Symposium
« BIODIVERSITE - VALORISATION DES SUBSTANCES NATURELLES »

# ACTIVITES ANTIMICROBIENNES DES BACTERIES MARINES ASSOCIEES A UNE EPONGE BSM1 DU RECIF CORALLIEN DE BELO-SUR-MER AU SUD OUEST DE MADAGASCAR

RANISAHARIVONY B.G.[1,2], RAJAONARIVELO J. [1], RAKOTONIRIANA E. F. [1], RABEMANANTSOA C. [1], ANDRIANTSIFERANA M. [2]

[1] IMRA Institut Malgache de Recherches Appliquées, Avarabohitra Itaosy BP: 3833
[2] LPNB Laboratoire de chimie des « Produits Naturels » et Biotechnologie, Université d'Antananarivo

# Encadreurs

Professeur Marta ANDRIANTSIFERANA

Directeur du Laboratoire de Chimie
des «Produits Naturels» & Biotechnologie

**LPNB**

Docteur Christian RABEMANANTSOA

Chef du Département de
Biodiversité et Biotechnologie

**IMRA**

# Plan

Introduction

Généralités  sur les éponges

Association éponge-microorganismes

Objectifs

Matériels et méthodes

Résultats

Conclusion

Perspectives

# 1. Introduction

# Introduction

**Mer: plus de 70% de la surface du globe**

**Fond marin et récif corallien: plus riches en biodiversité que les forêts tropicales humides**

**Madagascar: plus de 5000 km de côtes , riche en ressources marines**

**Éponges: sources de molécules à potentialité pharmaceutique**

**Similitude de structure entre les métabolites des éponges et ceux de leurs microorganismes associés**

**Microorganismes : ressource renouvelable**

# 2. Généralités sur les éponges

# Généralités sur les éponge

Dotée de pores inhalants et exhalant

Corps composé de spongine et de spicules

Diblastique

Hermaphrodite

La plupart sont marines

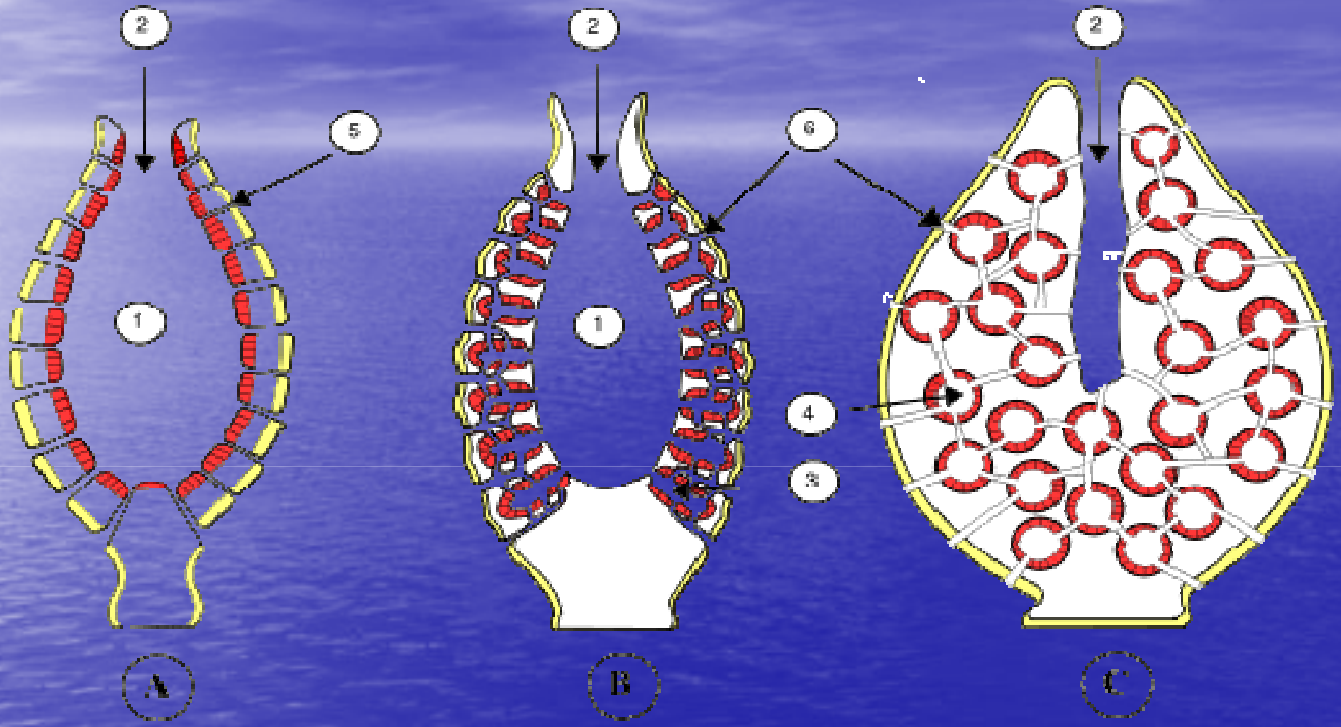
Sessile : se fixe à vie sur un substrat

# Généralités sur les éponge
# Classification

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Règne** | **ANIMALIA** | | |
| **Sous-règne** | **METAZOAIRE** | | |
| **Embranchement** | **SPONGIAIRE ou PORIFERA** | | |
| **Sous-embranchement** | **CELLULARIA** | | **SYNCITAL ou SYMPLASIA** |
| **Classe** | **Calcarea ou Calcisponge** | **Demospongiae ou Démosponge** | **Hexactinellida ou Hexactinellide** |
| **Sous classe** | **2** | 3 | 2 |
| **Ordre** | **5** | 13 | 4 |
| **Famille** | 18 | 71 | 19 |
| **Genre** | 63 | 501 | 113 |
| **Espèce** | 400-500 | 14000-15000 dont 4500-5000 répertoriés | 450-500 |

# Généralités sur les éponges

## Organisation




1. spongocoele ou atrium
2. oscule
3. tube vibratile ou tube radiaire
4. corbeille vibratile
5. pore inhalant ou ostiole
6. canal inhalant.

choanocytes en rouge

**Structure des types :asconoïde (A), syconoïde(B) et leuconoïde (C).**

http://fr.wikipedia.org/wiki/Porifera

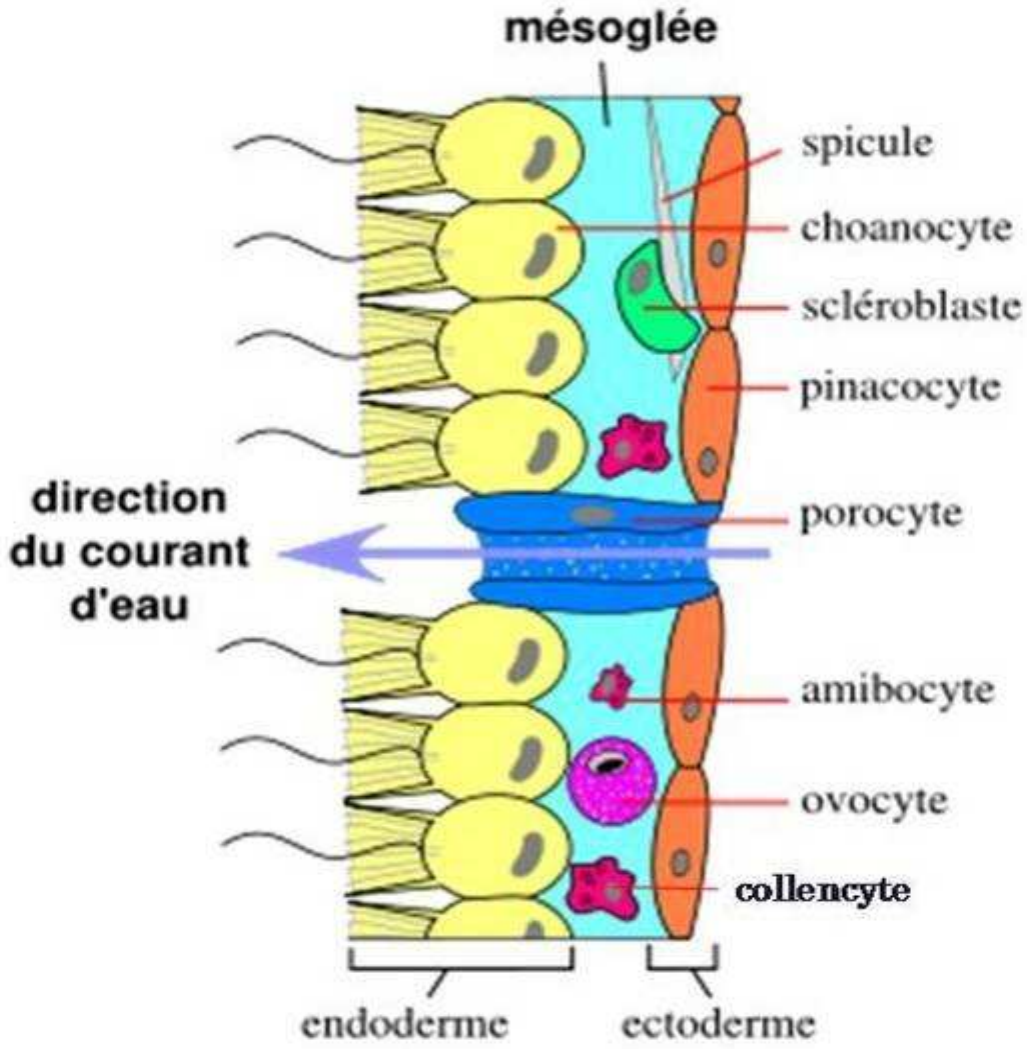
# Généralités sur les éponges

## Mode d'alimentation

- Suspensivores → organismes en suspension

- Hétérotrophes → substances organiques

- Microphages → organismes de petite taille
  → phytoplancton
  → principalement des bactéries
    - 80% des bactéries libres dans l'eau
    - Actinomycètes dans la zone abyssale




Structure histologique d'une éponge de type ascon

http://fr.wikipedia.org/wiki/Porifera

# 3. Association éponge - microorganismes

# Association éponge - microorganis (1)

Association avec des champignons ou des bactéries (principalement du genre *Pseudomonas* et *Aeromonas*)

Bactéries épibiotiques ou symbiotiques

Eponges: seuls animaux à vivre en symbiose avec des cyanobactéries [Brusca *et al.*, 2003]

# Association éponge - microorganis (2)

Présence d'une grande quantité de microorganismes dans la mésoglée des éponges [Althoff et *al*., 1998; Friedrich et *al*., 1999]

# 4. Objectifs

# Objectifs

Isolement des microorganismes associés aux éponges

Extraction des métabolites secondaires des microorganismes associés

Evaluation de l'activité antimicrobienne des métabolites extraits

# 5. Matériels et méthodes

# Matériels utilisés

## Matériel biologique:

Eponge codée BSM1 récoltée à l'ouest de Belo-sur-Mer

à 10 m de profondeur en novembre 2007, traitée et stockée à -20℃

## Milieux de culture:

Champignons : Sabouraud gélosé à 2% de NaCl + Chloramphénicol

Bactéries : Gélose nutritive à 2% de NaCl + Nystatine

# Méthodes

Isolement et identification préliminaires des microorganismes associés à BSM1

Production et extraction des métabolites secondaires des microorganismes associés

Criblage biologique des métabolites secondaires extraits

# Isolement des microorganismes associés de B

Désinfection en surface de BSM1 / Alcool 70°

Rinçage 4 fois à l'eau distillée stérile

Découpage stérilement en petits morceaux

Dépôt  sur les milieux

Incubation à 25°C

Transfert sur des milieux sans antimicrobienne des microorganismes

Purification des souches

# Vérification du  procédé de désinfection en surface

Ensemencement en nappe de 100µl de la dernière eau de rinçage sur les milieux

Incubation à 25°C pendant 4 semaines

# Identification préliminaire

- Observation macroscopique des colonies

(couleur, taille, contour, transparence, relief, aspect et consistance)

- Observation microscopique des microorganismes
  - à l'état frais (mobilité et mode de groupement)
  - Coloration de Gram (couleur, forme et taille des bactéries)
  - mise en évidence des spore (présent ou absent)

- Galerie biochimique

(catalase, métabolisme, respiration, lactase, production de $H_2S$, nitrate, gélatine, urée….)

# Production et extraction de métabolites second

- Production de métabolites secondaires
  - Culture fermentative de 200 ml avec $10^6$ ufc/ml de germe.
  - Incubation à 25°C pendant 12 jours à l'obscurité.

- Extraction des métabolites secondaires
  - Séparation de filtrat de culture et de biomasse par centrifugation
  - Ajout 200 ml d'hexane dans le filtrat
  - Macération pendant 24 heures
  - Récupération de la phase hexanique , séchage  et pesage
  - Ajout 200ml d'AcOEt dans le reste de phase
  - Macération, récupération de la phase à AcOEt , séchage et pesage

# Test antimicrobien

**Souches :**

*Staphylococcus aureus* , Gram (+),

*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* , Gram (-),

*Candida albicans* (levure)

**Produits à tester :**

- Extraits hexaniques
- Extraits à l'AcOEt

**Méthode** : CCM Bioautographie directe

# CCM Bioautographie directe

- Mise au point des CCM (dépôt, développement, révélation des fractions)
- Préparation de l'inoculum ( $10^6$ufc/ml de germe)
- Ensemencement en nappe de l'inoculum sur le chromatogramme
- Incubation pendant 24 heures à 37°C ou 25°C
- Pulvérisation avec un colorant vital (MTT)
- Observation de la présence de zone d'inhibition (zone claire sur fond violet)

# 6. Résultats

# Résultats

## Isolement de microorganismes

27 souches bactériennes au bout de 11 jours

Aucun champignon au bout de 4 semaines

## Désinfection en surface

Aucun microorganisme au bout de 4 semaines:

- Microorganismes épibiotiques éliminés
- Bactéries isolées: symbiotiques

# Résultats

## Identification préliminaires

- 18 souches dont les colonies sont de contour régulier
- Toutes les bactéries: bacilles dont 0,5µm≤l≤1,2µm et 0,9µm≤L≤3,3µm
- 1 bactéries mobile
- 9 (33,3%) bactéries à Gram (–)
- 18 (66,6%) bactéries à Gram (+)
- 7 (26%) bactéries sporulantes
- 20 (74%) bactéries non sporulantes
- 6 (22%) souches appartenant hypothétiquement au genre *Bacillus*
- 21 souches bactériennes réparties en 3 groupes distincts

# Résultats

## Extraction des métabolites secondaires

A partir des 200 ml de culture fermentative

Extraits hexaniques:

1,6 mg≤ masse ≤ 112,2 mg

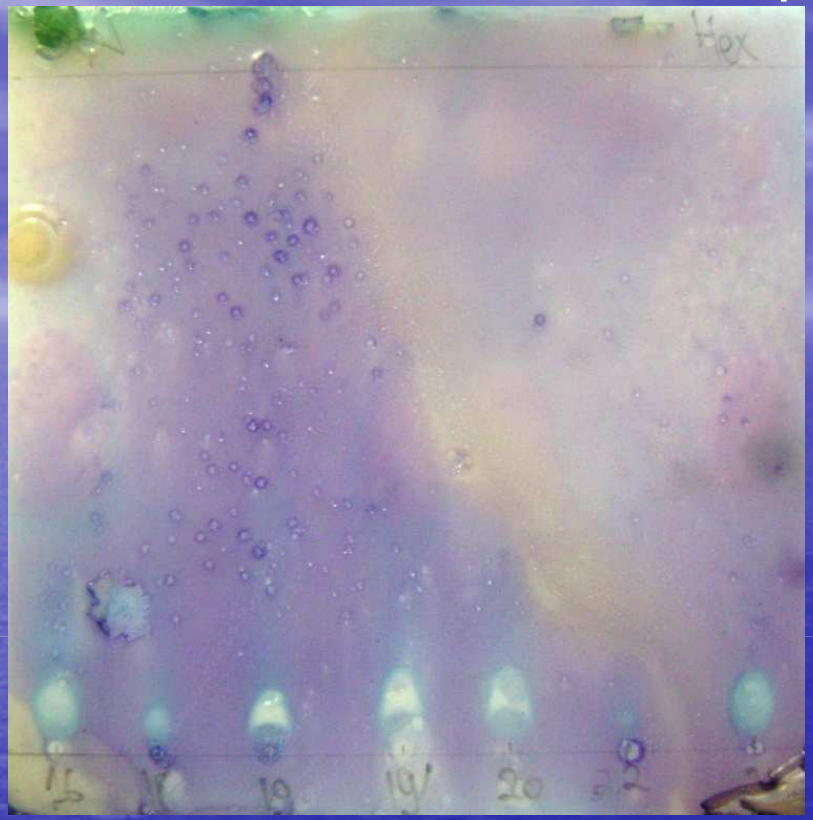
Extraits à l'AcOEt

8,2 mg≤ masse ≤ 231,3 mg

# Résultats

**Tests antimicrobiens**

# Tests sur les extraits hexaniques

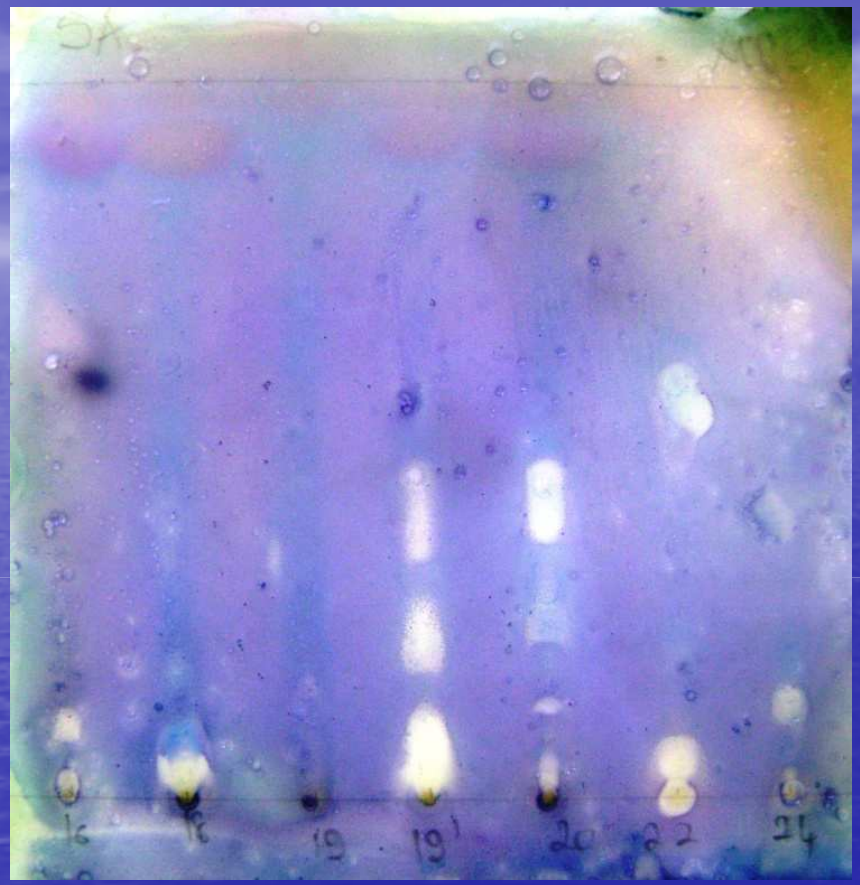



CCM Bioautographie directe contre *Staphylococcus aureus*

18 souches produisant des métabolites actifs contre *S. aureus*

Aucune activité contre *C. albicans*, *E. coli*, *P. aeruginosa*

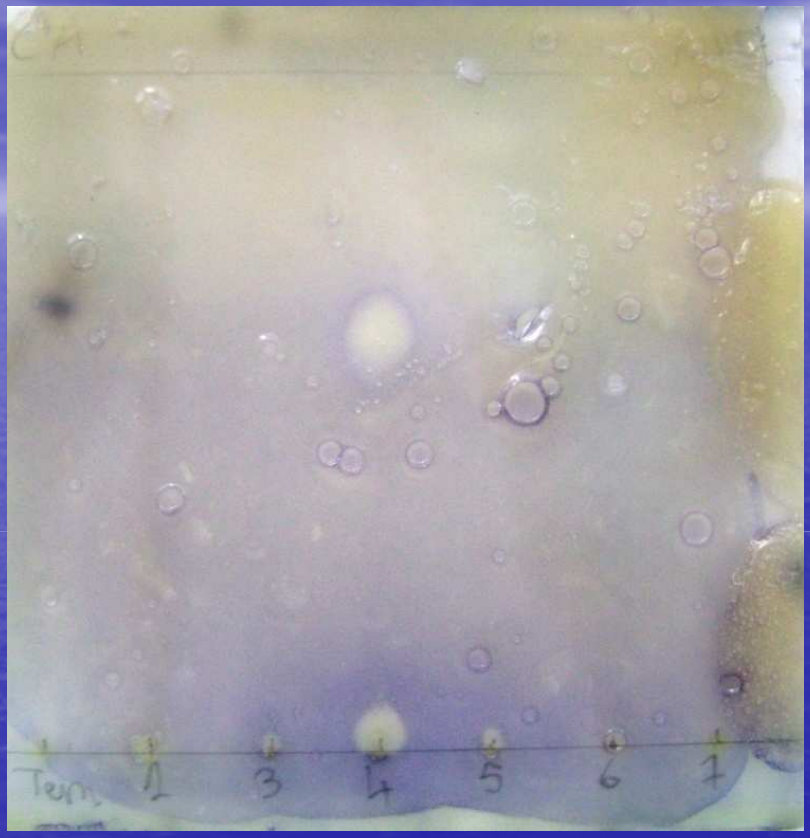
# Tests sur les extraits à l'AcOEt



CCM Bioautographie directe contre *Staphylococcus aureus*

15 souches produisant des métabolites actifs contre *S. aureus*

# Tests sur les extraits à l'AcOEt




CCM Bioautographie directe contre *Candida albicans*

4 Souches produisant des métabolites actifs contre *C. albicans*

Aucune activité contre *E. coli, P. aeruginosa*

# Résultats

## Tests antimicrobiens

Souches les plus productrices de composés actifs: B101, B103, B104, B105

| Souches | Gram | Spore | Extrait hexanique | | Extrait à l'AcOEt | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | *C. albicans* | *S. aureus* | *C. albicans* | *S. aureus* |
| B101 | - | - | - | + | + | + |
| B103 | - | - | - | + | + | +++ |
| B104 | + | - | - | + | ++ | +++++ |
| B105 | + | + | - | + | + | +++++ |

*Remarque*: le nombre de signe + représente le nombre de fractions actives contre la souche pathogène

# Résultats

Sur les 27 souches isolées : 20 (74%) productrices de composés actifs  dont 16 (59%) contre *S. aureus* uniquement et 4 (15%) contre *S. aureus* et *C. albicans*

Extraits à l'acétate d'éthyle plus actifs que les extraits hexaniques et possèdent plusieurs fractions actives

# 7. Conclusion

# Conclusion

Les 27 souches bactériennes isolées de BSM1 ne représentent qu' une fraction de la totale diversité présente dans l'éponge puisqu'il y a des bactéries qui nécessitent un milieu sélectif

Les résultats sont assez encourageants vu le pourcentage des bactéries ayant une activité antimicrobienne

Les bactéries associées constituent une source potentielle pour le développement d'antibiotique

# 8. Perspectives

# Perspectives

Identification des souches

Tests sur d’autres souches pathogènes

Test d’activité antioxydante

Culture à grande échelle en vue d’isolement et de détermination de structure des fractions actives

# Historique en images

Comité d'organisation de l'ETET_2007 (Morondava)
et le Professeur Luc Abadie, fondateur de l'ETET

# Comité d'organisation l'ETET_2007

En co-présidence

**Marie-Louise Cariou** **Marta Andriantsiferana**
René Bally
Gilles Comte

Un des fondateurs des ETETs : Professeur Luc Abadie

# Belo-sur-mer

**Première plongée scientifique Financement GDRI-BDDM : dans les récifs coralliens au large de Belo-sur-mer avec l'aide de Menabe Plongée**

# Les étapes de la collecte

# Remerciements

BIODEV/UNESCO

GDRI-BDDM: les Professeurs

René BALLY

Gilles COMTE

Luc ABADIE

CNRE:

LME

Rahanira RALAMBONDRAHETY

MERCI DE VOTRE ATTENTION