



(12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 35468 B1** (51) Cl. internationale : **A01N 27/00; C12R 1/465; C12N 1/20; A01N 63/02**
- (43) Date de publication : **02.10.2014**

-
- (21) N° Dépôt : **35532**
- (22) Date de Dépôt : **04.01.2013**
- (71) Demandeur(s) : **UNIVERSITÉ MOULAY ISMAIL, Marjane 2, BP:298 Meknès (MA)**
- (72) Inventeur(s) : **ERRAKHI RAFIK ; LEBRIHI AHMED**
- (74) Mandataire : **RAFIK ERRAKHI**

-
- (54) Titre : **Utilisation d'une nouvelle souche Streptomyces sp. NO2 comme bioherbicide**
- (57) Abrégé : Cette invention concerne l'utilisation de la souche Streptomyces sp. NO2, d'une souche mutante ou d'un composé actif pour inhiber la croissance de des herbes nuisibles. Egalement, la présente invention a pour objet une nouvelle souche actinomycète Streptomyces sp. NO2 caractérisée par une séquence d'ADNr 16S SEQ n°1 déposée dans la banque de donnée de nucléotides Pubmed/NCBI, ou une souche mutante de celle-ci, ainsi qu'un procédé de sélection de cette souche. L'invention vise aussi un procédé d'extraction et de purification de composés actifs de la souche Streptomyces sp. NO2 ou d'une souche mutante, ainsi que les composés actifs obtenus.

Abrégé

Utilisation des molécules d'une nouvelle bactérie endophyte filamenteuse comme produit antioxydant et anticancéreuse

Cette invention concerne l'utilisation de la souche *Streptomyces* sp. NO2, d'une souche mutante ou d'un composé actif pour inhiber la croissance de des herbes nuisibles.

Egalement, la présente invention a pour objet une nouvelle souche actinomycète *Streptomyces* sp. NO2 caractérisée par une séquence d'ADNr 16S SEQ n°1 déposée dans la banque de donnée de nucléotides Pubmed/NCBI, ou une souche mutante de celle-ci, ainsi qu'un procédé de sélection de cette souche.

L'invention vise aussi un procédé d'extraction et de purification de composés actifs de la souche *Streptomyces* sp. NO2 ou d'une souche mutante, ainsi que les composés actifs obtenus.

02 OCT 2014

Descriptif

Les bioherbicides sont des herbicides fondés sur un organisme vivant, comme des champignons ou des bactéries. Ils sont destinés à tuer les mauvaises herbes (Hynes et Boyetchko, 2006). En effet, le premier bioherbicide commercialisé est apparu pour la première fois sur le marché aux Etats-Unis au début des années 1980 avec la publication de produits Devine¹, Collego² et Biomal³. Le succès de ces produits et l'attente de l'obtention des produits analogues aux herbicides chimiques parfait ont ouvert une nouvelle perspective pour gestion des mauvaises herbes.

Depuis, plusieurs scientifiques phytopathologistes et microbiologistes ont focalisé leurs recherche vers l'élaboration de produits herbicides à base de microorganismes. De nombreux micro-organismes sont caractérisés pour leur capacité de lutte les mauvaises herbes et cela dans plusieurs cultures. Certains d'entre eux sont énumérés ici. *Alternaria cassiae* (Casst), *Cercospora rodmani* (ABG-5003), *Cercospora coccodes* (Velgo), *Collectotrichum orbiculaire*, *Fusarium aonifliral*, délétères rhizobacteria (DRB), *Pseudomonas* spp. *Agrobacterium*, *Xanthomonas* spp. *Ervinia herbicola*, *Pseudomonas syringae* pv. *Tagetis* (Pst), *Xanthomonas campaestris* pv. *Poannua*, (XCP), *S. hygroscoplus* (Bialaphos).

Récemment, les recherches s'orientent vers l'utilisation des actinomycètes. Ce groupe bactérien, producteur d'antibiotiques (Cf, paragraphe 2), est étudié aussi pour sa capacité de produire des molécules phytotoxiques.

Les actinomycètes ou les actinobactéries sont des bactéries Gram positif. Généralement, ils sont des aérobies, saprophytes et chimiohétérotrophes. Leur forme filamenteuse leur a procuré la nomination Actinomycètes qui signifie champignons filamenteux. Ils présentent un cycle biologique semblable à celui de certains champignons, mais leur structure procaryotique, sans noyau distinct, les a classés parmi les Bactéries (Figure 1).

Leurs activités écologiques et leur potentiel biotechnologique ont suscité beaucoup d'études. Ils sont utilisés pour la production des antibiotiques, l'amélioration de la qualité des sols, dégradation des produits et déchets toxiques, la protection des plantes contre des maladies végétales et autres.

Depuis plusieurs années, la taxonomie des actinomycètes a connu une évolution importante en fonction du développement des connaissances. Ce groupe de microorganismes procaryotes appartient à l'ordre des Actinomycétales créé par Buchaman en 1917 (in Bergey's 1989), la classification des espèces dans cet ordre devait être faite selon des critères morphologiques et chimiques. Malgré l'efficacité de ce type de classification, l'adoption des caractéristiques génétiques est devenue essentielle vu le nombre d'espèces découvertes ces dernières années.

Les actinomycètes ont un rôle important dans l'amélioration de la qualité du sol agricole. En effet, ils contribuent à la fertilisation du sol. Ils contribuent aux processus de recyclage et de la biodégradation de la matière organique et des éléments minéraux (Goodfellow *et al.*, 1984). Les actinomycètes ont un grand pouvoir de transformation des substances organiques complexes difficilement ou non dégradables par les autres microorganismes comme les polymères complexes, les polysaccharides, les lignocelluloses, la chitine (Lechevalier, 1978 ; Goodfellow et Williams, 1983). Certains genres de ce groupe bactérien forment des associations symbiotiques dans les nodules des racines (Benson et Silvester, 1993 ; Gualtieri et Bisseling, 2000 ; Campont *et al.*, 2005). Pawlowski et Sirrenberg (2003) ont reporté que les espèces de genre *Frankia* sp. permettent la fixation de l'azote dans le sol et forment des nodules avec plus de 200 espèces des angiospermes. Ces bactéries contribuent également au maintien d'une bonne structure du sol. En effet, leur structure filamenteuse ainsi que la production des polyssaccharides permettent la maintien des particules du sol (Kennedy, 1999). Elles améliorent ainsi l'infiltration de l'eau dans le sol et permettent une bonne aération du sol (Mckenna *et al.*, 2002).

Outre la structure et la fertilité du sol, les actinomycètes augmentent le pouvoir suppressif du sol. Mazzola (2002) a montré qu'un sol riche en actinomycètes est plus suppressif aux maladies végétales qu'un sol pauvre en ces bactéries.

Les actinomycètes constituent une source importante d'antibiotiques et d'autres métabolites secondaires à utilité industrielle (Takahashi et Omura, 2003 ; Hayakawa *et al.*, 2004). Plus de 70% des antibiotiques d'origine microbienne sont produits par ce vaste groupe bactérien (Gundliffe, 2006). Les actinomycètes produisent un grand nombre d'antibiotiques de structures chimiques très variées (aminoglycosides, anthracyclines, glycopeptides, beta-lactamines, macrolides, etc.) qui ont de nombreuses applications thérapeutiques (Okami et Hotta, 1988).

Les Streptomycètes à eux seuls sont à l'origine de plus de 80% des antibiotiques secrétés par des actinomycètes (Sanglier *et al.*, 1996). Cependant, depuis ces dernières années, les chercheurs se sont focalisés sur la recherche des actinomycètes rares (autre que *Streptomyces* sp.) dans le but de trouver de nouvelles molécules bioactives. Par exemple, les Actinoplanètes (Hayakawa *et al.*, 2003), *Sacharotrix* sp. (Zitouni *et al.*, 2005), *Kitasatospora* sp. (Takahashi et Omura, 2003).

Les bioherbicides produits par les actinomycètes sont nombreux. Par exemple : *Streptomyces saganonensis* produit deux phytotoxines très toxiques sur les plantes, l'herbicidine et l'herbimycine (Yongquan *et al.*, 2003).

- L'herbicidine est utilisée comme herbicide sélectif des mauvaises herbes des rizières et l'herbimycine contrôle les mauvaises herbes monocotylédones et dicotylédones (Stephen et Lydon, 1987).

- L'anismycine des Actinomycètes du genre *Streptomyces* inhibe la croissance des mauvaises herbes qui poussent annuellement dans les prairies, telles que les pâquerettes et les mauvaises herbes à larges feuilles. Cette toxine agit sur les plantes en inhibant la synthèse de la chlorophylle (Yufen, 1987).

- Le Bialaphos, métabolite de *Streptomyces viridochromogenes*, est très utilisé pour le contrôle des mauvaises herbes vivaces ainsi que celles à larges feuilles. De plus, il agit en métabolisant dans la phosphinothricine, laquelle va inhiber par la suite la synthèse de la glutamine.

- L'anismycine quant à elle, peut également agir sur de petits plants de pâquerettes, lesquelles meurent au-dessus de 50 mg/L et inhibe radicalement leur croissance au-dessous de 12,5 mg/L. Sa synthétase serait capable d'emmagasiner le gaz d'ammoniac et de contrôler par la suite la phosphorylation photosynthétique causant la mort de la plante (Changlin, 1999 et Xiliang, 1994).

- La coformycine carbocyclique et l'hydantocodine produites par *Streptomyces hygrosopicus* peuvent diminuer la concentration d'ATP et ralentir la synthèse de protéines (Pillmoor, 1998).

- De plus, la phytoxazoline, l'hydantocidine et l'homoalanosine des *Streptomyces* peuvent lutter contre plusieurs mauvaises herbes (YanChu, 1993).

Description de l'invention

L'invention concerne l'utilisation d'une souche nouvelle *Streptomyces* sp. No2 comme bioherbicide

Caractérisation de la souche selon l'invention

Procédé d'isolement de la souche *Streptomyces* sp. No2.

La souche *Streptomyces* sp. No2 a été obtenue selon un procédé de sélection comprenant les étapes suivantes :

- Mise en présence d'un échantillon biologique susceptible de contenir la *Streptomyces* sp. No2 et/ou une souche mutante, avec un milieu approprié pour la sélection de souches d'actinomycètes,
- Traitement dudit échantillon pour isoler les souches actinomycètes présents, et
- Isolement de souche *Streptomyces* sp. No2 et/ou d'une souche mutante, en fonction de sa capacité à tuer le tissu végétale.

L'isolement de la souche selon l'invention peut être effectué à partir d'échantillons d'une de la rhizosphère du sol de Maroc.

Le protocole décrit en suivant.

Des échantillons de la Rhizosphère de moyen atlas sont obtenus de façon stérile après avoir retiré 15 cm de la racine du sol.

Les échantillons prélevés sont placés dans des sachets stériles en polyéthylène fermés et stockés à 4°C.

Les souches actinomycètes sont en suite isolées sur milieu SEA Soil Extract Agar selon quatre types de traitements successifs : traitement par le broyage, la chaleur, agitation et centrifugation.

Après traitements des échantillons, on isole les souches d'actinomycètes par reconnaissance au microscope sur la base de leurs caractéristiques morphologiques.

Les actinomycètes sont transférés sur le milieu ISP2. Les isolats purs sont maintenus à 4°C pendant 2 mois. Alternativement, les cultures sont resuspendues et conservées dans le glycérol à -20°C

La souche *Streptomyces* sp. No2 selon l'invention est sélectionnée pour sa capacité de d'inhibition de la germination des semences de trèfle.

Caractérisation de la souche *Streptomyces* sp. No2 selon l'invention

Etude morphologique

Etude morphologique

La souche streptomyces sp. NO2 selon l'invention forme un mycélium de substrat largement ramifié sur les milieux de culture testés (ISP2, ISP3, et Bennet). Le mycélium aérien présente des spores blanches. Une observation au microscope optique de la souche a été effectuée (Figure 1,2).

Le mycélium aérien est blanc sur les milieux gélosés ISP2 et Bennett. **La souche *Streptomyces* sp. NO2 présente des** Chaînes de spores fragmentées (3 à 4 spores/chaîne) avec absence de spires

Etude physiologique

La souche *Streptomyces* sp. NO2 selon l'invention produit des pigments méloïdés sur les milieux de culture ISP6 et ISP7.

Les températures de croissance sont entre 12 et 37°C (optimale est comprise entre 28 et 32°C). Bonne croissance se produit à un pH 5-8. NaCl n'est pas toléré jusqu'à une concentration de 5% (p/v).

La souche *Streptomyces* sp. NO2 selon l'invention utilise pour sa croissance, D-le glucose, le mannitol, le Fructose, l'arabinose, le galactose, le lactose, le saccharose, le maltose et le dextrin. Par contre elle est incapable de dégrader l'inositol et le rhamnose. L'Amidon n'est pas hydrolysé. Les nitrates sont réduits en nitrites, la gélatine est liquéfiée par la souche, elle dégrade également l'adénine, la Tween 20, de l'acétate de sodium. Aussi, l'alanine L, L - la proline, La phenylalanine, L-theronine et D-novaline sont utilisés comme unique source de carbone.

Etude moléculaire

La souche *Streptomyces* sp. NO2 selon l'invention a été caractériser de point de vu moléculaire. L'amplification de son ADNr 16s a été effectuée en utilisant deux amorces universels 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').

La séquence 16s ADNr est la suivante : SEQ n°1

TCTGNACTCNAGGATGACGCCCTTTCGNNCTGATTTACTGTCAATAGGGTGATTAACAC
GTGGGCATCTCCCCTTCCCTCCGGAAAANCCCTGGAAACCGATTCTAATACCGNATAC
AACTCTGCCCTGATGGGACGGGGTTAAAAGCTTTGCGGTTCGAATGATGAACCGCGGCC
TACTTTTGTNGTGGGGNAATGGCCACCAAAGCAACNACGGGTCTGCCCCCTGAAA

GGGATACCCGCCCCACGGGAAATGAAACACGGCCCAATCTCCTNCGGGAGGCAACAG
TGGGAAATTTTGCANAATGGGCAAACGCCTGCTGCAACGCCCCCCCTTGAGGGGATGAC
CCCCTTCGGGTTGTAAACGCTCNNTCCNCAAGGGGTTGGGCCACCGGCTTCGGGTGTTA
CCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAG
CAATGCTGATCTGCGATTACTAGCAACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCA
ATCCGAACTGAGACCGGCTTTTTGAGATTTCGCTCCGCCTCGCGGCATCGCAGCTCATTG
TACCGGCCATTGTAGCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCATGATGACTTGACGT
CGTCCCCACCTTCCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCTGTGAGTCCCCATCACCCCGA
AGGGCATGCTGGCAACACAGAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACAT
CTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTATACCGACCACAAGGGGGGC
ACCATCTCTGATGCTTCCGGTATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTC
GAATTAAGCCACATGCTCCGCTGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAG
CCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGAACCTAATGCGTTAGCTGCGGCACCGACGAC
GTGGAATGTCGCCAACACCTAGTTCCCAACGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT
AATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAATGGCCCAGAGATCCGC
CTTCGCCACCGGTGNTTCCTCCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAATTCC
GATCTCCCCTACCACACTCTNNTAGCCCGTATCGGATGNAGACCCGGGGTTAAGCCCC
GGGCTTTCACATTCCGACGTGACAAGCCNCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCN
NGGANAACCGCTTGGCCCTACGATACCGCGGCTGCTGGCNCG

Cette séquence est déposée dans la banque de donnée de nucléotides Pubmed/NCBI.

L'analyse phylogénétique de la séquence 16s rADN montre que la La souche *Streptomyces* sp. NO2 selon l'invention appartient au genre de *Streptomyces*.

Effet de phytotoxicité sur des graines

La souche *Streptomyces* sp. NO2 présente un effet phytotoxique sur la germination des graines de trèfles. Le test suivant montre cet effet.

Le protocole

Les graines sont tout d'abord désinfectées dans un mélange eau distillée/eau de Javel puis rincées trois fois à l'eau distillée stérile. Les graines sont ensuite séchées sur un papier Whatman.

Sous conditions stériles, les graines de trèfle désinfectées sont mises en contact avec le mélange jus/culot cellulaire de la souche *Streptomyces* sp. NO2 puis placées sous agitation, à 190 rpm pendant 2 heures. Une fois les graines imbibées du mélange jus/culot cellulaire de chaque actinomycète, celles-ci sont déposées en un certain nombre dans des boîtes de Pétri contenant 1% d'agar.

Les dépôts sont les suivants : *Trèfle* : 20 graines/boîte

Les boîtes enveloppées de papier aluminium sont incubées à 25°C. La lecture des graines germées s'effectue 24h et 48h après le traitement. Les résultats sont exprimés en pourcentage des témoins non traités.

Les résultats ont montré que la souche *Streptomyces* sp. NO2 inhibe la germination de plus de 50% des graines de trèfles (Figure 3)

1.2 Test de phytotoxicité sur de jeunes plantules

La souche *Streptomyces* sp. NO2 présente un effet phytotoxique sur les jeunes plantules de trèfles. Le test suivant montre cet effet.

Le protocole :

Une fois les graines désinfectées, celles-ci sont semées en quantité définie dans des pots remplis de terreau.

Les semences sont les suivantes : *Trèfle* : 2g de graines/pot
Après 7 jours de croissance, les jeunes plantules sont pulvérisées trois fois du mélange jus/culot de la souche *Streptomyces* sp. NO2 à 2 jours d'intervalle. Les résultats sont exprimés en fonction d'un témoin négatif.

Les résultats :

L'application de la souche *Streptomyces* sp. NO2 a inhibé la croissance de jeunes plantules du trèfle (Figure 4) et même il eu apparition des taches noirâtres ce qui montre l'effet toxique exercé par la souche *Streptomyces* sp. NO2.

Composés actifs susceptibles s'être produits à partir de la souche *Streptomyces* sp. NO2.

La souche *Streptomyces* sp. NO2 selon l'invention est capable de produire des composés actifs. La présente invention propose un procédé d'extraction et de purification de ces composés actifs issus de la souche *Streptomyces* sp. NO2.

Le procédé d'extraction et de purification selon l'invention comprend les étapes suivantes :

- Fermentation de la souche *Streptomyces* sp. NO2
- Sonication de la culture produite de la souche *Streptomyces* sp. NO2
- Centrifugation du filtrat
- Récupération du surnagent
- Extraction en utilisant des solvants organiques hydrophiles et hydrophobes
- Evaporation des solvants
- Purification des composés actifs

L'invention vise les composés actifs ou antibiotiques obtenus par ce procédé.

L'activité bioherbicide des composés actifs de la souche *Streptomyces* sp. NO2 varie selon les solvants d'extraction. la figure 5 montre l'effet des composés extrait sur des jeunes plantules de trèfle.

Afin de choisir le meilleur solvant d'extraction, nous avons effectué un test d'activité sur des graines de trèfle. Les résultats montrent que l'hexane a un effet systémique sur la germination du trèfle, alors que l'acétate d'éthyle à un effet germicide (Figure 5). Par conséquent, nous utiliserons l'acétate d'éthyle comme solvant d'extraction.

La légende des figures

Figures 1 et 2 : Observations de la forme des spores de la souche 2 au microscope optique (X100) et (X400).

Figure 3 : test de confrontation souches et graines de trèfles

Figures 4 : Inhibition de la croissance de jeunes plantules de trèfle après pulvérisation avec la souche *Streptomyces* sp. NO2. La légende : A gauche le témoin non traité, au milieu souche témoin non phytotoxique, à droite l'application de la souche *Streptomyces* sp. NO2.

Figure 5 : Inhibition de de jeunes plantules de trèfles par leur pulvérisation des produits extrait de la souches *Streptomyces* sp. NO2. La légende : A = Témoin, B- Témoin solvant, C- Extrait Hexane D- Extrait Acétate d'éthyle

Les revendications

1. Souche *Streptomyces* sp. NO2, caractérisée par une séquence de l'ADNr 16S SEQ n°1.
2. Procédé de sélection d'une souche selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes
 - Mise en présence d'un échantillon de la rhizosphère du sol de la montagne de moyen atlas susceptible de contenir la souche *Streptomyces* sp. NO2, avec un milieu approprié pour la sélection de souches actinomycètes,
 - Traitement dudit échantillon pour isoler les souches d'actinomycètes présentes, et
 - Isolement de la souche *Streptomyces* sp. NO2, en fonction de sa capacité à produire des molécules inhibitrice de la germination des graines de trèfle.
3. Utilisation d'une souche selon la revendication 1, comme bioherbicide
4. Utilisation des produits de la souche selon la revendication 1, pour inhiber la germination des graines et la croissance de plantes.



Figures 1 et 2

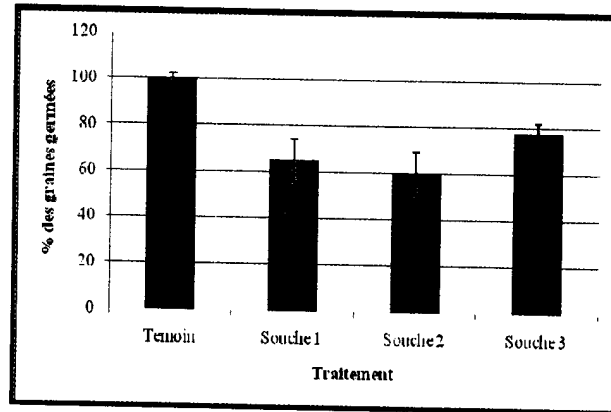
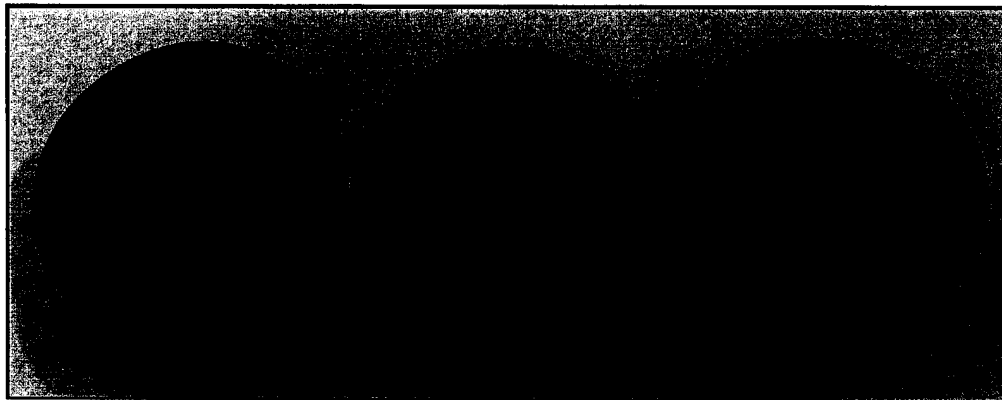


Figure 3



Figures 4 :

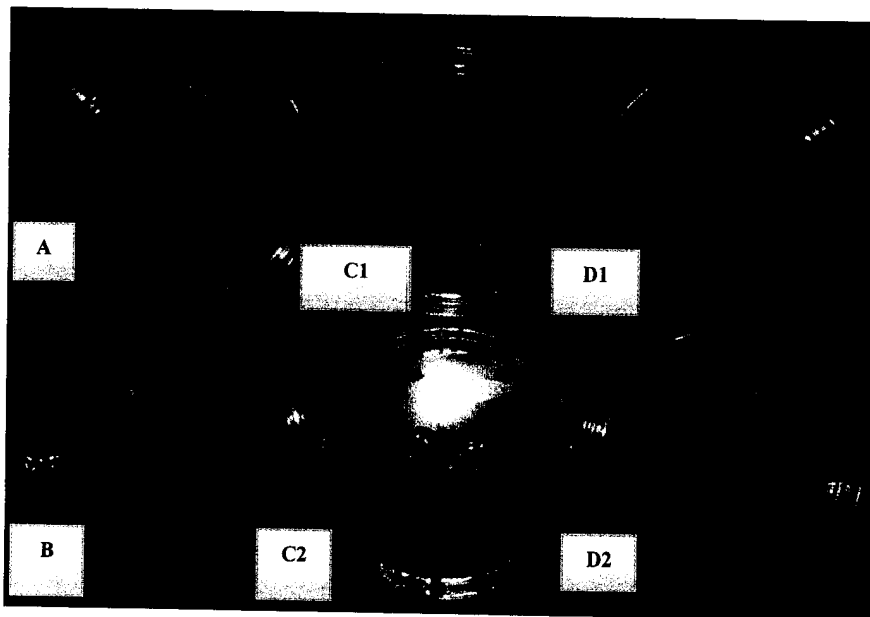


Figure 5