



(12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 35469 B1** (51) Cl. internationale : **A61P 31/06; C12R 1/01; C12N 1/20; A61P 35/00**
- (43) Date de publication : **02.10.2014**

-
- (21) N° Dépôt : **35536**
- (22) Date de Dépôt : **04.01.2013**
- (71) Demandeur(s) : **UNIVERSITÉ MOULAY ISMAIL, MARjane 2, BP:298 Meknès (MA)**
- (72) Inventeur(s) : **LEBRIHI Ahmed ; ERRAKHI Rafik**
- (74) Mandataire : **RAFIK ERRAKHI**

-
- (54) Titre : **Utilisation des molécules d'une nouvelle bactérie endophyte filamenteuse comme produit antioxydant et anticancéreux.**
- (57) Abrégé : Cette invention concerne l'utilisation de la souche Amycolatopsis sp. RC21, d'une souche mutante ou d'un composé actif pour inhiber la croissance de l'agent causal de la tuberculose, et/ou inhiber la prolifération des cellules cancéreuses et/ou pour un effet antioxydant. Egalement, la présente invention a pour objet une nouvelle souche actinomycète à caractère endophyte Amycolatopsis sp. RC21 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 Amycolatopsis sp. RC21 ou d'une souche mutante, ainsi que les composés actifs obtenus.

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

Cette invention concerne l'utilisation de la souche *Amycolatopsis* sp. RC21, d'une souche mutante ou d'un composé actif pour inhiber la croissance de l'agent causal de la tuberculose, et/ou inhiber la prolifération des cellules cancéreuses et/ou pour un effet antioxydant.

Egalement, la présente invention a pour objet une nouvelle souche actinomycète à caractère endophyte *Amycolatopsis* sp. RC21 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 *Amycolatopsis* sp. RC21 ou d'une souche mutante, ainsi que les composés actifs obtenus.

251123
02 OCT 2014

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

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses Gram-positives, présentes dans divers milieux écologiques et en particulier dans les sols. Ces microorganismes jouent un rôle important dans l'amélioration de la qualité du sol agricole, notamment en contribuant aux processus de recyclage et de biodégradation de la matière organique et des éléments minéraux (El-tarabily *et al.*, 2008). 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 (Goodfellow et Williams, 1983; Zaitlin et Watson, 2006). En agronomie, ces bactéries jouent un rôle important dans l'amélioration de la croissance et la protection des cultures de plantes.

La où elles sont très connus, c'est dans le domaine pharmaceutique et de cosmétique. Tel que 60% des antibiotiques naturels dans le monde sont produites par les actinomycètes. Par exemple ; deux nouvelles substances Thiazostatins A et B ayant un effet anti-oxydant puissant ont été isolés d'une souche d'actinomycète *Streptomyces toluosus 1368-MT1* (Shido et al 1989). Un autre exemple de trois isoflavonoïdes antioxydantes 4',7,8-Trihydroxyisoflavone, 3',4',7-Trihydroxyisoflavone et 8-chloro-3',4',5,7-tetrahydroxyisoflavone (3) ont été isolés à partir de *Streptomyces* sp. OH-1049.

Caractérisation de la souche selon l'invention

Procédé d'isolement de la souche endophyte RC21

La souche RC21a été obtenue selon un procédé de sélection comprenant les étapes suivantes :

- Mise en présence d'un échantillon biologique susceptible de contenir la souche RC21 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 RC21 et/ou d'une souche mutante, en fonction de sa capacité à envahir le tissu végétale et de vivre à l'intérieur sans causer de maladie.

L'isolement de la souche selon l'invention peut être effectué à partir d'échantillons d'une plante endémique au Maroc, qui ne pousse qu'au moyen atlas.

Le protocole décrit en suivant.

Des échantillons de la racine de la plante endémique 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 RC21 selon l'invention est sélectionnée pour sa capacité de d'inhibition des bactéries à gram positif et à gram négatif. Elle est reconnaissable par ces caractéristiques phénotypiques, physiologiques et moléculaire décrites ci-après.

Etude morphologique

La bactérie forme un mycélium de substrat largement ramifié sur les milieux de culture testés (ISP2, ISP3, et Bennet). Le mycélium aérien est fragmenté en forme de tige, caractère spécifique aux souches du genre *Amycolatopsis*.

Le mycélium aérien est blanc sur les milieux gélosés ISP2 et Bennett, mais il est brun à gris brun sur d'autres milieux. Le mycélium de substrat varie de jaune brun à gris brun selon le milieu. Spore chaînes est longue avec irrégulière flèches beaucoup de spores (10-50). Les spores sont lisses et non mobiles.

Etude physiologique

La souche RC21 ne produit pas de pigment méloïdés.

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 5-9. NaCl n'est pas toléré jusqu'à une concentration de 5% (p/v).

La souche RC21 utilise pour sa croissance, D-le glucose, le mannitol, le lactose, le saccharose, le maltose et le dextrin. Par contre le galactose, le xylose, l'inositol, le sorbose, le fructose, l'arabinose, le raffinose, le rhamnose et la cellulose, ne sont pas utilisés. L'Amidon n'est pas hydrolysé. Les nitrates sont réduits en nitrites, la gélatine n'est pas liquéfiée, 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

L'amplification de la partie ADNr 16s a été effectué en utilisant deux amorces universels 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3').

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

```
GGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCGTTGCTGATCT
GCGATTACTAGCGACTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATC
CGAACTGAGACCGGCTTTAAGGGATTTCGCTCCACCTCGCGGTATCGCAGC
CCTCTGTACCAGCCATTGTAGCATGTGTGAAGCCCTGGACATAAGGGGCA
TGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCT
CCCACGAGTCCCCGCCATAACGCGCTGGCAACGTAGGATAAGGGTTGCGC
TCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCA
TGCACCACCTGTACACCAACCACAAGGGAAGCCCCATCTCTGGGGATGTC
TGCGCATGTCAAGCCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATC
CACATGCTCCGCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAG
CCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGCGCTTAATGCGTTAGCTACGGCA
CGGACAACGTGGATGTCGCCACACCTAGCGCCCAACGTTTACAGCGTGG
ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGC
GTCAGTATCGGCCAGAGACCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTCCTGATA
```

TCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGGAATTCCAGTCTCCCCTACCGAACT
CAAGTCTGCCCCGATCGACCGCACGCTCCACGTTAAGCGTGGAGATTTCA
CGGCCGACGCGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCAATAAATCCGG
ACAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCC
GGTGCTTCTTATCCAGGTACCGTCACTTGCCTTCGTCCCTGGCGAAAGA
GGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGG
CTTTCGCCCATTTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTATGNGTATG
GGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCACCCTCTCAGGCCGGCTACC
CGTCGTCGCCTTGGTAGGCCATTACCCCAACAACAAGCTGATAGGCCGCG
GGTTCATCCTGCACCGCCGGAACCTTCAACAACCCCCCATGCGAGAGATT
GTGATATCCGGTATTAGACCTCGTTTCCAAGGCTTATCCAGAGTGCAGG
GCAGATTACCCACGTGTTACTACCCGTTCCGCACTCATCCCCACCCGA

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

L'analyse phylogénétique de la séquence 16s rADN montre que la dite bactérie endophyte RC21 appartient au genre de *Amycolatopsis*. Cette analyse a montré aussi qu'elle est proche 99% des souches suivantes *Amycolatopsis rifamycinica* DSM 46095 et *Amycolatopsis pretoriensis* NRRL B-24133.

Des tests physiologiques et l'Hybridation ADN-ADN ont montré qu'elle correspond à une nouvelle espèce dans le groupe des Actinomycètes.

La présente invention vise également les souches mutantes de la souche RC21. Par « souche mutante », on entend désigner toute souche RC21 pouvant être obtenue par mutation sélective à partir de la souche RC21. Les techniques de mutation consistent à mettre la souche RC21 en présence d'un agent mutagène physique, tel qu'un rayonnement, ou d'un agent mutagène chimique, puis à sélectionner dans un milieu approprié les mutants d'intérêt restant en utilisant leur spectre antibiotique.

La souche RC21 selon l'invention ou ses souches mutantes, montrent des activités biologiques importantes. Ces dernières sont variés et multiples. Il s'agit de la production des molécules antifongiques, antibactériennes, anticancéreuses et antioxydants.

La souche RC21 selon l'invention ou ses souches mutantes, a montré une activité contre *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium phlei* ceci montre que la souche RC21 peut être efficace contre la maladie de la tuberculose. Elle a montré également des activités antibactériennes très positives contre *Echerichia coli*, *Pseudomonas aerogenosa*, *staphylococcus aureus*, de même des activités antifongiques contre *Mucor ramaniamus* et *Candidat albicans* (figure 1 et 2).

La souche RC21 selon l'invention ou ses souches mutantes, a montré une activité contre les cellules cancéreuses de sein (L1) et cellules du rein (L2).

Des tests de l'effet anti-oxydatives ont été effectués également. Ils ont montré que la souche RC21 selon l'invention présente un effet anti-oxydatives.

Le spectre d'activité de la souche RC21 selon l'invention est résumé dans le tableau ci-dessous.

+ → Activité faible

++ → Activité moyenne

+++ → Activité élevée

Type d'activité	Niveau d'activité
Anti oxydative	++
Anti Cancéreuse (cellules cancéreuses du sein L1)	++
Anti Cancéreuse (cellules cancéreuses du rein L1)	++
Anti <i>E. coli</i>	++
Anti <i>Pseudomonas aerogenosa</i>	+
Anti <i>Mycobacterium phlei</i>	+++
Anti <i>Micrococcus luteus</i>	+++
Anti <i>Staphylococcus aureus</i>	++
Anti <i>Candida albicans</i>	++
Anti fongique (<i>Mucor ramaniamus</i>)	+++

Composés actifs susceptibles s'être produits à partir de la souche RC21

La souche RC21 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 RC21.

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

- Fermentation de la souche RC21
- Sonication de la culture produite de la souche RC21
- Centrifugation du filtrat
- Récupération du surnageant
- 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 des composés actifs de la souche RC21 selon les solvants d'extraction est représentée dans le tableau ci-dessous.

Souche	Activité antimicrobienne		Activité antioxydant		Activité anticancéreuse	
	Acétate d'éthyle	Hexane	Acétate d'éthyle	Hexane	Acétate d'éthyle	Hexane
RC21	++++	++	+	+	+++	++

Les revendications

1. Souche *Amycolatopsis* sp. RC21, 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 végétale d'une plante endémique de moyen atlas susceptible de cointenir la souche *Amycolatopsis* sp. RC21, 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 *Amycolatopsis* sp. RC21, en fonction de sa capacité à produire des molécules anticancéreuses, antioxydantes et antituberculeuses.
3. Utilisation d'une souche selon la revendication 1, pour inhiber la croissance de l'agent causal de la tuberculeuse
4. Utilisation d'une souche selon la revendication 1, pour inhiber la prolifération des cellules cancéreuses de sein (L1) et des cellules cancéreuses de rein (L1).
5. Utilisation d'une souche selon la revendication 1, pour avoir un effet antioxydant.

Figure 1 : Zone d'inhibition de la croissance de *Mycobacterium phlei* par la souche *Amycolatopsis* sp. RC21 selon l'invention.

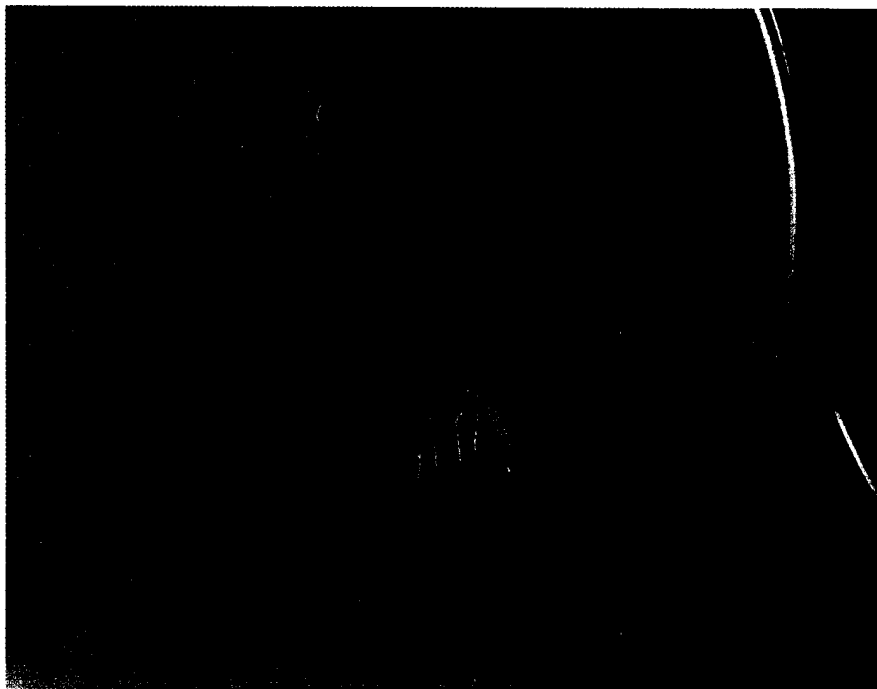


Figure 2 : Inhibition de la croissance de *Candidat albicans* par la souche *Amycolatopsis* sp. RC21 selon l'invention.

