (mm) sur *M. smegmatis*			
Solvants / **volume**	Ethanol	Méthanol	Acétate d'éthyle
20 µl	10,0 ± 1,14	7,5 ± 0,70	13,66 ± 1,11

Témoins : le dépôt de 20 µl de chacun des trois solvants utilisés a abouti à un diamètre de 0 mm.

Les résultats de la méthode de diffusion sur disque montrent que le diamètre de la zone d'inhibition obtenu par l'extrait d'acétate d'éthyle est significativement plus important que ceux

des autres solvants. De ce fait, l'extrait d'acétate d'éthyle est retenu pour les autres expériences de cette étude.

L'activité de l'extrait étudié est également testée en milieu liquide (Tableau 8).

Tableau 8 : Effet de l'extrait sur l'activité antimycobactérienne en milieu liquide

	Culture	**Croissance**	
		3 jours	6 jours
M. smegmatis	E	-	-
	T+	-	-
	T-	+	+

E : culture en présence de l'extrait ; T+ : culture en présence de l'ail (contrôle positif) ; T- : culture en absence de l'extrait (control négatif), + : croissance et - : absence de croissance

Les résultats de l'évaluation de l'activité de l'extrait des feuilles de l'olivier en milieu liquide (Tableau 8) montrent que l'extrait d'acétate d'éthyle (concentration = 50 mg de MS/ml) inhibe la croissance de *M. smegmatis* cultivé sur milieu liquide. Par conséquent, l'extrait étudié est aussi efficace que celui de l'ail qui est connu pour sa grande capacité bactéricide (Tessema *et al.,* 2006).

II. Evaluation et comparaison de l'effet antimycobactérienne des extraits des feuilles fraîches et sèches

Les résultats obtenus par la méthode de disque des extraits de l'acétate d'éthyle des feuilles fraîches et sèches sont représentés sur les Figures 33 et 34 :

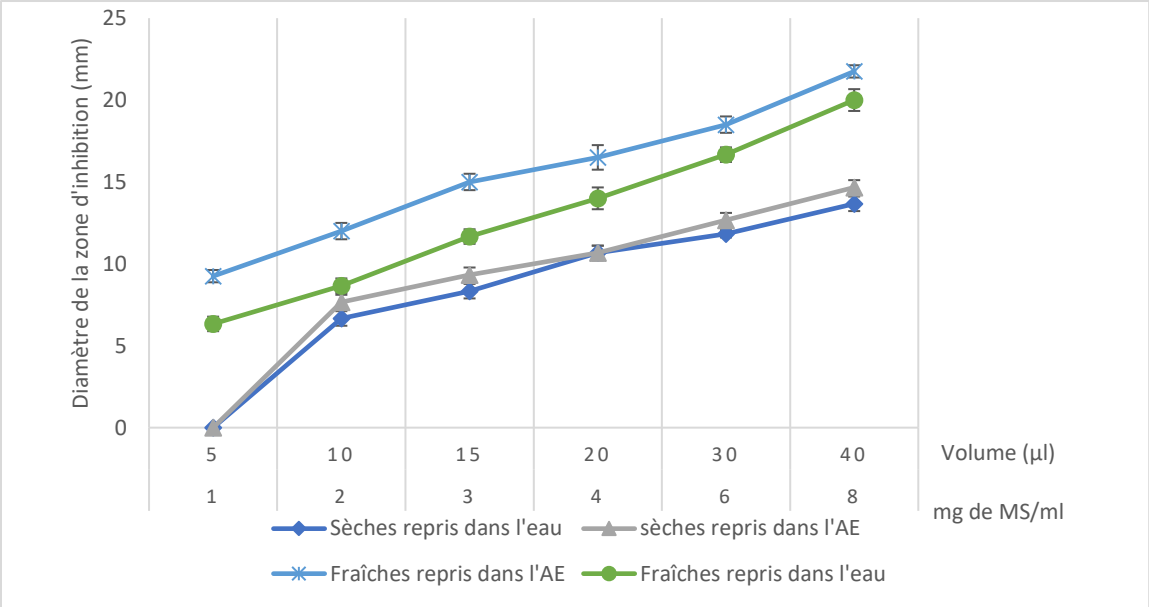

Figure 33 : Effet antimycobactérien de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles fraîches et sèches de l'olivier repris séparément dans l'acétate d'éthyle (AE) et dans l'eau

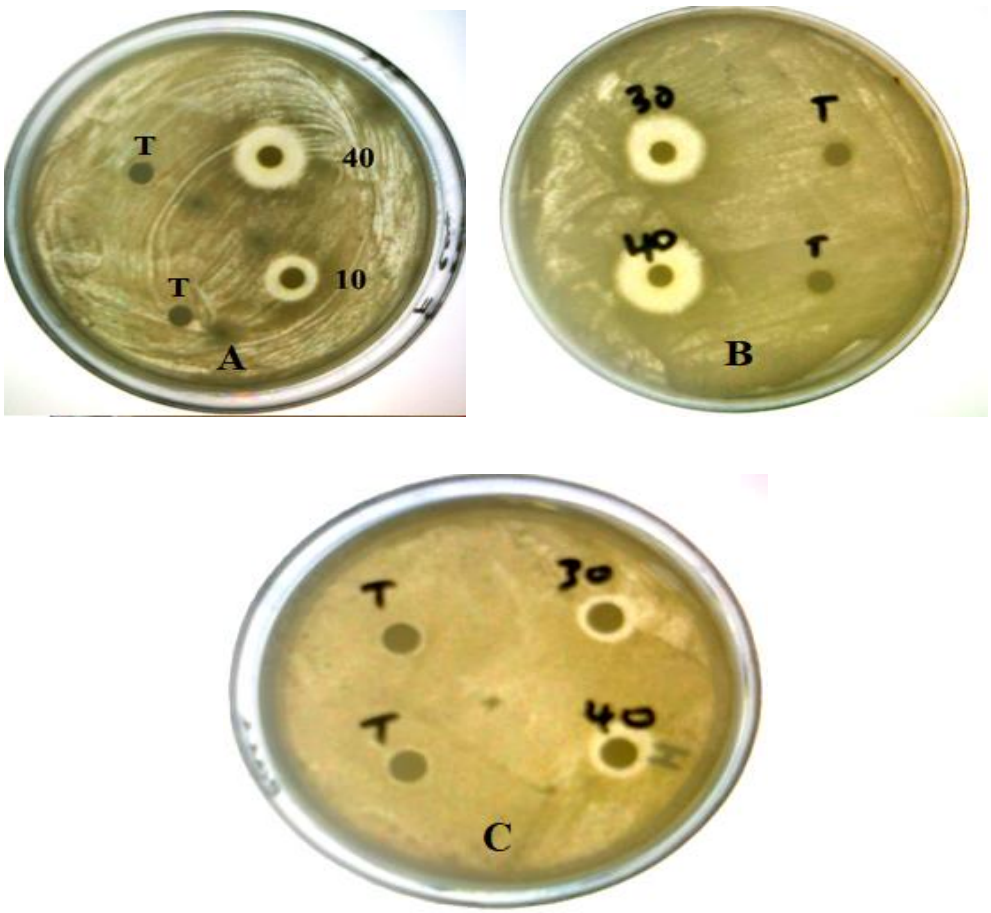

Figure 34 : Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles fraîches (A et B) et de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles sèches (C)

Les résultats obtenus montrent que les diamètres des zones d'inhibition augmentent en fonction du volume déposé, et donc de la concentration en matière sèche végétale.

Ces résultats mettent en évidence la présence d'une corrélation positive entre la concentration en matière sèche végétale des extraits et l'intensité du pouvoir antimycobactérien et montre que l'activité biologique obtenue vis-à-vis *M. smegmatis* est bien due aux principes actifs présents dans les extraits.

Pour l'ensemble des extraits préparés, il n'y a pas de différence significative entre les diamètres des zones d'inhibition de l'extrait repris dans l'eau et l'extrait repris dans l'acétate d'éthyle (Figure 34). De ce fait, le ou les principes actifs ont le même degré de solubilité dans l'eau et dans l'acétate d'éthyle.

Les diamètres des zones d'inhibition des extraits des feuilles fraîches, sont significativement plus importants que ceux des extraits des feuilles sèches (Figure 34).

III. Détermination des CMI et des CMB de l'extrait des feuilles de l'olivier

Les résultats de la CMI et de la CMB de l'extrait des feuilles de l'olivier, sont représentés dans le Tableau 9 :

Tableau 9 : CMI et CMB de l'extrait des feuilles de l'olivier

Espèce	CMI (mg de MS/ml)	CMB (mg de MS/ml)
M. smegmatis	12.5	12.5
M. aurum	6.25	6.25

Ces résultats montrent que la CMI et la CMB pour *M. smegmatis* sont identiques et correspondent à 12.5 mg de MS/ml. Chez *M. aurum*, elles sont égales à 6.25 mg de MS/ml.

IV. Etude de l'effet de l'extrait sur la paroi des mycobactéries

Dans cette expérience, on a voulu savoir si l'effet antimycobactérien de l'extrait étudié est dû ou non à une détérioration de la paroi de *M. smegmatis*. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 35 :

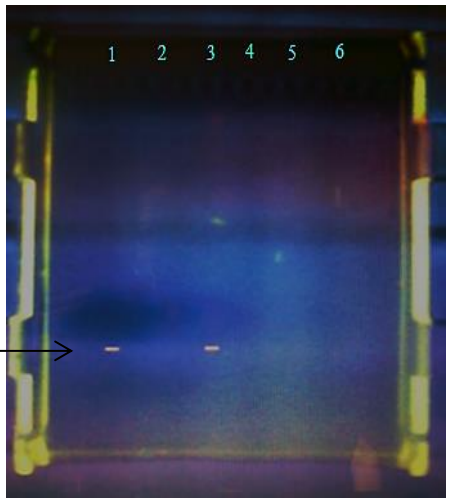

Figure 35 : Analyse par électrophorèse sur gel d'agarose (1%) du contenu acellulaire de *M. smegmatis* traité par différents extraits.

1 et 3 : *M. smegmatis* traité par l'extrait de *T. vulgaris* (Témoin positif) ;

2 et 4 : *M. smegmatis* traité par l'extrait des feuilles de l'olivier ;

5 et 6 : *M. smegmatis* traité par l'eau distillée stérile (Témoin négatif).

L'effet de l'extrait des feuilles de l'olivier sur la paroi de *M. smegmatis*, est évalué en testant sa capacité à extraire l'ADN ou l'ARN. L'analyse du gel d'électrophorèse ne révèle aucune bande d'acides nucléique pour *M. smegmatis* traité avec l'extrait des feuilles de l'olivier, le même résultat est obtenu pour le témoin négatif, alors que pour le témoin positif on note la présence d'une bande d'ARN. Ces résultats montrent que l'extrait des feuilles de l'olivier sont incapables d'extraire l'ARN de *M. smegmatis*, et donc le cible d'action de cet extrait n'est pas la paroi bactérienne.

V. Bioautographie et étude phytochimique

1. Bioautographie

1.1. Choix du solvant

Pour la séparation de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de l'olivier par CCM, nous avons utilisé le système hexane-acétate d'éthyle et nous avons testé plusieurs proportions (Tableau 10) :

Tableau 10 : proportions des solvants utilisés pour la CCM

Solvants	**Hexane : Acétate d'éthyle (v:v)**						
Proportions (V/V)	6,5:3,5	6:4	5,5:4,5	5:5	4,5:5,5	4:6	3,5:6,5
Résultats	+	++	+	-	-	-	-

(++) : Meilleure séparation : la majorité des bandes sont séparées.

(+) : Séparation : certaines bandes ne sont pas séparées.

(-) : pas séparation.

Le système de solvants Hexane/ Acétate d'éthyle (6/4) a permis d'obtenir une bonne séparation des composés présents dans l'extrait. Ce système est retenu pour la séparation de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de l'olivier.

1.2.Séparation des composés présents dans l'extrait

Le résultat du fractionnement de l'extrait des feuilles de l'olivier par CCM, est présenté dans la Figure 36 et le Tableau 11 :

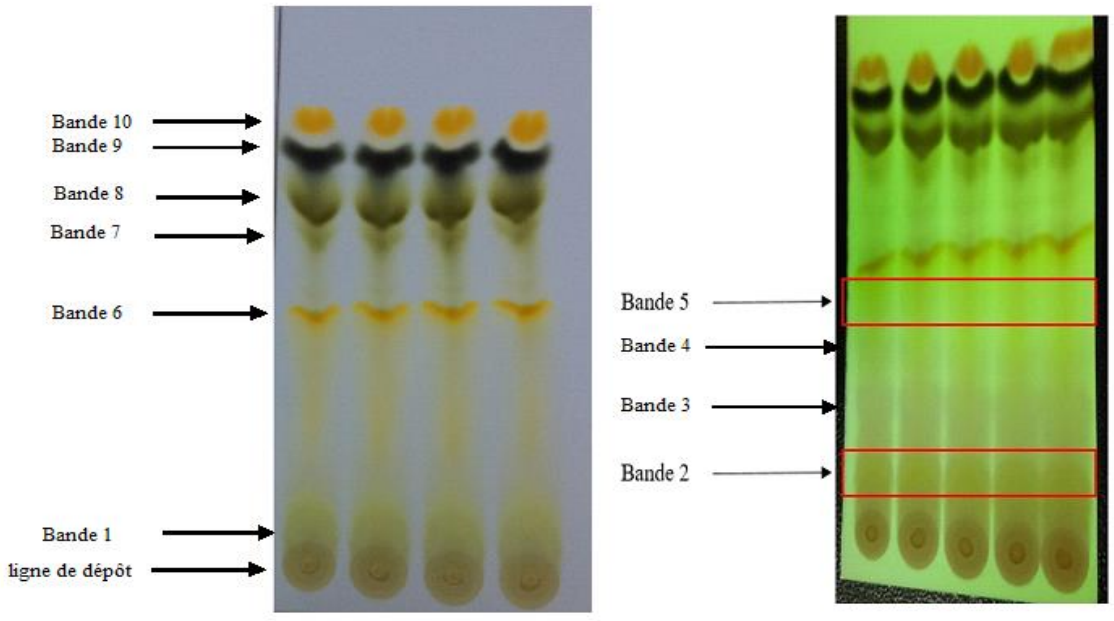

Figure 36 : chromatogramme de l'extrait des feuilles de l'olivier

Tableau 11 : Bandes séparées de l'extrait des feuilles de l'olivier et leurs rapports frontaux (Rf)

Bandes séparées	Rf
10	0,96
9	0,92
8	0,85
7	0,80
6	0,73
5*	0,52
4*	0,45
3	0,35
2*	0,23
1	0,15

*: bandes visualisées sous la lumière UV

Le résultat a mis en évidence la présence de dix bandes séparées sur la plaque de silice. Les bandes qui ne sont pas visibles à la lumière du jour, sont visualisées sous la lumière UV (bandes 2, 4 et 5).

Ce résultat suggère la présence de plusieurs molécules, appartenant probablement à diverses classes chimiques, dans l'extrait étudié. L'activité antimycobactérienne observée est due à une ou à plusieurs molécules détectées sur la plaque CCM (Figure 36).

1.3.Localisation des bandes actives responsables de l'activité antimycobactérien

Le résultat du fractionnement bioautographique de l'extrait des feuilles de l'olivier est présenté dans la Figure 37 :

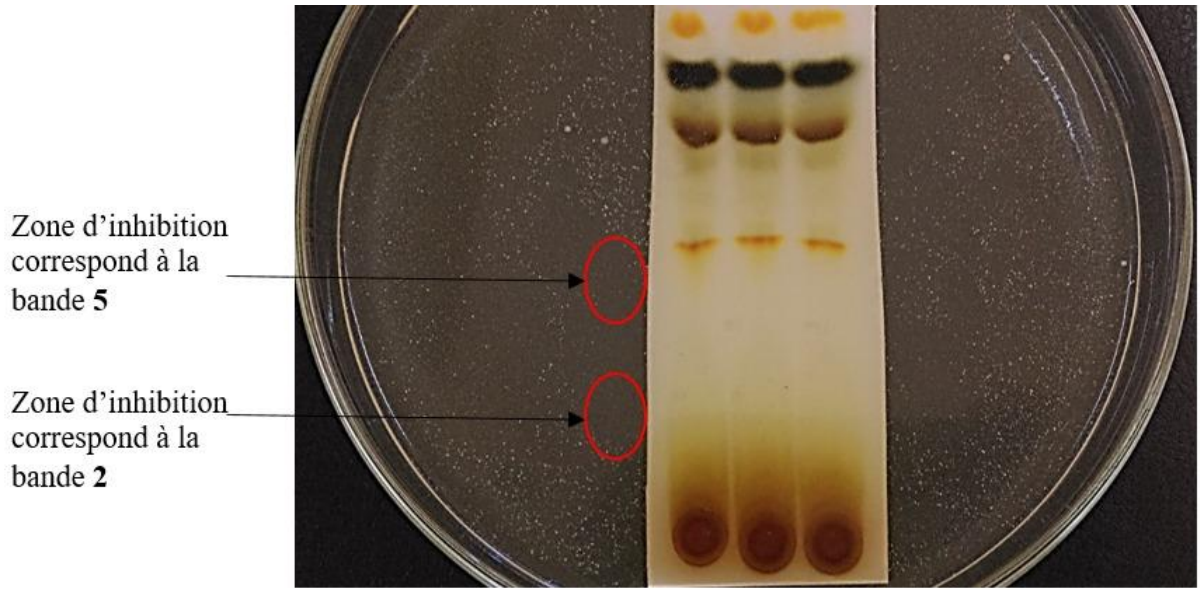

Figure 37 : Bioautographie de l'extrait des feuilles de l'olivier

Le fractionnement bioautographique a permis la mise en évidence de deux zones d'inhibition (Figure 37), qui sont formées autour de deux bandes distinctes (bande 2 et bande 5) ; les R_f de ces zones sont respectivement 0,23 et 0,52 (Tableau 9).

1.4.Purification des bandes actives

La purification est réalisée dans le but de vérifier les résultats de la bioautographie. En effet, les bandes (2 et 5) sont purifiées puis testées pour leur capacité à inhiber la croissance de *M. smegmatis*. Les résultats sont présentés dans le Tableau 12 :

Tableau 12 : Effet antimycobactérien des fractions actives de l'extrait des feuilles de l'olivier

	Fractions actives	**Rf**	**Diamètre de la zone d'inhibition (mm)**
M. smegmatis	2	0,23	12
	5	0,53	14

Le Tableau 12 montre l'effet des fractions 2 et 5 par la méthode de disque. Les substances contenues dans ces zones conduisent respectivement à des diamètres d'inhibition de 12 mm et 14 mm. Ce résultat confirme la présence d'un effet dans les zones révélées actives par la bioautographie (Figure 37). Ainsi les composés présents dans ces fractions sont responsables de l'activité antimycobactérienne observée.

2. Etude phytochimique

Les résultats des tests phytochimiques effectués sur l'extrait et sur les fractions actives (2 et 5) sont regroupés dans le Tableau 13 :

Tableau 13 : Mise en évidence des flavonoïdes, des tanins et des polyphénols totaux

	Flavonoïdes	**Tanins**	**Polyphénols totaux**
Extrait brut	+	+	+
2	-	-	+
5	-	-	+

+ : présence ; - : absence

On remarque la présence des flavonoïdes, tanins et polyphénols totaux dans l'extrait brut. Cependant, dans la zone 2 (R_f = 0,23) et la zone 5 (R_f = 0,53), contenant les principes actifs responsables de l'activité antimycobactérienne, on note la présence seulement des polyphénols totaux.

Le but de ce travail est d'étudier l'activité antimicrobienne *in vitro* des extraits des feuilles de l'olivier contre *M. smegmatis* et *M. aurum* afin de prédire l'activité contre l'agent pathogène *M. tuberculosis*.

M. smegmatis et *M. aurum* sont choisis dans ce travail parce qu'elles sont utilisées par les chercheurs comme modèles pour évaluer l'activité des substances actives contre *M. tuberculosis*, en raison de leurs taux d'inhibition faibles et de leur non pathogénicité (Reyrat et Kahn 2001 ; Abidi *et al.*, 2014).

Dans le présent travail, nous avons démontré l'activité antimycobactérienne de l'extrait aqueux des feuilles de l'olivier contre *M. smegmatis* et *M. aurum*. Cette activité pourrait être due à la présence de composés de nature polaire facilement extractibles par l'eau. L'activité antimycobactérienne ne change pas en chauffant l'extrait pendant 15 min à 100 ° C. Cela signifie que les composés actifs ne sont probablement pas de nature protéique. Plusieurs autres extraits sont aussi testés (extrait éthanolique, extrait méthanolique, extrait d'acétate d'éthyle), et se sont révélés actifs contre les deux souches mycobactériennes étudiées. Mais, l'extrait de l'acétate d'éthyle est le plus efficace. Plusieurs études antérieures ont testé différents extraits de plantes pour leurs activités contre *M. smegmatis* et d'autres mycobactéries, et ils ont montré que cette activité est détectée dans les extraits aqueux, éthanolique et d'acétate d'éthyle (Sqalli *et al.*, 2007 ; El ouarti *et al.*, 2011 ; Haouat *et al.*, 2013).

L'activité élevée de l'extrait d'acétate d'éthyle indique que les composés phytochimiques extraits possèdent une polarité modérée, étant donné que ce solvant n'extrait que les composés moyennement polaires (Derbel *et al.*, 2010). L'extrait d'éthanol et l'extrait de méthanol ont également eu des activités importantes contre *M. smegmatis*, ce qui suggère que les feuilles de l'olivier sont riches en composés bioactifs et peuvent constituer une source potentielle de nouveaux médicaments antimycobactériens.

Les résultats de ce travail ont montré également que les extraits préparés à partir des feuilles fraîches sont plus actives contre *M. smegmatis* et *M. aurum* que ceux préparés des feuilles sèches. Ce résultat peut être explique par le fait que, le processus de séchage peut causer des dommages thermiques et de graves modifications des propriétés chimiques et organoleptiques des plantes aromatiques (An *et al.*, 2016). Plusieurs travaux ont montré le séchage influence l'activité des plantes : Bertani et ses collaborateurs ont étudié l'effet de séchage sur l'activité antipaludique du thé des feuilles d'*Quassia amara*, et ils ont conclu que La préparation la plus

active est celle faite avec les feuilles fraîches (Bertani *et al.*, 2007), la même conclusion est faite par Rasoanaivo et *al*. (2004) qui ont rapporté que seul le thé en feuilles fraîches est considéré comme présentant une bonne activité (Rasoanaivo *et al.,* 2004).

Plusieurs autres chercheurs ont confirmé que le mode de séchage joue un rôle très important sur la composition chimique des plantes, Harbourne et *al*. (2009) ont montré que le séchage de *Filipendula ulmaria* et de *Salix alba* à des températures élevées a entraîné une réduction des flavonoïdes, par contre, la lyophilisation et le séchage à l'air ont donné des extraits riches en phénols et en principes actifs (Harbourne *et al.,* 2009).

Pour tous les extraits testés, une augmentation des diamètres des zones d'inhibition en fonction du volume déposé est enregistrée. Ces résultats mettent en évidence une corrélation positive entre la concentration en matière sèche végétale de l'extrait et l'intensité de l'activité antimycobactérienne. Ces résultats sont confirmés par les données bibliographiques. En effet, Haouat (2013) a testé l'effet antimycobacterien des extraits éthanoliques par la méthode des disques de *C. albidus, C. salvifolius, T. africana* et *T. gallica,* et a enregistré que pour toutes ces plantes, l'activité antimycobactérienne augmente en fonction du volume déposé, c'est-à-dire en fonction la quantité en matière sèche de l'extrait (Haouat, 2013). Les mêmes observations sont signalées par Squalli (2008) en testant l'effet des extraits éthanolique des feuilles de *Berberis sp., Juniperus oxycedrus, thymus pallidus* et des racines de *Tamarix africana,* contre *M. smegmatis* et *M. aurum* (Squalli, 2008).

Pour les deux souches étudiées, les rapports CMB/CMI sont égaux à 1, ce qui indique que l'extrait des feuilles de l'olivier a un effet bactéricide.

À notre connaissance, il s'agit de la première étude montrant l'activité antimycobactérienne de l'extrait des feuilles de l'olivier, mais plusieurs études antérieures ont démontré l'effet antibactérien de cet extrait contre d'autres bactéries : L'extrait des feuilles de l'olivier a une activité appréciable sur *Campylobacter jejuni, Helicobacter pylori* et *Staphylococcus aureus* (Sudjana *et al.,* 2008). L'évaluation de l'effet antimicrobien de l'extrait aqueux des feuilles de l'olivier par la méthode de diffusion en milieu gélosé vis à vis une dizaine de souches pathogènes est testée dont certaines sont résistantes à plusieurs antibiotiques. L'extrait s'est révélé très actif sur plusieurs espèces dont *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis,* ainsi que *Pseudomonas aeruginosa* (Chebaibi *et al.,* 2007).

Ilias et *al*. (2011), ont testé l'effet de différents extraits des feuilles de l'olivier (acétone, méthanol, butanol et acétate d'éthyle) sur *Aspergillus, Salmonella typhemurium* et *Bacillus cereus* et ont montré que l'extrait d'acétate d'éthyle avait l'effet le plus élevé par rapport aux autres extraits (Ilias *et al.*, 2011). Dans une étude plus récente, Liu et Malik (2017), ont montré que l'extrait des feuilles de l'olivier inhibait presque complètement la croissance de *Listeria monocytogenes*, d'*Escherichia coli* O157 : H7 et de *Salmonella Enteritidis* (Liu et Malik, 2017). L'extrait des feuilles de l'olivier semble posséder aussi une activité leishmanicide intéressante (Sifaoui *et al.*, 2014). Dans une étude expérimentale Lee-Huang et ses collaborateurs ont constaté que l'extrait des feuilles d'olivier a une activité anti-HIV en bloquant l'entrée de virus d'HIV aux cellules hôtes (Lee-Huang *et al.*, 2007)

Les résultats de l'effet de l'extrait d'acétate d'éthyle sur la paroi de *M. smegmatis* ont montré que l'extrait éthanolique de *T. vulgaris* est capable d'extraire l'ARN. Ce qui suggère que cet extrait provoque la formation des pores au niveau de la paroi mycobactérienne qui permettent la sortie de l'ARN. Ce résultat confirme ceux de plusieurs travaux qui ont montré que l'extrait de *Thymus* est capable d'agir sur la paroi de certaines levures et bactéries y compris les mycobactéries (Rhayour, 2002 ; Haouat, 2013). Par contre, l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de l'olivier est incapable d'extraire l'ARN ou l'ADN. Dans ce cas, on pourrait suggérer que cet extrait agit au niveau d'autres sites par d'autres mécanismes d'action.

Pour déterminer si la bioactivité de notre extrait est due à un seul ou plusieurs composés phytochimiques, une séparation des substances de l'extrait et une analyse bioautographique à sont effectuées. Ainsi, deux zones se sont révélées actives et sont caractérisées par la présence des polyphénols, qui sont des produits du métabolisme secondaire des plantes et incluent une large gamme de produits chimiques caractérisés par la présence de groupes phénoliques ; par ailleurs, l'absence des flavonoïdes et des tanins dans les deux zones détectées permet de conclure que les principes actifs responsables de cette activité sont des polyphénols autres que les flavonoïdes et les tanins. Certaines études ont montré que les feuilles d'olivier contiennent des grandes quantités de substances phénoliques (Brahmi *et al.*, 2012 ; Kiritsakis *et al.*, 2017 ; Leonardis *et al.*, 2008). Lucas-González et ses collaborateurs ont identifié vingt-six composés phénoliques regroupés dans : les Sécoiridoïdes, les flavonoïdes, les phénols simples, les oléosides et les acides phénoliques (Lucas-González *et al.*, 2018). L'oleuropéine et les composés triterpénoïques, abondants dans les feuilles d'olivier, possèdent aussi une activité inhibitrice contre les virus, les rétrovirus, les bactéries, les levures, les moisissures et autres

parasites. Ils ne sont pas toxiques et sont utilisés dans les produits cosmétiques et médicaux (Korukluoglu *et al.,* 2010 ; Pereira *et al.,* 2007 ; Sudjana *et al.,* 2008).

En phytothérapie, l'effet de nombreuses plantes médicinales est attribué aux composés phénoliques. Ces substances possèdent des activités biologiques qui les rendent bénéfiques à la santé humaine. Beaucoup d'études indiquent que les polyphénols pourraient diminuer le risque de survenue d'un certain nombre de pathologies, en particulier celles liées au vieillissement et aux lésions oxydatives (cancers, maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives) (Leong et Shui, 2002).

Enfin, nous suggérons que l'effet de notre extrait pourrait être amélioré en le combinant avec d'autres médicaments antituberculeux, par exemple avec certains antibiotiques. Lim et *al* ont prouvé que la combinaison de l'extrait de feuilles d'olivier avec de l'ampicilline renforçait l'effet antibactérien de l'extrait (lim *et al.,* 2016).

L'infection par les mycobactéries est une menace majeure pour la santé publique mondiale à cause de l'augmentation de la résistance aux traitements courants, la co-infection avec le VIH et à la formation des biofilms. Durant ces dernières années, l'intérêt des feuilles de l'olivier comme agents anti-infectieux s'est renforcé et leur pouvoir antimicrobien en fait d'excellents candidats thérapeutiques. Cependant, il y'a un manque énorme de travaux menés sur leur effet antimycobactérien.

À cet égard, Cette étude évalue l'activité des extraits des feuilles de l'olivier contre des souches mycobactériennes: *Mycobacterium aurum* et *Mycobacterium smegmatis* qui sont considérées comme modèle pour évaluer l'activité des substances actives contre *Mycobacterium tuberculosis*. Différents extraits des feuilles de l'olivier sont préparés (aqueux, éthanolique, méthanolique et extrait d'acétate d'éthyle). L'évaluation de l'activité de ces extraits contre les deux souches mycobactériennes est effectuée par la méthode de l'incorporation des extraits dans le milieu gélosé : par cette technique, nous avons pu démontrer que ces différents extraits exercent une activité inhibitrice vis-à-vis *M. smegtmatis* et *M. aurum*. Cette activité est confirmée par la technique de diffusion sur disque qui a montré une corrélation positive entre la concentration en matière sèche des extraits et le pouvoir inhibiteur, et que l'extrait d'acétate d'éthyle possède l'effet antimycobactérien le plus élevé. L'étude de l'effet de l'extrait d'acétate d'éthyle sur la paroi de *M. smegmatis* n'a montré aucune activité, ce qui montre que cet extrait n'agit pas sur *M. smegmatis* au niveau de sa paroi, mais il attaque cette bactérie dans un autre site (réplication, transcription, traduction ou voies métaboliques…etc). Ensuite, les substances actives sont séparées et révélées par chromatographie sur couche mince (CCM) suivie d'une bioautographie. Les tests phytochimiques ont montré que ces molécules correspondent à des polyphénols autres que les flavonoïdes et les tanins.

Etant donné que l'extrait des feuilles de l'olivier inhibe la croissance de *M. smegmatis* et de *M. aurum*, et que ces deux bactéries présentent la même sensibilité aux antituberculeux que *M. tuberculosis*, Les résultats obtenus dans ce travail sont très encourageants et ouvrent une voie prometteuse pour l'utilisation des feuilles de l'olivier comme un nouveau composé potentiel pour le développement de nouveaux médicaments contre la tuberculose.

Chapitre 4 : Effet des extraits d'*Olea europaea*, de *Berberis hispanica*, de *Populus alba* et d'*Arbutus unedo* sur la croissance mycobactérinne à l'état planctonique et de biofilm

La tuberculose est historiquement une des principales maladies infectieuses et contagieuses due aux mycobactéries du complexe *tuberculosis*. L'émergence des souches des bacilles tuberculeux multirésistants et ultrarésistants aux traitements courants, l'impact de la co-infection avec le VIH et l'augmentation de la prévalence des infections causées par les mycobactéries atypiques, rend l'infection par les mycobactéries un problème majeur de santé public et parmi les principales causes de mortalité par infection dans le monde (WHO ; 2017).

De plus, la capacité des mycobactéries à s'adhérer à une surface et être enrobées dans une matrice extracellulaire renforce leur résistance aux antibiotiques (Martín-de-Hijas *et al.,* 2009). En effet, les problèmes générés par les biofilms mycobactériens sont nombreux et touchent différents domaines. Bien évidemment le secteur hospitalier est le plus touché, les biofilms mycobactériens causent de nombreuses pathologies nosocomiales notamment lors d'interventions invasives (prothèse, cathéters…) (Ojha, 2018). Mais ils sont également un problème pour l'industrie de la pisciculture, où ils entrainent des infections couramment appelée granulome des aquariums ou tuberculose du poisson (Alavi *et al.,* 2007).

L'étape clé dans la formation des biofilms est l'adhésion cellulaire. Une meilleure compréhension des facteurs physico-chimiques pouvant influencer l'adhésion bactérienne devrait permettre de trouver des outils thérapeutiques capables de lutter contre cette structure dynamique qui est responsable en grande partie de l'échec de l'antibiothérapie. Ces propriétés physicochimiques sont évaluées par plusieurs techniques telles que l'angle de contact (Busscher *et al.,* 1984) et l'adhésion microbienne au solvant (Bellon Fontaine *et al.,* 1996). La mesure de l'angle de contact par la goutte sessile est une méthode simple et rapide qui fournit des informations précieuses, notamment les valeurs d'énergie de surface. Il peut également fournir une estimation réelle de l'hydrophobicité à la surface des cellules (Van Der Mei et Busscher, 1998) et du caractère donneur / accepteur d'électrons (Hamadi *et al.,* 2012). Très peu d'études sont consacrées à la caractérisation physico-chimique de la surface des mycobactéries à l'aide de l'angle de contact.

Aujourd'hui, il y a un intérêt croissant du développement de nouvelles substances antimycobactériennes accessibles et efficaces sur les bactéries en état planctonique et en mode biofilm. Les plantes médicinales, peuvent constituer une source précieuse de nouveaux médicaments antimycobactériens utiles. En effet, la médecine traditionnelle est utilisée depuis des siècles pour traiter les symptômes liés à la tuberculose, tels que douleurs thoraciques, toux,

fièvre et sueurs nocturnes (Kirimuhuzya *et al.,* 2009). En raison de la diversité des climats tropicaux, subtropicaux et désertiques, les plantes africaines sont soumises à un certain nombre de facteurs écophysiologiques différents qui améliorent le profil métabolique secondaire. L'environnement sévère fait que les plantes, cultivées en Afrique, accumulent plus d'agents chimio-préventifs que leurs homologues de l'hémisphère nord (Oosthuizen *et al.,* 2018).

Un certain nombre d'études ont révélé l'existence d'une gamme de produits naturels ayant une activité prometteuse contre les mycobactéries (El ouarti *et al.,* 2011 ; Haouat *et al.,* 2013 et 2014 ; Oosthuizen *et al.,* 2018). D'où l'intérêt de la présente étude qui vise à évaluer la physicochimie de *M. smegmatis* et de *M. aurum* par la méthode de l'angle de contact, et l'effet des extraits des plantes étudiées sur cette physicochimie. Ce travail vise également à étudier la cinétique de formation du biofilm par des souches mycobactérienne : *M. smegmatis* et *M. aurum,* et à déterminer l'activité antibiofilm des quatre extraits de plantes : *Olea europaea, Populus alba, Berberis hispanica, Arbutus unedo*.

I. Souches bactériennes

Les microorganismes sélectionnés pour cette étude sont : les souches bactériennes *Mycobacterium smegmatis* MC2 155 et *Mycobacterium aurum A* $^{+}$. Ces deux souches sont à croissance rapide, avirulentes et saprophytes, et elles sont utilisées dans ce travail comme modèle pour évaluer l'activité antimycobactérienne des extraits de plantes contre *Mycobacterium tuberculosis*, et pour l'étude des paramètres physicochimique des mycobactéries et leur relation avec la formation de biofilm.

Mycobacterium smegmatis AI est utilisée aussi pour l'évaluation de l'effet du lycopène sur la formation de biofilm.

Ces différentes souches sont cultivées dans le milieu Sauton (Nigou et Besra, 2002) dont la composition est donnée en Annexe 1.

II. Matériel végétal

1. Origine géographique et description des plantes

Les plantes choisies dans cette partie du travail sont : *Olea europaea*, *Populus alba*, *Berberis Hispanica* et *Cistus unedo* (Annexe 3). Ces plantes sont choisies grâce à leur potentiel antimycobactérien démontré dans la présente étude (*Olea europaea*) et dans des études précédentes (*Populus alba*, *Berberis Hispanica* et *Cistus unedo)* (Haouat *et al.,* 2013 et 2014 ; El ouarti *et al.,* 2011).

Olea europaea est collecté en mois de Février dans la région de *Fès-Boulemane.* Cet arbre appartient à la famille des *Oleaceae*. L'olivier est originaire des régions tropicales et chaudes, en particulier les zones côtières de la Méditerranée orientale, du Liban, parties maritimes de l'Asie Mineure, et le Nord de l'Iran jusqu'à l'extrémité sud de la mer Caspienne (FAO/WHO, 2003). C'est un arbrisseau toujours vert et vivace qui croît spontanément dans les bois méditerranéens. Ses rameaux sont épineux et de section presque carrée. Ses feuilles sont persistantes, opposées (elles sont blanc argenté à la face inférieure, vert grisâtre à la face supérieure), sans stipule et généralement simples. Les fleurs sont tétramères, petites et blanches et réunies en grappes dressées. Les fruits, olives, sont des drupes ovoïdes, vertes puis noires à maturité, à noyau dur fusiforme (Ghedira, 2008). Ses fruits sont également plus petits, avec une faible épaisseur de pulpe. L'olivier a besoin d'une température moyenne annuelle comprise entre 16 et 22°C, cependant il tolère bien de grands écarts de températures. Beaucoup d'Oléacées

sont cultivées pour leurs qualités environnementales : les lilas, les forsythias, les troènes, les frênes. Seul l'olivier présente un intérêt économique.

Arbutus unedo est collecté en mois de Mars, 2018 dans la région d'Ourdzarh, province de Taounat, connue par sa production en plantes aromatique et médicinale. C'est un arbuste à feuilles persistantes appartenant à la famille des *Ericacea*e, originaire de la région méditerranéenne, mais il peut également coloniser d'autres régions caractérisées par des étés chauds et des hivers doux et pluvieux. Il atteint jusqu'à 3 m de hauteur, ses feuilles sont oblancéolées, vert foncé, coriace, a pétiole court et dentées. Ses fleurs sont très caractéristiques sous forme de cloches blanches, et ses fleurs sont des baies globuleuses d'environ 15 à 20 mm de diamètre appelés arbouses (Maleš *et al.,* 2006). Au Maroc, il est largement utilisé en médecine traditionnelle comme astringent, antiseptique, antidiarrhéique et dépuratif des voies urinaires (Bouyahya *et al.,* 2016). Elle est aussi l'une des plantes les plus couramment utilisées pour traiter le diabète dans l'est du Maroc, en particulier dans les régions de Taza et Beni Mellal (Jouad *et al.,* 2001). Sur le plan environnemental, *Arbutus unedo* est aussi très important en raison de sa tolérance à la sécheresse et les basses températures, en plus de sa capacité à se régénérer et recoloniser les forêts incendiées (Morgado *et al.,* 2018).

Berberis hispanica (épine-vinette) est collecté en janvier 2018 dans la région d'Immouzzer-Kander, province de Sefrou. Cette plante est originaire d'Europe et des Îles britanniques et naturalisée en Amérique du Nord. C'est un buisson à rameaux anguleux, à feuilles fasciculées, à fleurs jaunes et à fruit bacciforme, pruineux, bleuâtre à bleu noir. Elle est largement utilisée en médecine homéopathique contre les douleurs et l'élimination des calculs rénaux. Son activité est due principalement à des alcaloïdes isoquinoléiques comme la berbérine, largement utilisée dans la médecine chinoise. Les décoctions et les extraits de berbérine de ces plantes ont montré des activités antimicrobiennes *in vitro* (El ouarti *et al.,* 2011)

Populus alba (peuplier blanc) est collecté en mois d'Avril dans la région de *Fès-Boulemane*. Le genre *Populus,* membre de la famille des *Salicaceae,* est largement répandu dans l'hémisphère nord. Il est composé d'environ 30 espèces pour la plupart dioïques subdivisées en six sections. Cette plante est originaire du bassin méditerranéen et est largement répandue dans les vallées fluviales en Europe méridionale, centrale et orientale, en Asie occidentale et centrale et en Afrique du Nord (Paolucci *et al.,* 2010). *Populus alba* est un arbre qui peut atteindre 20 à 30 m de hauteur, à feuilles au revers tomenteuses, lui donnant un aspect blanc, et vert foncé sur

la face supérieure. Les jeunes rameaux sont recouverts d'un duvet blanc et cotonneux puis deviennent gris en vieillissant et les fruits sont des capsules à graines cotonneuses.

2. Préparation des extraits

Les parties des plantes utilisées sont les feuilles d'*Olea europaea,* d'*Arbutus unedo,* de *Populus alba,* et les racines de *Berberis hispanica*. Ces parties de plantes sont séchées à l'air libre à l'ombre, à l'exception des feuilles d'*Olea europaea* qui sont utilisées fraîches. Elles sont ensuite stockées dans des sachets en papier fermés, à température ambiante, à l'abri de l'humidité et de la lumière pour la préparation des extraits :

- 15 g de poudre de *Berberis hispanica*, et d'*Arbutus unedo* sont macérés à l'ombre pendant 24 h dans 50 ml d'éthanol absolu (Elouarti *et al.,* 2011).
- 8 g de poudre de *Populus alba* sont macérés pendant 24 h à l'ombre dans 50 ml d'acétate d'éthyle (Haouat *et al.,* 2013).
- 15 g des feuilles d'*Olea europaea* sont macérés pendant 24 h à l'ombre dans 50 ml d'acétate d'éthyle (voir chapitre 3).

Ces différents extraits sont filtrés sous vide au rotavapor à 37°C. Les résidus sont ensuite récupérés et pesés.

III. Etude de l'effet des extraits de plantes contre *M. smegmatis* et *M. aurum* : Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB)

Les CMI et les CMB des extraits de *Berberis hispanica*, *Arbutus unedo* et *Populus alba* sont déterminées selon le protocole expérimental détaillé dans le chapitre 3. Alors que les CMI et les CMB d'*Olea europaea* sont déjà déterminés dans le chapitre 3.

Chaque expérience est répétée trois fois.

IV. Caractérisation physicochimique de la paroi de *M. smegmatis* et de *M. aurum*

La détermination de l'angle de contact est l'une des principales techniques d'identification des caractères physicochimiques d'une surface biologique. La mesure de cet angle permet de déterminer le caractère hydrophobe ou hydrophile et le caractère donneur/accepteur d'électrons de la surface membranaire (Vogler, 1998).

La mesure de l'angle de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité. Elle permet de calculer l'énergie de surface du liquide ou du solide. La méthode consiste à mesurer l'angle de la tangente (Figure 38) du profil d'une goutte déposée sur le substrat au point triple solide - liquide - vapeur par la technique de la goutte posée ou sessile drop fitting à l'aide d'un goniomètre (GBX Instruments, France). L'angle de contact initial de chaque liquide est mesuré après stabilisation des gouttes sur les surfaces des échantillons solides. Les angles de contact sont mesurés trois fois avec des cultures bactériennes différentes. La température de mesures est de 25 ± 2 ° C. Le principe de fonctionnement est assez simple, une caméra permet de relever le profil de la goutte posée sur le substrat au moyen d'une seringue et d'une plateforme mobile. Ensuite, le logiciel d'exploitation (le logiciel WINDROP) permet l'affichage des résultats et l'extraction automatique de l'angle de contact, en utilisant différents algorithmes.

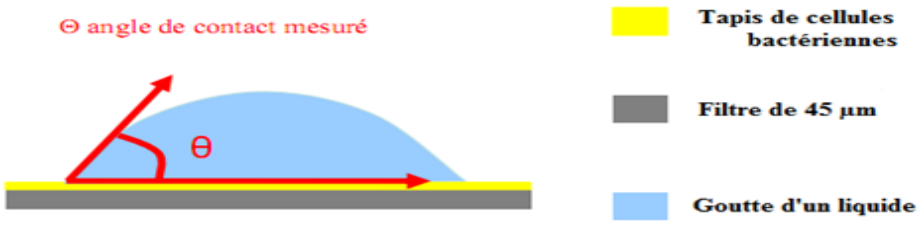

Figure 38 : Illustration de la mesure de l'angle de contact de cellules bactériennes

Pour estimer l'énergie libre totale interfaciale d'interaction, les angles de contact (θ) (Figure 38) des différentes entités en interactions doivent être mesurés avec deux liquides polaires (eau et formamide) et un liquide apolaire (diiodométhane) dont les caractéristiques énergétiques sont connues (Tableau 14) (van Oss, 2003).

Tableau 14 : Propriétés des tensions de surface de l'eau, du formamide et du diiodométhane

Liquides	$\gamma LW(mJ.m-2)$	$\gamma^{+}(mJ.m-2)$	$\gamma^{-}(mJ.m-2)$
Eau	21.8	25.5	25.5
Formamide	39	2.3	39.6
Diiodomethane	50.5	0	0

γLW : composante de Lifshitz-van der Waals, γ- : la base donneuse d'électrons ou Lewis-base et γ + : l'accepteur d'électrons ou Lewis-acide

Ensuite, tous les paramètres des caractéristiques physico-chimiques de surface (composante de Lifshitz-van der Waals (γ^{LW}), la base donneuse d'électrons ou Lewis-base (γ-) et l'accepteur d'électrons ou Lewis-acide (γ +)), et l'énergie libre de la surface de chaque échantillon (Giwi), sont calculées par l'équation de Young-Van Oss (van Oss *et al.*, 1987) :

$$\gamma_L(\cos\theta + 1) = 2(\gamma_S^{LW}\gamma_L^{LW})^{1/2} + 2(\gamma_S^{+}\gamma_L^{-})^{1/2} + 2(\gamma_S^{-}\gamma_L^{+})^{1/2}$$

Où les termes (S) et (L) désignent respectivement les phases solides de surface et liquide.

La composante acide-base de Lewis γ_S^{AB} est déterminée par :

$$\gamma_S^{A\,B} = 2(\gamma_S^{-}\gamma_S^{+})^{1/2}$$

Le degré d'hydrophobicité des échantillons est évalué par des mesures d'angle de contact et par l'approche de Van Oss et Giese (1995). Selon cette approche, le degré d'hydrophobicité d'un matériau donné (i) est exprimé en tant qu'énergie libre d'interaction entre deux entités de ce matériau immergé dans l'eau (w) : ΔGiwi. Cette dernière est évaluée à travers les composantes de tension superficielle des entités en interaction, selon la formule suivante :

$$\Delta\mathrm{Giwi} = -2\gamma_{iw} = -2\left[\left(\left(\gamma_i^{LW}\right)^{1/2} - \left(\gamma_w^{LW}\right)^{\frac{1}{2}}\right)^2 + 2\left((\gamma_i^{+}\gamma_i^{-})^{\frac{1}{2}} + (\gamma_w^{+}\gamma_w^{-})^{\frac{1}{2}} - (\gamma_i^{+}\gamma_w^{-})^{\frac{1}{2}} - (\gamma_w^{+}\gamma_i^{-})^{\frac{1}{2}}\right)\right]$$

Lorsque ΔGiwi est négatif, (la surface de la cellule microbienne ou du matériau) est hydrophobe. Inversement, la surface étudiée est hydrophile lorsque ΔGiwi est positif.

Le protocole de la mesure est le suivant ;

10 ml de chaque suspension bactérienne de *M. aurum* et de *M. smegmatis* sont centrifugés, resuspendus dans une solution de KNO_3 (0.1 M), puis filtrés sur une membrane de 0,45 µm afin d'avoir un tapis bactérien homogène (Figure 39).

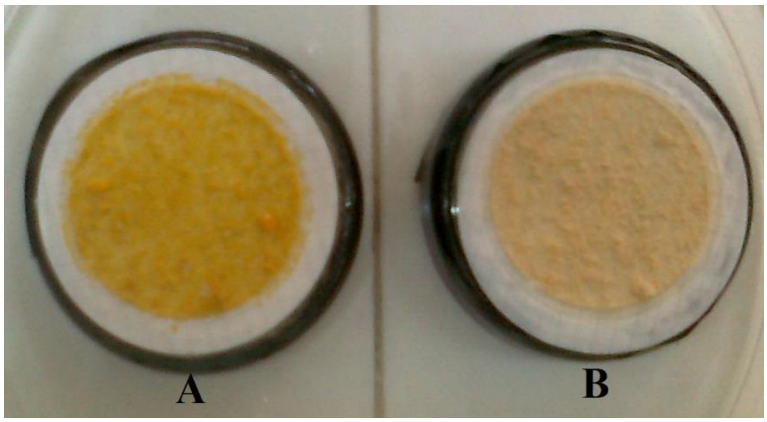

Figure 39 : Tapis de *M. aurum* (A) et de *M. smegmatis* (B) sur filtre de 0,45 µm

Une goutte du solvant étudié (Eau, Diodométhane ou Formamide) est déposée sur le tapis. L'angle de contact est ensuite mesuré.

V. Effet des extraits sur la physicochimie de la paroi des cellules mycobactériennes

10 ml d'une suspension bactérienne de *M. smegmatis* et *M. aurum* avec une DO de 0.6 sont préparés, puis, les extraits testés sont ajoutés afin d'obtenir les concentrations correspondant aux CMI. Enfin, les cellules sont incubées pendant une nuit. Après le temps d'incubation, les suspensions bactériennes sont filtrées à travers une membrane de nitrocellulose de 0,45 µm de porosité. Les membranes sont ensuite placées sur des boîtes de Pétri avant de passer aux mesures des angles de contact comme décrit auparavant avec les 3 liquides ; l'eau, le formamide et le diiodométhane.

VI. Cinétique de la formation de biofilm par *M. smegmatis* et *M. aurum*

La quantification du biofilm est effectuée quantitativement en utilisant la technique de coloration au cristal violet (Crémet *et al.,* 2013). Cette technique de quantification est parmi les méthodes indirectes d'estimation de la production de biofilm sur différents types de support (Djordjevic *et al.,* 2002). La coloration adsorbée est directement corrélée à la densité du biofilm formé, et sa solubilisation permet une quantification de celui-ci (Musk *et al.,* 2005). Cette méthode utilise la spectrophotométrie pour mesurer la capacité des souches bactériennes à adhérer sur les puits des microplaques en polypropylène. Le cristal violet colore les bactéries et la matrice des biofilms (Pantanella *et al.,* 2013).

100 µl d'une suspension bactérienne de densité équivalente au standard 0,5 de Mac Farland (10^8 UFC.ml^{-1}) sont ajoutés dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits en polypropylène en utilisant un bouillon sauton comme contrôle négatif. Les microplaques sont couvertes et incubées à 37 ° C pendant 12 jours. Le suivi de la formation de biofilm par les deux souches étudiées est réalisé quotidiennement : chaque puits est soigneusement vidé de la culture bactérienne, et rincés 3 fois à l'eau distillée en vue d'éliminer les cellules planctoniques non adhérées.

Après séchage à l'air pendant 30 min, les cellules adhérentes sur les parois du puits sont révélées après coloration à l'aide d'une solution aqueuse de cristal violet à 0,1 % dans de l'eau (m/v). Après un temps de contact de 15 minutes, l'excès de colorant est éliminé puis 3 ou 4 lavages à l'eau distillée sont effectués. Les puits sont enfin séchés à l'air libre.

Le cristal violet qui a pénétré dans les bactéries est remis en solution par l'ajout de 200 µl d'éthanol à 95%. Après 15 min, l'absorbance de la solution obtenue est mesurée à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La quantité de colorant retenue étant alors directement proportionnelle à la quantité de bactéries fixées.

Les résultats sont exprimés en D.O à 570 nm en fonction de temps. Chaque mesure est répétée en triplicat sur des cultures bactériennes indépendantes.

VII. L'activité Antibiofilm des extraits de plantes

1. Inhibition de l'adhésion cellulaire

Les différents extraits étudiés sont évalués pour leur capacité à inhiber l'adhésion de *M. smegmatis,* de *M. smegmatis* AI et de *M. aurum* à des concentrations des CMI. 100 µl de chaque extrait sont ajoutés aux puits d'une microplaque, et 100 µl d'eau distillée sont ajoutés dans le cas du contrôle négatif. Ensuite, des cultures standardisées (0,5 McFarland) de *M. smegmatis,* de *M. smegmatis* AI et de *M. aurum* sont ensuite rajoutées séparément dans les puits pour avoir un volume final de 200 µl dans chaque puits. Les plaques sont incubées à 37 °C pendant 72h. Après incubation, La quantification du biofilm est effectuée selon la procédure décrite précédemment (Sandasi *et al.,* 2010).

2. Inhibition de la croissance du biofilm

Des échantillons de 100 µl d'une culture standardisée (0,5 McFarland) de *M. smegmatis*, *M. smegmatis* AI et *M. aurum* sont introduits dans des puits d'une microplaque et incubés une nuit pour préformer un biofilm mycobactérien. Ensuite, 100 µl de chaque extrait sont ajoutés dans les puits afin d'obtenir une concentration finale de CMI, et 100 µl d'eau sont rajoutés en tant que contrôle négatif (Sandasi *et al.,* 2010). Les plaques sont ensuite incubées pendant 48 h avant que le dosage au cristal violet soit effectué comme décrit ci-dessus.

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{percentage d'inhibition} = \frac{\text{DO controle} - \text{DO experimentale}}{\text{DO controle}}$$

I. Etude de l'effet des extraits de plantes contre *M. smegmatis* et *M. aurum* : Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB)

Les résultats des CMI et des CMB des différents extraits étudiés sont représentés dans le Tableau 15 :

Tableau 15 : CMI et CMB des différents extraits vis **à** vis *M. smegmatis* et *M. aurm*

	CMI (mg de MS/ml)		**CMB (mg de MS/ml)**	
	M. smegmatis	*M. aurum*	*M. smegmatis*	*M. aurum*
Olea europaea	12.5	6.25	12.5	6.25
Berberis hispanica	0.39	0.195	0.39	0.195
Populus alba	6.25	6.25	ND	ND
Arbutus unedo	6.25	3.125	6.25	3.125

ND : non déterminé

D'après les résultats du Tableau 15, *M. smegmatis* et *M. aurum* sont sensibles à tous les extraits testés, mais l'extrait de *Berberis hispanica* est l'extrait le plus efficace avec des valeurs de CMI de 0,39 mg / ml et de 0,195 mg / ml pour *M. smegmatis* et *M. aurum* respectivement. Les extraits d'*Arbutus unedo* et de *populus alba*, ont présenté la même activité contre *M. smegmatis* avec une valeur de CMI de 6,25 mg / ml, par contre *M. aurum* est plus sensible à l'extrait d'*Arbutus unedo* (CMI= 3,125 mg / ml) qu'à l'extrait de *Populus alba* (CMI= 6,25 mg / ml). L'extrait des feuilles de l'olivier a inhibé la croissance de *M. smegmatis* et de *M. aurum* à des concentrations de 12.5 mg de MS/ml et de 6.25 mg de MS/ml, respectivement.

Les CMB des extraits d'*Arbutus unedo* de *Berberis hispanica* et d'*Olea europaea* sont similaires à leurs CMI pour *M. smegmatis* et *M. aurum*. Par contre *Populus alba* n'a présenté aucune activité bactéricide contre *M. smegmatis* et *M. aurum*.

Par ailleurs, *M. smegmatis* AI a présenté les mêmes valeurs de CMI et de CMB que *M. smegmatis* MC2 155, ce qui montre que la mutation de la souche AI n'a pas affecté sa sensibilité aux extraits des plantes étudiées.

II. Caractérisation physicochimique de la paroi de *M. smegmatis* et de *M. aurum*

Les propriétés phisico-chimiques de *M. aurum* et de *M. smegmatis* sont determinées par la méthode de l'angle de contact. Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau 16 :

Tableau 16 : Angles de contact de la paroi de *M. aurum* et de *M. smegmatis*

	Angles de contact des liquides (°)			Composants de tension de surface (mJ/m^2)			
	θw	θ_F	θ_D	γ^{LW}	γ +	γ -	ΔGiwi
M. smegmatis	64±0.16	60.2±1.23	40.6±0.91	39.3±0.46	0.3±0.11	26.2±0.89	-3.52
M. aurum	101,53± 0,47	76,73±0,15	42,43±0,11	38,28±0.05	0.38±0.04	0.49±0.13	-81,62

θw: Angle de contacte en utilisant l'eau ; θ_F : Angle de contacte en utilisant la formamide ; θ_D : Angle de contacte en utilisant le Diodométhane ; γ^{LW} : Composantes de Lifshitz-Van der waals de la surface ; γ + : Composante d'accepteur d'électron ; γ - : Composante de donneur d'électron; ΔGiwi : Energie libre de la surface.

L'angle de contact mesuré avec l'eau est utilisé comme une indication qualitative de l'hydrophobicité de la surface, et la valeur de l'énergie de surface ΔGiwi est utilisée comme une indication quantitative de l'hydrophobicité de la surface. Ainsi, les valeurs supérieures à 65° indiquent une surface hydrophobe, en revanche, les valeurs d'angle de contact de l'eau inférieures à 65° indiquent que la surface est hydrophile (Vogler, 1998), en outre, une valeur positive de ΔGiwi signifie que la surface biologique est hydrophile et une valeur négative indique qu'elle est hydrophobe (Van Oss, 1995). L'affinité au formamide reflète la basicité et inversement celle au diiodométhane reflète l'acidité.

Dans notre travail et comme le montre le Tableau 14, *M. aurum* est qualitativement hydrophobe puisque l'angle de contact avec l'eau est égal à 101,53° ± 0,47. Pour *M. smegmatis*, l'angle de contact calculé (64°±0.16) est très proche de la valeur limite (65°), ce qui montre que cette bactérie peut être également considérée hydrophobe. Ces résultats sont confirmés par les

valeurs négatives de l'énergie de surface ΔGiwi des deux souches testées (-3.52 mJ/m^{2}pour *M. smegmatis* et -81,62 mJ/m^2 pour *M. aurum*), ce qui indique que ces deux souches sont hydrophobes qualitativement et quantitativement avec une hydrophobicité plus marquée chez *M. aurum*.

Pour le caractère donneur d'électrons (γ -) / accepteur d'électrons (γ +) (Tableau 16), les résultats ont montré que le caractère donneur d'électron γ - des deux souches est supérieur au caractère accepteur d'électrons γ +. Le caractère donneur d'électron de *M. smegmatis* est supérieur à celui de *M. aurum*, avec une valeur du paramètre de base de Lewis (γ-) de 26.2±0.89 mJ m $^{-2}$ pour *M. smegmatis* et de 0.49±0.13 mJ m^{-2} pour *M. aurum*. De même, les deux souches sont des accepteurs faibles d'électrons avec des valeurs de γ + de 0.3±0.11 mJ m^{-2} pour *M. smegmatis* et de 0.38±0.04 mJ m $^{-2}$ pour *M. aurum. Ainsi,* les deux souches sont donc principalement donneuses d'électrons.

La valeur de γ^- permet également d'évaluer l'hydrophobicité d'une surface. En effet, lorsque la valeur de γ^- dépasse 27,9 mJ m^{-2}, la surface est caractérisée comme hydrophile et inversement, la surface est hydrophobe lorsque la valeur est inférieure à 27,9 mJ m^{-2} (Kaelble *et al.,* 1974). Ainsi, la surface des deux souches est hydrophobe (γ^-< 27,9 mJ m^{-2}), ce qui confirme les conclusions précédentes.

III. Effet des extraits sur la physicochimie de *M. smegmatis* et de *M. aurum*

Les propriétés physicochimiques des deux souches mycobacteriennes : *M. smegmatis* et *M. aurum*) après leur traitement avec les extraits de plantes de : *Olea europaea, Berberis hispanica, Arbutus unedo* et *Populus alba* sont présentés dans le Tableau 17 :

Tableau 17 : Effet des extraits sur la physicochimie de la paroi de *M. aurum* et *M. smegmatis*

		Angles de contact des liquides (°)			Composants de tension superficielle (mJ m^{-2})			
		θw	θ_F	θ_D	γ^{LW}	γ^-	γ^+	ΔGiwi
Olea europaea	***M.smegmatis***	30.86± 0.8	15.36± 0.32	59.76± 0.05	28.64± 0.03	38.62± 0.94	5.18± 0.11	11.96
	M. aurum	11.46± 0.2	9.9±1.47	50.66± 2.19	33.82± 1.23	53.07± 0.44	2.76± 0.44	27.61
Berberis hispanica	***M.smegmatis***	33.46± 0.28	15.73± 0.28	28.13± 0.23	44.88± 0.09	37.24± 0.28	0.92± 0.02	9.15
	M. aurum	20.86± 0.23	18.36± 1.00	41.4±0.26	38.81± 0.13	50.52± 0.65	1.27± 0.06	27.36
Arbutus unedo	***M.smegmatis***	32.7±0.00	32.36± 0.40	53.6±0.26	32.17± 0.15	46.35± 0.29	1.61± 0.11	24.54
	M. aurum	36.43± 0.37	45.66± 0.57	54.63± 0.37	31.59± 0.21	53.80± 1.03	0.27± 0.03	39.54
Populus alba	***M.smegmatis***	18.1±0.1	21.23± 0.73	68.33± 0.05	23.75± 0.03	52.42± 0.33	5.55± 0.12	23,5
	M. aurum	11.86± 0.25	13.56± 0.50	51.46± 0.28	33.38± 0.16	53.96± 0.17	2.63± 0.07	28.97

Le traitement avec les différents extraits étudiés a modifié les degrés d'hydrophobicité des deux souches, d'un point de vue qualitatif et quantitatif. En effet, les valeurs θw sont significativement diminuées avec des valeurs nettement inférieures à 65° (variant entre 11.46° et 36.43°). Ce qui indique que les deux souches mycobactériennes sont devenues qualitativement hydrophiles après les différents traitements. Le calcul de l'énergie libre ΔGiwi confirment ces résultats, en effet, toutes les valeurs de ΔGiwi des deux souches étudiées sont devenues positives après le traitement par les extraits de différentes plantes: l'extrait de *Berberis hispanica* a permis d'obtenir la valeur la plus faible de ΔGiwi (9.15 pour *M. smegmatis* et 27.36 pour *M. aurum*), suivi de l'extrait d'*Olea europaea* (11.96 pour *M. smegmatis* et 27.61 pour *M. aurum*), suivi de l'extrait de *Populus alba* (pour *M. smegmatis* 23,5 et 28.97 pour *M. aurum*) et enfin l'extrait d'*Arbutus unedo* (24.54 pour *M. smegmatis* et 39.54 pour *M. aurum*).

Ainsi, le traitement par les différents extraits des plantes a permis de changer l'hydrophobicité de *M. smegmatis* et de *M. aurum*, qui sont devenus qualitativement et quantitativement hydrophiles.

Les résultats de l'effet des extraits testés sur le caractère donneur d'électrons (γ -) et accepteur d'électrons (γ +) des deux souches mycobactériennes sont présentés dans le Tableau 17 : Les valeurs de γ^- varient entre 37.24±0.28 mJ m^{-2} et 53.96±0.17 mJ m^{-2}, et sont supérieurs aux valeurs de γ +, qui varient entre 0.27±0.03 mJ m^{-2} et 5.55±0.12 mJ m^{-2}. Donc, le traitement par les différents extraits de plante a permis de renforcer le caractère donneur d'électron des deux souches bactériennes. Ces résultats indiquent une acidité de la surface des deux souches, cette acidité est confirmée par les valeurs de θ_D qui sont supérieures aux valeurs de θ_F.

Ainsi, à la lumière de toutes ces découvertes, il apparaît clairement que la surface des cellules non traitées est à la fois qualitativement et quantitativement hydrophobes avec un caractère donneur d'électrons. Le traitement par les différents extraits a permis de renforcer le caractère hydrophile de la surface des cellules mycobactériennes.

IV. Cinétique de la formation des biofilms par *M. smegmatis* et *M. aurum*

La formation de biofilms par *M. smegmatis* et *M. aurum* est étudiée par mesure de la densité optique des cellules bactériennes adhérées au polypropylène à différentes périodes d'incubation allant jusqu'à 12 jours (Figure 40, 41).

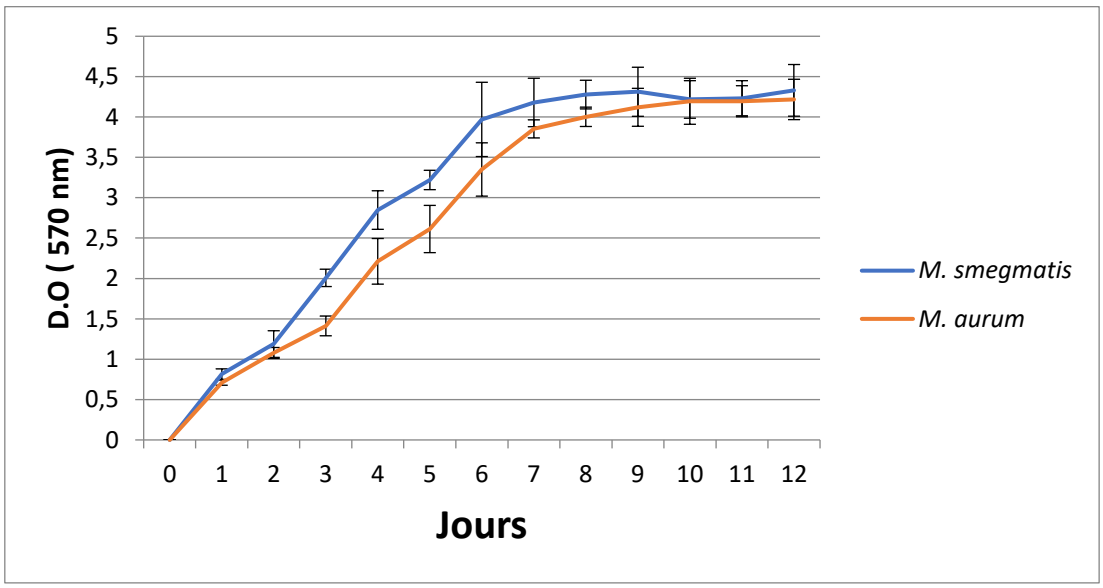

Figure 40 : Cinétique de la formation du biofilm par *M. smegmatis* et *M. aurum*

Les deux espèces de *Mycobacterium* adhérent tôt à la surface de polypropylène et forment un biofilm. La cinétique de formation de biofilms suit l'allure d'une courbe de croissance bactérienne standard, caractérisée par une augmentation d'adhésion dans les premiers jours pour atteindre un maximum et puis l'adhésion stabilise. La formation du biofilm chez *M. smegmatis* semble plus rapide que celle observée chez *M. aurum* (en particulier pour les premiers jours d'incubation) mais le test statistique ne montre aucune différence significative entre les deux espèces. Le maximum d'adhésion est atteint à partir du huitième jour pour *M. smegmatis* et à partir du dixième jour pour *M. aurum* (Figure 40).

Nos résultats montrent donc que ces bactéries ont une grande capacité à former un biofilm à la surface du polypropylène.

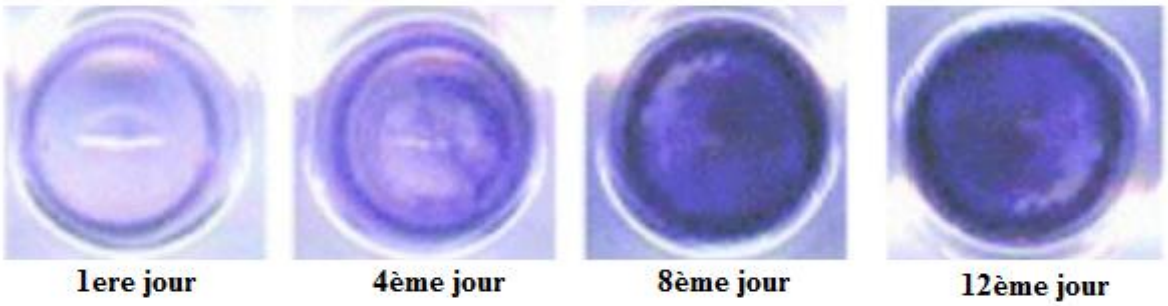

Figure 41 : Coloration du biofilm de *M. smegmatis* par le cristal violet à différents temps d'incubation

V. Activité Antibiofilm des extraits de plantes : inhibition de l'adhésion cellulaire et de la croissance du biofilm

L'effet des extraits de : *Olea europaea*, *Populus alba*, *Arbutus unedo* et *Berberis hispanica* sur l'inhibition de l'adhésion et du développement du biofilm mycobactérien est évalué par la technique de la coloration au cristal violet (Figure 42).

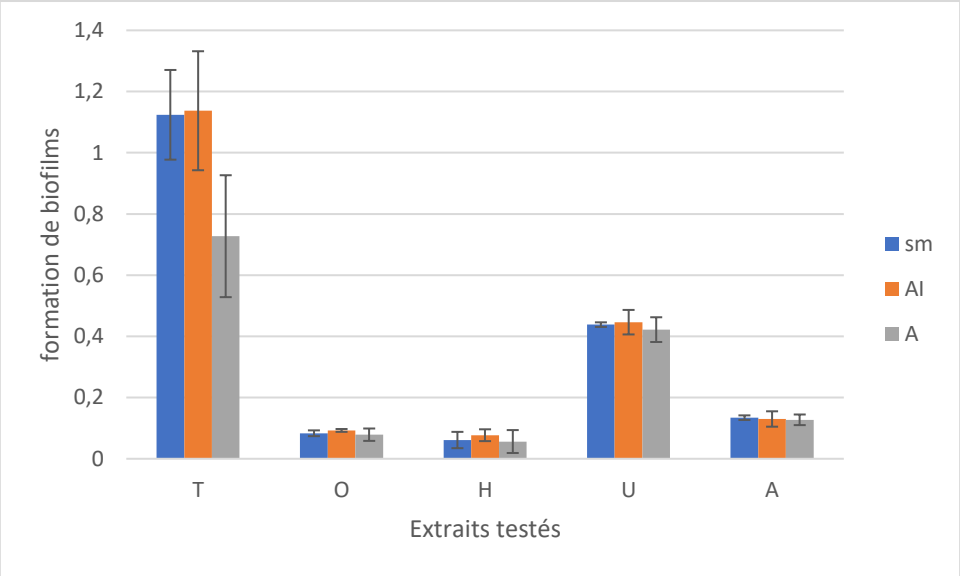

Figure 42 : Effets des différents extraits sur l'adhésion de *M. smegmatis* et de *M. aurum*. T : témoins ; O : extrait d'*Olea europaea* ; H : extrait de *Berberis hispanica* ; U : extrait d'*Arbutus unedo* ; A : extrait de *Populus alba ;* SM : *M. smegmatis* ; AI : *M. smegmatis* AI ; A : *M. aurum.*

Les résultats obtenus (Figure 42) montrent que tous les extraits testés aux concentrations des CMI ont la capacité d'inhiber l'adhésion de *M. smegmatis* et de *M. aurum*, avec des taux d'inhibition importants : *Berberis hispanica* (94.57% pour *M. smegmatis* et 92.29% pour *M. aurum*), *Olea europaea* (92.61% pour *M. smegmatis*; 89.27% pour *M. aurum*), *Populus alba* (88% pour *M. smegmatis*; 82.53% pour *M. aurum*) et *Arbutus unedo* (61% pour *M. smegmatis*; 41.95% pour *M. aurum*).

Les résultats de la Figure 42 montrent également que la souche *M. smegmatis* AI (produisant le lycopène) réagit de la même façon que *M. smegmatis* MC^2 155. Ce qui montre que la mutation de la souche AI n'affecte pas sa capacité à former les biofilms.

Par ailleurs les résultats obtenus pour *Arbutus unedo* sont significativement différents de ceux des autres extraits ; ce qui montre que cette dernière possède l'effet antiadhésif le plus faible (Figure 42).

La Figure suivante représente l'effet des extraits sur le développement de biofilms de *M. smegmatis* et de *M. aurum :*

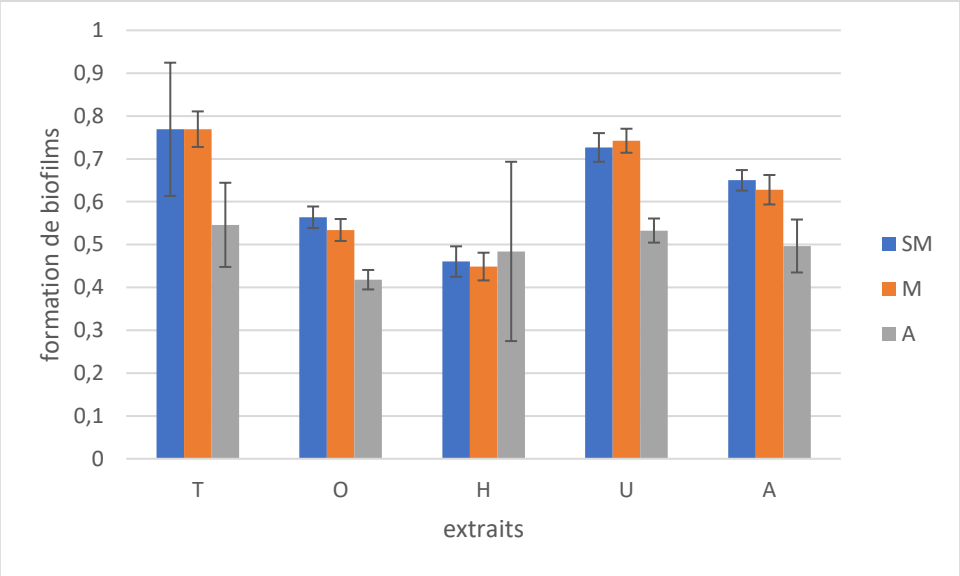

Figure 43 : Effets des différents extraits sur le développement des biofilms de *M. smegmatis* et de *M. aurum.* T : témoins ; O : extrait d'*Olea europaea* ; H : extrait de *Berberis hispanica* ; U : extrait d'*Arbutus unedo* ; A : extrait de *Populus alba ;* SM : *M. smegmatis* ; M : *M. smegmatis* AI ; A : *M. aurum.*

Les extraits testés dans ce travail montrent aussi une activité sur des biofilms préformés de *M. smegmatis* et de *M. aurum* aux concentrations des CMI (Figure 43). Les pourcentages d'inhibition contre *M. smegmatis* et *M. aurum* sont les suivants : *Berberis hispanica* (40.18% pour *M. smegmatis* et 26.55% pour *M. aurum*), *Olea europaea* (26.78% pour *M. smegmatis* et 23.46% pour *M. aurum*), *Populus alba* (15.47% pour *M. smegmatis* et 9.15% pour *M. aurum*) et *Arbutus unedo* (5.59% pour *M. smegmatis* et 2.56% pour *M. aurum*). A l'exception de l'extrait de cette dernière plante ; les résultats observés pour les autres extraits diffèrent significativement avec ceux du témoin.

Pour ce test aussi, aucune différence significative entre *M. smegmatis* MC_2 155 et *M. smegmatis* AI n'est observée dans le développement des biofilms.

Dans la présente étude, des extraits de quatre plantes : *Olea europaea, Berberis hispanica, Arbutus unedo* et *Populus alba* sont testés pour leur capacité à inhiber la croissance de *M. smegmatis* et de *M. aurum* : les valeurs des CMI varient entre 0.195 mg/ml et 12.5 mg/ml. Les résultats montrent que *Berberis hispanica* possède l'effet inhibiteur le plus élevé avec les plus faibles valeurs de la CMI, qui sont de 0.195 mg/ml contre *M. aurum* et de 0.39 mg/ml contre *M. smegmatis*, suivie d'*Arbutus unedo* et de *Populus alba* avec des valeurs de la CMI de 3.125 mg/ml et de 6.25 mg/ml, respectivement, contre *M. aurum* et de 6.25 mg/ml contre *M. smegmatis. Olea europaea* présente l'effet le plus faible avec des CMI de 6.25 mg/ml contre *M. aurum* et de 12.5 mg/ml contre *M. smegmatis.*

Pour les extraits de : *Olea europaea, Berberis hispanica, Arbutus unedo.* Le rapport CMB/CMI est égal à 1, ce qui indique que ces trois extraits ont un effet bactéricide contre les deux espèces mycobactériennes. Par contre *Populus alba* n'a présenté aucune activité bactéricide contre *M. smegmatis* et *M. aurum*, et ceci même à la concentration de 50 mg / ml, ce qui montre que cet extrait n'a pas d'activité bactéricide contre ces deux espèces mycobactériennes.

Dans la littérature, plusieurs travaux se sont également intéressés à l'effet antimycobactérien des plantes, comme par exemple :

- Elouarti et *al*. (2011) ont évaluer l'activité antimycobactérienne des extraits éthanoliques de *Berberis hispanica* et d'*Arbutus unedo*. *Berberis hispanica* a montré des valeurs des CMI de 0,15 mg/ml pour *M. aurum*, de 0,2 mg/ml pour *M. bovis* et de 1,1 mg/ml pour *M. smegmatis. Arbutus unedo* a montré des valeurs des CMI de 5.59 mg/ml pour *M. aurum* A + et de 6.02 mg/ ml pour *M. smegmatis* et *M. bovis* (Elouarti *et al.*, 2011). Ces valeurs sont proches de celles obtenues dans notre étude.
- Des extraits de 16 espèces de *Salvia* sud-africaines, couramment utilisées en médecine traditionnelle pour traiter diverses infections microbiennes, sont étudiés pour leur activité antimycobactérienne *in vitro*. Une activité importante est observée contre *M. tuberculosis* (CMI≤0,50 mg / ml). Les extraits de *S. radula, S. verbenaca et S. dolomitica* ont présenté l'activité la plus favorable (CMI=0,10 mg / ml) (Kamatou *et al.*, 2007).
- D'autres extraits ont montré une activité significative contre *Mycobacterium in vitro*, avec une CMI inférieure à 50 µg / ml. Ces plantes comprennent : *Berchemia discolor* avec une CMI de 12,5 µg / ml, *Warbugia salutaris* (25 µg / ml), *Terminalia*

sericea (25 µg / ml), *Bridelia micrantha* et *Diospyros mespiliformis* (12,5 µg / ml) (Green *et al.,* 2010).

- Dans une autre étude, Haouat (2013) a déterminé les CMI des extraits éthanoliques de quatre plantes contre *M. smegmatis* : *C. salvifolius, C. albidus, T. africana* et *T. gallica*, et elle a trouvé des valeurs entre 31.2 mg/ml et 54.8 mg/ml (Haouat, 2013). Ces valeurs sont supérieures à celles obtenues dans notre travail, donc les extraits de plantes testées dans cette étude sont doués d'une activité antimycobactérienne importante.
- Lall *et al.,* 2016 ont évalué l'extrait éthanolique de *E. natalensis* qui est révélé actif contre *M. tuberculosis* avec une CMI de 125 µg/ml (Lall *et al.,* 2016).
- *Salvia africana-lutea*, *Ficus sur* et *Sphedamnocarpus pruriens* ont montré une activité antimycobactérienne contre *M. smegmatis* avec des valeurs de CMI de 31,25, 62,5 et 62,5 µg/ml, respectivement (Oosthuizen *et al.,* 2018).
- L'activité antimycobactérienne de certaines plantes médicinales utilisées traditionnellement pour traiter les symptômes liés à la tuberculose est évaluée. Sur les 35 plantes testées, 11 espèces de plantes ont montré une activité anti-mycobactérienne avec une CMI allant de 500 à 31,25 µg/ml contre *M. tuberculosis*. Les extraits de plantes ont également montré une activité antimycobactérienne contre six souches cliniques multi-résistantes de *M. tuberculosis* (Gupta *et al.,* 2018).
- Six espèces de Rubiacées ont testées pour leur activité contre *M. tuberculosis*, les résultats obtenus ont révélé que les six extraits testés présentent une activité antimycobactérienne contre *M. tuberculosis* avec des valeurs de CMI allant de 39 à 312 µg/ml (Aro *et al.,* 2019).

Plusieurs études ont rapporté la relation entre la composition chimique des plantes et leur pouvoir antibactérien. Des études phytochimiques des plantes étudiées dans ce travail ont montré leur richesse en métabolites secondaires. En effet, les feuilles d'*Arbutus unedo* contiennent plusieurs composés phénoliques dont les tanins, les flavonoïdes et les glycosides phénoliques (Mrabti *et al.,* 2019). D'autres analyses phytochimiques ont prouvé la présence d'alcaloïdes, des coumarines, et des polyphénols dans *Berberis hispanica* (Elyoubi *et al.,* 2012). En outre, les polyphénols, dont les flavonoïdes, les coumarines et les acides organiques sont les composés majeurs des plantes du genre *Populus* (Haouat, 2013 ; Belkhodja *et al.,* 2016). Certaines études ont montré que les feuilles d'*Olea europaea* contiennent également des

grandes quantités des substances phénoliques dont les Sécoiridoïdes, les flavonoïdes, les phénols simples, les oléosides et les acides phénoliques (Edziri *et al.*, 2019).

Les polyphénols sont très connus dans la littérature par leurs propriétés biologiques responsables de l'effet de nombreuses plantes médicinales, ils ont des effets anti-inflammatoires, hépatoprotecteur, antitumoral, antiviral, antiVIH, antimicrobien, antifongique, antidiabétique, gastroprotecteur et antihyperlipidémique (Sanchez Avila et *al*, 2007 ; Gorzynik-Debicka *et al.*, 2018). L'effet antimycobactérien de ces molécules est bien établi dans la bibliographie. En effet, da Cruz *et al.*, 2012 ont montré que des polyphénols extraits à partir de plantes médicinales, utilisées traditionnellement pour traiter des maladies respiratoires, sont actifs *in vitro* contre *M. tuberculosis* (da Cruz *et al.*, 2012). Les polyphénols du thé sont également testés sur *M. tuberculosis in vivo*, et ils sont révélés actifs contre cette bactérie (Anand *et al.*, 2006).

L'adhésion initiale des micro-organismes à la surface de différents substrats est un processus physico-chimique complexe qui implique un certain nombre de paramètres de trois éléments essentiels : le support solide, la cellule microbienne et le milieu de suspension qui jouent un rôle important dans ce phénomène. La compréhension de ce phénomène nécessite l'étude des caractéristiques de ces éléments ; ce qui va nous permettra d'empêcher ou au moins de limiter l'adhésion cellulaire, et par conséquent la formation du biofilm. En effet, ces dernières années, plusieurs auteurs ont montré que, en fonction de la distance d'approche au substrat, différentes forces agissent sur les microorganismes. Il s'agit des interactions physicochimiques du type de Van der Waals, du paramètre donneur/accepteur d'électrons, de l'énergie de surface ainsi que de l'hydrophobie qui régissent l'adhérence sur les surfaces de matériaux (Barkai *et al.*, 2016).

Dans cette étude nous avons étudié les propriétés physicochimiques de deux espèces mycobactériennes : *M. smegmatis* et *M. aurum*. Ces informations peuvent constituer des données importantes pour prédire la fixation de ces deux souches sur un support donné. En effet, les rapports de littérature ont montré que des paramètres tels que l'hydrophobie, les propriétés de charge de surface et d'accepteur /donneur d'électrons (acide /base) peuvent avoir un effet significatif sur l'adhésion microbienne (Azelmad *et al.*, 2018). Le caractère hydrophobe / hydrophile et donneur / accepteur d'électro est caractérisé par la mesure de l'angle de contact à l'aide du goniomètre. Les résultats montrent que *M. smegmatis* et *M. aurum* sont hydrophobes qualitativement et quantitativement. Ces résultats sont en accord avec les données de la

littérature, qui montrent que la paroi des mycobactéries est extrêmement hydrophobe : MacLeod et Daugulis ont rapporté que *Mycobacterium* PYR-1 est très hydrophobe avec un angle de contact de 90° (MacLeod et Daugulis, 2005), dans une autre étude, Bastiaens *et al.*, ont montré que d'autres espèces de *Mycobacterium* sont hydrophobes, avec des angles de contact allant de 85° à 103° (Bastiaens *et al.,* 2000). Cette hydrophobicité est probablement due à la composition de la paroi des mycobactéries riche en lipides surtout les acide mycoliques, mais également peut être due à la surface rugueuse des mycobactéries ; en effet, Jeffs *et al.,*1999 ont découvert dans leur étude que les spores à surface rugueuse sont hydrophobes tandis que celles à surface lisse sont hydrophiles (Jeffs *et al.,*1999). Pour les propriétés donneur-accepteur d'électron, les résultats obtenus montrent que les deux souches sont principalement donneuses d'électrons avec des valeurs γ- de 26.2±0.89 mJ m $^{-2}$ pour *M. smegmatis* et de 0.49±0.13 mJ m $^{-2}$ pour *M. aurum*. Plusieurs auteurs ont rapporté aussi que les surfaces des cellules bactériennes sont principalement des donneurs d'électrons (Bos *et al.,* 1999 ; Boks et *al*. 2008, Barkai *et al.,* 2016). Des études ont signalé la relation entre la composition chimique de la surface d'un microorganisme et leurs propriétés d'accepteur d'électrons / donneurs d'électrons (acide-base). Ainsi, la composante de base de Lewis (γ-) de la surface est souvent dû à la présence de différents groupes chimiques à la surface de ces microorganismes, qui sont principalement chargés négativement, tels que la fonction carboxylate (COO-), la fonction amine (NH2), les groupes phosphates ($PO4^{-2}$) ou sulfate (SO3). Ces groupes chimiques appartiennent aux principales macromolécules qui constituent les membranes externes des microorganismes (lipopolysaccharides, lipoprotéines et phospholipides). En outre, la propriété d'accepteur d'électrons est en accord avec une concentration élevée de polysaccharide et une concentration faible de protéines (Hamadi *et al.,* 2008).

Il est très utile d'étudier comment les propriétés de surface des souches mycobactériennes pourraient être affectées si elles sont exposées à une substance possédant des propriétés antimycobactériennes, car chaque famille de micro-organisme possède des propriétés physico-chimiques qui lui sont propres, et toute modification des caractéristiques énergétiques de surface des microorganismes peut entraîner une augmentation ou une diminution de l'adhésion bactérienne (Carniello *et al.,* 2018). Les résultats observés dans cette étude révèlent que les propriétés de surface initiales de *M. smegmatis* et de *M. aurum* sont significativement modifiées après le traitement avec les extraits des différentes plantes testées. En effet, les deux souches testées sont devenues très hydrophiles et leur propriété de donneur d'électron est accentuée. Ces modifications peuvent être liées à la composition chimique de ces extraits riches en

polyphénols. Ces derniers sont des composés polyhydroxy, polaires et connus par leur caractère hydrophile, ce groupe hydroxyle induit un caractère donneur d'électrons plus fort de la surface par des paires d'électrons de l'atome d'oxygène (Sadiki *et al.*, 2014). Donc, les extraits étudiés pourraient être très efficaces dans le traitement des surfaces surtout dans le domaine médical afin de prévenir l'adhérence et la formation de biofilms par des microorganismes pathogènes, tels que les mycobactéries. Des données bibliographiques ont rapporté des changements dans les propriétés physicochimiques des microorganismes lorsqu'ils sont exposés aux molécules à effet inhibiteur : Barkai *et al.,* 2016 ont étudié l'effet de carvacrole sur la physicochimie des spores de *Penicillium expansum,* et ont montré que le carvacrole influence l'hydrophobicité et les propriétés donneur-accepteur d'électron des spores qui sont devenus plus hydrophiles avec un caractère donneur d'électron important (Barkai *et al.,* 2015).

L'adhésion cellulaire est influencée à la fois par les propriétés physicochimiques du microorganisme et du substrat. La surface de polypropylène, support de fixation et de formation de biofilm dans ce travail, est caractérisée comme étant hydrophobe (Pagedar *et al.*, 2010). Dans cette étude, nous avons mis en évidence que *M. smegmatis* et *M. aurum* sont capables de s'adhérer sur la microplaque en polypropylène. Cette fixation est due principalement due aux interactions physicochimiques entre le substrat et les deux souches mycobactériennes. Ainsi, Il est généralement admis que les interactions hydrophobes sont attractives tandis que les interactions hydrophiles sont répulsives. Plusieurs études ont montré que les bactéries adhèrent en plus grand nombre sur des surfaces hydrophobes que sur des surfaces hydrophiles (Hamadi *et al.,* 2012). Grivet et ses collaborateurs ont aussi mis en évidence que l'adhésion de quatre souches de *Streptococcus* sur des alliages dentaires dépend de leurs caractéristiques énergétiques, la souche la plus hydrophile présentant les plus faibles taux d'adhésion (Grivet *et al.,* 2000).

Ces remarques sont confirmées par les tests de fixation des souches traitées par les extraits. En effet, les souches, traitées avec les extraits de plantes, deviennent hydrophiles et forment moins de biofilm sur les microplaques en polypropylène. L'extrait de *Berberis hispanica* qui a l'effet le plus prononcé sur l'hydrophobicité des deux souches a donné le taux d'inhibition d'adhésion le plus élevé. De même, l'extrait d'*Arbutus unedo* qui a l'effet le plus faible sur la physicochimie des deux souches a enregistré le taux d'inhibition d'adhésion le plus faible. Ce qui montre que le changement dans la physicochimie des deux souches est responsable à l'effet antiadhésif des extraits. Des résultats similaires sont observés dans le cas de traitement des

surfaces des matériaux : De nombreuses études ont montré qu'un prétraitement du substrat par certaines molécules antimicrobiennes peut réduire l'adhésion microbienne (Barkai *et al.,* 2015 ; Sadiki *et al.,* 2014).

En plus des propriétés physicochimiques, l'effet antibiofilm des extraits peut être aussi dû à l'activité antimycobactérienne des extraits testés. Plusieurs études (Slobodníková *et al.,* 2016, Álvarez-Martínez *et al.,* 2019) ont montré que l'activité antimicrobienne des plantes est due à des composés phénoliques (coumarines, des tannins ou des flavonoïdes…etc.). Il est démontré que ces composés s'associent aux protéines bactériennes et inhibent l'adhésion microbienne, les enzymes, les protéines de transport et la synthèse de l'enveloppe cellulaire (Upadhyay *et al.,* 2014 ; Slobodníková *et al.,* 2016). Nos extraits ont probablement inhibé la formation des biofilms mycobactériens via certains de ces mécanismes, et comme l'adhésion est la première étape de la formation de biofilm (Vasse *et al.,* 2017), les substances qui empêchent l'adhésion bactérienne peuvent être utilisés comme médicaments anti-biofilm.

Dans la présente étude, nous avons mis en évidence la capacité de *M. smegmatis* et de *M. aurum* de former un biofilm sur la microplaque en polypropylène. Pour tester l'effet de lycopène sur la formation de biofilm, *M. smegmatis* AI (une souche produisant le lycopène) est étudié dans ce travail. Les résultats n'ont montré aucune différence significative entre *M. smegmatis* MC2 155 et *M. smegmatis* AI dans la quantité de biofilm formé et la sensibilité aux différents extraits de plantes évalués. Ce qui montre que le lycopène n'a pas d'effet sur la capacité de la bactérie à se fixer et à produire un biofilm.

Par ailleurs, plusieurs études ont analysé le développement des biofilms mycobactériens et ont montré que la cinétique de la formation de ces structures est analogue à celle mise en évidence dans la présente étude (Esteban *et al.,* 2008 ; Ojha *et al.,* 2008).

L'aptitude de la formation des biofilms par les mycobactéries est confirmée par d'autres travaux. En effet, il est établi que ces structures sont produites par plusieurs mycobactéries, comme par exemple : *M. smegmatis M. tuberculosis*, *M. avium M. marinum* et *M. fortuitum* (Shi *et al.,* 2011 ; Abidi *et al.,* 2014 ; Faria *et al.,* 2015 ; Bhunu *et al.,* 2017 ; Ojha, 2018).

Plusieurs problèmes sont associés aux biofilms mycobactériens : les mycobactéries non tuberculeuses sont des habitants normaux des réseaux de distribution d'eau potable et de la plomberie domestique. On en trouve un nombre élevé attachées dans des biofilms à la surface

des tuyaux (Liu *et al.,* 2016 ; Loret et Dumoutier, 2019). Les biofilms mycobactériens sont aussi responsables de plusieurs problèmes dans le domaine de la pisciculture, et le domaine hospitalier (Fennelly *et al.,* 2016). D'où la nécessité de trouver une solution pour ce problème croissant.

Les quatre extraits de plantes sont étudiés également pour leur capacité à inhiber un biofilm mycobactérien préformé, et les résultats ont montré que l'inhibition de l'adhésion bactérienne est beaucoup plus efficace que l'inhibition du biofilm préformé. Cependant, ce problème peut être résolu en augmentant les concentrations des extraits et le temps de contact des extraits avec les bactéries. Ces résultats confirment des rapports antérieurs selon lesquels l'inhibition de la fixation des cellules sur un substrat est plus facile que celle de la croissance d'un biofilm déjà établi (Solokhina *et al.,* 2018 ; Marini *et al.,* 2019). Cette activité antibiofilm réduite des extraits testés peut être expliquée par le fait que les cellules d'un biofilm sont plus résistantes aux agents antimicrobiens que les cellules en suspension libre (Solokhina *et al.,* 2018). Certaines données ont montré que certaines bactéries pathogènes en biofilm sont 100 à 1000 fois plus résistantes aux antibiotiques testés que leurs homologues planctoniques (Liu et yang, 2019). Plusieurs facteurs sont responsables de cette résistance à savoir : la présence de l'exopolysaccharide qui entoure les cellules du biofilm, et la charge négative de ce dernier qui limite la pénétration des molécules par attraction de charge, (Singh *et al.,* 2017). D'autres mécanismes incluent la dégradation, l'inactivation de l'agent antimicrobien et la présence des pompes d'efflux qui expulsent les médicaments des cellules (Singh *et al.,* 2017). Un autre facteur est le ralentissement du taux de croissance des biofilms par rapport aux cellules planctoniques en raison de la réduction des apports en nutriments et en oxygène. De nombreux agents antimicrobiens se sont révélés efficaces contre les microorganismes qui se développent et se divisent rapidement. En conséquence, le faible taux de croissance observé dans les biofilms les rend moins susceptibles aux agents antimicrobiens normalement efficaces contre les cellules métaboliquement actives (Liu et yang., 2019).

La tuberculose est une des maladies infectieuses les plus fréquentes, et demeure actuellement une des principales causes de décès à l'échelle mondiale. Son éradication représente un challenge continu pour les cliniciens et les chercheurs. D'où l'importance de la présente étude dont l'objectif est d'évaluer l'activité des extraits de quatre plantes différentes (*Olea europaea, Berberis hispanica, Populus alba* et d'*Arbutus unedo)* contre *M. smegmatis* et *M. aurum* à l'état planctonique et en mode biofilm, et d'étudier l'impact des paramètres physicochimiques sur l'adhésion et la formation de biofilm par ces deux souches.

Les extraits des plantes testées ont montré ainsi une activité antimycobactérienne importante avec des valeurs de CMI faibles. L'extrait de *Berberis hispanica* était le plus efficace.

Pour les extraits de : *Olea europaea, Berberis hispanica, Arbutus unedo* ont un effet bactéricide contre les deux espèces mycobactériennes. Par contre *Populus alba* n'a présenté aucune activité bactéricide contre *M. smegmatis* et *M. aurum*.

Ensuite, l'étude par la technique de l'angle de contact de la physicochimie des deux souches étudiées a montré que les deux souches sont hydrophobes avec un caractère donneur d'électron. Ce caractère hydrophobe des souches étudiées a favorisé leur capacité à s'adhérer sur la microplaque en polypropylène. En plus, l'étude de l'effet de ces extraits sur la physicochimie et la formation de biofilm par *M. smegmatis* et *M. aurum* a montré que les quatre extraits ont diminué le caractère hydrophobe, et donc ont renforcé le caractère hydrophile. Cette modification de la physicochimie est à l'origine de l'effet inhibiteur observé sur l'adhésion cellulaire la formation du biofilm. Les résultats de cette étude ont montré aussi que le lycopène n'a aucun effet sur la formation du biofilm mycobactérien.

A la lumière des résultats obtenus dans la présente étude ; nous pouvons conclure que les extraits des quatre plantes : *Olea europaea, Berberis hispanica, Populus alba* et *Arbutus unedo* sont doués d'une activité mycobactérienne prometteuse, et malgré que *Populus alba* n'a pas présenté une activité bactéricide contre *M. smegmatis* et *M. aurum*, l'activité antibiofilm de cette plante est importante. Les extraits étudiés peuvent être donc utilisés dans des nouvelles formulations des médicaments antituberculeux. En plus, la capacité de ces extraits à modifier les propriétés de surface des mycobactéries peut être exploitée pour empêcher l'adhésion et la formation des biofilms qui sont à l'origine de plusieurs problèmes surtout dans le domaine médical.

Conclusion générale et perspectives

En raison de la multitude de rapports récents qui suggèrent un rôle important du lycopène dans la santé humaine, la demande pour des produits alimentaires et nutraceutiques riches en lycopène est en augmentation. La plupart du lycopène actuellement utilisé est synthétisés chimiquement. Cependant, cette méthode pose énormément des inconvénients à savoir : la complexité du processus, et son cout élevé, en plus de la présence des résidus toxiques dans le produit final. A mesure que la demande des consommateurs pour des additifs alimentaires naturels de haute qualité augmente, les sources naturelles gagnent en importance. La tomate est la source de lycopène naturel la plus utilisée, avec comme inconvénient une faible teneur (30 mg kg^{-1}), en plus du processus pénible de purification grâce au mélange des caroténoïdes produites par les tomates. De nombreuses bactéries produisent également le lycopène. La production de biomasse bactérienne est généralement facile, avec des taux de croissance élevés. La production du lycopène à l'aide de bactéries pourrait donc être avantageuse par rapport aux méthodes classiques de production.

De ce fait, la première partie de notre travail (chapitre 1 et 2) est focalisé sur l'exploitation des mycobactéries non pathogènes comme système de production du lycopène. Dans ce cadre spécifique, nous avons décidé de produire ce carotène chez *M. smegmatis*. Ainsi, les gènes, qui codent pour la synthèse du lycopène de *Mycobacterium aurum*, sont exprimés chez *M. smegmatis*. Le résultat obtenu correspond à l'obtention de colonies orange témoignant de l'expression des gènes du lycopène chez *M. smegmatis*. Ces gènes exprimés sont *crtE*, *crtB* et *crtI* qui codent respectivement pour la synthèse du GGPP, du phytoène et du lycopène, ces gènes sont portés par le plasmide pC51. La souche transformée produit le lycopène avec un rendement de 1,41 mg/g de poids sec. A fin d'améliorer la production du lycopène par le transformant, un mutant rouge (*M. smegmatris* AI) est sélectionné par UV à partir de *M. smegmatis* transformé par pC51 ; l'étude de la nature de la mutation a permis de conclure qu'il s'agit d'une mutation au niveau du chromosome bactérien. Ce mutant produit le lycopène avec un rendement important de 22,50 ± 2,13 mg/g de poids sec. La comparaison de ce rendement avec les données de la bibliographie montre que la quantité de lycopène produite par le mutant isolé est très importante, ce qui suggère que ce mutant pourrait être utilisé comme un système de production de ce carotène. Nous avons montré également que la production du lycopène par *M. smegmatis* AI, contenant pC51, est optimisée pour atteindre 25,787 mg/g, lorsque la culture est réalisée à pH 5,5 en présence de la lumière à une température de 37°C et avec une vitesse d'agitation de 120 rpm.

Le chapitre deux est consacré à valoriser bio technologiquement le lycopène ; ainsi deux applications sont étudiées :

La première consiste à utiliser le lycopène comme antioxydant dans l'huile de soja au cours du chauffage à des températures de friture. Pour cela, l'huile de soja contenant 50 mg / l de lycopène et le témoin (huile sans lycopène) sont chauffés à 180 ° C pendant 36 heures. Les échantillons sont analysés toutes les 6 h pour leur teneur en peroxyde et leur acidité. Les résultats obtenus ont montré que l'ajout du lycopène a réduit la teneur en peroxyde et l'acidité de l'huile par 65,89% et 29,39%, respectivement, après 36 h de chauffage par rapport au témoin. L'évaluation sensorielle, a permis de conclure que l'huile contenant le lycopène garde les propriétés organoleptiques des chips lors de la friture. Donc le lycopène peut être utilisé comme conservateur naturel des huiles végétales lors de la friture.

La deuxième application biotechnologique du lycopène consiste a utilisé le lycopène dans une crème protectrice contre les radiations UV. Dans un premier temps, la capacité du lycopène à protéger contre les UV est évalué *in vivo* et *in vitro* contre les cellules de *M. smegmatis*. Les résultats obtenus ont montré que le lycopène est capable de protéger les cellules de *M. smegmatis* contre les effets néfastes des UV *in vitro* et *in vivo*. Dans un deuxième temps, le lycopène est mélangé avec le beurre de karité afin d'obtenir une crème à base du lycopène. Cette crème s'est révélée efficace dans la protection de la peau des lapins contre les UV. De ce fait, elle peut être utilisée comme écran solaire.

Le troisième chapitre de notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche de nouvelles substances à effet antimycobactérien. Notre travail est consacré à l'étude de l'activité antimycobactérienne des feuilles de l'olivier. Nous avons obtenu les résultats suivants :

L'étude sur les cultures planctoniques a montré que l'extrait aqueux possède un effet inhibiteur contre *M. smegmatis* et *M. aurum.* La vérification de cet effet 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 feuilles de l'olivier, en fonction du solvant d'extraction utilisé, a montré que l'extrait d'acétate d'éthyle présente l'effet inhibiteur le plus

important. De plus, l'activité de l'extrait des feuilles fraiches s'est révélée meilleure que celle de l'extrait des feuilles sèches.

L'extrait des feuilles de l'olivier a un effet bactéricide, les valeurs de CMI et CMB sont identiques et sont respectivement égales à 6.25 mg de MS/ml chez *M. aurum* et à 12.5 mg de MS/ml chez *M. smegmatis*.

L'extrait des feuilles de l'olivier n'a aucun effet sur la paroi de *M. smegmatis*, ce qui suggère que cet extrait agit au niveau d'autres sites par d'autres mécanismes d'action.

La séparation chromatographique a permis de fractionner les différents constituants de l'extrait et l'étude phytochimique a montré que les substances actives sont des polyphénols autres que les flavonoïdes et les tanins.

Le dernier chapitre (le chapitre 4) a consisté premièrement à évaluer l'activité des extraits de trois plantes : *Berberis hispanica, Populus alba* et *Arbutus unedo* sur la croissance de *M. smegmatis* et *M. aurum* à l'état planctonique. Les résultats obtenus ont montré que *Berberis hispanica* possède l'effet inhibiteur le plus élevé avec les plus faibles valeurs de la CMI, qui sont de 0.195 mg/ml contre *M. aurum* et de 0.39 mg/ml contre *M. smegmatis*, suivie d'*Arbutus unedo* et de *Populus alba* avec des valeurs de la CMI de 3.125 mg/ml et de 6.25 mg/ml, respectivement, contre *M. aurum* et de 6.25 mg/ml contre *M. smegmatis.* Pour les extraits de : *Berberis hispanica*, *Arbutus unedo.* Le rapport CMB / CMI est égal à 1, ce qui indique que ces extraits ont un effet bactéricide contre les deux espèces mycobactériennes. Par contre *Populus alba* n'a présenté aucune activité bactéricide contre *M. smegmatis* et *M. aurum,* à la concentration de 50 mg / ml, ce qui montre que cet extrait a une activité bactériostatique contre ces deux espèces mycobactériennes.

La deuxième partie de ce chapitre a consisté à étudier les propriétés physicochimiques de *M. smegmatis* et de *M. aurum* par la méthode de l'angle de contact, évaluer l'effet des extraits d'*Olea europaea, de Berberis hispanica, de Populus alba* et *d'Arbutus unedo* sur la physicochimie des deux souches étudiées, et mettre en évidence l'impact des paramètres physicochimiques des souches étudiées sur la formation du biofilm. En effet, la caractérisation physico-chimique, a montré que la paroi de *M. aurum* et de *M. smegmatis* est hydrophobe et possède un caractère donneur d'électrons important. Ces caractéristiques sont des facteurs importants dans le phénomène d'adhésion et de formation du biofilm mycobactérien. L'étude

de l'adhésion, a montré que *M. smegmatis* et *M. aurum* sont capables de former des biofilms sur la microplaque en polypropylène. Cette capacité d'adhésion est le résultat de leur caractère hydrophobe.

Le traitement des souches par les extraits a changé le caractère hydrophobe des deux souches qui sont devenu hydrophiles, et le caractère donneur d'électron est accentué. Les tests d'adhésion des deux souches après traitement avec les quatre extraits ont montré une diminution importante dans le pouvoir des deux souches à former un biofilm. Ceci est expliqué par le caractère hydrophile requis apprès le traitement par les extraits. Donc les quatre extraits testés inhibent la formation du biofilm mycobactérien : l'extrait de *Berberis hispanica* était le plus actif, tandis que celui d'*Arbutus unedo* était le moins actif. L'étude de ces extraits sur un biofilm mycobactérien préformé a montré une efficacité moindre en comparaison avec celle d'inhibition de l'adhésion cellulaire. Ceci est expliqué par la résistance développée par le biofilm. L'élimination complète du biofilm préformé peut être obtenue en augmentant la concentration des extraits.

On propose pour la suite de ce travail, les perspectives suivantes :

- ☺ Réduire les coûts de production du lycopène par *M. smegmatis* AI en utilisant des milieux de cultures peu coûteux.
- ☺ Isolement d'un mutant de *M. smegmatis* AI a temps de génération plus court.
- ☺ Intégration des gènes *crtE*, *crtB* et *crtI* qui codent respectivement pour la synthèse du GGPP, du phytoène et du lycopène dans le chromosome de *M. smegmatis* AI.
- ☺ Mise au point d'une méthode permettant l'extraction du lycopène sans l'utilisation de solvant.
- ☺ L'évaluation de l'activité de l'extrait des feuilles de l'olivier sur les macrophages péritonéaux du rat infectés par des mycobactéries.
- ☺ Etudes des fractions actives de l'extrait des feuilles de l'olivier contre le biofilm mycobactérien.
- ☺ Etude de l'effet synergétique des extraits contre les mycobactéries planctoniques et en biofilm.
- ☺ Etude de l'effet des différents extraits sur des souches mycobactériennes résistantes.
- ☺ Identification chimique des principes actifs des extraits étudiés

Références bibliographiques

Abdul-Hamid, M., and Salah, M. 2013. Lycopene reduces deltamethrin effects induced thyroid toxicity and DNA damage in albino rats. *The Journal of Basic and Applied Zoology*. 66 (4) : 155-163.

Abdulkarim, S. M., Long, K., Lai, O. M., Muhammad, S. K. S., Ghazali, H. M. 2007. Frying quality and stability of high-oleic *Moringa oleifera* seed oil in comparison with other vegetable oils. *Food Chemistry*. 105(4) : 1382-1389.

Abidi, S. H., Ahmed, K., Sherwani, S. K., Bibi, N., Kazmi, S. U. 2014. Detection of *Mycobacterium smegmatis* biofilm and its control by natural agents. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* 3 : 801-812.

Aínsa, J. A., Pérez, E., Pelicic, V., Berthet, F. X., Gicquel, B., Martín, C. 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*. *Molecular microbiology*. 24(2) : 431-441.

Alavi, M. R., Shukla, H. D., Whitaker, B., Arnold, J., Shahamat, M. 2007. Attachment and biofilm formation of *Mycobacterium marinum* on a hydrophobic surface at the air interface. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 23(1) : 93.

Álvarez-Martínez, F. J., Barrajón-Catalán, E., Encinar, J. A., Rodríguez-Díaz, J. C., Micol, V. 2019. Antimicrobial capacity of plant polyphenols against gram-positive bacteria: A comprehensive review. *Current medicinal chemistry*.

An, K., Zhao, D., Wang, Z., Wu, J., Xu, Y., Xiao, G. 2016. Comparison of different drying methods on Chinese ginger (*Zingiber officinale Roscoe*): Changes in volatiles, chemical profile, antioxidant properties, and microstructure. *Food chemistry.* 197 : 1292-1300.

Anand, P. K., Kaul, D., Sharma, M. 2006. Green tea polyphenol inhibits *Mycobacterium tuberculosis* survival within human macrophages. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 38(4) : 600-609.

Anon. Directive (95/45/EC) laying down specific purity criteria concerning colors for use in foodstuffs. *Official Journal of the European Communities* 1995, No. L 226, 22.9.95, 1–45.

Arab, L., Steck, S. 2000. Lycopene and cardiovascular disease. *The American journal of clinical nutrition.* 71(6) : 1691S-1695S.

Aro, A. O., Jean Paul, D., Goddard, A., Fonteh, P., Kayoka-Kabongo, P., McGaw, L. J. 2019. *In vitro* antimycobacterial, apoptosis-inducing potential and immunomodulatory activity of some *Rubiaceae* species. *Frontiers in pharmacology*. 10 : 185.

Arora, K., Whiteford, D.C., Lau-Bonilla, D., Davitt, C.M., Dahl, J.L. 2008. Inactivation of lsr2 results in a hypermotile phenotype in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology*.190(12) :4291-300.

Aust, O., Stahl, W., Sies, H., Tronnier, H., Heinrich, U. 2005. Supplementation with tomato-based products increases lycopene, phytofluene, and phytoene levels in human serum and

protects against UV-light-induced erythema. *International journal for vitamin and nutrition research*. 75(1) : 54-60.

Azelmad, K., Hamadi, F., Mimouni, R., Amzil, K., Latrache, H. 2018. Physicochemical characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from catering substratum surface and investigation of their theoretical adhesion. *Surfaces and Interfaces*. 12 : 26-30.

Bailey, J. R. 2015. Lycopene : Food Sources, Potential Role in Human Health and Antioxidant Effects. *Nova Science*.

Barberis, I., Bragazzi, N. L., Galluzzo, L., Martini, M. 2017. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's *bacillus*. *Journal of preventive medicine and hygiene*. 58(1) : E9.

Barkai, H., El abed, S., Sadiki, M.,Iraqui, H, M., Ibnsouda, K. S. 2016. A study on the impact of the adhesion of *Penicillium expansum* on the physicochemical surface properties of cedar wood. *The Journal of Adhesion*. 92(5) : 341-348.

Barkai, H., Sadiki, M., El abed, S., EL harchli, H., Boutahari, S., Ibnsouda, K. S. 2015. The Effect of Carvacrol and Carvone Treatments on the Cedar Wood SurfacePhysico-chemical Properties. *International Journal of Scientific & Engineering Research*. 6 (6)

Barreiro, C., Barredo, J. L. 2018. Carotenoids Production: A Healthy and Profitable Industry. *In Microbial Carotenoids.* 45-55.

Basaraba, R. J., and Ojha, A. K. 2017. Mycobacterial biofilms: revisiting tuberculosis bacilli in extracellular necrotizing lesions. *Microbiology Spectrum*. 5(3):TBTB2-0024-2016.

Bastiaens, L., Springael, D., Wattiau, P., Harms, H., deWachter, R., Verachtert, H., Diels, L. 2000. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 :1834-43.

BCC research. 2011. Food And Beverage. The global market for carotenoids. September 2011: Report code: FOD025D Wellesley, MA.

Belkhodja, H., Meddah, B., Touil, A.T., Şekeroğlu, N., Sonnet, P. 2016. Chemical composition and properties of essential oil of *rosmarinus officinalis* and *populus alba*. *world journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. 5041 : 108-119.

Bellon Fontaine, M.N., Rault, J., van Oss, C. J. 1996. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 7(1-2) : 47-53.

Bertani, S., Houel, E., Bourdy, G., Stien, D., Jullian, V., Landau, I., Deharo, E. 2007. *Quassia amara* L. (*Simaroubaceae*) leaf tea: Effect of the growing stage and desiccation status on the antimalarial activity of a traditional preparation. *Journal of Ethnopharmacology*. 111(1) : 40-42.

Bhar, H., Balouk, A. 2011. Les plantes aromatiques et medecinales, Ces plantes odorantes qui soulagent la douleur. *L'espace marocain*. 68(2) : 20-27.

Bhat, A. H., Dar, K. B., Anees, S., Zargar, M. A., Masood, A., Sofi, M. A., Ganie, S. A. 2015. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 74 : 101-110.

Bhataya, A., Schmidt-Dannert, C., Lee, P. C. 2009. Metabolic engineering of *Pichia pastoris* X-33 for lycopene production. *Process Biochemistry*. 44(10) : 1095-1102.

Bhunu, B., Mautsa, R., Mukanganyama, S. 2017. Inhibition of biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis* by *Parinari curatellifolia* leaf extracts. *BMC complementary and alternative medicine*. 17(1) : 285.

Billings, N., Birjiniuk, A., Samad, T. S., Doyle, P. S., Ribbeck, K. 2015. Material properties of biofilms-a review of methods for understanding permeability and mechanics. *Reports on Progress in Physics*. 78(3) : 036601.

Bissett, D., Hannonand, D., Orr, T. 1987. An animal model of solar-aged skin: histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochemistry and photobiology*. 46(3) : 367-378.

Boks, N. P., Norde, W., van der Mei, H. C., Busscher, H. J. 2008. Forces involved in bacterial adhesion to hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Microbiology*. 154(10) : 3122-3133.

Borba, C. M., Tavares, M. D. N., Moraes, C. C., Burkert, J. F. D. M. 2018. Carotenoid production by *Sporidiobolus pararoseus* in agroindustrial medium: optimization of culture conditions in shake flasks and scale-up in a stirred tank fermenter. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 35(2) : 509-520.

Boritsch, E. C., Brosch, R. 2016. Evolution of *Mycobacterium tuberculosis*: New Insights into Pathogenicity and Drug Resistance. *Microbiology spectrum*. 4(5).

Bos, R., Van der Mei, H. C., Busscher, H. J. 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions–its mechanisms and methods for study. *FEMS microbiology reviews*. 23(2) : 179-230.

Bouhdid, S., Abrini, J., Zhiri, A., Espuny, J., Manresa, A. 2009. Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. *Journal of Applied Microbiology*. 106: 1558-68.

Bourn, W. R., Jansen, Y., Stutz, H., Warren, R. M., Williamson, A. L., van Helden, P. D. 2007. Creation and characterisation of a high-copy-number version of the pAL5000 mycobacterial replicon. *Tuberculosis*. 87(6) : 481-488.

Bouyahya, A., El Moussaoui, N., Abrini, J., Bakri, Y., Dakka, N. 2016. Determination of phenolic contents, antioxidant and antibacterial activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf extracts. *British Biotechnology Journal*. 14(3) : 1-10.

Boyacioglu, M., Kum, C., Sekkin, S., Yalinkilinc, H. S., Avci, H., Epikmen, E. T., & Karademir, U. 2016. The effects of lycopene on DNA damage and oxidative stress on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Clinical Nutrition*. 35(2) : 428–435.

Brahmi, F., Mechri, B., Dhibi, M., Hammami, M. 2013. Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons. *Industrial Crops and Products*. 49 : 256-264.

Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. 2008. Carotenoids. *Natural Functions*. Vol. 4. Ch. 1. (Eds.). Birkhauser Verlag Basel.

Bruno, Richard S., Robert EC Wildman, and Steven J. Schwartz. "Lycopene: food sources, properties, and health. *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. CRC press, 2016. 66-83.

Busscher, H. J., Weerkamp, A. H., van der Mei, H. C., Van Pelt, A. W., de Jong, H. P., Arends, J. 1984. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl Environ Microbiol*. 48(5) : 980-983.

Butnariu, M. V., Giuchici, C. V. 2011. The use of some nanoemulsions based on aqueous propolis and lycopene extract in the skin's protective mechanisms against UVA radiation. *Journal of nanobiotechnology*. 9(1) : 3.

Caldwell, D. E., Atuku, E., Wilkie, D. C., Wivcharuk, K. P., Karthikeyan, S., Korber, D. R., Wolfaardt, G. M. 1997. Germ Theory Vs. Community Theory in Understanding and Controlling the Proliferation of Biofilms. *Advances in Dental Research*. 11(1) : 4-13.

Calmette, A. 1936. L'Infection Bacillaire et la Tuberculose. Paris: Masson et Cie.

Calvo, M. M., Garcia, M. L., Selgas, M. D. 2008. Dry fermented sausages enriched with lycopene from tomato peel. *Meat science*.80(2) : 167-172.

Carniello, V., Peterson, B. W., van der Mei, H. C., Busscher, H. J. 2018. Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth. *Advances in colloid and interface science*.

Ceriello, A., Testa, R. 2009. Antioxidant anti-inflammatory treatment in type 2 diabetes. Diabetes care, 32(suppl 2), S232-S236.

Chammem, N., Saoudi, S., Sifaoui, I., Sifi, S., De Person, M., Abderraba, M., Moussa, F., &Hamdi, M. 2015. Improvement of vegetable oils quality in frying conditions by adding rosemary extract. *Industrial Crops and Products*.74 : 592–599.

Chamovitz, D., Misawa, N., Sandmann, G., Hirschberg, J. 1992. Molecular cloning and expression in Escherichia coli of a cyanobacterial gene coding for phytoene synthase, a carotenoid biosynthesis enzyme. *FEBS letters*. 296(3) : 305-310.

Chebaibi ,A., Rhazi Filali , F., Lahlou Amine ,I., Chahlaoui ,A., L'kassmi H. 2007. Etude de l'activité antimicrobienne des feuilles de l'olivier. *Journée Scientifique « Ressources Naturelles et Antibiothérapie», Faculté des Sciences, Département de Biologie. Kenitra.*

Chen, D., Huang, C., Chen, Z. 2019. A review for the pharmacological effect of lycopene in central nervous system disorders. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 111 : 791-801.

Chen, Y., Xiao, W., Wang, Y., Liu, H., Li, X., Yuan, Y. 2016. Lycopene overproduction in *Saccharomyces cerevisiae* through combining pathway engineering with host engineering. *Microbial cell factories*.15(1) : 113.

Cherif H. 2013. Evaluation de l'activité antimycobactérienne *in vitro*, fractionement et identification des molécules responsable de cette activité de plantes d'origine marocaine. *Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Faculté des sciences et techniques, Fès.*

Chiaradia, L. 2018. Isolement et caractérisation de la mycomembrane des mycobactéries (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).

Choudhari, S. M., Ananthanarayan, L., Singhal, R. S. 2008. Use of metabolic stimulators and inhibitors for enhanced production of β-carotene and lycopene by *Blakeslea trispora* NRRL 2895 and 2896. *Bioresource Technology*. 99(8) : 3166-3173.

Costerton, J. W., Geesey, G. G., Cheng, K. J. 1978. How bacteria stick. *Sci Am.* 238(1) : 86-95.

Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284(5418) : 1318-1322.

Crémet, L., Corvec, S., Batard, E., Auger, M., Lopez, I., Pagniez, F., Dauvergne, S. Caroff, N. 2013. Comparison of three methods to study biofilm formation by clinical strains *of Escherichia coli*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 75(3) : 252-255.

Cyanotech Corporation (2018). https://www.cyanotech.com/astaxanthin/. Accessed 11 July 2018.

da Costa Flores, V., dos Santos Siqueira, F., Mizdal, C. R., Bonez, P. C., Agertt, V. A., Stefanello, S. T., Rossi, G. G., de Campos, M. M. A. 2016. Antibiofilm effect of antimicrobials used in the therapy of mycobacteriosis. *Microbial pathogenesis*. 99 : 229-235.

da Cruz, R. C., Agertt, V., Boligon, A. A., Janovik, V., Anraku de Campos, M. M., Guillaume, D., Athayde, M. L. 2012. *In vitro* antimycobacterial activity and HPLC–DAD screening of phenolics from *Ficus benjamina* L. and *Ficus luschnathiana* (Miq.) Miq. leaves. *Natural product research*. 26(23) : 2251-2254.

Daenen, K., Andries, A., Mekahli, D., Van Schepdael, A., Jouret, F., Bammens, B. 2019. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatric Nephrology*. 34(6) : 975-991.

Damanik, M., Murkovic, M. 2019. Derivatisation of 2, 4 (dinitrophenyl hydrazine) DNPH in Canola oil oxidation. *Indonesian Journal of Chemical Science and Technology (IJCST)*. 2(1) : 80-83.

Danhaive, P., Hoet, P., Cocito, C. 1982. Base compositions and homologies of deoxyribonucleic acids of corynebacteria isolated from human leprosy lesions and of related microorganisms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 32(1) : 70-76.

Daniel, T. M. 2015. Jean-Antoine Villemin and the infectious nature of tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 19(3) : 267-268.

David, H. L. 1974. Biogenesis of β-carotene in *Mycobacterium kansasii*. *Journal of bacteriology*. 119(2) : 527-533.

Delmas, O. (2017). Médecin généraliste et tuberculose: enquête auprès des médecins généralistes de Côte d'Or sur les habitudes de prise en charge d'une suspicion de tuberculose pulmonaire (Doctoral dissertation).

Derbel, S., Bouaziz, M., Dhouib, A., Sayadi, S., Chaieb, M. 2010. Chemical composition and biological potential of seed oil and leaf extracts of *Henophyton deserti* Coss. & Durieu. *Comptes rendus chimie*. 13(4) : 473-480.

Desmarchelier, C., Borel, P. 2017. Overview of carotenoid bioavailability determinants: From dietary factors to host genetic variations. *Trends in Food Science & Technology*. 69 : 270-280.

Devaraj, S., Mathur, S., Basu, A., Aung, H. H., Vasu, V. T., Meyers, S., Jialal, I. 2008. A dose-response study on the effects of purified lycopene supplementation on biomarkers of oxidative stress. *Journal of the American College of Nutrition*. 27(2) : 267-273.

Dheda, K., Chang, K. C., Guglielmetti, L., Furin, J., Schaaf, H. S., Chesov, D., Esmail, A., Lange, C. 2017. Clinical management of adults and children with multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Clinical Microbiology and Infection*. 23(3) : 131-140.

Di Mascio, P., Kaiser, S., Sies, H. 1989. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of biochemistry and biophysics*. 274(2) : 532-538.

Diop, E. A., Queiroz, E. F., Kicka, S., Rudaz, S., Diop, T., Soldati, T., & Wolfender, J. L. 2018. Survey on medicinal plants traditionally used in Senegal for the treatment of tuberculosis (TB) and assessment of their antimycobacterial activity. *Journal of ethnopharmacology*. 216 : 71-78.

Djordjevic, D., Wiedmann, M., McLandsborough, L. A. 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(6) : 2950-2958.

Dobarganes, M., Màrquez-Ruiz, G. 2013. Analysis of used frying oils. *Lipid Technology*. 25(7) : 159-162.

Dong, J., Li, W., Cheng, L. M., Wang, G. G. 2019. Lycopene attenuates LPS-induced liver injury by inactivation of NF-κB/COX-2 signaling. *International Journal Of Clinical And Experimental Pathology*. 12(3) : 817-825.

Durairajanayagam, D., Agarwal, A., Ong, C., Prashast, P. 2014. Lycopene and male infertility. *Asian journal of andrology*. 16(3) : 420.

Earl, E. A., Altaf, M., Murikoli, R. V., Swift, S., O'Toole, R. 2010. Native New Zealand plants with inhibitory activity towards *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC complementary and alternative medicine*. 10(1) : 25.

Edziri, H., Jaziri, R., Chehab, H., Verschaeve, L., Flamini, G., Boujnah, D., Hammamif M., Aouni, M., Mastouri, M. 2019. A comparative study on chemical composition, antibiofilm and biological activities of leaves extracts of four Tunisian olive cultivars. *Heliyon*. 5(5) : e01604.

El Helou, G., Viola, G.M., Hachem, R., Han, X. Y., and Raad, I. I. 2013b. Rapidly growing mycobacterial bloodstream infections. *The Lancet Infectious Diseases*. 13 : 166–174.

El Ouarti, A., Hassi, M., Sqalli, H., Aarab, L., Ennabili, A., Houari, A., Haggoud, A., Ibnsouda, S., Iraqui, M. 2011. Activité antimycobactérienne extra et intracellulaire de l'écorce des racines de *Berberis hispanica. Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*. 149 : 67-84.

El Youbi, A. E. H., Bousta, D., Jamoussi, B., Greche, H., El Mansouri, L., Benjilali, J., Soidrou, S. H. 2012. Activités antioxydante, apoptotique et antiprolifération de Tetraena gaetula (Emb. & Maire) Beier & Thulin et de *Berberis hispanica* Boiss. & Reut. originaires du Maroc. *Phytothérapie*. 10(3) : 151-160.

Esteban, J., García-Coca, M. 2018. *Mycobacterium* biofilms. *Frontiers in microbiology*. 8 : 2651.

Esteban, J., García-Pedrazuela, M., Muñoz-Egea, M. C., Alcaide, F. 2012. Current treatment of nontuberculous mycobacteriosis : an update. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 13, 967-986.

Esteban, J., Nieves, Z., Martín, H., Teemu, J. 2008. Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *BMC Microbiology.* 8 :184-196.

Eze, E. D., Afodun, A. M., Sulaiman, S. O., Ponsiano, N., Ezekiel, I., Adams, M. D., Okpanachi, A. O., Rabiu, K. M. 2018. Lycopene attenuates diabetes-induced oxidative stress in Wistar rats. *Journal of Diabetes and Endocrinology*. 9(2) : 11-19.

Falkinham, J. O. III., Williams, M. D., Kwait, R., Lande, L. 2016. *Methylobacterium* spp. As an indicator for the presence or absence of *Mycobacterium* spp. *International Journal of Mycobacteriology*. 5 : 240–243.

FAO/WHO, (2003). www.fao.org/docrep/x1880f/x1880f03.htm.

Faria, S., Joao, I., Jordao, L. 2015. General overview on nontuberculous mycobacteria, biofilms, and human infection. *Journal of pathogens*. 2015.

Fennelly, K. P., Ojano-Dirain, C., Yang, Q., Liu, L., Lu, L., Progulske-Fox, A., Wang, G. P, Antonelli, P., Schultz, G. 2016. Biofilm formation by *Mycobacterium abscessus* in a lung cavity. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 193(6) : 692-693.

Feofilova, E. P., Tereshina, V. M., Memorskaya, A. S., Dul'Kin, L. M., Goncharov, N. G. 2006. Fungal lycopene : the biotechnology of its production and prospects for its application in medicine. *Microbiology*. 75(6) : 629-633.

Frankel, E. N. 2005. Lipid oxidation (2nd ed.). Bridgewater, England: The Oily Press.

Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schultz, R. A., Ellenberger, T. 2006. DNA repair and mutagenesis, 2nd ed. Washington, DC: ASM Press.

Friedberg, E.C. 2011. Nucleotide excision repair of DNA: the very early history. DNA Repair (Amst) 10:668-672.

Gagneux, S. 2018. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis. Nature Reviews Microbiology.* 16(4) : 202-213.

García, M. L., Calvo, M. M., Selgas, M. D. 2009. Beef hamburgers enriched in lycopene using dry tomato peel as an ingredient. *Meat science*. 83(1) : 45-49.

Gautam, R., Saklani, A., Jachak, S. M. 2007. Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents. *Journal of ethnopharmacology*. 110(2) : 200-234.

Gawad, J., Bonde, C. 2018. Current affairs, future perspectives of tuberculosis and antitubercular agents. *Indian Journal of Tuberculosis*. 65(1) : 15-22.

Geier, H., Mostowy, S., Cangelosi, G. A., Behr, M. A., Ford, T. E. 2008. Autoinducer-2 triggers the oxidative stress response in Mycobacterium avium, leading to biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(6) : 1798-1804.

Gelaw, Y. A., Williams, G., Magalhães, R. J. S., Gilks, C. F., Assefa, Y. (2019). HIV Prevalence Among Tuberculosis Patients in Sub-Saharan Africa: A Systematic Review and Meta-analysis. *AIDS and behavior.* 1-15.

Gerster, H. 1997. The potential role of lycopene for human health. *Journal of the American College of Nutrition.* 16(2) : 109-126.

Ghedira, K. 2008. L'olivier. *Phytothérapie*. 6(2) : 83-89.

Gordon, R., Smith, M. 1953. Rapidly Growing, acid fast bacterial. Species' Descriptions of *Mycobacterium phlei* Lehmann and Neumann and *Mycobacterium smegmatis* (Trevisan) Lehmann and Neumann". *Journal of Bacteriology*. 66: 41-48.

Gorzynik-Debicka, M., Przychodzen, P., Cappello, F., Kuban-Jankowska, A., Marino Gammazza, A., Knap, N., Wozniak, M., Gorska-Ponikowska, M. 2018. Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. *International journal of molecular sciences*. 19(3) : 686.

Goulter, R. M., Gentle, I. R., Dykes, G. A. 2009. Issues in determining factors influencing bacterial attachment: a review using the attachment of *Escherichia coli* to abiotic surfaces as an example. *Letters in applied microbiology.* 49(1) : 1-7.

Green, E., Samie, A., Obi, C. L., Bessong, P. O., Ndip, R. N. 2010. Inhibitory properties of selected South African medicinal plants against Mycobacterium tuberculosis. *Journal of ethnopharmacology*. 130(1) : 151-157.

Grether-Beck, S., Marini, A., Jaenicke, T., Stahl, W., Krutmann, J. 2017. Molecular evidence that oral supplementation with lycopene or lutein protects human skin against ultraviolet

radiation: results from a double-blinded, placebo-controlled, crossover study. *British Journal of Dermatology*. 176(5) : 1231-1240.

Grivet, M., Morrier, J. J., Benay, G., Barsotti, O. 2000. Effect of hydrophobicity on *in vitro* streptococcal adhesion to dental alloys. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 11(10) : 637-642.

Gruber, A., Durham, A.M., Chuoung, H. del Portillo, H.A. 2008. Bioinformatics in Tropical Disease Research: a practical and case study approach. Edition Bethesda (MD) : National Librqry of Medecine (US), NCBI.

Gupta, V. K., Kaushik, A., Chauhan, D. S., Ahirwar, R. K., Sharma, S., Bisht, D. 2018. Anti-mycobacterial activity of some medicinal plants used traditionally by tribes from Madhya Pradesh, India for treating tuberculosis related symptoms. *Journal of ethnopharmacology*. 227 : 113-120.

Gurumurthy, P., Ramachandran, G., Hemanth Kumar, A. K., Rajasekaran, S., Padmapriyadarsini, C., Swaminathan, S., Bhagavathy, S., Venkatesan, P., Sekar, L., Mahilmaran, A., Ravichandran, N., Paramesh, P. 2004. Decreased bioavailability of rifampin and other antituberculosis drugs in patients with advanced human immunodeficiency virus disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48(11) : 4473-4475.

Gutierrez, M. C., Supply, P., Brosch, R. 2009. Pathogenomics of mycobacteria. In Microbial Pathogenomics (Vol. 6, pp. 198-210). Karger Publishers.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews microbiology*. 2(2) : 95.

Hall-Stoodley, L., Keevil, C. W., Lappin-Scott, H. M. 1998. *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae* biofilm formation under high and low nutrient conditions. *Journal of applied microbiology*. 85(S1) : 60S-69S.

Hall-Stoodley, L., Stoodley, P. 2005. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends in Microbiology*. 13 : 7-10.

Hamadi, F., Latrache, H., Zahir, H., El Abed, S., Ellouali, M., Saad, I. K. 2012. The relation between the surface chemical composition of *Escherichia coli* and their electron donor/electron acceptor (acid-base) properties. *Research Journal of Microbiology*. 7 : 32-40.

Hamadi, F., Latrache, H., Zahir, H., Elghmari, A., Timinouni, M., Ellouali, M. 2008. The relation between *Escherichia coli* surface functional groups' composition and their physicochemical properties. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39(1) : 10-15.

Haouat, A. C., El Guendouzi, S., Haggoud, A., David, S., Sqalli, H., Ibnsouda, S., Iraqui, M. 2013. Antimycobacterial activity of *Populus alba* leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*. 7(16) : 1015-1021.

Haouat, A. C., Haggoud, A., David, S., Ibnsouda, S., Iraqui, M. 2014. *In Vitro* Evaluation of the Antimycobacterial Activity and Fractionation of *Berberis hispanica* Root Bark. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 8(2) : 1-9.

Harbourne, N., Marete, E., Jacquier, J. C., O'Riordan, D. 2009. Effect of drying methods on the phenolic constituents of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) and willow (*Salix alba*). *LWT-Food Science and Technology*. 42(9) : 1468-1473.

Harrison, J. J., Turner, R. J., Ceri, H. 2005. High-throughput metal susceptibility testing of microbial biofilms. *BMC microbiology*. *5*(1) : 53.

Hassi, M., Haggoud, A., El Mzibri, M., Ibnsouda, S., Iraqui, M. 2007. Isolation and identification of a *staphylococcal* strain with an anti-mycobacterial activity and study of it's mode of action. *Annals of Microbiology*. 57 : 651-656.

Heber, D., Lu, Q. Y. 2002. Overview of mechanisms of action of lycopene. *Experimental biology and medicine*. 227(10) : 920-923.

Henrici, A. T. 1933. Studies of freshwater bacteria: I. A direct microscopic technique. *Journal of bacteriology*. 25(3) : 277.

Hermoni, K. L., Sharoni, Y. 2019. Carotenoids and Polyphenols Synergistically Balance Skin Response to UV (P02-007-19).

Hernandez-Almanza, A., Montanez, J., Martinez, G., Aguilar-Jimenez, A., Contreras-Esquivel, J. C., Aguilar, C. N. 2016. Lycopene: progress in microbial production. *Trends in Food Science & Technology*. 56 : 142-148.

Herrero, M., Temirzoda, T. N., Segura-Carretero, A., Quirantes, R., Plaza, M., Ibañez, E. 2011. New possibilities for the valorization of olive oil by-products. *Journal of Chromatography A*. 1218(42): 7511-7520.

Honarvar, B., Movahedan, H., Mahmoodi, M., Sheikholeslami, F.M., Farnia P. 2012. *Mycobacterium aurum keratitis*: an unusual etiology of a sight-threatening infection. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*.16 (2).

Hong, J., Park, S. H., Kim, S., Kim, S. W., Hahn, J. S. 2018. Efficient production of lycopene in *Saccharomyces cerevisiae* by enzyme engineering and increasing membrane flexibility and NAPDH production. *Applied microbiology and biotechnology*. 103(1) : 211-223.

Houben, R. M. Dodd, P. J. 2016). The global burden of latent tuberculosis infection : a reestimation using mathematical modelling. *PLOS Med.* 13 : e1002152.

Houssaini-Iraqui, M., Clavel-Seres, S., Rastogi, N. and David, H.L. 1993a. Partial physical and functional map of a *Mycobacterium aurum* carotenogenesis operon. *Current Microbiology*. 26: 65-74.

Houssaini-Iraqui, M., David, H.L., Clavel-Seres, S., Hilali, F. and Rastogi, N. 1993b. Characterization of *car* α, *car Lep*, and *Crt I* genes controlling the biosynthesis of carotenes in *Mycobacterium aurum*. *Current Microbiology*. 27 (6) : 317-322.

Houssaini-Iraqui, M., Khamlichi, N., El Yamani, J., Rastogi, N. 2001. Response of Escherichia coli containing mycobacterial carotene genes to UV radiation. *BioMed Research International.* 1(2) : 79-84.

Houssaini-Iraqui, M., Lazraq, R., Clavel-Sérès, S., Rastogi, N., David, H. L. 1992. Cloning and expression of *Mycobacterium aurum* carotenogenesis genes in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS microbiology letters*. 90(3) : 239-244.

Hu, M., Jacobsen, C. 2016. Oxidative stability and shelf life of foods containing oils and fats. San Diego, CA: AOCS Press.

Hwang, H.-S., Winkler-Moser, J. K. 2017. Antioxidant activity of amino acids in soybean oil at frying temperature: Structural effects and synergism with tocopherols. *Food Chemistry*. 221 : 1168-1177.

Ishida, S., Arai, M., Niikawa, H., Kobayashi, M. 2011. Inhibitory effect of cyclic trihydroxamate siderophore, desferrioxamine E, on the biofilm formation of *Mycobacterium* species. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 34(6) : 917-920.

Islam, M. S., Richards, J. P., Ojha, A. K. 2012. Targeting drug tolerance in mycobacteria: a perspective from mycobacterial biofilms. *Expert review of anti-infective therapy*. 10(9) : 1055-1066.

Jeffs, L. B., Xavier, I. J., Matai, R. E., Khachatourians, G. G. 1999. Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the general *Beauveria, Metarhizium, Paecilomyces, Tolypocladium*, and *Verticillium*. *Canadian Journal of Microbiology*. 45(11) : 936-948.

Jiang, C. H., Gan, M. L., An, T. T., Yang, Z. C. 2019. Bioassay-guided isolation of a *Mycobacterium tuberculosis* bioflim inhibitor from Arisaema sinii Krause. *Microbial pathogenesis*. 126 : 351-356.

Jouad, H., Haloui, M., Rhiouani, H., El Hilaly, J., Eddouks, M. 2001. Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez–Boulemane). *Journal of Ethnopharmacology*. 77(2-3) : 175-182.

Kaelble, D. H., Dynes, P. J., Cirlin, E. H. 1974. Interfacial bonding and environmental stability of polymer matrix composites. *The Journal of Adhesion*. 6(1-2) : 23-4.

Kaleem, A., Aziz, S., Iqtedar, M., Abdullah, R., Aftab, M., Rashid, F., Shakoori, F. R., Naz, S. 2015. Investigating changes and effect of peroxide values in cooking oils subject to light and heat. *FUUAST Journal of Biology*. 5(2) : 191.

Kalsum, S. 2019. Characterizing phenotypes of *Mycobacterium tuberculosis* and exploring anti-mycobacterial compounds through high content screening (Vol. 1657). Linköping University Electronic Press.

Kamatou, G. P. P., Van Vuuren, S. F., Van Heerden, F. R., Seaman, T., & Viljoen, A. M. 2007. Antibacterial and antimycobacterial activities of South African *Salvia* species and isolated compounds from *S. chamelaeagnea*. *South African Journal of Botany*. 73(4) : 552-557.

Kandola, K., Bowman, A., Birch-Machin, M. A. 2015. Oxidative stress-a key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics. *International Journal of Cosmetic Science*. 37 : 1-8.

Kaur, D., Wani, A. A., Singh, D. P., Sogi, D. S. 2011. Shelf life enhancement of butter, ice-cream, and mayonnaise by addition of lycopene. *International journal of food properties*. 14(6) : 1217-1231.

Kaya, E., Ozer Kaya, S., Yilmaz, S., Ceribasi, A. O., Turk, G. 2019. Evaluation of ameliorating effect of lycopene against testicular toxicity due to diethylnitrosamine using biochemical, spermatological and histopathological data. *Andrologia*. e13274.

Kehili, M., Choura, S., Zammel, A., Allouche, N., Sayadi, S. 2018. Oxidative stability of refined olive and sunflower oils supplemented with lycopene-rich oleoresin from tomato peels industrial by-product, during accelerated shelf-life storage. *Food Chemistry*. 246 : 295-304.

Kempker, R. R., Kipiani, M., Mirtskhulava, V., Tukvadze, N., Magee, M. J., Blumberg, H. M. 2015. Acquired drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and poor outcomes among patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Emerging infectious diseases*. 21(6) : 992.

Kerr, S., Cale, C., Cabral, J. M. S., Van Keulen, F. 2004. Factors enhancing lycopene production by a new *Mycobacterium aurum* mutant. *Biotechnology letters*. 26(2) : 103-108.

Kester, J. C., and Fortune, S. M. 2014. Persisters and beyond: mechanisms of phenotypic drug resistance and drug tolerance in bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 49 : 91-101.

Khodaiyan, F., Razavi, S. H., Emam-Djomeh, Z., Mousavi, S. M. A., Hejazi, M. A. 2007. Effect of culture conditions on canthaxanthin production by Dietzia natronolimnaea HS-1. *Journal of microbiology and biotechnology*. 17(2) : 195.

Kirimuhuzya, C., Waako, P., Joloba, M., Odyek, O. 2009. The anti-mycobacterial activity of Lantana camara a plant traditionally used to treat symptoms of tuberculosis in South-western Uganda. *African health sciences*. 9(1) : 40-45.

Kiritsakis, A., Shahidi, F., Anousakis, C. 2017. Antioxidants of Olive Oil, Olive Leaves, and their Bioactivity. Olives and Olive Oil as Functional Foods. *Bioactivity, Chemistry and Processing*. 367-382.

Koch, A., Cox, H., Mizrahi, V. 2018. Drug-resistant tuberculosis : challenges and opportunities for diagnosis and treatment. *Current opinion in pharmacology*. 42 : 7-15.

Koch, R. 1982. Classics in infectious diseases. The etiology of tuberculosis : Robert Koch. Berlin, Germany 1882. *Rev Infect Dis*. 4 : 1270-1274.

Kong, K. W., Khoo, H. E., Prasad, K. N., Ismail, A., Tan, C. P., Rajab, N. F. 2010. Revealing the Power of the Natural Red Pigment Lycopene. *Molecules*. 15(2) : 959-987.

Korukluoglu, M., Sahan, Y., Yigit, A., Ozer, E. T., Gücer, S. 2010. Antibacterial activity and chemical constitutions of *Olea europaea* L. leaf extracts. *Journal of food processing and preservation*. 34(3) : 383-396.

Lalas, S., Dourtoglou, V., 2003. Use of rosemary extract in preventing oxidation during deep-fat frying of potato chips. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 80 : 579-583.

Lall, N., Kumar, V., Meyer, D., Gasa, N., Hamilton, C., Matsabisa, M., Oosthuizen, C. 2016. *In vitro* and *In vivo* antimycobacterial, hepatoprotective and immunomodulatory activity of Euclea natalensis and its mode of action. *Journal of ethnopharmacology*. 194 : 740-748.

Lee, L. K., Foo, K. Y. 2013. An appraisal of the therapeutic value of lycopene for the chemoprevention of prostate cancer: A nutrigenomic approach. *Food research international*. 54(1): 1217-1228.

Lee-Huang, S., Huang, P. L., Zhang, D., Lee, J. W., Bao, J., Sun, Y., Chang, Y. Tae., Zhang, J.Z.H., Huang, P. L. 2007. Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part I. Integrase inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 354(4): 872-878.

Leonardis, A., Aretini, A., Alfano, G., Macciola, V., Ranalli, G. 2008. Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea Europaea* L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *European Food Research and Technology*. 226 : 653-659.

Leong, H. Y., Show, P. L., Lim, M. H., Ooi, C. W., Ling, T. C. 2018. Natural red pigments from plants and their health benefits : A review. *Food reviews international*. 34(5) : 463-482.

Leong, L.P., Shui, G. 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food chemistry*. 76(1) : 69-75.

Levey-Frebault, V., David, H.L. 1979. Mutations Affecting Pigment Synthesis in *Mycobacterium aurum. Journal of General Microbiology*. 115: 317-323.

Li, X., Wang, Z., Zhang, G., Yi, L. 2019a. Improving lycopene production in *Saccharomyces cerevisiae* through optimizing pathway and chassis metabolism. *Chemical Engineering Science*. 193 : 364-369.

Li, X., Wu, G., Yang, F., Meng, L., Huang, J., Zhang, H., Jin, Q., Wang, X. 2019b. Influence of fried food and oil type on the distribution of polar compounds in discarded oil during restaurant deep frying. *Food Chemistry*. 272 : 12-17.

Li, Y.F., Chang, Y.Y., Huang, H.C., Wu, Y.C., Yang, M.D. and Chao, P.M. 2015. Tomato juice supplementation in young women reduces inflammatory adipokine levels independently of body fat reduction. *Nutrition*. 31 : 691-696.

Li, Z., Chen, Q., Tang, J., Li, Q., Zhang, X. 2019. Integrating balanced mevalonate pathway into chromosome for improving lycopene production in *Escherichia coli*. *Sheng wu gong cheng xue bao= Chinese journal of biotechnology*. 35(3) : 404-414.

Liang, M. H., Zhu, J., Jiang, J. G. 2018. Carotenoids biosynthesis and cleavage related genes from bacteria to plants. *Critical reviews in food science and nutrition*. 58(14) : 2314-2333.

Lim, A., Subhan, N., Jazayeri, J. A., John, G., Vanniasinkam, T., Obied, H. K. 2016. Plant phenols as antibiotic boosters: *in vitro* interaction of olive leaf phenols with ampicillin. *Phytother Res*. 30: 503-509.

Liu, S., Gunawan, C., Barraud, N., Rice, S. A., Harry, E. J., Amal, R. 2016. Understanding, monitoring, and controlling biofilm growth in drinking water distribution systems. *Environmental science & technology*. 50(17) : 8954-8976.

Liu, X. J., Liu, R. S., Li, H. M., Tang, Y. J. 2012. Lycopene production from synthetic medium by *Blakeslea trispora* NRRL 2895 (+) and 2896 (−) in a stirred-tank fermenter. *Bioprocess and biosystems engineering*. 35(5) : 739-749.

Liu, Y., McKeever, L. C., Malik, N. S. 2017. Assessment of the antimicrobial activity of olive leaf extract against foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in microbiology*. 8: 113.

Liu, Y., Yang, J. 2019. Advances in Research on Resistance Mechanisms of Bacterial Biofilms. *Agricultural Biotechnology*. 8(1) : 190-193.

Loret, J. F., Dumoutier, N. 2019. Non-tuberculous mycobacteria in drinking water systems : A review of prevalence data and control means. *International journal of hygiene and environmental health*.

Lowe, G. M., Graham, D. L., Young, A. J. 2018. Lycopene: Chemistry, Metabolism, and Bioavailability. In Lycopene and Tomatoes in Human Nutrition and Health (pp. 1-20). CRC Press.

Löwenstein, E. 1920. Vorlesungen über Bakteriologie, Immunität, spezifische Diagnostik und Therapie der Tuberkulose. Jena : Fischer.

Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Álvarez, J. A. P., Fernández-López, J. 2018. Changes in bioaccessibility, polyphenol profile and antioxidant potential of flours obtained from persimmon fruit (*Diospyros kaki*) co-products during *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food chemistry*. 256 : 252-258.

MacLeod, C. T., Daugulis, A. J. 2005. Interfacial effects in a two-phase partitioning bioreactor: degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a hydrophobic *Mycobacterium*. *Process Biochemistry*. 40(5) : 1799-1805.

Maleš, Ž., Plazibat, M., Vjera, B. V., Žuntar, I. 2006. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree *Arbutus unedo* L. (*Ericaceae*). *Acta Pharmaceutica*. 56(2) : 245-250.

Maniatis, F., Frisch, E.F., Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. NewYork, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Marini, E., Di Giulio, M., Ginestra, G., Magi, G., Di Lodovico, S., Marino, A., Facinelli, B., Cellini, L., Nostro, A. 2019. Efficacy of carvacrol against resistant rapidly growing mycobacteria in the planktonic and biofilm growth mode. *PloS one*. 14(7) : e0219038.

Martín-de-Hijas, N. Z., García-Almeida, D., Ayala, G., Fernández-Roblas, R., Gadea, I., Celdran, A., Gomez-Barrena, E., Esteban, J. 2009. Biofilm development by clinical strains of non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *Clinical Microbiology and Infection*. 15(10) : 931-936.

Martínez, A., Melendez-Martínez, A. J. 2016. Lycopene, oxidative cleavage derivatives and antiradical activity. *Computational and Theoretical Chemistry*. 1077 : 92-98.

Martini, Marie-Claude et Seiller, Monique. Actifs et additifs en cosmétologie. Troisième édition. Paris : Tec & Doc, 2006. p. 1050.

Masetto, A., Flores-Cotera, L. B., Díaz, C., Langley, E., Sanchez, S. 2001. Application of a complete factorial design for the production of zeaxanthin by *Flavobacterium* sp. *Journal of bioscience and bioengineering*. 92(1) : 55-58.

Matteelli, A., Migliori, G. B., Cirillo, D., Centis, R., Girard, E., Raviglione, M. 2007. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* : epidemiology and control. *Expert review of anti-infective therapy*. 5(5) : 857-871.

Mei, Y., Thompson, M. D., Cohen, R. A., Tong, X. 2015. Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1852(2) : 243-251.

Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., Adholeya, A. 2016. A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in microbiology*. *7* : 546.

Miotto, P., Cirillo, D. M., Migliori, G. B. 2015. Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Mechanisms Challenging Fluoroquinolones and Pyrazinamide Effectiveness. *Chest journal*. 147(4) : 1135-1143.

Montesano, D., Cossignani, L., D'Arco, G., Simonetti, M. S., Damiani, P. 2006. Pure Lycopene from Tomato Preserves Extra Virgin Olive Oil from Natural Oxidative Events During Storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 83(11) : 933-941.

Moran, N. A., Jarvik, T. 2010. Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids. *Science*. 328(5978) : 624-627.

Morgado, S., Morgado, M., Plácido, A. I., Roque, F., Duarte, A. P. 2018. *Arbutus unedo* L.: From traditional medicine to potential uses in modern pharmacotherapy. *Journal of ethnopharmacology*.

Morris, G., Stubbs, B., Köhler, C. A., Walder, K., Slyepchenko, A., Berk, M., Carvalho, A. F. 2018. The putative role of oxidative stress and inflammation in the pathophysiology of sleep dysfunction across neuropsychiatric disorders : focus on chronic fatigue syndrome, bipolar disorder and multiple sclerosis. *Sleep medicine reviews*. 41 : 255-265.

Mouchrik, H., Soulaymani, A., Jabri, M., Hami, H., Mokhtari, A. 2018. Pulmonary Tuberculosis in Morocco : A Two Year Retrospective Study. *Journal of Tuberculosis Research*. 6(01) : 104.

Mrabti, H. N., Faouzi, M. E. A., Mayuk, F. M., Makrane, H., Limas-Nzouzi, N., Dibong, S. D., Cherrah, Y., Elombo, K. F., Gressier, B., Desjeux Je-F., Eto, B. 2019. *Arbutus unedo* L. (*Ericaceae*) inhibits intestinal glucose absorption and improves glucose tolerance in rodents. *Journal of ethnopharmacology*. 235 : 385-391.

Muñoz-Egea, M. C., Esteban, M., and Esteban, J. 2016a. Inhibition of *Mycobacterium abscessus* biofilms by *Methylobacterium* sp, in 29th ECCMI

Muñoz-Egea, M. C., Garcia-Pedrazuela, M., Mahillo-Fernandez, I., Esteban, J. 2016b. Effect of antibiotics and antibiofilm agents in the ultrastructure and development of biofilms developed by nonpigmented rapidly growing mycobacteria. *Microbial Drug Resistance*. 22 : 1-6.

Muñoz-Egea,M. C., García-Pedrazuela,M., Mahillo, I., García,M. J., Esteban, J. 2013. Autofluorescence as a tool for structural analysis of biofilms formed by nonpigmented rapidly growing mycobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 79 : 1065-1067.

Musk, D. J., Banko, D. A., Hergenrother, P. J. 2005. Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry & biology*. 12(7) : 789-796.

Mussagy, C. U., Winterburn, J., Santos-Ebinuma, V. C., Pereira, J. F. B. 2018. Production and extraction of carotenoids produced by microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology*. 103(3) : 1095-1114.

Naegeli, H., Sugasawa, K. 2011. The xeroderma pigmentosum pathway: decision tree analysis of DNA quality. DNA Repair (Amst) 10:673-683.

Ndjouenkeu, R., Ngassoum, M. 2002. Etude comparative de la valeur en friture de quelques huiles vegetales:(Comparative study of frying behaviour of some vegetable oils). *Journal of food engineering*. 52(2) : 121-125.

Nguyen, L. 2016. Antibiotic resistance mechanisms in *M. tuberculosis* : an update. *Archives of toxicology*. 90(7) : 1585-1604.

Nguyen, L., Pieters, J. 2009. Mycobacterial subversion of chemotherapeutic reagents and host defense tactics : challenges in tuberculosis drug development. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 49 : 427-453.

Nigou, J., Besra, G. S. 2002. Characterization and regulation of inositol monophosphatase activity in *Mycobacterium smegmatis*. *Biochemical Journal*. 361(2) : 385-390.

Norme ISO 3960, 1977. Corps gras d'origines animale et végétale – Détermination de l'indice de peroxyde.

Norme ISO 660, 1996. Corps gras d'origines animale et végétale – Détermination de l'indice d'acide et de l'acidité.

Ojha, A. K. 2018. Impact of Mycobacterial Biofilms on Public Health. *The Connections Between Ecology and Infectious Disease*. *Springer Cham*. 163-181.

Ojha, A. K., Baughn, A. D., Sambandan, D., Hsu, T., Trivelli, X., Guerardel, Y., Alahari, A., Kremer, L., Jacobs, R.W., Hatfull, G. F. 2008. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Molecular microbiology*. 69(1) : 164-174.

Ojha, A. K., Jacobs, W. R. Jr., Hatfull, G. F. 2015. Genetic dissection of mycobacterial biofilms. *Methods in Molecular Biology*. 1285 : 215-226.

Ojha, A., Anand, M., Bhatt, A., Kremer, L., Jacobs, W. R. Jr., Hatfull, G. F. 2005. GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. *Cell*. 123 : 861-873.

Oliveira, R. G. A., de Carvalho, M. J. L., Nutti, R. M., de Carvalho, L. V. J., Fukuda, W. G. 2010. Assessment and degradation study of total carotenoid and ß-carotene in bitter yellow cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties. *African Journal of Food Science*. 4(4): 148 - 155

Olofsson, A. C., Hermansson, M., Elwing, H. 2003. N-Acetyl-L-Cysteine Affects Growth, Extracellular Polysaccharide Production, and Bacterial Biofilm Formation on Solid Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(8) : 4814-4822

Ono, M., Takeshima, M., Nakano, S. 2015. Mechanism of the anticancer effect of lycopene (tetraterpenoids). In The Enzymes. Academic Press. 37 *:* 139-166.

Oosthuizen, C. B., Gasa, N., Hamilton, C. J., Lall, N. 2018. Inhibition of mycothione disulphide reductase and mycobacterial biofilm by selected South African plants. *South African journal of botany*.120 :291-297.

Oudghiri, A., Karimi, H., Chetioui, F., Zakham, F., Bourkadi, J. E., Elmessaoudi, M. D., Laglaoui, A., Chaoui, I., El Mzibri, M. 2018. Molecular characterization of mutations associated with resistance to second-line tuberculosis drug among multidrug-resistant tuberculosis patients from high prevalence tuberculosis city in Morocco. *BMC infectious diseases*. 18(1) : 98.

Özcan, M. M., Matthäus, B. 2017. A review: benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *European Food Research and Technology*. 243(1): 89-99.

Özcan, M. M., Matthäus, B. 2017. A review: benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *European Food Research and Technology*.243(1) : 89-99.

Padhi, A., Naik, S. K., Sengupta, S., Ganguli, G., Sonawane, A. 2015. Expression of Mycobacterium tuberculosis NLPC/p60 family protein Rv0024 induce biofilm formation and resistance against cell wall acting anti-tuberculosis drugs in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbes and infection.* 18(4) : 224-236.

Pagedar, A., Singh, J., Batish, V. K. 2010. Surface hydrophobicity, nutritional contents affect *Staphylococcus aureus* biofilms and temperature influences its survival in preformed biofilms. *Journal of basic microbiology*. 50(S1) : S98-S106.

Pai, M., Behr, M. A., Dowdy, D., Dheda, K., Divangahi, M., Boehme, C. C., Ginsberg, A. Swaminathan S, Spigelman M, Getahum H, Menzies D, Ravigilone M. 2016. Molecular Basis of Tuberculosis Pathogenesis. *Tuberculosis.* 2 : 1-23.

Palozza, P., Catalano, A., Simone, R., Cittadini, A. 2012. Lycopene as a guardian of redox signalling. *Acta Biochimica Polonica.* 59 : 21–5.

Pantanella F, Valenti P, Natalizi T, Passeri D et Berlutti F .2013. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces : pros and cons of the main techniques currently in use. *Annali di Igiene*. 25 : 31-42.

Paolucci, I., Gaudet, M., Jorge, V., Beritognolo, I., Terzoli, S., Kuzminsky, E., Muleo, R., Mugnozza, G. S., Sabatti, M. 2010. Genetic linkage maps of *Populus alba* L. and comparative mapping analysis of sex determination across *Populus* species. *Tree Genetics & Genomes*. 6(6) :863-875.

Papa, F, Rivière, M., Fournié, J. J., Puzo, G., David, H. 1987. Specificity of a *Mycobacterium kansasii* phenolic glycolipid (mycoside A) immunoserum. *Journal of clinical microbiology*. 25(12): 2270-2273.

Park, B., Hwang, E., Seo, S. A., Cho, J. G., Yang, J. E., Yi, T. H. 2018. Eucalyptus globulus extract protects against UVB-induced photoaging by enhancing collagen synthesis via regulation of TGF-β/Smad signals and attenuation of AP-1. *Archives of biochemistry and biophysics*.637 :31-39.

Parry Nutraceuticals 2018. http://www.parrynutraceuticals.com/ products/natural-mixed-caretenoids/. Accessed 11 July 2018.

Paul, S., Mitta, G.S. 1996. Dynamics of fat/oil degradation during frying based on optical properties. *Journal of Food Engineering*. 30 : 389-403.

Pereira AP, Ferreira ICFR, Marcelino F, Valentão P, Andrade PB, Seabra R, Estevinho L, Bento A, Pereira J.A. 2007. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules.* 12 : 1153-1162.

Perveen, R., Suleria, H. A. R., Anjum, F. M., Butt, M. S., Pasha, I., Ahmad, S. 2015. Tomato (*Solanum lycopersicum*) carotenoids and lycopenes chemistry ; metabolism, absorption, nutrition, and allied health claims-a comprehensive review. *Critical reviews in food science and nutrition*.55(7) : 919-929.

Petyaev, I. M., Dovgalevsky, P. Y., Klochkov, V. A., Chalyk, N. E., Pristensky, D. V., Chernyshova, M. P., Udumyan, R., Kocharyan, T., Kyle, N. H., Marina V. Lozbiakova Bashmakov, Y. K. 2018. Effect of lycopene supplementation on cardiovascular parameters and markers of inflammation and oxidation in patients with coronary vascular disease. *Food Science & Nutrition*. 6(6) : 1770-1777.

Porter, J.W., Anderson, D.G. 1967. Biosynthesis of carotenes. *Annual Review of Physiology*. 18 :197-228.

Prema, A., Janakiraman, U., Manivasagam, T., Thenmozhi, A. J. 2015. Neuroprotective effect of lycopene against MPTP induced experimental Parkinson's disease in mice. *Neuroscience letters*. 599 : 12-19.

Priyanka S, Mary SRI, Nandini HS, Kutty AVM, Kiranmayee P. 2018. A pilot study on sun protection factor of plant extracts : an observational study. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* 11(4) : 67.

Quiles-Rosillo, M. D., Ruiz-Vázquez, R. M., Torres-Martínez, S., Garre, V. 2005. Light induction of the carotenoid biosynthesis pathway in Blakeslea trispora. *Fungal Genetics and Biology*. 42(2) : 141-153.

Qvist, T., Eickhardt, S., Kragh, K. N., Andersen, C. B., Iversen, M., Høiby, N., Bjarnsholt, T. 2015. Chronic pulmonary disease with *Mycobacterium abscessus* complex is a biofilm infection. *European Respiratory Journal*. 46(6) : 1823-1826.

Ramalho, V. C., Jorge, N., 2008. Antioxidant action of rosemary extract in soybean oil submitted to thermoxidation. *Grasas Aceites* .59 :38–41.

Ranjbar Nedamani, A., Ranjbar Nedamani, E., Salimi, A. 2018. The role of lycopene in human health as a natural colorant. *Nutrition & Food Science*.49(2): 284-298.

Rao, A. V., Ali, A. 2007. Biologically active phytochemicals in human health : Lycopene. *International Journal of Food Properties*. 10(2): 279-288.

Rasoanaivo, Ph., Deharo, E., Ratsimamanga-Urverg, S., Frappier, F., 2004. Guidelines for the evaluation of the non-clinical efficacy of traditional antimalarials. In: Wilcox, M., Bodeker, G., Rasoanaivo, Ph. (Eds.), Traditional Medicinal Plants and Malaria. CRC Press. 255-270.

Rastogi, N., Legrand, E., Sola, C. 2001. The mycobacteria : an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*. 20(1) : 21-54.

Recht J, Kolter R. 2001.Glycopeptidolipid acetylation affects sliding motility and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology*.183(19) :5718–24.

Reck, M., Rutz, K., Kunze, B., Tomasch, J., Surapaneni, S. K., Schulz, S., Wagner-Döbler, I. 2011. The biofilm inhibitor carolacton disturbs membrane integrity and cell division of *Streptococcus* mutans through the serine/threonine protein kinase PknB. *Journal of bacteriology*.193(20) : 5692-5706.

Redondo-Cuevas, L., Castellano, G., Raikos, V. 2017. Natural antioxidants from herbs and spices improve the oxidative stability and frying performance of vegetable oils. *International Journal of Food Science & Technology*.52(11) :2422–2428.

Rehman, N. N. M. A., Dixit, P. P. 2019. Influence of light wavelengths, light intensity, temperature, and pH on biosynthesis of extracellular and intracellular pigment and biomass of Pseudomonas aeruginosa NR1. *Journal of King Saud University-Science*.

Reyrat, J. M. and D. Kahn. 2001. *Mycobacterium smegmatis*: an absurd model for tuberculosis. *Trends Microbiol*. 9(10): 472-474.

Rhayour, K. 2002. Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thése de doctorat. *Université Sidi Mohamed Ben Abdellah Faculté des sciences Dhar Mehraz, Fés.*

Richards, JP., Ojha, AK. 2014. Mycobacterial biofilms. *Microbiol Spectrum*. 2(5) : MGM2-0004-2013

Rizk, E. M., El-Kady, A. T., El-Bialy, A. R. 2014. Characterization of carotenoids (lyco red) extracted from tomato peels and its uses as natural colorants and antioxidants of ice cream. *Annals of Agricultural Sciences*. 59(1) : 53-61.

Rochette, P.J., Therrien, J.P., Drouin, R., Perdiz, D., Bastien, N., Drobetsky, E.A., Sage, E. 2003. UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells. *Nucleic Acids Research*. 31:2786-94.

Rodrigues, N., Malheiro, R., Casal, S., Asensio, M. C., Manzanera, S., Bento, A., Pereira, J.A. 2012. Influence of spike lavender (*Lavandula latifolia Med.*) essential oil in the quality, stability and composition of soybean oil during microwave heating. *Food and Chemical Toxicology*. 50 : 2894-901.

Runyon, E. H. 1970. Identification of mycobacterial pathogens utilizing colony characteristics. *American journal of clinical pathology*. 54(4) : 578-586.

Russell, D. G., Barry, C. E., Flynn, J. L. 2010. Tuberculosis : what we don’t know can, and does, hurt us. *Science*. 328(5980) : 852-856.

Sadiki, M., Barkai, H., Ibnsouda, K. S., Elabed, S. 2014. The effect of the *Thymus vulgaris* extracts on the physicochemical characteristics of cedar wood using angle contact measurement. *Journal of Adhesion Science and Technology*. 28(19) :1925-1934.

Sahin, K., Gencoglu, H., Bilir, B., Kucuk, O. 2018. Protective role of lycopene against oxidative stress in liver. *Academic Press*. 155-167.

Sahoo, R. C. R. A. K. 2014. Developments of Lycopene enrich Noodles. *South Asian Journal of Management Research*. 6(1) : 461-470.

Saini, R. K., Keum, Y. S. 2018. Microbial platforms to produce commercially vital carotenoids at industrial scale : an updated review of critical issues. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*.1-18.

Sanchez Avila, N., Priego Capote, F., Luque de Castro, M. D. 2007. Ultrasound-assisted extraction and silylation prior chromatography–mass spectrometry for the characterization of the triterpenic fraction in olive leaves. *Journal of Chromatography A*.1165: 158–165.

Sandasi, M., Leonard, C. M., Viljoen, A. M. 2010. The *in vitro* antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against Listeria monocytogenes. *Letters in applied microbiology*. 50(1) : 30-35.

Saoudi, S., Chammem, N., Sifaoui, I., Bouassida-Beji, M., Jiménez, I. A., Bazzocchi, I. L., Silva, S. D., Hamdi, M., Bronze, M. R. 2016. Influence of Tunisian aromatic plants on the prevention of oxidation in soybean oil under heating and frying conditions. *Food chemistry*. 212 : 503-511.

Sasaki, Y. F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K., Tsuda, S. 2002. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 519(1-2): 103-119.

Saviola, B. 2018. Pigments of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiology & Experimentation.* 6(2) :114-115.

Seung, K. J., Keshavjee, S., Rich, M. L. 2015. Multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 5(9) : a017863.

Sevgili, A., Erkmen, O. 2019. Improved Lycopene Production from Different Substrates by Mated Fermentation of *Blakeslea Trispora*. *Foods*. 8(4) : 120.

Shah, H., Mahajan, S. R. 2014. Screening of topical gel containing lycopene and dexamethasone against UV radiation induced photoaging in mice. *Biomedicine & Aging Pathology* .4(4) : 303-308.

Sharma, P., Montes de Oca, M. K., Alkeswani, A. R., McClees, S. F., Das, T., Elmets, C. A., Afaq, F. 2018. Tea polyphenols for the prevention of UVB-induced skin cancer. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*. 34(1) :50-59

Sharma, S. K., Mohan, A. 2013. Tuberculosis : From an incurable scourge to a curable disease-journey over a millennium. *The Indian journal of medical research.* 137(3) : 455.

Shi, T., Fu, T., Xie, J. 2011. Polyphosphate deficiency affects the sliding motility and biofilm formation of *Mycobacterium smegmatis*. *Current microbiology*. 63(5): 470.

Shimada, H., Kondo, K., Fraser, P. D., Miura, Y., Saito, T., & Misawa, N. 1998. Increased Carotenoid Production by the Food Yeast *Candida utilis* through Metabolic Engineering of the Isoprenoid Pathway. *Applied and Environmental Microbiology.* 64(7) :2676-2680.

Shore, R. E .2001. Radiation-induced skin cancer in humans. *Medical and Pediatric Oncology*. 36: 549-54.

Sies, H., Berndt, C., Jones, D. P. 2017. Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*. 86 : 715-748.

Sifaoui, I., López-Arencibia, A., Martín-Navarro, C. M., Ticona, J. C., Reyes-Batlle, M., Mejri, M., Jiménez, A. I., Lopez-Bazzocchi, I., Valladares, B., Lorenzo-Morales, J., Abderabbaa, M., Piñero, J. E. 2014. *In vitro* effects of triterpenic acids from olive leaf extracts on the mitochondrial membrane potential of promastigote stage of *Leishmania* spp. *Phytomedicine*. 21(12) : 1689-1694.

Silva, M. M., Lidon, F. C. 2016. An overview on applications and side effects of antioxidant food additives. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 823-832.

Silva, P. E. A., Aínsa, J. A. 2007. Drugs and drug interactions. *Tuberculosis*.593-633.

Singh, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., Singh, R. 2017. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *The open microbiology journal*. 11 : 53.

Sivaramakrishnan, R., Incharoensakdi, A. 2017. Enhancement of lipid production in *Scenedesmus* sp. by UV mutagenesis and hydrogen peroxide treatment. *Bioresource technology*. 235 :366-370.

Siwach, R., Tokas, J., Seth, R. .2016. Use of lycopene as a natural antioxidant in extending the shelf-life of anhydrous cow milk fat. *Food chemistry*.199:541-546.

Slobodníková, L., Fialová, S., Rendeková, K., Kováč, J., Mučaji, P. 2016. Antibiofilm activity of plant polyphenols. *Molecules*. 21(12) :1717.

Snedecor, G. W., & Cochran, W. G. 1984. Méthodes statistiques. Paris: Association de coordination technique agricole.

Solokhina, A., Bonkat, G., Kulchavenya, E., Braissant, O. 2018. Drug susceptibility testing of mature *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra and *Mycobacterium smegmatis* biofilms with calorimetry and laser spectroscopy. *Tuberculosis*. 113 : 91-98.

Sowmya, R., Sachindra, N. M. 2015. Carotenoid production by Formosa sp. KMW, a marine bacteria of *Flavobacteriaceae* family : Influence of culture conditions and nutrient composition. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 4(4) : 559-567.

Spigelman, M. K. 2007. New tuberculosis therapeutics : a growing pipeline. *The Journal of infectious diseases*. 196(Supplement_1). S28-S34.

Sqalli, H., El Ouarti, A., Ennabili, A., Ibnsouda, S., Farah, A., Haggoud, A., Houari A., Iraqui, M. 2007. Evaluation de l'effet antimycobactérien de plantes du centre-nord du Maroc. *Bulletin de la Société de pharmacie de Bordeaux*. 146 :271-288.

Squalli H. 2008. Valorisation des plantes du centre du maroc-recherche de l'activité antimycobactérienne. Habilitation Universitaire, *Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Faculté des Sciences et Techniques, Fès.*

Srinivasan, M., Kalpana, K. B., Devipriya, N., Menon, V. P. 2014. Protective effect of lycopene on whole body irradiation induced liver damage of Swiss albino mice : Pathological evaluation. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 4(2) : 87-94.

Srivastava, S., Srivastava, A. K. 2015. Lycopene ; chemistry, biosynthesis, metabolism and degradation under various abiotic parameters. *Journal of Food Science and Technology* .52(1) : 41-53.

Stahl, W., Heinrich, U., Jungmann, H., Sies, H., Tronnier, H. 2000. Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light–induced erythema in humans. *The American journal of clinical nutrition*. 71(3). 795-798.

Stahl, W., Heinrich, U., Wiseman, S., Eichler, O., Sies, H., Tronnier, H. 2001. Dietary tomato paste protects against ultraviolet light–induced erythema in humans. *The Journal of nutrition*. 131(5) : 1449-1451.

Stahl, W., Sies, H. 1992. Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. *The Journal of nutrition*.122(11) : 2161-2166.

Stahl, W., Sies, H. 1996. Lycopene : a biologically important carotenoid for humans. *Archives of biochemistry and biophysics*. 336(1) :1-9.

Steinbrenner, J., Linden, H. 2001. Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga Haematococcus pluvialis. *Plant physiology*. 125(2) : 810-817.

Stephen, N. M., Gayathri, R., Niranjana, R., Prasad, Y., Das, A. K., Baskaran, V., Ganesan, P. 2017. Carotenoids : types, sources, and biosynthesis. In Plant Secondary Metabolites, Volume Two (pp. 103-132). Apple Academic Press.

Sudjana, A.N, D'Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., Riley, T.V, Hammer K.A.2008. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 33 : 461-463

Sulieman, A. E. R. M., El-Makhzangy, A. T. T. Y. A., Ramadan, M. F. 2006. Antiradical performance and physicochemical characteristics of vegetable oils upon frying of French fries : a preliminary comparative study. *Journal of Food Lipids*.13(3) :259-276.

Sun, D., Zhang, Z., Zhang, Y., Cheng, K. W., Chen, F. 2019. Light induces carotenoids accumulation in a heterotrophic docosahexaenoic acid producing microalga, *Crypthecodinium* sp. SUN. *Bioresource technology*. 276 : 177-182.

Svobodová, A., Psotová, J., Walterová, D. 2003. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 147(2) : 137-145.

Tahraoui, A., El-Hilaly, J., Israili, Z.H., Lyoussi, B. 2007. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension anddiabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province). *Journal of Ethnopharmacology.* 110: 105–117.

Tarmizi, A. H., Hishamuddin, E., Abd Razak, R. A. 2019. Impartial assessment of oil degradation through partitioning of polar compounds in vegetable oils under simulated frying practice of fast food restaurants. *Food Control*. 96 : 445-455.

Tárnok, I., Tarnok, Z. S. 1971. Carotenes and xanthophylls in mycobacteria. II. Lycopene, α- and β-carotene and xanthophyll in mycobacterial pigments. *Tubercle*.52(2) :127-135.

Taron-Dunoyer, A., Gonzalez-Cuello, R., Juan, F. C., Jose, D. B., Garcia Zapateiro, L. 2018. Use of lycopene as a natural antioxidant in a high-fat food type butter. *Contemporary Engineering Sciences*. 11(27) : 1301-1311.

Teixeira, P. C., Leite, G. M., Domingues, R. J., Silva, J., Gibbs, P. A., Ferreira, J. P. 2007. Antimicrobial effects of a microemulsion and a nanoemulsion on enteric and other pathogens and biofilms. *International journal of food microbiology*.118(1) :15-19.

Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Lowrie, D., Cole, S., Colston, M.J., Matter, L., Schopfer, K., Bodmer, T.1993. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Lancet*. 341 : 647-650.

Tessema, B., Mulu, A., Kassu, A., Yismaw, G. 2006. An *in vitro* assessment of the antibacterial effect of garlic (*Allium sativum*) on bacterial isolates from wound infections. *Ethiopian medical journal*. 44 : 385-9.

Tian, L., Xu, X., Jiang, L., Zhang, Z., Huang, H. 2019. Optimization of fermentation conditions for carotenoid production in the radiation-resistant strain Deinococcus xibeiensis R13. *Bioprocess and biosystems engineering*. 42(4) : 631-642.

Unissa, A. N., Subbian, S., Hanna, L. E., Selvakumar, N. 2016. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection, Genetics and Evolution.* 45 : 474-492.

Upadhyay, A., Upadhyaya, I., Kollanoor-Johny, A., Venkitanarayanan, K. 2014. Combating Pathogenic Microorganisms Using Plant-Derived Antimicrobials: A Minireview of the Mechanistic Basis. *BioMed Research International*. 2014: 1-18.

Van der Mei, H. C., Bos, R., Busscher, H. J. 1998. A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. *Colloids and surfaces B* : *Biointerfaces*. 11(4) : 213-221.

van Oss, C. J. 2003. Long-range and short-range mechanisms of hydrophobic attraction and hydrophilic repulsion in specific and aspecific interactions. *Journal of Molecular Recognition*.16(4) : 177-190.

Van Oss, C. J., Chaudhury, M. K., Good, R. J. 1987. The mechanism of partition in aqueous media. *Separation Science and Technology*. 22(6) :1515-1526.

Van Oss, C. J., Giese, R. F. 1995. The hydrophilicity and hydrophobicity of clay minerals. *Clays and Clay minerals*. 43(4) :474-477.

Vasse, M., Noble, R. J., Akhmetzhanov, A. R., Torres-Barceló, C., Gurney, J., Benateau, S., Gougat-Barbera C, Kaltz O., Hochberg, M. E. 2017. Antibiotic stress selects against cooperation in the pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 114(3): 546-551.

Veziris, N., Cambau, E., Sougakoff, W., Robert, J., Jarlier, V. 2005. Résistance aux antituberculeux. *Archives de pédiatrie*. 12 : S102-S109.

Vilchèze, C., Jacobs, W. R. 2014. Resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis* : genes, mutations, and causalities. In Molecular Genetics of Mycobacteria, Second Edition (pp. 431-453). American Society of Microbiology.

Viveiros, M., Krubasik, P., Sandmann, G., Houssaini-Iraqui, M. 2000. Structural and functional analysis of the gene cluster encoding carotenoid biosynthesis in *Mycobacterium aurum* A+. *FEMS microbiology letters*. 187(1) :95-101.

Vogel, P., Machado, I. K., Garavaglia, J., Zani, V. T., de Souza, D., Dal Bosco, S. M. 2015. Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L) to human health. *Nutrición hospitalaria*. 31(3) : 1427-1433.

Vogler E. 1998. Structure and Reactivity of water at Biomaterial Surfaces. *Interface. Science.* 74 : 69-117.

Voladri, R. K. R., Lakey, D. L., Hennigan, S. H., Menzies, B. E., Edwards, K. M., Kernodle, D. S. 1998. Recombinant expression and characterization of the major β-lactamase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*.42(6) : 1375-1381.

Waghmare, A., Patil, S., LeBlanc, J. G., Sonawane, S., Arya, S. S. 2018. Comparative assessment of algal oil with other vegetable oils for deep frying. *Algal Research*. 31 : 99-106.

Wang, X. F., Huang, Y. F., Wang, L., Xu, L. Q., Yu, X. T., Liu, Y. H., Li, C. L., Zhan, J. Y. X., Su, Z. R., Chen, J. N., Zeng, H. F. 2016. Photo-protective activity of pogostone against UV-induced skin premature aging in mice. *Experimental gerontology*.77 :76-86.

Wang, Z., Fan, J., Wang, J., Li, Y., Xiao, L., Duan, D. and Wang, Q. 2016, Protective effect of lycopene on high-fat diet-induced cognitive impairment in rats. *Neuroscience Letters*. 627 : 185-191.

WHO. Global Tuberculosis Report 2016. Geneva: World Health Organization; 2016.

WHO. Global tuberculosis report. 2017. Geneva : World Health Organization, 2017.

WHO.. *Global tuberculosis control : epidemiology, strategy, financing : WHO report 2009*. World Health Organization.

Won, E. J., Han, J., Lee, Y., Kumar, K. S., Shin, K. H., Lee, S. J., Park, H. G., Lee, J. S. 2015. *In vivo* effects of UV radiation on multiple endpoints and expression profiles of DNA repair

and heat shock protein (Hsp) genes in the cycloid copepod *Paracyclopina nana*. *Aquatic Toxicology*. 165 : 1-8.

Woodman, M., Haeusler, I. L., Grandjean, L. 2019. Tuberculosis Genetic Epidemiology : A Latin American Perspective. *Genes*. 10(1) : 53.

Xiang, X., Deng, W., Liu, M., Xie, J. 2014. Mycobacterium biofilms : factors involved in development, dispersal, and therapeutic strategies against biofilm-relevant pathogens. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*. 24(3).

Yamano, S., Ishii, T., Nakagawa, M., Ikenaga, H., Misawa, N. 1994. Metabolic engineering for production of β-carotene and lycopene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 58(6) : 1112-1114.

Yang, W. 2011. Surviving the sun: Repair and bypass of DNA UV lesions. *Protein Science*. 20:1781-1789.

Yang, Y., Thomas, J., Li, Y., Vilchèze, C., Derbyshire, K. M., Jacobs Jr, W. R., Ojha, A. K. 2017. Defining a temporal order of genetic requirements for development of mycobacterial biofilms. *Molecular microbiology*. 105(5) :794-809.

Yoon, S.H., Kim, J.E., Lee, S.H., Park, H.M., Choi, M.S., Kim, J.Y., Lee, S.H., Shin, Y.C., Keasling, J.D., Kim, S.W., 2007. Engineering the lycopene synthetic pathway in E. coli by comparison of the carotenoid genes of Pantoea agglomerans and Pantoea ananatis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74(1) :131-139.

Zambrano, M. M., and Kolter, R. 2005. Mycobacterial biofilms : a greasy way to hold it together. *Cell* .123 :762-764.

Zelkha, M., Ben-Yehuda, M., Hartal, D., Raveh, Y., Garti, N. 1997. Industrial processing of tomatoes and lycopene extraction. *WO patent*. 97 : 48287.

Zhang Y.2007. Advances in the treatment of tuberculosis. *Clin Pharmacol Ther*. 82 : 595- 600.

Zhang, L., Mah, T. F. 2008. Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. *Journal of bacteriology*. 190(13) : 4447-4452.

Zhang, Q., Saleh, A.S.M., Chen, J., Shen, Q., 2012. Chemical alterations taken place during deep-fat frying based on certain reaction products: a review. *Chem. Phys. Lipids* .165 :662-681.

Zhang, X., Xie, Y. L., Yu, X. T., Su, Z. Q., Yuan, J., Li, Y. C., Su, Z. R., Zhan, J. Y. X., Lai, X. P. 2015. Protective effect of super-critical carbon dioxide fluid extract from flowers and buds of *Chrysanthemum indicum* linnen against ultraviolet-induced photo-aging in mice. *Rejuvenation research*. 18(5) : 437-448.

Zhang, Y., Yew, W. W. 2009. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [State of the art series. Drug-resistant tuberculosis. Edited by CY. Chiang. Number 1 in the series]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*.13(11) : 1320-1330.

Zhang, Z., Lu, J., Liu, M., Wang, Y., Zhao, Y., Pang, Y. 2017. *In vitro* activity of clarithromycin in combination with other antimicrobial agents against *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium massiliense*. *International journal of antimicrobial agents*. 49(3) : 383-386.

Zhao, Y., Guo, L., Xia, Y., Zhuang, X., Chu, W. 2019. Isolation, Identification of Carotenoid-Producing *Rhodotorula* sp. from Marine Environment and Optimization for Carotenoid Production. *Marine drugs*. 17(3) :161.

Zhu, B., Dockrell, H. M., Ottenhoff, T. H., Evans, T. G., Zhang, Y. 2018. Tuberculosis vaccines : Opportunities and challenges. *Respirology*. 23(4) : 359-368.

Annexes

Annexe 1 : Composition des milieux de culture

- Composition du milieu **LB (Luria Bertoni)**

Tableau 18: Composition du milieu LB (Luria Bertoni)

Constituant	Concentration en (g/l)
Peptone	10 g
NaCl	10 g
Extrait de levure	5 g

- Composition du milieu **Sauton**

Tableau 19: Composition du milieu Sauton

Constituants	Concentration en (g/l)
Phosphate monopotassique	1
Phosphate disodique	2,5
Sulfate de magnesium	0,01
Sulfate de zinc	0,001
Sulfate de cuivre	0,001
Citrate d'ammonium de fer	0,05
Casitone	2
Asparagine	5
Glycérol	10

- Composition du milieu **Mueller-Hinton**

Tableau 20: Composition du milieu Mueller-Hinton

Constituants	Concentration en (g/l)
infusion de viande de bœuf	300 ml
Peptone de caséine	17,5
Amidon de maïs	1,5

Annexe 2: Solutions

- Tompon d'électrophorése **(TAE)**

Tableau 21: Constituants du tompon d'électrophorése (TAE)

Constituants	Quantité
Tris base	242 g
Acide acétique glacial 100%	57,1 ml
EDTE 0,5 M	100 ml
EDS	800 ml

- Solution de charge

Tableau 22: Constituants de la solution de charge

Constituants	Quantité
Bleu de bromophénol	2,5 mg
Glycérol	300 µl
EDS	700 µl

- Solutions d'extraction du plasmide:

Solution I : Glucose 50 mM, Tris HCl 25 mM, EDTA 10 mM ; pH 8

Solution II : SDS 1 %, NaOH 0,2 N

Solution III : Acétate de potassium 5 M ; pH 4,8

Annexe 3: photos des plantes étudiés

Olea europaea



https://naturealpha.skyrock.com/3244364794-Olivier-europeen-Olea-europaea.html

Berberis hispanica



https://www.teline.fr/fr/photos/berberidaceae/berberis-hispanica#photo-4

Populus alba



http://vizcayado.blogspot.com/2011/02/populus-alba-bolleana.html

Arbutus unedo



https://materredebruyere.blogspot.com/2010/09/parlons-de-larbousier-arbutus-unedo-ou.html