



UNIVERSITE FRANÇAISE
DU PACIFIQUE



Université Française du Pacifique
Centre Universitaire de Polynésie Française

Diplôme d'Etudes Approfondies

"Connaissance et Gestion des Milieux Coralliens Littoraux et Océaniques"
(C.G.Mi.C.L.O.)

présenté par

Marie - Hélène COURBAT

**RECHERCHE DE NOUVELLES SUBSTANCES ANTIBIOTIQUES
DE SOUCHES BACTERIENNES ISOLEES D'UN SPONGIAIRE
ANOMOIANHELLA RUBRA Bergquist (1995)**

sous la direction scientifique de Cécile DEBITUS, Docteur ès Sciences

soutenu le 30 juin 1995 à Papeete devant le Jury composé de

| | | |
|------------------|----------------------|-----------------------|
| <u>Président</u> | Raymond BAGNIS | Professeur |
| <u>Membres</u> | M. Christian HERBAUT | Professeur |
| | M. Bernard MARTIN | Maître de Conférences |
| | Mme. Claude PAYRI | Professeur |
| | M. Antoine PEYRE | Professeur |

Laboratoire d'accueil :
Département Santé, UR des substances naturelles d'intérêt thérapeutique, laboratoire des Biotechnologies marines, centre
ORSTOM de Nouméa-Nouvelle Calédonie

ABBREVIATIONS

Souches pathogènes

S. a : *Staphylococcus aureus*

V. a : *Vibrio anguillarum*

K. p : *Klebsiella pneumoniae*

E. c : *Escherichia coli*

P. a : *Pseudomonas aeruginosa*

C. a : *Candida albican*

Milieux de culture

MA : Marine Agar

MB : Marine Broth

MH : Müller Hinton

EdM : eau de mer

CL : concentration létale

SOMMAIRE

| | |
|--|------|
| Introduction | p 2 |
| (Présentation du programme général dans lequel entre l'étude) | |
| I généralités | p 2 |
| 1) la chimie des organismes marins dans la chimie des substances naturelles | p 2 |
| 2) la chimie des microorganismes marins | p 4 |
| II travaux personnels : Etude d'une souche bactérienne isolée de <i>Anomoianthella rubra</i> (Verongida, <i>Ianthellidae</i>) | p 5 |
| 1) généralités sur les <i>Ianthellidae</i> : | p 5 |
| 2) Etude de <i>Anomoianthella rubra</i> n.sp. BERQUIST (1995) | p 6 |
| a) biologie, écologie | p 7 |
| b) activité des extraits d'éponge | p 8 |
| 3) étude de la microflore de <i>Anomoianthella rubra</i> | p 8 |
| a) isolement des souches actives | p 8 |
| b) mise en culture et activité des extraits bruts | p 9 |
| 4) étude de la souche R171-23 | p 9 |
| a) caractéristiques morphologiques | p 9 |
| b) mise en culture | p 10 |
| c) propriétés des extraits sur souches pathogènes aquacoles et larves de crustacés | p 11 |
| d) localisation de l'activité culot /surnageant | p 12 |
| 5) recherche du principe actif | p 12 |
| a) sur extrait total (culot + surnageant) | p 12 |
| b) mise en évidence du principe actif | p 12 |
| c) isolement du principe actif | |
| - chromatographie analytique préliminaire de l'extrait brut | |
| - chromatographie préparative moyenne pression | |
| - analyse en CLHP sur fraction active : | |
| Conclusion | p 14 |
| Partie expérimentale | p 15 |
| Bibliographie | p 24 |
| Remerciements | p 27 |

INTRODUCTION

Ce travail est réalisé dans le cadre du programme Biotechnologies Marines mené à Nouméa par l'unité de recherches "Substances Naturelles d'Intérêt Thérapeutique" du département Santé de l'ORSTOM.

Pendant plus de 15 ans, les organismes marins de Nouvelle Calédonie ont été étudiés tant au niveau de la zoologie que de leur composition chimique et de leur intérêt pharmacologique potentiel. Un grand nombre de produits intéressants ont été isolés, soit pour leur intérêt académique, soit pour leur activité pharmacologique, en particulier dans le domaine des antibiotiques.

Ce travail de criblage a montré combien il est important de disposer de sources fiables de matière première, ce qui est rarement le cas avec les organismes marins, et jamais dans le cas d'organismes intéressants ! L'étude des organismes marins de Nouvelle Calédonie a été orientée vers les microorganismes marins qui constituent une source intéressante et maîtrisable de métabolites actifs originaux.

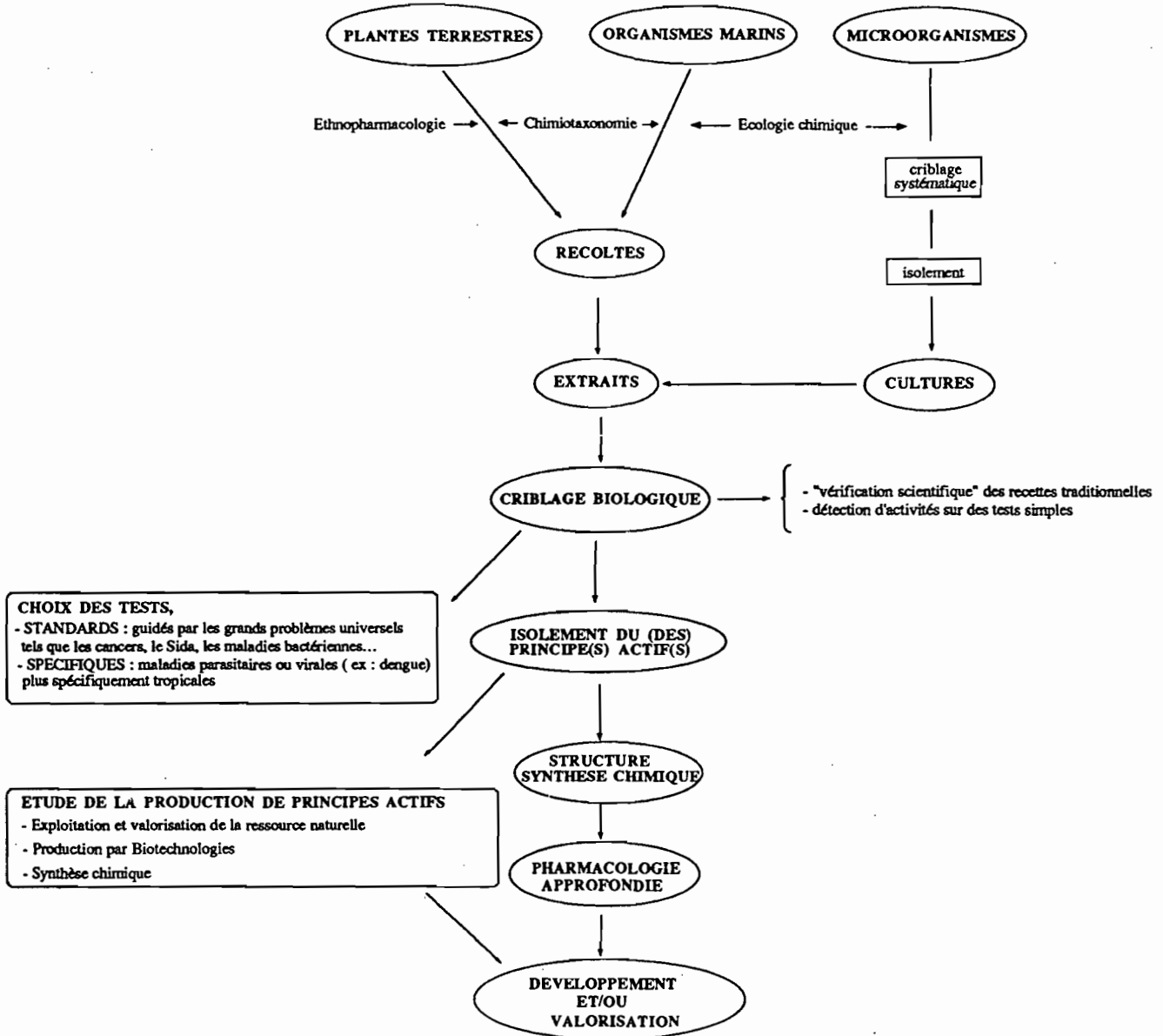
Devant l'intérêt du développement de l'aquaculture en particulier dans la zone intertropicale - la production de crevettes pénéïdes est l'une des principales ressources de la Nouvelle-Calédonie -, la recherche de principes actifs sur les principaux agents pathogènes des élevages aquacoles a été développée (programme ORSTOM-IFREMER).

I Généralités

1) La chimie des organismes marins dans la chimie des substances naturelles

L'océan possède une grande biodiversité. Le nombre d'espèces y vivant est estimé entre 2,5 et 4,5 millions dont la majorité n'est pas encore décrite. Cette biodiversité offre un potentiel énorme de découverte de nouvelles substances naturelles pharmacologiquement actives. Les organismes marins vivent dans des environnements complètement différents de ceux rencontrés dans le milieu terrestre. C'est pour cette raison qu'ils sont soupçonnés produire des composés possédant des structures et des activités uniques afin de répondre aux besoins dictés par leur conditions de vie. Aujourd'hui, le rôle de certains métabolites secondaires dans les interactions aussi bien écologiques que comportementales été mis en évidence.

Substances Naturelles d'Intérêt Biologique



Les fonctions de ces composés peuvent être diverses: défense chimique contre des agresseurs potentiels ou espèces concurrentes. Ainsi des invertébrés tels que les éponges, les coraux ou les ascidies synthétisent des métabolites dans le but d'éloigner des poissons prédateurs, de lutter pour l'espace, de contrôler la colonisation et le développement bactérien sur leurs surfaces (1,2,3,4).

Les produits naturels marins ont reçu une attention toute particulière depuis ces vingt dernières années. Les premières recherches de principes actifs ont été réalisées par Bergmann dans les années 50. Il a isolé deux ara-nucléosides de l'éponge *Cryptothethya crypta*. Ces ara-nucléosides sont à l'origine de toute une série de synthèse d'analogues à activité antivirale (Ara-C) et antitumorale (Ara-A). La découverte de ces substances, et de leurs activité biologique a ouvert une nouvelle voie de recherche importante (5).

Aujourd'hui, environ 4000 nouveaux métabolites ont été isolés d'organismes marins aussi divers que procaryotes, invertébrés, ou poissons. Ces métabolites possèdent des origines biosynthétiques variées. Une analyse de la distribution phylogénétique de ces composés montre que la majorité (93%) sont confinés dans quatre groupes principaux: macroalgues, coelentérés, échinodermes et éponges. Actuellement les éponges sont les plus étudiées. Ceci est expliqué par le fait qu'elles ont de multiples possibilités dans leurs voies de biosynthèses que ne possèdent pas les autres organismes marins (6,7,8). Environ 400 substances actives ont été isolées; parmi elles se trouvent des antitumoraux, antiviraux, immunomodulateurs, antibiotiques, antifongiques, inhibiteurs enzymatiques ainsi que des molécules agissant au niveau des systèmes cardiovasculaire et nerveux. Actuellement trois médicaments d'origine marine sont commercialisés: des antibiotiques (les céphalosporines ayant pour origine des champignons marins), un antiviral (Ara-C : vidarabine), et un antitumoral (Ara-A : cytarabine). Il est important de noter qu'un grand nombre de composés nouveaux sont décrits chaque année, ce qui montre bien que les organismes marins sont toujours une source potentielle importante de produits naturels actifs originaux.

Il n'existe pas d'utilisation traditionnelle sur laquelle fonder une démarche ethnopharmacologique pour l'étude des organismes marins (schéma 1). Des méthodes modernes de criblage pharmacologique systématique rendent cependant possible la mise en évidence de molécules actives des organismes marins, dont le succès peut être favorisé par la chimiotaxonomie et l'écologie chimique (9). Seul un tout petit nombre de ces substances sera exploité à des fins pharmacologiques car la molécule doit répondre à de nombreux critères dont: activité, stabilité, absence de toxicité, mais aussi disponibilité.

En raison de contraintes écologiques, il est rarement possible, en industrie, de pouvoir exploiter un organisme marin en quantité suffisante pour en extraire les principes actifs ; la synthèse est donc privilégiée. Deux méthodes sont à présent utilisées pour obtenir des produits en quantité suffisante: la synthèse et l'hémisynthèse qui est la transformation d'un précurseur naturel. Cependant la synthèse de molécules complexes est rarement compatible avec des objectifs économiques.

Dans notre laboratoire le choix des organismes à étudier s'est porté sur les spongiaires. Le nombre d'espèces est en effet particulièrement important dans le lagon de Nouvelle-Calédonie (plus de 600) (10). Les spongiaires possèdent de plus les meilleures activités antibiotiques. Organismes filtreurs, consommateurs de micro-organismes tels que bactéries ou microplanctons, les spongiaires ont, au cours de l'évolution, adapté un système de résistance contre le développement bactérien. Ces mécanismes de défense ont pour origine la production de substances interdisant l'invasion par les microorganismes étrangers, substances dont il est intéressant de rechercher l'origine, étant donné que la proportion en matière vivante de bactéries peut atteindre 30% chez certaines éponges. Il a été démontré chez *Dysidea herbacea* que les propriétés anti-microbiennes étaient dues non seulement à la production par l'éponge elle-même de substances actives mais aussi à la synthèse de composés par leurs propres bactéries symbiotiques (11).

2) La chimie des microorganismes marins

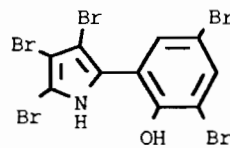
Depuis la découverte de la pénicilline en 1929, le monde des microorganismes est une source importante de substances utiles en santé : à ce jour, environ 50000 produits ont été découverts à partir de microorganismes. Parmi eux figurent 10000 principes actifs dont 5000 sont des antibiotiques. Ceci montre bien le potentiel important de biosynthèse et de production de métabolites biologiquement actifs des microorganismes.

La plupart des antibiotiques originaires du monde microbien proviennent de bactéries terrestres appartenant au groupe des actinomycètes. Il est clair que la découverte de nouveaux métabolites isolés d'actinomycètes est en plein déclin. 90% des produits obtenus de souches actives sont des produits déjà connus. De nouvelles sources de produits naturels biologiquement actifs doivent être explorées. D'un point de vue microbiologique, l'océan est très diversifié, et offre des conditions de vie variées aussi bien au niveau de la température, de la salinité que de la pression. Les microorganismes ont su développer des capacités

physiologiques et métaboliques uniques afin d'assurer leur survie dans des conditions extrêmes et offrent un potentiel de production de métabolites originaux, jamais observés chez les organismes terrestres (12).

En 1947, Rosenfeld et Zobell mettent en évidence la production d'agents antimicrobiens par une bactérie marine. De plus, ils montrent que l'eau de mer possède des propriétés bactéricides dues certainement à la production d'antibiotiques par des algues planctoniques mais aussi par des bactéries.

Dans les années 70, Burkholder et ses collaborateurs purifient le premier antibiotique à partir d'une bactérie marine. Lovell identifie sa structure : un pyrrole bromé.



Les activités biologiques des substances découvertes par la suite ne se limitent pas à des propriétés antibiotiques, qui ont été principalement mises en évidence dans la microflore des sédiments. Les substances produites par des bactéries isolées d'organismes marins (gorgones, éponges, ascidies), ont essentiellement des activités antimicrobiennes, anticancéreuses et antibiotiques (13 à 25). Les structures chimiques de ces composés sont très variées. Ce sont des polysaccharides, aminoglycosides, quinones, alcaloïdes halogénés...

II Travaux personnels: Etude d'une souche bactérienne isolée de *Anomoianthella rubra* (*Verongida*, *Ianthellidae*)

Cet échantillon a été choisi en raison de sa surface toujours propre et dépourvue d'organismes épiphytes, critères de choix des organismes étudiés dans le cadre du programme Biotechnologies Marines.

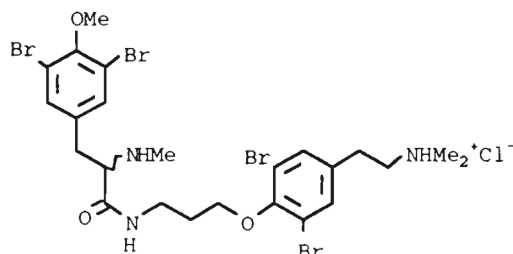
1) Généralités sur les *Ianthellidae*. (ordre des *Verongida*)

Actuellement, l'ordre des *Verongida* a permis l'isolement d'un grand nombre de substances antibiotiques : environ 30% de tous les composés isolés de cet ordre appartiennent à cette famille. La majorité de ces produits sont des dérivés bromés ou chlorés de la tyrosine qui apparaissent comme étant des substances très caractéristiques de cet ordre. Cependant, ces composés ont uniquement été isolés d'extraits d'éponges, jamais de leur microflore.

L'éponge étudiée, *Anomoianthella rubra* n.sp. Bergquist (1995) (26), appartient à la

famille des *Ianthellidae*. Elle n'est pas très abondante dans le lagon néo-calédonien et n'a jamais fait l'objet de recherche de principes actifs.

Une seule espèce, *Anomoianthella popae* a été étudiée. Un dérivé de la tyrosine, l'Anomoian A, actif sur *Staphilococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Candida albicans* a été isolé de l'extrait méthanolique (27).



Anomoian A

Les propriétés antibiotiques de ce métabolite, en particulier sur *Staphilococcus aureus* et *Candida albicans*, sont caractéristiques des substances dites "antifouling" protégeant ce spongiaire de la colonisation par les organismes épiphytes (28).

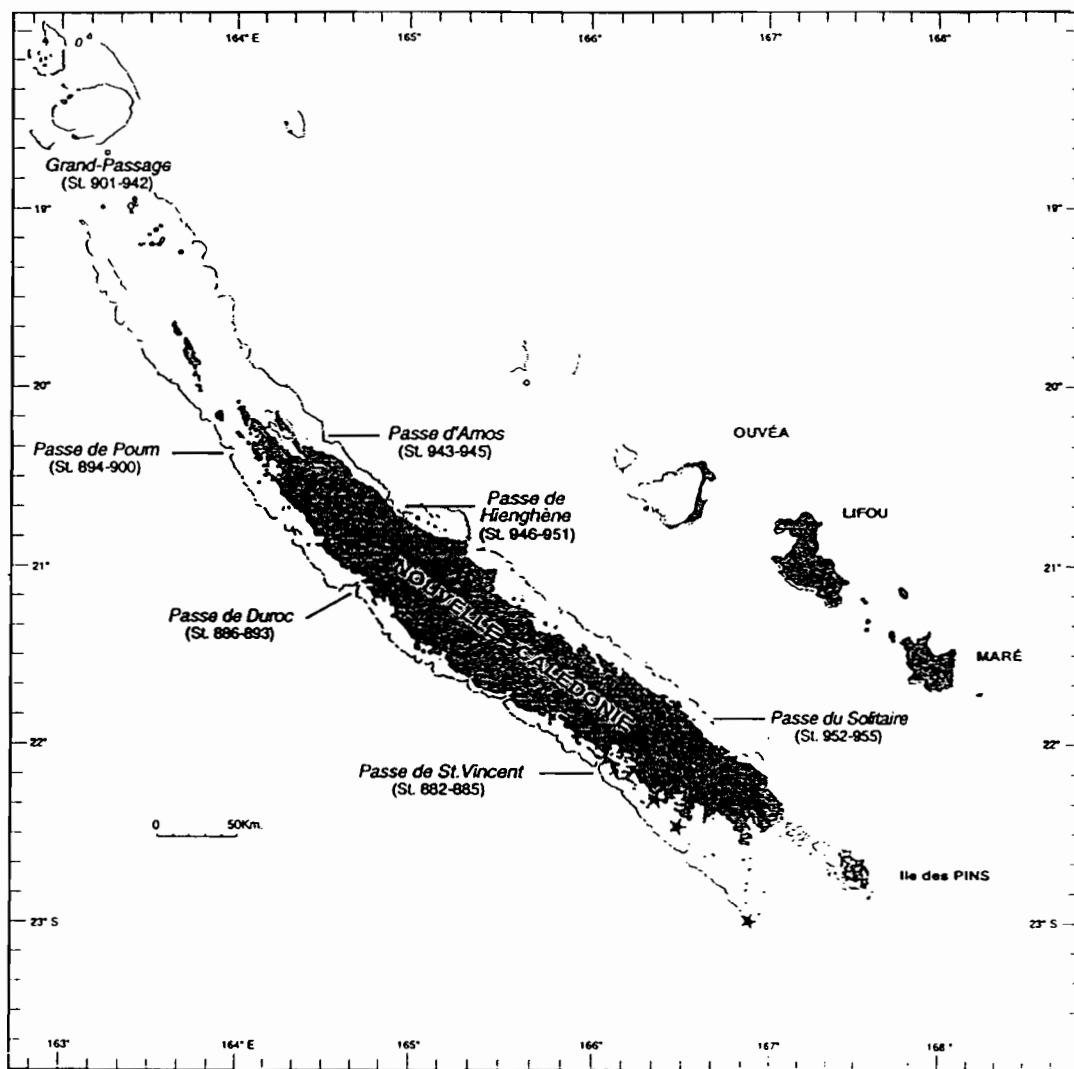
D'autres composés antibiotiques ont été décrits dans des éponges du genre *Ianthella* appartenant à la même famille (29 - 33).

2) Etude de *Anomoianthella rubra* n.sp. BERGQUIST (1995)



a) *biologie, écologie* : cette éponge couleur lie de vin se présente sous la forme d'une boule molle, plus ou moins allongée, hérissée d'aspérités piquantes. Sa taille peut atteindre 20 cm de diamètre. Cette espèce est assez commune dans le lagon Sud-Ouest de Nouvelle-Calédonie, mais toujours éparse. Elle se rencontre sur fond de sable gris coquiller, dans les passes sur fond mixte de dalle ensablée, à une profondeur de 19 à 24 m.

Un échantillon de référence est conservé dans la zoothèque du centre ORSTOM de Nouméa sous la référence R171. Elle a été décrite comme une nouvelle espèce par le Pr Patricia Bergquist (Université d'Auckland).



★ Lieux de récolte

Carte 1 : stations d'échantillonnage de R171

b) activité des extraits d'éponge

Afin de vérifier l'origine des défenses chimiques de l'éponge vis à vis des organismes épiphytes, deux extraits ont été réalisés, un extrait hydroalcoolique (B) et un extrait chlorométhylénique (C), et testés sur les souches pathogènes de criblage.

| souches | <i>S. a.</i> | <i>V. a.</i> | <i>K. p.</i> | <i>E. c.</i> | <i>P. a.</i> | <i>C. a.</i> |
|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| extrait B | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| extrait C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tableau 1: activité antibiotique des extraits d'éponge (100µg/disque et 1mg /disque)

Aucune inhibition n'est observée. L'éponge ne synthétise pas de substances antibiotiques ou "antifouling" responsables de l'aspect de sa surface. C'est donc à la surface de l'éponge que sont recherchés les agents protecteurs.

3) Etude de la microflore de *Anomoianthella rubra*

a) Isolement des souches actives:

Les souches actives (test de contact) ou atypiques (les souches atypiques sont souvent intéressantes pour d'autres propriétés) du frottis de départ sont isolées sur des milieux gélosés MA. Six souches bactériennes ont ainsi été isolées de notre éponge. Chacune d'entre elles a été testée par contact avec des souches pathogènes de référence. Parmi celles-ci, deux présentent une activité antibactérienne sur au moins une souche pathogène. L'activité est évaluée par le diamètre d'inhibition de croissance de la souche pathogène testée autour de la colonie étudiée.

| souches | <i>S. a.</i> | <i>V. a.</i> | <i>K. p.</i> | <i>E. c.</i> | <i>P. a.</i> | <i>C. a.</i> |
|---------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 171.10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 171.23 | 0 | ++++ | 0 | ++ | 0 | 0 |
| 171.3 | +++ | +++ | 0 | ++++ | 0 | 0 |
| 171.4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 171.5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 171.7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

"+": diamètre d'inhibition très faible (inf à 1 mm)
 "++": diamètre d'inhibition faible (entre 1 et 2 mm)
 "+++": diamètre d'inhibition moyen (entre 2 et 5 mm)
 "++++": diamètre d'inhibition important (+ 5 mm)

Tableau 2 : activités observées lors du test de contact

b) Mise en culture et activité des extraits bruts

Toutes les souches ayant présentée une activité, même faible, sont cultivées sur milieu gélosé et en bouillon afin de faire l'extraction de leurs principes actifs. Chaque extrait est déposé, à une concentration connue, sur un disque. L'auréole d'inhibition est mesurée et confirme la présence de composés antibiotiques actifs sur les souches pathogènes. Par ailleurs, la cytotoxicité des extraits est évaluée sur un test Kb (cellules épithéliales d'une tumeur de la gorge) en routine au laboratoire.

| souche | <i>S. a.</i> 1mg/disque | <i>V. a.</i> 1mg/disque | <i>K. p.</i> 1mg/disque | <i>E. c.</i> 1mg/disque | <i>P. a.</i> 1mg/disque | <i>C. a.</i> 1mg/disque | Kb 10µg/ml |
|--------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------|
| 171.3 | 15mm | 15mm | 0 | 25mm | 0 | 0 | <10% |
| 171.4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | <10% |
| 171.5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | <10% |
| 171.7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | <10% |
| 171.10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | <10% |
| 171.23 | 0 | 25mm | 0 | 10mm | 0 | 0 | <10% |
| témoin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

**tableau 3 : activité des extraits des cultures en Marine Agar
(diamètre des disques : 6mm)**

4) Etude de la souche R171-23

La souche R171-23 a été choisie pour étude approfondie pour son activité notable sur un agent pathogène marin, *Vibrio anguillarum*, ainsi que sa relative spécificité : l'activité sur les autres souches pathogènes est limitée à une inhibition minimale de *E. coli*. Cette spécificité peut-être intéressante pour une utilisation en aquaculture.

a) caractéristiques morphologiques

La bactérie 171.23 se présente sous forme de petites colonies circulaires convexes basses. Sa couleur est brune, et son aspect plutôt brillant avec une opacité au centre. Le test de Gram nous indique qu'il s'agit d'une bactérie Gram-. La microscopie permet d'observer un bacille de taille inférieure à 1 µm. Cette bactérie n'est pas répertoriée dans les banques de données biomédicales. Ceci confirme qu'il ne s'agit effectivement pas d'une souche courante.

b) mise en culture

| milieu | volume | rendement moyen en mg | activité sur <i>V. a.</i> à 1 mg/disque | croissance |
|-------------------------------------|-------------------|-----------------------|---|----------------------|
| MA | 3 boites de pétri | 7 mg | 15 mm | + |
| MB | 500 ml | 55 mg | 16 mm | + |
| Zobell/eau distillée+ 5g/l NaCl | 100 ml | 7 mg | auréole | + |
| Zobell/eau distillée+ 10g/l NaCl | 100ml | 7 mg | auréole | + |
| Zobell/eau distillée+ 15g/l NaCl | 100ml | 6 mg | auréole | + |
| Zobell/eau distillée+ 20g/l NaCl | 100ml | 4 mg | auréole | + |
| Zobell EdM 0% | 100ml | 7 mg | 0 | pas de croissance |
| Zobell EdM 25% | 100 ml | 8 mg | 0 | + |
| Zobell EdM 50% | 100 ml | 9 mg | 0 | + |
| Zobell EdM 100% | 100 ml | 5 mg | 0 | + |

Tableau 4: rendements et activités des extraits obtenus dans différents milieux de culture (diamètre du disque 6 mm)

Les milieux de cultures sont préparés avec de l'eau distillée additionnée de différentes quantités de chlorure de sodium. Il est à noter qu'ils ne permettent pas tous la croissance bactérienne. Le milieu sans eau de mer, ni chlorure de sodium ne permet pas le développement de la souche bactérienne ; ce milieu est hypotonique pour une souche bactérienne marine.

Les extraits obtenus de ces cultures ne possèdent pas tous des propriétés antibiotiques sur *Vibrio anguillarum*. Une auréole n'est pas significative (diamètre d'inhibition de 7mm environ pour un disque de 6 mm de diamètre).

Suivant la concentration en chlorure de sodium, ou en eau de mer, une phase de latence plus ou moins longue est observée. Les cultures sont arrêtées en phase exponentielle et la quantité d'extrait est donc fonction du temps d'incubation et de la durée de la phase de latence.

Les métabolites antibiotiques sont synthétisés uniquement en milieu Marine Broth (Difco), reste à déterminer quels en sont les éléments absents dans le milieu Zobell (Eau de Mer) et qui sont indispensables à cette synthèse.

Il est alors intéressant de tester l'activité des extraits d'éponge sur la souche 171.23; aucun des deux extraits B ou C n'inhibe sa croissance, ce qui montre qu'éponge et bactérie peuvent parfaitement vivre en symbiose et que cette souche bactérienne peut jouer un rôle dans la protection de son hôte.

c) propriétés des extraits sur souches pathogènes aquacoles et larves de crustacés

Dans le but de préciser l'activité antibiotique, l'extrait brut (culture liquide MB) est testé sur différentes souches pathogènes aquacoles.

| souches pathogènes aquacoles | Pathogénie | inhibition en mm à 500 µg et 250 µg par disque |
|-------------------------------|--|---|
| <i>Vibrio anguillarum</i> | très répandu chez les animaux marins, des bivalves aux poissons | 28 mm - 21 mm |
| <i>Vibrio alginolyticus</i> | naissains et larves de bivalves (surinfection des plaies et otites chez l'homme) | 23 mm - 18 mm |
| <i>Vibrio splendidus</i> | des anneaux bruns de la palourde | 34 mm- 24 mm |
| <i>Vibrio logei</i> | animaux marins en général | 34 mm- 25 mm |
| VRP (<i>Vibrio</i> sp.) | des larves de palourdes | 30 mm - 20 mm |
| S322 (<i>Vibrio</i> sp.) | des huîtres creuses | 15 mm - 11 mm |
| A365(<i>Vibrio</i> sp.) | des larves de coquille Saint Jacques | 33 mm - 25 mm |
| V.Turbot (<i>Vibrio</i> sp.) | des larves de Turbot | 33 mm - 23 mm |
| <i>Pseudomonas</i> U1 | stimule les élevages larvaires | 24 mm - 16 mm |

Tableau 5 : activité de l'extrait d'une culture en bouillon (MB) sur divers agents pathogènes marins

Il est intéressant de remarquer que certaines souches bactériennes du biotope sont nécessaires au bon développement de certains organismes marins. Ainsi le *Pseudomonas* U1, isolé de la microflore de l'eau de mer, est indispensable à la survie des larves. Dans notre cas, on voit que l'activité antibiotique de l'extrait est relativement importante sur *Pseudomonas* U1. Il s'agira de doser l'antibiotique lors d'une future utilisation afin de limiter son action sur *Pseudomonas* tout en conservant l'effet bactéricide sur d'autres souches plus sensibles.

En aquaculture, les principaux problèmes sanitaires sont posés dès le stade larvaire, dans les écloseries : il est donc essentiel que la toxicité de l'antibiotique soit faible et autorise la survie de la population larvaire des espèces élevées. Un test sur larves de crustacés (*Artemia salina*) fraîchement éclosent (stade nauplii) révèle la toxicité potentielle de l'antibiotique. (34)

| concentration de l'extrait | mortalité (%) |
|----------------------------|---------------|
| 10 µg/ml | 2% |
| 50 µg/ml | 6% |
| 100µg/ml | 46% |

Tableau 6 : toxicité de l'extrait d'une culture liquide (MB) sur *Artemia salina*

A une concentration relativement élevée d'extrait brut, la mortalité reste inférieure à 50%. La CL₅₀ est supérieure à 100µg/ml : notre extrait actif est considéré comme étant faiblement toxique.

d) localisation de l'activité culot/surnageant

Dans le but de déterminer dans quelle fraction se trouve le principe actif, le culot ainsi que le surnageant d'une culture liquide (MB) sont extraits séparément. L'activité antibiotique est présente uniquement dans le surnageant (500 µg/disque ->inhibition de 27mm). Le culot quant à lui est inactif sur *V. anguillarum*.

5) Recherche du principe actif

a) sur extrait total (culot+surnageant)

Sachant que l'activité antibiotique se retrouve uniquement dans le surnageant, et que l'extrait du culot représente une quantité négligeable du poids total d'extrait (12 mg/l soit 10%), l'extraction est réalisée sur la culture non centrifugée.

b) mise en évidence du principe actif

En utilisant le principe de l'autobiogramme, il est possible de localiser la fraction contenant les principes actifs, et d'estimer sa polarité dans un solvant donné. Une plaque de CCM analytique est utilisée pour la chromatographie de l'extrait brut (solvant de migration : CH₂Cl₂/ MeOH : 95/5). La plaque est déposée sur une boîteensemencée avec *V. anguillarum*. La zone d'inhibition correspond à l'endroit où se trouve le(s) principe(s) actif (s). Celle-ci est localisée dans le quart supérieur de l'autobiogramme. Les produits actifs migrent rapidement dans le solvant utilisé : ils sont très peu polaires.

c) isolement du principe actif

- chromatographie analytique préliminaire de l'extrait brut :

Pour la chromatographie, différents mélanges de solvants ont été testés. Celui retenu (CH₂Cl₂/ MeOH : 95/5) permet la meilleure séparation des différents constituants de l'extrait

brut. Le Rf du principe actif est de 0,22. Ce solvant sera utilisé pour toutes les chromatographies sur gel de silice.

En faisant la corrélation entre la position de la zone d'inhibition obtenu sur l'autobiogramme et la révélation à la vanilline sulfurique d'une plaque CCM, nos produits sont colorés en rose (acides gras ou stérols?). La révélation au Dragendorff après migration dans le solvant accompagné de vapeurs d'ammoniaque, ne présente aucune coloration caractéristique de la présence d'alcaloïdes. La révélation aux UV ($\lambda=254$ nm) des CCM n'est que très indicative.

- chromatographie préparative moyenne pression:

| fractions | poids en mg | activité (mm d'inhibition) dépôt de 100 μ g / disque |
|-----------|-------------|---|
| 1 | 13 | 0 - 0 |
| 2 | 32 | 0 - 0 |
| 3 | 3 | 0 - 0 |
| 4 | 8 | 0 - 0 |
| 5 | 15 | 12mm - 14mm |
| 6 | 27 | 13mm - 13mm |
| 7 | 5 | 0 - 0 |
| 8 | 8 | 0 - 0 |
| 9 | 3 | 0 - 0 |
| 10 | 2 | 0 - 0 |

Tableau 7 : poids et activités des fractions obtenues par chromatographie à moyenne pression de l'extrait brut

Les produits recherchés sont relativement bien purifiés puisque l'activité ne se retrouve que dans deux fractions (n° 5 et 6). Le rendement de cette chromatographie est supérieur à 78%, dans notre cas il n'est alors pas nécessaire de réaliser un gradient de solvant.

- analyse en CLHP des fractions actives:

cette analyse est en cours sur deux types de colonnes, en phase normale (silice) et en phase inverse C18.

CONCLUSION

L'éponge *Anomoianthella rubra* nous a permis d'isoler plusieurs souches bactériennes vivant sur sa surface, et capables de synthétiser des métabolites actifs. Une d'entre elles, active spécifiquement sur un pathogène marin, *Vibrio anguillarum*, a été retenue pour une étude plus approfondie. La faible toxicité des extraits bruts a été évaluée sur des larves d'*Artemia*.

Différents essais de culture en milieux liquides et solides ont été réalisés. La croissance avec production de composés antibiotiques est possible uniquement en milieu Marine Broth (liquide ou solide). Les raisons de ce phénomène n'ont pas été résolues.

Les métabolites actifs, quant à eux, ont été partiellement purifiés par différentes chromatographies successives (moyenne et haute pression). A chaque étape, l'activité antibiotique a été contrôlée par un test sur pastilles déposées sur la souche pathogène de référence, et l'activité recherchée sur divers vibrios pathogènes en aquaculture.

Actuellement l'extrait purifié est en cours d'analyse par CLHP. Après cette étape de purification, la détermination structurale du principe actif pourra être réalisée (spectres UV, IR, RMN, masse). La structure de notre produit sera comparée à celles de composés antibiotiques déjà connus.

Par ailleurs, son rôle dans la protection de la surface de l'éponge doit être approfondi par recherche d'une activité sur les bactéries marines responsables du "fouling".

Son originalité, ainsi que son spectre d'activité, lui permettra peut être de devenir une substance potentiellement intéressante pour l'industrie et les aquaculteurs.

Ce type d'étude doit être étendu aux autres espèces de l'ordre des Verongida présents en Nouvelle Calédonie.

PARTIE EXPERIMENTALE

| | |
|--|-------|
| 1) souches pathogènes de test | p. 16 |
| 2) milieux de culture | p. 16 |
| 3) extraction de l'éponge | p. 17 |
| 4) isolement des bactéries marines | p. 17 |
| 5) tests d'activité antibiotique sur souches pathogènes de référence | p. 18 |
| 6) extraction des métabolites bactériens | p. 18 |
| a) après culture sur milieu solide | p. 18 |
| b) après culture en milieu liquide | p. 19 |
| 7) tests d'activité antibiotique des extraits sur souches pathogènes | p. 19 |
| 8) tests d'activité antibiotique des extraits sur souches pathogènes d'aquaculture | p. 20 |
| 9) test de toxicité sur larves d' <i>Artemia salina</i> | p. 20 |
| 10) chromatographie analytique | p. 21 |
| a) CCM sur silice | p. 21 |
| b) par CLHP | p. 22 |
| 11) chromatographies préparatives | p. 22 |
| a) chromatographie sous moyenne pression | p. 22 |
| b) chromatographie préparative par CLHP | P. 23 |

1) Souches pathogènes de test

Staphylococcus aureus (collection Institut Pasteur n° 7625): bactérie gram+. Pouvoir pathogène chez l'homme: manifestations cutanées et muqueuses (impétigos, furoncles, sinusites, otites), systémiques (méningites, septicémies), et digestives. *Staphylococcus aureus* est également impliqué dans un grand nombre d'infections à la suite d'opérations chirurgicales, de la pose de cathéters et de matériel étranger.

Escherichia coli (collection Institut Pasteur n° 7624): bactérie gram-. Impliquée dans un grand nombre d'infections chez l'homme qui peuvent-être causées par des pathovars. Elle est capable de coloniser les muqueuses avec ou sans invasions tissulaire, de produire des toxines ou de donner lieu à des suppurations massives et/ou des disséminations systémiques.

Pseudomonas aeruginosa (collection Institut Pasteur n°76110): bactérie gram-. Est l'une des bactéries les plus fréquemment rencontrée dans les infections hospitalières et représente environ 80 à 90% de tous les *pseudomonas* isolées en laboratoire. Sa transmission à un malade hospitalisé se fait soit à partir d'un réservoir, soit de malade à malade par le personnel soignant, soit enfin à la suite d'une auto-infection par une souche endogène. *P. aeruginosa* n'a pas de site préférentiel et sera responsable d'infections très variées (infections pulmonaires, cutanées, oculaires ...).

Klebsiella pneumoniae (collection Institut Pasteur): bactérie gram - . Pathogène humain (entérobactérie) commun chez les enfants en Nouvelle Calédonie

Candida albicans (collection Institut Pasteur): levure impliquée dans des infections généralisées chez les immunodéprimés. Souche présente aussi bien dans l'air que dans l'eau.

Vibrio anguillarum (collection Ifremer, laboratoire de Jean-Louis Nicolas): bactérie gram-. Pathogène très répandu chez les animaux marins, des bivalves aux poissons, il est non pathogène pour l'homme.

2) Milieux de culture

-milieux liquides:

MB: Marine Broth 2216 (DIFCO) auquel on ajoute éventuellement la quantité d'agar pour obtenir la consistance souhaitée.

Zobell: peptone (LABOSI) 5g/l, extrait de levure (DIFCO) 1g/l, eau de mer du large, filtration sur un filtre 0,2µm.

- milieux solides :

MA: Marine Agar 2216 (DIFCO) ou MB: Marine Broth 2216 (DIFCO) auquel la quantité d'agar nécessaire pour obtenir la consistance souhaitée est ajoutée.

GT: gélose tryptone-soja (DIFCO) + NaCl 20g/l

MH : Müller Hinton (DIFCO)

3) Extraction de l'éponge

Extraction:

Extrait A: la poudre lyophilisée est extraite 3 fois par de l'eau distillée à 4°C, à l'obscurité (3X11 pour 50g lyophilisés); l'extrait est centrifugé à 4°C et lyophilisé après être débarrassé du culot. L'extrait A est ainsi obtenu.

Extrait B et C: la poudre lyophilisée est extraite une fois avec de l'éthanol à 80% (v/v), puis 2 fois par de l'éthanol à 96° à température ambiante, sous agitation mécanique (volume de solvant de 2l pour 100g lyophilisés); les extraits sont réunis et l'alcool évaporé sous vide.

Le résidu obtenu est repris par de l'eau distillée (1l pour 100g lyophilisés), et extrait jusqu'à épuisement par plusieurs fractions de chlorure de méthylène. Les phases organiques sont réunies, lavées à l'eau distillée et séchées sur sulfate de sodium anhydre; l'évaporation du solvant fournit l'extrait C. La phase aqueuse est "dégazée" sous vide et lyophilisée; le lyophilisat est alors repris par de l'éthanol absolu, filtré. L'élimination de l'alcool sous pression réduite jusqu'à poids constant permet d'obtenir l'extrait B.

4) Isolement des bactéries marines

- chaque morceau d'éponge est rincé avec de l'eau de mer stérile, puis brossé avec un écouvillon à prélèvement stérile.

- la brosse est plongée dans 10ml de sérum physiologique.

- des dilutions dans du sérum physiologique sont préparées (1, 1/10, 1/100), puis ensemencées dans des boîtes de pétri contenant du milieu gélosé MA.
- le temps d'incubation à 24°C est variable (durée nécessaire au développement d'un maximum de colonies différentes).
- la dilution qui a permis le meilleur isolement bactérien est conservée et chaque colonie est testée sur différentes souches pathogènes (test de contact).
- les souches actives sont repiquées sur gélose jusqu'à obtention d'une culture bactérienne monoclonale et active.

5) Tests d'activité antibiotique sur souches pathogènes de référence

- chaque souche pathogène est ensemencée sur boîte de pétri avec le milieu qui lui convient:

| souches pathogènes | test de contact | test antibiotique |
|------------------------------------|------------------------|--------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> (Sa) | GT | MH |
| <i>Escherichia coli</i> (Ec) | GT | MH |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pa) | GT | MH |
| <i>Candida albicans</i> (Ca) | GT ou SAB | GT ou SAB |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Kp) | GT | MH |
| <i>Vibrio anguillarum</i> (Va) | MA | MA |

- chaque colonie isolable est piquée à l'aide d'un cure-dent stérile sur chaque souche pathogène (test de contact)
- le temps d'incubation est de 24 h pour Sa, Ec, Pa, et Ca; et 48 h pour Va.
- les bactéries possédant une activité antibiotique inhibent le développement de la souche pathogène. Le diamètre d'inhibition de croissance de la souche de test est mesuré.
- Les souches actives sont purifiées et conservées en collection en gélose profonde.

6) Extraction des métabolites bactériens.

a) après culture sur milieu solide

culture :

- 3 boîtes de pétri (Ø 90mm) de MA sont ensemencées par la souche active étudiée et incubées 3 à 4 jours à 26°C (jusqu'à confluence du tapis bactérien).

extraction

- la gélose infestée est alors fragmentée à l'aide d'un presse -ail puis extraite dans un erlenmeyer par 100ml d'acétate d'éthyle
- après 1 heure d'agitation l'acétate d'éthyle est filtré
- cette opération est répétée (4 fois) jusqu'à épuisement de la gélose
- l'acétate d'éthyle est évaporé sous vide et l'extrait sec obtenu est conservé dans un tube fermé, au frais et à l'abri de la lumière.

b) après culture en milieu liquide

culture:

- Un tube de 10ml de Marine Broth estensemencé avec 2 ou 3 colonies de la souche étudiée et incubé 24h à 26°C.
- Les 10 ml sont versés dans un erlenmeyer contenant 1l de Marine Broth.
- Cette culture est incubée 4 à 5 jours à 26°C sous agitation puis extraite.

extraction :

La culture est versée dans une ampoule à décanter et extraite par 3 fois 300ml d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont réunies, lavées par de l'eau distillée et séchées sur sulfate de sodium anhydre. L'acétate d'éthyle est éliminé sous pression réduite.

7) Tests d'activité antibiotique des extraits sur souches pathogènes

- chaque extrait sec obtenu est dissous dans de l'acétate d'éthyle afin d'obtenir une concentration de 50 mg/ml.
- 20 µl (=1mg) sont déposés sur des disques de cellulose stériles de 6mm de diamètre (bioMERIEUX 5499 1).
- les disques ainsi préparés sont séchés 30 min à 37°C puis déposés sur des boites de pétri préalablementensemencées avec les différentes souches pathogènes.
- les boites sont laissées 24h à 37°C pour les souches Sa, Kp, Ec, Pa et Ca; et 48h à 26°C pour la souche Va.
- le diamètre d'inhibition mesuré en mm traduit l'activité antibiotique.

Remarque: les disques ne sont pas préparés stérilement, car les contaminations sont exceptionnelles. Par contre ils sont déposés stérilement sur la gélose.

8) Tests d'activité antibiotique des extraits sur souches pathogènes d'aquaculture

souches utilisées (collection Jean Louis NICOLAS IFREMER):

Vibrio anguillarum (souche 408, coll. LPAA)

Vibrio alginolyticus (souche ATCC 17749)

Vibrio splendidus (souche ATCC 33125)

Vibrio logei (souche ATCC 15382)

Vibrio pathogène pour les larves de palourdes: VPR

Vibrio pathogène pour les larves d'huitres creuses: S322

Vibrio pathogène pour les larves de coquilles Saint Jacques: A365

Vibrio pathogène pour les larves de Turbot: V. Turbot

Pseudomonas U1

La méthode est la même que pour les souches précédentes. L'incubation est de 24 à 48h à 26°C.

9) Test de toxicité sur larves d'*Artemia salina*

Préparation des larves d' Artemia :

Un aquarium (capacité \approx 1,5l) composé d'une partie sombre et d'une partie claire est rempli d'eau de mer à 70%. Les oeufs (deux pointes de spatules) sont mis à éclore 60h avant le test dans le compartiment sombre de l'aquarium, avec un bullage d'air doux, à une température d'environ 23°C.

Les larves sont ensuite attirées par phototropisme dans le compartiment clair, se séparant ainsi des larves mortes et des débris d'oeufs; ce qui facilite notablement le comptage. Elles sont prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur et transférées dans des tubes à hémolyse (10 par tube). Le volume est ajusté à un volume final de 5 ml avec de l'eau de mer à 70%.

Préparation des extraits :

- 25mg d'extrait sont pesés avec précision et dissous dans 0,5 ml de solvant (eau ou DMSO). On obtient la solution 1 à 50 mg/ml.

100 μ l de solution 1 sont dilués à 1 ml dans de l'eau : solution 2 à 5 mg/ml.

Réalisation du test:

L'extrait est testé à trois concentrations différentes: 100, 50, et 10 μ g/ml. Chaque concentration est testée 5 fois (50 larves au total) : la solution à tester est ajoutée aux tubes de

tests préparés : 10 µl de solution 1 (concentration finale 100µg/ml) ; 50 µl de solution 2 (concentration finale de 50µg/ml) ; 10 µl de solution 2 (concentration finale de 10µg/ml).

Une série de tubes témoins est gardée: sans solvant, avec 10µl et 50µl de DMSO dilué au 1/10^{ème}.

Les tests sont ensuite laissés 24h sous éclairage artificiel.

Lecture des résultats

Le nombre de larves vivantes est compté dans chaque tube (certaines larves mortes étant dévorées par les vivantes). La mortalité est calculée à chaque concentration, la mortalité témoin ne devant pas excéder 15%.

$$\%morts = [(\%morts\ essai - \%morts\ témoins)/(100 - \%morts\ témoins)] \times 100$$

A partir de ces résultats on procède à une estimation de la concentration létale 50 (CL₅₀).

Celle-ci est classée en 4 groupes:

| | |
|------------------------------------|-----|
| CL ₅₀ >100µg/ml | - |
| 100µg/ml>CL ₅₀ >50µg/ml | + |
| 50µg/ml>CL ₅₀ >10µg/ml | ++ |
| CL ₅₀ <10µg/ml | +++ |

10) Chromatographie analytique

a) CCM sur silice

- plaques de CCM en verre MERCK, gel de silice 60F₂₅₄ (épaisseur de la couche 0,25mm).
- plaque de CCM en aluminium MERCK, gel de silice 60F₂₅₄ (épaisseur de la couche 0,2mm), utilisée pour les autogrammes.

- solvant : CH₂Cl₂/MeOH 95:5 (anhydre)

Remarque: la plaque d'aluminium est découpée en deux. La première partie sert pour l'autogramme en étant déposée sur une boîte de pétriensemencée avec la souche pathogène ; la deuxième est révélée à la vanilline sulfurique chauffée, aux UV (λ= 254 nm).

-composition des révélateurs:

Vanilline - Acide sulfurique, réactif des alcools supérieurs, des phénols, des stéroïdes et des huiles étherées:

Solution vaporisée : dissoudre 1g de vanilline dans 100 ml d'acide sulfurique concentrée.

Traitement complémentaire: chauffer à 120° C jusqu'à atteindre l'intensité optimale pour la coloration des tâches.

Réactif de Dragendorff selon Munier et Macheboeuf, réactif des alcaloïdes et d'autres composés azotés:

solution a: dissoudre 0,85g de nitrate de bismuth basique dans 10 ml d'acide acétique cristallisable et 40 ml d'eau.

solution b: dissoudre 8g d'iodure de potassium dans 20 ml d'eau.

Solution de réserve: mélanger des volumes égaux des solutions a et b (cette solution se conserve bien en flacon sombre).

Solution vaporisée : avant emploi mélanger 1 ml de solution de réserve, 2 ml d'acide acétique cristallisable et 10 ml d'eau.

b) par CLHP

- ensemble CLHP WATERS, 2 pompes 510 et programmeur de gradient, Détecteur à barrettes de diode 996
- contrôle des paramètres et traitement des données par le logiciel Millennium
- colonne analytique μ BONDAPACK C18, 125 Angström; 10 μ m; 4,6 x 250 mm.
- débit : 1,2 ml/mn
- éluants: t = 0 mn : H₂O/MeOH/CH₂Cl₂ : 50:45:5
 t = 20 mn : MeOH/CH₂Cl₂ : 90:10
- poids de l'extrait: 200 μ g
- solvants : LABOSI ANALYCHROM (filtrés sous vide et mélangés sous pression) .

11) Chromatographies préparatives

a) chromatographie sous moyenne pression

- chromatographe en phase liquide préparatif JOBIN-YVON
- type de colonne: Chromatospac PRLP 10, Longueur: 50cm, \varnothing : 40 mm
- collecteur de fractions associé à un détecteur spectrophotométrique à 254 nm avec enregistreur
- silice MERCK 60H (150g)
- éluants: CH₂Cl₂/MeOH : 95:5 (anhydre)
 CH₂Cl₂/MeOH : 85:15 (anhydre)

- pression 7 bars
- extrait brut (300 mg)

Remarque : tous les solvants (techniques) sont fraîchement redistillés.

b) Chromatographie préparative par CLHP

- ensemble CLHP WATERS
- colonne préparative MICROBONDAPACK C18 7,8 x 300 mm.
- débit : 4,2 ml/mn
- éluants: t = 0 mn: H₂O/MeOH/CH₂Cl₂ : 50:45:5
t = 20 mn: MeOH/CH₂Cl₂ : 90:10
- poids de l'extrait: 1 mg

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Bacerro M.A., Lopez N.I., Turon X., Uriz M.J.
Antimicrobial activity and surface bacterial film in marine sponges.
J. Exp. Biol. Ecol. **179**, 195-205 (1994).
- 2 Holmstrom C., Kjelleberg S.
Development of a tissue cell culture bioassay for identifying mechanisms of inhibition of settlement of barnacle and tunicate larvae by surface-colonizing marine bacteria. *Biofouling* **7**, 329-337 (1993).
- 3 Miki W., Otaki N., Shimidzu N., Yokoyama A.
Carotenoids as free radical scavengers in marine animals.
J. Mar. Biotechnol. **2**, 35-37 (1994).
- 4 Paul V.
Marine natural products.
Workshop on marine/coastal biodiversity in the tropical island pacific region. International Conference. Hawaii, November 7-9 (1994).
- 5 Munro M.H.G., Blunt J.W., Lake R.J., Litaudon M.
From seabed to sickbed: What are the prospects?
Proceeding of the 4 th International Porifera Congress: "Sponges in time and space".
Amsterdam, 19-23 april 1993.
- 6 Attaway D.H., Zaborsky O.
Marine Biotechnology: "Pharmaceutical and bioreactive natural products". Vol 1, 346 pages.
Ed. Plenum Press, NY and London (1993).
- 7 Austin B.
Novel pharmaceutical compounds from marine bacteria
J. of Appl. Bact. **67**, 461-470 (1989).
- 8 Guyot M.
Bioreactive metabolites from marine invertebrates.
Pure Appl. Chem. **66**, 2223-2226 (1994).
- 9 Schut F., Vries E.G., Gottschal J.C., Robertson B.R., Harder W., Prins R.A., Button D.K.
Isolation of typical marine bacteria by dilution culture: growth, maintenance, and characteristics of isolates under laboratory conditions.
Appl. Environ. Microbiol. **59** (7), 2150-2160 (1993).
- 10 Levi C.
Coral reef sponges of New-Caledonia.
ORSTOM Edition (1996) à paraître.
- 11 Unson M.D., Holland N.D., Faulkner D.J.
A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue.
Marine Biology **119**, 1-11 (1994).
- 12 Fenical W.
Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource.
Chem. Rev. **93**, 1673-1683 (1993).

- 13 Bell R., Carmeli S.
Vibrindole A, a metabolite of the marine bacterium, *Vibrio parahaemolyticus*, isolated from the toxic mucus of the boxfish *Ostracion cubicus*.
J. Nat. Prod. **57** (11), 1587-1590 (1994).
- 14 Imamura N., Adachi K., Sano H.
Magnesidin A, a component of marine antibiotic magnesidin, produced by *Vibrio gazogenes* ATCC 29988.
J. of Antibiotics **47** (2), 257-261 (1994).
- 15 Jensen P.R., Fenical W.
Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: Ecological perspectives.
Ann. Rev. Microbiol. **48**, 559-584 (1994).
- 16 Kobayashi M., Aoki S., Gato K., Matsunami K., Kurusu M., Kitagawa I.
Marine natural products: Trisindoline, a new antibiotic indole trimer, produced by a bacterium of *Vibrio* sp. separated from the marine sponge *Hyrtios altum*.
Chem. Pharm. Bull. **42** (12) 2449-2451 (1994).
- 17 McCarthy S.A., Johnson R.M., Kakimoto D.
Characterization of an antibiotic produced by *Alteromonas luteoviolacea* Gauthier 1982, 85 isolated from Kinko Bay, Japan.
J. of Appl. Bact. **77**, 426-432 (1994).
- 18 Miki W., Otaki N., Yokoyama A., Izumida H., Shimidzu N.
Okadaxanthin, a novel C₅₀-carotenoid from a bacterium, *Pseudomonas* sp. KK10206C associated with marine sponge, *Halichondria okadai*.
Experientia **50** (1994).
- 19 Myouga H., Yoshimizu M., Ezura Y., Kimura T.
Anti-infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) substances produced by bacteria from aquatic environment.
Gyobyo Kenkiu **28** (1), 9-13 (1993).
- 20 Oclarit J.M., Okada H., Ohta S., Kaminura K., Yamaoka Y., Lizuka T., Miyashiro S., Ikegami S.
Anti-bacillus in the marine sponge, *Hyatella* species, produced by an associated *Vibrio* species bacterium.
Microbios **78**, 7-16 (1994).
- 21 Okusumi M., Hiraishi A, Kobayashi T., Fujii T.
Photobacterium histaminium sp. nov.; a histamine-producing marine bacterium.
Intern. J. of Systematic Bacteriology **631-636** (1994).
- 22 Shiozawa H., Kagazaki T., Kinoshita T., Haruyama H., Domon H., Utsui Y., Kodama K., Takahashi S.
Thiomarinol, a new hybrid antimicrobial antibiotic produced by a marine bacterium - Fermentation, isolation, structure, and antimicrobial activity.
J. of Antibiotics **46** (12), 1834-1842 (1993).
- 23 Stierle D.B., Stierle A.A.
Pseudomonic acid derivatives from a marine bacterium.
Experientia **48**, 1165-1169 (1992).
- 24 Trischman J.A., Jensen P.R., Fenical W.
Halobacillin: a cytotoxic cyclic peptide of the iturin class produced by a marine *Bacillus*.
Tetrahedron Letters **35** (31), 5571-5574 (1994).

- 25 Wratten S.J., Wolfe M.S., Andersen J.A., Faulkner D.J.
Antibiotic metabolites from a marine *Pseudomonad*.
Antimicrob. Agents Chemother. 11 (3), 411-414 (1977).
- 26 Berquist P.R.
Dictyoceratida, Dendroceratida, and Verongida from the New-Caledonia lagoon (Porifera: demospongiae).
Memoirs of the Queensland museum 38 (1), 1-51.
- 27 Kernam M.R., Cambie R.C., Bergquist P.R.
Chemistry of sponge, VIII. Anomoian A, a bromotyrosine derivative from *Anomoianthella popeae*.
J. Nat. Prod 53, 720-723 (1990).
- 28 Watanabe N., Watanabe A., Ogura C., Etoh, H., Sakata, K., Okamoto K., Kimura T., Ina K.
Efficient screening method for antifouling substances
Biosc. Biotech. Biochem. 57 (10), 1747-1749 (1993)
- 29 Cosulich D.B., Lovell F.M.
An X-Ray determination of the structure of an antibacterial compound from the sponge *Ianthella ardis*.
J. Chem. Soc. Chem. Commun. 397-398 (1971).
- 30 Fulmor W., Lear G.E., Morton G.O., Mills R.D.
Isolation absolute configuration of Aeroplysinin I enantiomeric pair from *Ianthella ardis*.
Tetrahedron Lett. 4551-4552 (1970).
- 31 Kazlauskas R., Lidgard R.O., Murphy P.T., Wells R.J.
Brominated tyrosine-derived metabolites from the sponge *Ianthella basta*.
Tetrahedron Lett. 21, 2277-2280 (1980).
- 32 Kazlauskas R., Lidgard R.O., Murphy P.T., Wells R.J., Blount J.F.
Brominated tyrosine-derived metabolites from the sponge *Ianthella basta*.
Aust. J. Chem. 34, 765-786 (1981).
- 33 Litaudon M., Guyot M.
Ianthelline; derivative of 3;5 dibromo tyrosine from the sponge *Ianthella ardis* (Verongida).
Tetrahedron Lett. 27, 4455-4456 (1986).
- 34 Meyer B.N., Ferigni N.R., Patnam J.E., Jacobsen L.B., Nichols D.E., Mc Laughlin J.L.
Brine shrimp: a convenient bioassay for active plant constituents.
Planta medica 45, 31-34 (1982).

Remerciements

Je tiens à remercier:

Mlle Cécile DEBITUS,
pour m'avoir confié le sujet de ce travail et accueillie dans son laboratoire.

Mr Daniel DUHET,
pour son aide et ses conseils précieux tout au long de ce stage.

Enfin, mes remerciements vont à tous ceux et à toutes celles qui, par leur profonde amitié et, à titres divers, ont rendu très agréable mon séjour parmi eux.

RESUME

Les organismes marins offre un potentiel immense pour la recherche de nouvelles substances naturelles à intérêt thérapeutique. De nos jours les investigations se tournent vers le monde microbien marin qui semble prometteur quant à la découverte de nouveaux métabolites actifs, originaux.

Le but de ce travail est la recherche de nouvelles substances antibiotiques produites par des bactéries associées aux éponges. Les spongiaires sont en effet très bien représentés dans le lagon Néo-Calédonien. L'éponge *Anomoianthella rubra* (Verongida, *Ianthellidae*) possède des bactéries symbiotiques intéressantes productrices de métabolites biologiquement actifs. L'une d'entre elles a été choisie et étudiée afin de la cultiver dans un milieu adéquat, d'en extraire les métabolites secondaires, et d'essayer de purifier les principes actifs pour en déterminer la structure ultérieurement.

MOTS-CLES: bactéries marines, antibiotiques, éponges, *Anomoianthella rubra*, aquaculture.

ABSTRACT

Identification of antibiotic substances from bacteria strains isolated from a marine sponge Anomoianthella rubra Bergquist (1995)

Marine organisms have an important point of study in the search for novel pharmacological compounds. Today, both academic and industrial interest in marine microorganisms is on the rise, in part because of the growing number of unique, biologically active secondary metabolites reported from marine bacteria.

Our work is interested in finding new antibiotics from bacteria associated with sponges. The new caledonian lagoon is rich of a great number of different species of Porifera. The sponge *Anomoianthella rubra* (Verongida, *Ianthellidae*) has been found to harbor marine microorganisms. One of these bacteria, identified as an antibiotic producer, is studied. The aim is to cultivate the bacterium, to extract the secondary metabolites and purified the active compound for further identification.

KEYWORDS: marine bacteria, antibiotics, sponges, *Anomoianthella rubra*, aquacult