

Eclibon du Centre de Sorbonne 5, SOL. 558 (1979)

 243
 ISOLEMENT, ETUDE STRUCTURALE ET PROPRIETES ANTIBIOTIQUES ET ANTIFONGIQUES D'UN COMPOSANT POLYSACCHARIDIQUE DE LA DIATOMEE MARINE CHEATOCEROS LAUDERI (RALFS CC).

D. PESANDO*, M. GNASSIA-BARELLI*, E. GUEHO**, M. RINAUDO*** et J. DEFAYE***

* Laboratoire de Physique et Chimie Marines, 8 X, La Darse, 06230 Villefranche sur Mer.

** Laboratoire de Cryptogamie, U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques, 8 Avenue Rockefeller, 69373 Lyon cédex.

*** Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales, C.N.R.S., 53 X, 38041 Grenoble cédex.

Abstract

The marine diatom Chaetoceros lauderi (Ralfs cc) produces a high molecular weight ionic polysaccharide which exhibits a significant antibiotic activity against staphylococcus species acid pathogenic fungi. Acidic hydrolysis followed by GC-MS identification of the corresponding alditol acetates leads to a basic structural composition comprising arabinose, xylose, galactose, mannose and glucose in the ratio 12:21:15:25:5. The presence of uronic and sulfate residues in the ratio 3:2 is suspected from the conductimetric titration curve using sodium hydroxyde.

Introduction

Les propriétés antibactériennes du phytoplancton marin sont connues (Rosenfeld..., 1947 ; Steeman-Nielsen, 1955 ; Jørgensen..., 1961 ; Sieburth..., 1962 ; Aubert..., 1966 ; Moebus, 1972 ; Andersen..., 1972 ; Sims..., 1975 ; Baslow, 1977). Quelques composants actifs ont pu être caractérisés (Mautner..., 1953 ; Jørgensen, 1962 ; Sieburth, 1963 ; Berland..., 1972 ; Fenical..., 1973). Les études portant sur les propriétés antifongiques du phytoplancton sont comparativement plus rares (Burkholder..., 1962 ; Sharma..., 1968 ; Gauthier, 1969). Le présent rapport a pour objectif l'isolement et la caractérisation partielle d'une substance à propriétés antibiotique et antifongique produite par la diatomée marine Chaetoceros lauderi (Ralfs cc)

Résultats et discussions

Une étude prospective systématique préalable, conduite sur les extraits aqueux de 48 algues planctoniques (Pesando..., 1978), a permis de mettre en évidence une activité antifongique significative pour 5 diatomées : Asterionella notata, Chaetoceros lauderi, Chaetoceros pseudocurvisetus, Chaetoceros socialis et Fragilaria

pinnata. Une étude plus complète a été réalisée sur Chaetoceros socialis dont le spectre antifongique apparaît particulièrement intéressant (Gueho..., 1977). Cette diatomée était précédemment connue pour son large spectre antibactérien vis à vis des germes aérobies (Aubert..., 1966) et anaérobies (Aubert..., 1972). L'activité antibactérienne, tout d'abord attribuée à Chaetoceros teres, espèce morphologiquement identique à Chaetoceros lauderi, a pu être rattachée à cette dernière grâce à l'examen des spores (Nival, 1976).

La souche sur laquelle ont été réalisés nos travaux a été isolée en Janvier 1976 à la Station Marine de Villefranche sur Mer. Les cellules, cultivées dans des conditions axéniques (Provasoli, 1966) pendant 12 jours sont récupérées par filtration sur membrane (Sartorius 8 microns). 500 Litres de culture conduisent à 1 g de cellules (poids sec). La suspension cellulaire dans l'eau distillée (1:20, poids humide/v) est broyée (Ultraturrax 20 000 tours/min/5 min), centrifugée (30 min) puis filtrée sur membrane (0.2 microns). L'extraction et la purification du composant actif sont suivis par des tests d'antibiogramme (Chabbert, 1963) effectués vis à vis de Staphylococcus epidermitis (CIP 53 124), micro-organisme particulièrement sensible à l'action de la diatomée (Pesando..., 1978). Après filtration sur membrane (Amicon PM 30) l'activité antibiotique est retrouvée dans la fraction de masses moléculaires supérieures à 30 000. Par purification de cette fraction sur une résine échangeuse d'anions (Cellex Bio Rad, tampon véronal 0.05 M, pH 8, Medcalf 1975) et élution à l'aide d'un gradient continu de chlorure de sodium (0.2 à 1M) la fraction active est détectée dans l'éluant de concentration 0.5 M. Après concentration, déminéralisation sur membrane (Amicon PM 30), la solution obtenue est précipitée à froid avec 3 volumes d'éthanol (24 h, 4°) puis centrifugée (12 000 trs/min/30 min). Le précipité, qui comporte la totalité de l'activité antibiotique, est redissous dans l'eau et soumis à une filtration sur gel (Ultrogel LKB, AC H 34, 20 000 - 350 000 daltons). Le composé actif (15 mg) est obtenu dans le volume d'exclusion de la colonne ce qui est en faveur d'une masse moléculaire supérieure à 200 000. Il présente une forte activité antibactérienne sur Staphylococcus epidermitis (50 µg provoquent une lyse de 5 mm) et inhibe le développement de Microsporium gypseum et Sporothrix schenckii (concentration minimum inhibitrice, 150-200 µg/ml). Les activités antibactériennes et antifongiques sont maintenues lorsque la substance est placée dans une gamme de pH 2.5 - 11.5 ; l'inactivation est obtenue par chauffage à 80°.

Parmi les tests d'orientation, seules les réactions à l'antrone et au réactif carbazole sulfurique (Dische, 1962) se sont révélées positives indiquant une structure glucidique. La présence de groupements sulfate et uronate a pu être mise en évidence par conductimétrie (Rinaudo, 1966 ; Karimian, 1978). La répartition des

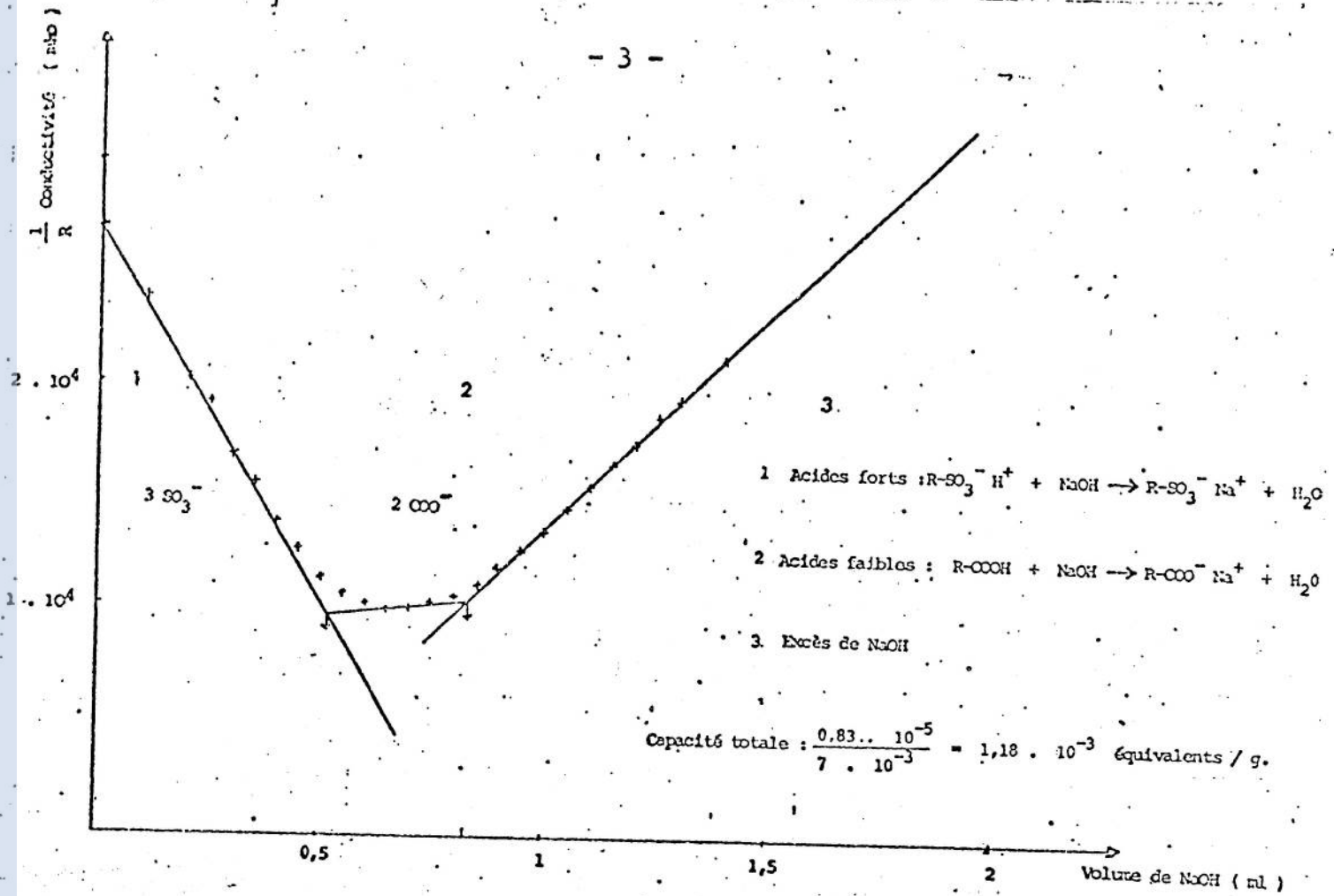


Fig. 1 : Courbe de neutralisation conductimétrique par NaOH $\frac{N}{100}$ d'une solution contenant 7 mg. de polysaccharide.

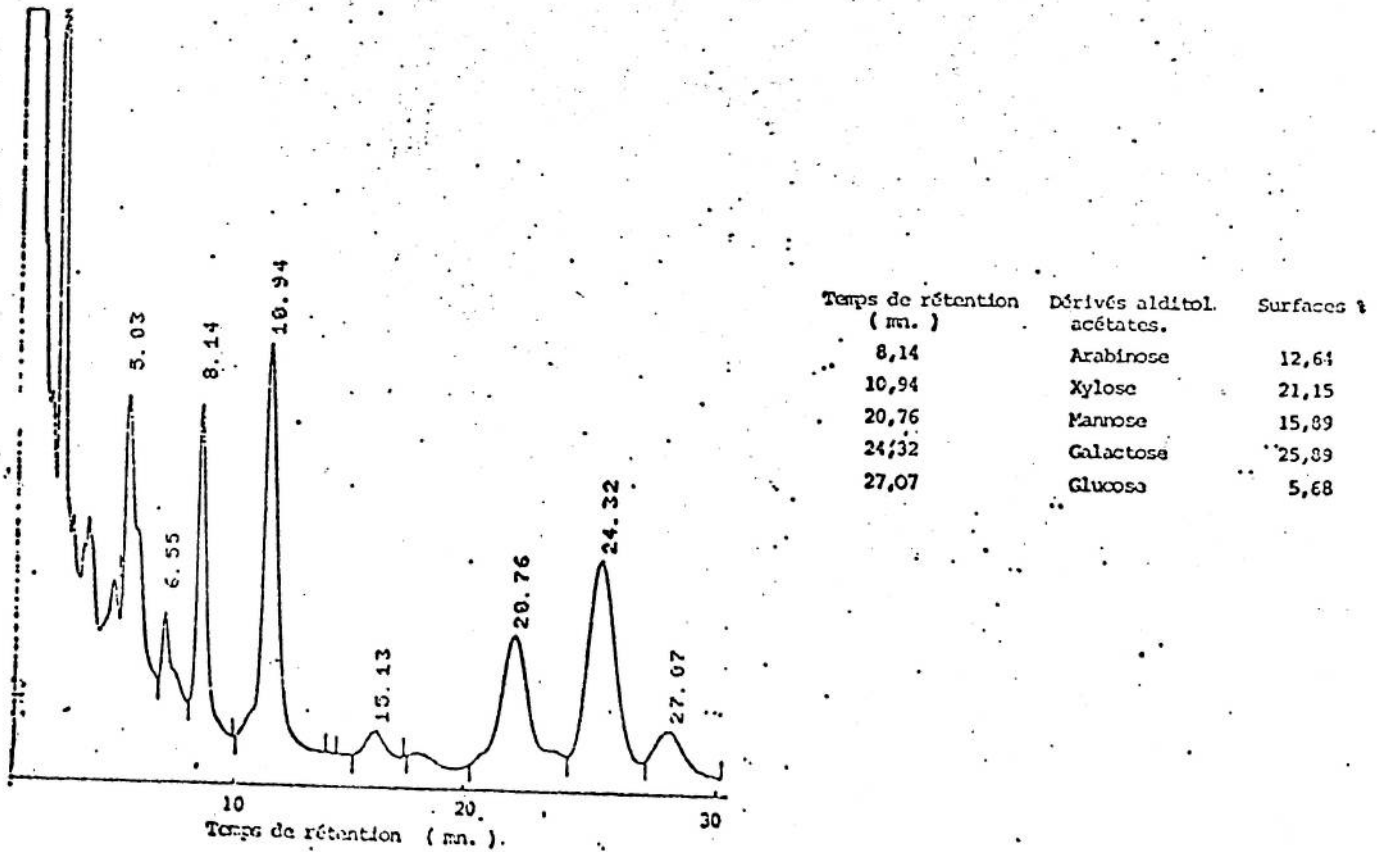


Fig. 2 : Diagramme de chromatographie en phase vapeur des alditol acétates du mélange total d'alditol acétates obtenus après hydrolyse du polysaccharide actif de Chaetoceros lutheri.

charges déduites de la courbe de titration (fig. 1) est en faveur de la présence de trois groupements ester sulfate pour deux résidus uroniques (capacité ionique $1.18 \cdot 10^{-3}$ équivalents/g). L'hydrolyse par l'acide trifluoroacétique en tube scellé du polysaccharide ionique (4 mg) suivie de réduction par le borohydrure de sodium et peracétylation de l'hydrolysate total a permis la mise en évidence par chromatographie en phase vapeur (colonne ECNSSM, 180°) des constituants monosaccharidiques suivants : arabinose, xylose, mannose, galactose et glucose dans les proportions respectives 12:21:15:25:5 (intégration des surfaces de pics des alditols peracétylés correspondants, fig. 2). Des traces de 6-désoxy hexoses du type rhamnose et fucose sont également détectables. Le couplage avec la spectrométrie de masse (appareil MS 30, AEI, interface à membrane) a confirmé par les fragmentations séquentielles classiques des hexitols et pentitols peracetates (Chizhov..., 1966) les attributions précédentes. Une tentative de mise en évidence de groupes uronates par réduction préalable du polysaccharide ionique total en présence d'un agent deutériant (Taylor..., 1972) n'a pour l'instant pas permis de confirmer les résultats de titrage conductimétrique et de nouveaux essais sont nécessaires pour confirmer ce point.

Conclusion

L'utilisation de tests antibiotiques et antifongiques systématiques a permis la mise en évidence et la purification à partir d'une souche axénique de la diatomée Chaetoceros lauderi d'un polysaccharide ionique de haut poids moléculaire.

Sa caractérisation se poursuit activement dans nos laboratoires et nécessite conjointement la production à plus grande échelle du micro-organisme considéré ainsi que la mise au point corrélative de méthodes d'étude structurale adaptées aux faibles quantités de substance mises en oeuvre. Si la richesse en constituants polysaccharidiques des algues pluri-cellulaires est bien connue (Percival..., 1967 ; Percival, 1970) et que celle des diatomées marines commence à être investiguée (Myklestad..., 1974 ; Smestad..., 1974, 1975 ; Handa..., 1969 ; Haug, 1976 ; Allan..., 1972), il ne semble pas que des composés de haute masse moléculaire présentant une activité antibactérienne ou antifongique aient été mis en évidence jusqu'ici à partir d'algues planctonique. Un domaine de recherche d'intérêt est donc ici perceptible.

Références

- Allan, C.G., Lewin, J. et Johnson, P.G. ; Marine Polymers. IV Diatom polysaccharides. Bot. Mar., 15, 102-108 (1972).
- Andersen, R.J. et Faulkner, D.J. ; Antibiotics from marine organisms of the gulf of California, Prof. Third Food and Drugs from the Sea Conf., Kingston, Rhode Island, August 1972, Worthen. L. R. ed., Marine Technology Society, Washington, 1972, p.111-115.
- Aubert, M. et Gambarotta, J.P. ; Etude de l'action antibactérienne d'espèces phyto-planctoniques marines vis à vis de germes anaérobies. Rev. Int. Oceanogr. Med., 25, 39-48 (1972).
- Aubert, M. et Gauthier, M.J. ; Origine et nature des substances antibiotiques présentes dans le milieu marin. VIIe Partie : Note sur l'activité antibactérienne d'une diatomée marine, Chaetoceros teres (Cleve). Rev. Int. Oceanogr. Med., 4, 33-38 (1966).
- Aubert, M. et Gauthier, M.J. ; Origine et nature des substances antibiotiques présentes dans le milieu marin. 8e Partie : Etude systématique de l'action antibactérienne d'espèces phytoplanctoniques vis à vis de certains germes telluriques aérobies. Rev. Int. Oceanogr. Med., 5, 63-72 (1966 b).
- Baslow, M.H. ; dans Marine Pharmacology : a Study of Toxins and Other Biologically Active Substances of Marine Origin, R.E. Krieger Pub. Co, Huntington, New-York, 1977, 327 pp.
- Berland, B.R., Bonin, D.J. et Cornu, A.L. ; The antibacterial substances of the marine alga Stichochrysis immobilis (Chrysophyta). J. Phycol., 8, 383-392 (1972).
- Burkholder, P.R., Burkholder, L.M. et Almadovar, L. ; Antibiotic activity of some marine algae of Puerto Rico, Bot. Mar., 2, 149-156 (1960).
- Chabbert, Y.A. ; l'Antibiogramme, Tourelle ed. St Mandé, coll. Techniques de Base (1963).
- Chizhov, O.S., Golovkina, L.S. et Wulfson, N.S. ; Izv. Akad. Nauk. SSSR, Ser. Khim., 1915 (1966).
- Dische, Z. ; Color reactions of hexuronic acids, dans Methods Carbohydr. Chem., Whistler, R.L. et Wolfrom, M.L. ed. , Academic Press, New York, vol. I, 1962.
- Fenical, W. et Sims, J.J. ; Cycloeuodesmol, an antibiotic cyclopropane containing sesquiterpene from the marine alga Chondria oppositoclada Dawson. Tetrahedron Lett., 13, 1137- 1140 (1974).
- Gauthier, M.J. ; Activité antibactérienne d'une diatomée marine, Asterionella notata (Grun). Rev. Int. Oceanogr. Med., 25-26, 103-165 (1969).
- Gueho, E., Pesando, D. et Barelli, M. ; Propriétés antifongiques d'une diatomée marine Chaetoceros lauderi (Ralfs cc). Mycopathologia, 60, 105-107 (1977).
- Handa, N. ; Carbohydrate metabolism in the marine diatom Skeletonema costatum. Mar. Biol., 4, 208-214 (1969).
- Haug, A. ; Polysaccharides of marine diatoms with special reference to Chaetoceros species. Mar. Biol., 34, 217-222 (1976).

Jørgensen, E.G. ; Antibiotic substances from cells and culture solutions of unicellular algae with special reference to some chlorophyll derivatives. Physiol. Plant., 15, 530-545 (1962).

Jørgensen, E.G. et Steeman-Nielsen, E. ; Effect of filtrate from culture of unicellular algae on the growth of Staphylococcus aureus. Physiol. Plant., 14, 896-908 (1961).

Karimian, A. ; Caractérisation et propriétés en solution des κ , ι et λ carraghénanes. Thèse de spécialité, Université de Grenoble, 1978.

Mautner, H.G., Gardner, G.M. et Pratt, R. ; J. Am. Pharm. Assoc., 42, 294-296 (1953).

Medcalf, D.G., Scott, J.R., Brannon, J.H., Hemerick, G.A., Cunningham, R.L. Chessen, J.H. et Shah, J. ; Some structural features and viscosimetric properties of the extracellular polysaccharide from Porphyridium cruentum, Carbohydr. Res., 44, 87-96 (1975).

Moebus, K. ; Seasonal changes in antibacterial activity of North Sea water, Mar. Biol., 13, 1-13 (1972).

Myklestad, S. ; Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. I. Comparison of nine different species in culture. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 15, 261-274 (1974).

Nival, P. ; Communication personnelle (1976)

Percival, E. ; Algal Polysaccharides, dans the Carbohydrates, 2nd ed., Pigman, W. et Horton, D. ed., vol. II B, Academic Press, New-York, 1970, p. 537-568.

Percival, E. et Mc Dowell, R.H. ; Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides, Academic Press, New-York, 1967.

Pesando, D., Gueho, E. et Gnassia-Barelli, M. ; Antifungal properties of some marine planctonic algae, Bot. Mar., 1978, sous presse.

Provasoli, L. ; Media and prospects for cultivation of marine algae, Proc. U.S. Japan Conf. Hakone, Sept. 1966, Jpn. Soc. Plant Physiol., 63-75 (1966).

Rinaudo, M. ; Etude physico-chimique des polyélectrolytes en solution : les O-carboxyméthyl-celluloses ; Thèse d'Etat, Université de Grenoble, 1966.

Rosenfeld, D.W. et Zobell, C.E. ; Antibiotic production by marine micro-organisms. J. Bacteriol., 93, 1911-1916 (1947).

Sharma, G.M., Michaels, L. et Burkholder, P.R. ; Goniiodomin, a new antibiotic from a dinoflagellate. J. Antibiot., 21, 659-664 (1968).

Sieburth, J. McN. ; Antibacterial substances produced by marine algae. Dev. Ind. Microbiol., 5, 124-134 (1963).

Sieburth, J. McN. et Pratt, D.M. ; Anticoliform activity of sea water associated with the determination of Skeletonema costatum blooms. Trans. N.Y. Acad. Sci., 24, 498-501 (1962).

Sims, J.J., Donnel, M.S. and Leary, J.V. ; Antimicrobial agents from marine algae, Antimicrob. Agents Chemother., 7, 320-321 (1975).

Smestad, B., Haug, A. et Myklestad, S. ; Production of carbohydrate by the marine diatom Chaetoceros affinis var. Willei (Gran) Hustedt. III. Structural studies of the

extracellular polysaccharide. Acta Chem. Scand., Ser. B, 28, 662-666 (1974).

Smestad, B., Haug, A. et Myklestad, S. ; Structural studies of the extracellular polysaccharide produced by the diatom Chaetoceros curvisetus cleve. Acta Chem. Scand., Ser. B, 29, 337-340 (1975)

Steeman-Nielsen, E. ; The production of antibiotics by plankton algae and its effect upon bacterial activities in the sea. Deepsea Res., 3 (suppl), 281-286 (1955).

Taylor, R.L. et Conrad, H.E. ; Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl group. Biochemistry, 12, 1383-1388 (1972).