

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/226382799>

# Activités biologiques des métabolites excrétés par la cyanobactérie filamenteuse *Arthrospira platensis*

Article in *Phytotherapie* · October 2010

DOI: 10.1007/s10298-010-0577-2

CITATIONS

4

READS

1,622

3 authors, including:



Lamia Trabelsi

Institut National des Sciences et Technologies de la Mer

17 PUBLICATIONS 290 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Hatem Ben Ouada

Institut National des Sciences et Technologies de la Mer

40 PUBLICATIONS 437 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



LAB B3AQUA INSTM [View project](#)



LMI COSYS-Med [View project](#)

## Article original

### Pharmacognosie

# Activités biologiques des métabolites excrétés par la cyanobactérie filamenteuse *Arthrospira platensis*

L. Trabelsi<sup>1</sup>, H. Ben Ouada<sup>1</sup>, H. Bassa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de biodiversité et biotechnologie marine, INSTM centre de Monastir, BP 59 route de Khniss, 5000 Monastir, Tunisie

<sup>2</sup>Laboratoire de recherches sur les substances biologiquement compatibles, faculté de médecine dentaire, 5000 Monastir, Tunisie

Correspondance : ltrabelsi2004@yahoo.fr

**Résumé :** Les cyanobactéries en général, synthétisent et se-crètent dans leur milieu de culture des substances diverses à activité algicide, antibiotique, cytotoxique et immunosuppressive afin de prédominer dans leurs écosystèmes. Chez l'espèce *Arthrospira platensis*, ces substances et surtout leurs effets sont très peu étudiés. Notre travail vise la mise en évidence et la quantification de trois activités biologiques de métabolites extracellulaires de la cyanobactérie *Arthrospira platensis*, originaire du lac Tchad, à savoir l'activité cytotoxique sur les cellules Caco et Véro, l'activité antibactérienne sur les bactéries Gram positives *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus* et sur les bactéries Gram négatives *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Salmonella paratyphi* et l'activité stimulatrice de la division cellulaire sur la microalgue *Cosmarium lundellii*.

**Mots clés :** *Arthrospira platensis* – Substances extracellulaires – Cytotoxicité – Activité antibactérienne – Stimulation de la division cellulaire

### Biological activities of *Arthrospira platensis* (filamentous cyanobacteria) extracellular metabolites

**Abstract:** In order to prevail in their ecosystem, the cyanobacteria synthesize and secrete various substances which may have algicide, antibiotic, cytotoxic and immunosuppressive activities. For *Arthrospira platensis*, these substances and their effects have not been subject to full study. Our work aims to put in evidence and to quantify the existence of such activities in the extracellular substances of *Arthrospira platensis* (isolated from Chad Lake). We have tested the promoting effect of these substances on the cellular division of one microalgae *Cosmarium lundellii* and the antibacterial effect on the Gram positive bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus* and the Gram negative bacteria: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Salmonella paratyphi*.

**Keywords:** *Arthrospira platensis* – Extracellular substances – Cytotoxicity – Antibacterial activity – Promoting cell division

### Introduction

Les cyanobactéries sont des micro-organismes dont les diverses espèces colonisent, depuis 3,5 milliards d'années, le monde vivant à l'échelle du globe. Ces espèces sont connues pour leur plasticité écologique exceptionnelle [4,10,21] leur permettant de s'adapter et de peupler pratiquement tous les environnements.

Les cyanobactéries produisent une grande variété de métabolites qui peuvent être des peptides de faibles poids moléculaires, des alcaloïdes, des terpénoïdes, des polysaccharides et des lipopolysaccharides [16–20,37,38,40–42]. La plupart de ces métabolites sont accumulés dans la biomasse cyanobactérienne, mais cela n'empêche pas que certaines cyanobactéries (*Nostoc commune*, *Tolypothrix byssoidea*, *Nodularia harveyana*, *Anabaena cylindrica*, *Arthrospira platensis*, etc.) excrètent ces métabolites dans leur environnement, d'où leurs nominations par certains auteurs d'exométabolites ou de métabolites extracellulaires [18–21,36–38].

Les métabolites extracellulaires sont dans la plupart des cas des substances bioactives dont les activités biologiques sont diverses et multiples : antifongique, antivirale, antibactérienne, antialgale, stimulatrice de la croissance cellulaire [11,18–20,23,28,36–38] d'où leur intérêt potentiel dans l'industrie pharmaceutique, agronomique ainsi que dans d'autres applications [13].

Mis à part ces substances, les cyanobactéries produisent des cyanotoxines posant de sérieux risques pour la santé des animaux domestiques et sauvages ainsi que pour la santé humaine. La production des cyanotoxines est surtout observée pendant les périodes de « bloom » où il y a lyse cellulaire et libération de ces métabolites dans l'environnement [25]. Parmi ces cyanotoxines on cite selon leur mode d'action les hépatotoxines (microcystines et nodularines) les neurotoxines (anatoxines et saxitoxines) et les dermatotoxines [5,22,30,35].

*Arthrospira platensis*, appelée communément spiruline, est une cyanobactérie qui est exploitée, aussi bien en lacs naturels qu'en bassins industriels, dans diverses régions

du monde. Si les propriétés diététiques et thérapeutiques de la spiruline sont bien connues et très étudiées [1], les propriétés des substances excrétées par cette espèce ne sont pas identifiées de façon certaine à l'heure actuelle [27]. Toutefois, diverses indications ont été publiées dans la littérature scientifique concernant de tels effets. Les propriétés particulières de ces substances sont connues empiriquement par certaines populations, notamment par les populations tchadiennes. Ces propriétés sont décrites dans les travaux de Clément et al. [7]. Ces derniers auteurs citent sans le définir ou le caractériser « un principe actif » présent dans le milieu de culture accélérant le processus de cicatrisation et favorable au traitement d'affections de la peau (œdèmes, eczémas).

Durant cette dernière décennie, des travaux plus récents mettent en évidence chez ces substances une activité antivirale [14,15,29] ou stimulatrice de la croissance des bactéries lactiques [27]. Ces travaux sont cependant, d'une part, réalisés sur différentes souches d'*Arthrospira platensis* et d'autre part ne donnent que peu d'indications sur les seuils d'activité, les conditions de culture et les périodes de prélèvements des métabolites extracellulaires. Ces paramètres peuvent affecter qualitativement et quantitativement les activités biologiques de ces métabolites.

Notre travail a pour objectif de mettre en évidence certains effets des métabolites excrétés par la cyanobactérie *Arthrospira platensis* souche Compère moyennant des cultures stériles en batch réalisée dans des conditions prédéfinies. Trois types d'effets sont considérés : pouvoir cytotoxique, activité antibactérienne et activité stimulatrice de la division cellulaire. Nous quantifions ces effets et déterminons les seuils d'action et de saturation de ces actifs. Nous étudions également la cinétique de leur sécrétion et la variation des activités en fonction de l'âge de culture.

## Matériels et méthode

### Culture de la spiruline

La cyanobactérie *Arthrospira platensis* (Compère n°1968/3786) utilisée dans ce travail est originaire du lac Tchad, purifiée et acclimatée pendant plusieurs années au laboratoire de photobiologie de l'université de Liège. Le milieu préconisé pour la culture est le milieu « Zarruk » [43] de composition (g/l) :  $\text{NaNO}_3$ , 2,50 ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,50 ;  $\text{NaHCO}_3$ , 10,00 ;  $\text{NaCl}$ , 1,00 ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,2 ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,02 ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 et de pH initial 9,02. Les cultures expérimentales stériles sont maintenues dans une salle climatisée, à 30 °C et sont soumises à un éclairage en continu (24/24), d'une intensité de 50  $\mu\text{moles}/\text{m}^2$  par seconde, assurée par des tubes fluorescents (Mazda Fluor TF18 W/L). Une homogénéisation en continu des cultures est assurée par de l'air comprimé stérile enrichi en  $\text{CO}_2$  (1 %). Le pH du milieu de culture n'est pas réajusté à la valeur initiale, mais il évolue progressivement et après 25 jours de culture il est de 10 à 10,2.

### Détermination de la biomasse

La concentration en biomasse sèche d'*Arthrospira platensis* est évaluée en mesurant la densité optique pour chaque échantillon à  $\lambda = 670 \text{ nm}$  par un spectrophotomètre (Beckman Coulter DU 640B, États-Unis). La valeur de la biomasse sèche est déterminée en rapportant la valeur de l'absorbance sur la courbe d'étalonnage biomasse sèche en fonction d'absorbance de 670 nm préétablie selon la méthode de Costa et al. [8].

### Obtention des métabolites extracellulaires

La biomasse et le milieu de culture sont séparés par une filtration sur une toile en nylon de 25  $\mu\text{moles}$  de porosité suivie d'une centrifugation à 7 000 t/min durant 20 minutes. Le milieu de culture obtenu est filtré à travers une colonne en verre remplie de résine XAD-1182 Amberlite™ [37] (VWR international, prolabo, France). Après adsorption des composés organiques hydrosoluble du milieu de culture sur la résine Amberlite™ une élution avec du méthanol p.a (Fluka Chemie, Switzerland) a été réalisée. La solution méthanol-métabolites extracellulaires obtenue est rotaévaporée jusqu'à séchage complet par un système de rotaévaporation (Laborota 4000WB Heidolph, Germany). Le résidu est récupéré dans l'eau déminéralisée puis lyophilisée et conservée à 4 °C. La contamination des métabolites extracellulaires par des produits de lyse est déterminée par le suivi des pics d'absorption des pigments photosynthétiques ( $\lambda = 620 \text{ nm}$  et  $\lambda = 680 \text{ nm}$ ) dans le spectre d'absorption UV-Visible de la solution méthanol-métabolites extracellulaires. L'absence d'absorbances pour ces pigments indique l'absence d'une lyse cellulaire [33]. Nous signalons que la lyse cellulaire au-delà du j22 devient assez conséquente. Les métabolites intracellulaires s'absorbent massivement aux métabolites extracellulaires présents dans la culture, rendant l'interprétation des résultats assez difficile. Les résultats relatifs à cette période ne sont par conséquent pas pris en compte dans le présent travail.

### Test de cytotoxicité : test MTT

L'étude de la cytotoxicité des métabolites extracellulaires a été effectuée sur des cellules Caco-2 du côlon humain et des cellules Véro de rein de singe.

(*Cercopithecus aethiops*) (Biovalori, France) en utilisant le test MTT : sel de tétrazolium (bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium).

Le milieu de culture employé pour la culture des cellules Véro est le milieu synthétique RPMI 1640 (Sigma, France), pour la culture des cellules Caco-2 milieu de culture utilisé est le milieu synthétique Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma, France). Ces milieux de base sont toujours supplémentés avec 1 % de L-glutamine (2 mM concentration finale) [Sigma, France], sérum de veau fœtal (SVF) [Sigma, France] et 1 % mélange de pénicilline (100 U/ml) et de streptomycine (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

[Sigma, France]. Le test MTT de la viabilité cellulaire a été réalisé selon Mosman [24]. Le principe du test MTT est basé sur la capacité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes de réduire le MTT de couleur jaune en cristaux bleus de formazan. L'intensité de la couleur bleue du formazan est proportionnelle au nombre des cellules vivantes. Ainsi, l'effet cytotoxique peut être mesuré grâce à un dosage spectrophotométrique. Les cellules Véro et Caco-2 sont cultivées en monocouches dans des plaques de 96 puits (polylabo, France) et dans du milieu complet.

Les cellules sont ensemencées à raison de  $2 \times 10^4$  cellules/puits, elles sont ensuite traitées par des concentrations croissantes en métabolites extracellulaires (0, 100, 200, 300, 400 µg/ml) pendant 24 heures. 150 µl de la solution MTT (5 mg/ml) dissoute dans le milieu de culture sont additionnés dans chaque puits puis la plaque est incubée à 37°C pendant trois heures. Le surnageant est éliminé et 200 µl de la solution de HCl dans l'isopropanol (0,04N) sont additionnées à chaque puits avant la lecture de la densité optique à 540 nm avec le lecteur Elisa (Stat Fax 3200 Awareness Technology).

#### Activité stimulatrice de la multiplication cellulaire

*Cosmarium lundellii* souche Lefèvre répertoriée chez CCAP (culture collection of alga and protozoa) sous le code CCAP612/15. Cette microalgue a été utilisée dans certains travaux [23] pour prouver l'activité stimulatrice de métabolites extracellulaires de certaines cyanophycées sur la multiplication cellulaire. Les cellules de cette microalgue sont de grande taille, et pendant la division les deux cellules filles issues de la cellule mère restent en contact pendant plusieurs heures par les hémisomates néoformés (Fig. 1) ce qui permet de les identifier sous un microscope optique à faible grossissement.

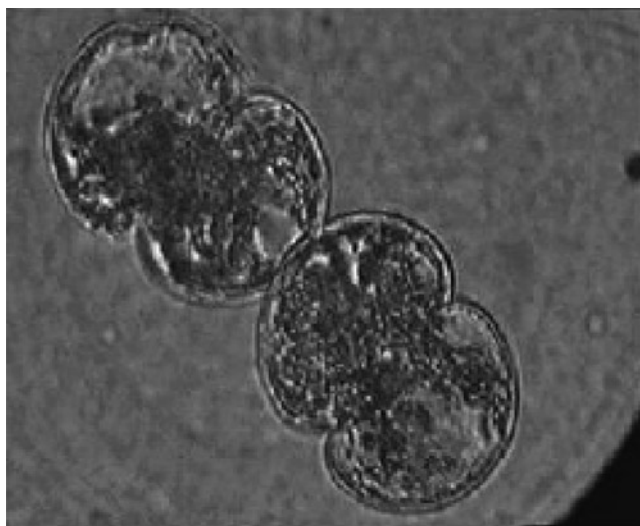


Fig. 1. Deux hémisomates néoformés de la microalgue *Cosmarium lundellii*. ( $\times 100$ )

*Cosmarium lundellii* est un milieu recommandé par CCAP et de composition en mg/l :  $\text{NaNO}_3$ , 0,25 ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,075 ;  $\text{NaCl}$ , 0,025 ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,075 ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,175 ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,025 ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,28 ; EDTA, 1,25 ;  $\text{KOH}$ , 0,77 ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,12 ;  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0,02.

*Cosmarium lundellii* sont ensemencées dans des boîtes de pétri en verre de 6 cm de diamètre et sont traitées avec des concentrations croissantes de métabolites extracellulaires. Les cultures sont incubées dans les mêmes conditions de température et d'éclairage que la culture témoin. L'activité stimulatrice de la multiplication cellulaire est déterminée par le comptage des cellules en division après 12 heures dans une population de 30 individus sous un microscope Hund V300 et à un grossissement ( $G \times 100$ ). Le pourcentage du nombre des cellules en division par rapport au nombre total des cellules quantifie l'effet des métabolites extracellulaires sur la multiplication cellulaire.

#### Activité antibactérienne

Les bactéries Gram positives *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Micrococcus luteus* et des bactéries Gram négatives *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Salmonella paratyphi* sont utilisées dans ce test.

L'activité antibactérienne est déterminée par l'utilisation de la méthode de diffusion sur milieu solide. Des boîtes de pétri contenant chacune 20 ml de gélose nutritive sont inondées séparément par 2 à 3 ml d'une suspension d'inocula bactérien de  $10^5$  à  $10^6$  CFU (unité formant colonie)/ml. Des disques stériles de papier wattman de 8 mm de diamètre sont déposés sur la surface de la gélose. Chacun des disques contient 60 µg de métabolite extracellulaire. Des disques imprégnés d'eau distillée stérile et des disques d'antibiotiques chargés de 30 µg de kanamycine sont utilisés en tant que témoins négatifs et positifs. Les boîtes sont incubées à l'étuve à 37 °C entre 18 et 24 heures. L'activité antibactérienne des métabolites extracellulaires testés est déterminée par la mesure des zones d'inhibition obtenues au contact et autour des disques.

Tous les tests sont réalisés en triplicata.

## Résultats

#### *Arthrospira platensis*.

Les métabolites extracellulaires de la cyanobactérie *Arthrospira platensis*, dont les activités biologiques sont testées, sont obtenus à partir d'une culture en fin de la phase exponentielle de croissance, à pH = 10 et de biomasse sèche de 0,6 g/l.

#### Cytotoxicité : test MTT

L'effet in vitro des métabolites extracellulaires de la cyanobactérie *Arthrospira platensis*, recherché sur des cellules en culture (Caco-2 et Véro) montre l'absence de toxicité de ces métabolites. En effet, après 24 heures d'incubation la viabilité

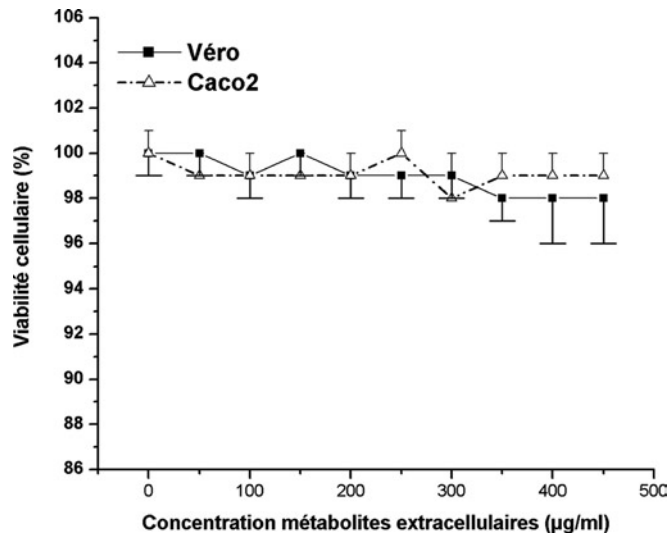


Fig. 2. Pourcentage de la viabilité cellulaire (cellules Caco-2 et des cellules Véro) après 24 heures d'incubation en présence de différentes concentrations de métabolites extracellulaires déterminée par le test MTT

des cellules Véro et des cellules Caco-2 n'est pas réduite, même lorsqu'elles sont exposées à une concentration élevée atteignant 400 µg/ml de métabolites extracellulaires (Fig. 2).

#### Activité stimulatrice de la multiplication cellulaire

La variation du pourcentage de cellules de *Cosmarium lundellii* en division obtenue après 12 heures de culture sous différentes concentrations de métabolites extracellulaires de la cyanobactérie *Arthrospira platensis* est représentée dans la Figure 3.

Le premier point de la courbe représente le pourcentage de cellules de *Cosmarium lundellii* en division dans la culture non traitée et considérée comme témoin.

L'analyse des résultats montre que la multiplication cellulaire de *Cosmarium lundellii* est positivement stimulée par l'ajout de métabolites extracellulaires d'*Arthrospira platensis* et que l'intensité de cet effet varie d'une manière dose-dépendante.

L'ajout de 15, de 25 et de 40 µg/ml de métabolites extracellulaires n'entraîne aucune variation de la multiplication cellulaire de *Cosmarium lundellii* en comparaison avec le

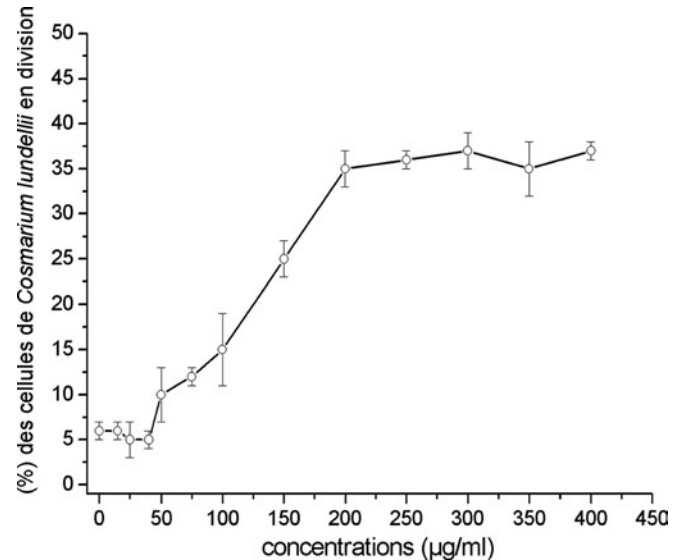


Fig. 3. Pourcentage des cellules de *Cosmarium lundellii* en division après 12 heures d'incubation à différentes concentrations de métabolites extracellulaires

témoin. Le seuil minimal de l'effet stimulateur correspond à une concentration de 50 µg/ml de métabolites extracellulaires pour une augmentation de 5 % du nombre de cellules de *Cosmarium lundellii* en division par rapport au témoin. Cet effet augmente linéairement dans l'intervalle de concentrations 50 à 200 µg/ml de métabolites extracellulaires. Le seuil de saturation est observé à 200 µg/ml pour un maximum de 35 % de cellules de *Cosmarium* en division. L'ajout jusqu'à 400 µg/ml de métabolites extracellulaires n'entraîne pas de variation significative de l'effet.

#### Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne a été étudiée sur six souches bactériennes *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Salmonella paratyphi B*.

Les métabolites extracellulaires de la cyanobactérie *Arthrospira platensis* sont actifs contre les bactéries *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Micrococcus luteus*

Tableau 1. Variation du diamètre de la zone d'inhibition en fonction de différentes concentrations de métabolites extracellulaires

Échantillons testés	Diamètres (mm) de la zone d'inhibition					
	ME (30 µg/disc)	ME (45 µg/disc)	ME (60 µg/disc)	ME (95 µg/disc)	ME (120 µg/disc)	Kanamycine (30 µg/disc)
<i>Staphylococcus aureus</i>	11 ± 1	13 ± 2	17 ± 1,7	17 ± 2	17 ± 2	30 ± 0,7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10 ± 1,2	15 ± 1,5	16 ± 1,3	17 ± 1,8	17 ± 1	31 ± 0,5
<i>Micrococcus luteus</i>	-	10 ± 1,9	13 ± 1,4	13 ± 2	13 ± 1,5	25 ± 1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	24 ± 1,4
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	36 ± 1,1
<i>Salmonella paratyphi B</i> .	-	-	-	-	-	22 ± 0,9

(-) indique que le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 8 mm

mais ils sont, en revanche, inactifs contre les bactéries *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Salmonella paratyphi* B. (Tableau 1). Pour une charge de 30 µg/disque de métabolites extracellulaires, le diamètre de la zone d'inhibition est de 10 à 11 mm pour les deux bactéries de genre *Staphylococcus*. Pour la bactérie *Micrococcus luteus* l'effet antibactérien n'est observé qu'à partir d'une charge de 45 µg/disque.

La moyenne des zones d'inhibition produites par les métabolites extracellulaires est au maximum de 17 mm à une charge de 60 µg/disque.

Par comparaison à la kanamycine (30 mm pour une charge de 30 µg/disque), l'activité antibactérienne des métabolites extracellulaires sécrétés par *Arthrospira platensis* serait modérée.

## Cinétique de la sécrétion et de l'activité biologique des métabolites extracellulaires en fonction de l'âge de la culture d'*Arthrospira platensis*

### Cinétique de la sécrétion des métabolites extracellulaires

L'évolution quantitative des métabolites extracellulaires (Fig. 4) en fonction de l'âge de la culture d'*Arthrospira platensis* montre l'existence de trois phases distinctes : une phase s'étendant de j1 à j8 avec une production non significative de métabolites, une phase de production massive de métabolites s'étendant de j8 à j12 avec une augmentation linéaire atteignant une production journalière de 15 mg/ml par jour et une phase de stabilisation s'étendant à j22 et autour d'une valeur asymptotique de 80 mg/ml.

Par ailleurs, en comparant les phases de production des métabolites extracellulaires avec ceux de la croissance, nous remarquons une parfaite dissociation entre les deux courbes. En effet, la phase exponentielle de croissance à

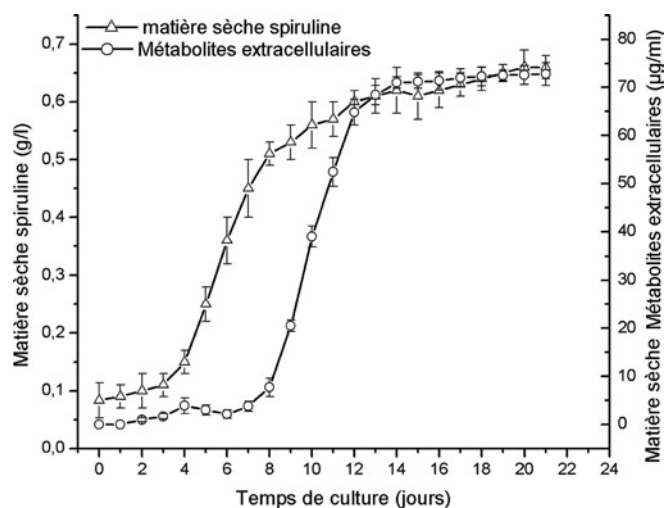


Fig. 4. Variations de la croissance en biomasse sèche d'*Arthrospira platensis* et de la concentration en matière sèche des métabolites extracellulaires en fonction du temps

lieu entre j2 et j8, période pendant laquelle aucune production significative de métabolites extracellulaires n'est enregistrée. La production massive de ces derniers a lieu, en revanche, au cours de la phase stationnaire de croissance entre j12 et j21.

### Variabilité de l'activité stimulatrice et de l'activité antibactérienne

La variation de l'activité biologique stimulatrice de la division cellulaire et antibactérienne en fonction de l'âge de la culture d'*Arthrospira platensis* est établie moyennant des prélèvements effectués entre j4 et j21 de culture à quatre jours d'intervalle.

Pour chaque test nous utilisons la même quantité de métabolites extracellulaires, soit 60 µg/disque pour l'activité antibactérienne et 200 µg/ml pour l'activité stimulatrice de la division cellulaire. Ces deux valeurs correspondent aux concentrations générant les maximums d'activités (cf. paragraphe activités biologiques des métabolites extracellulaires chez *Arthrospira platensis*).

Les résultats relatifs aux tests d'activité, établis dans ces conditions, sont représentés en fonction de l'âge de la culture dans la Figure 5 pour l'activité stimulatrice et dans le Tableau 2 pour l'activité antibactérienne. Dans les deux cas, nous remarquons une variation notable de l'activité en fonction de l'âge de la culture d'*Arthrospira platensis*.

Pour l'activité stimulatrice de la division cellulaire, le pourcentage des cellules en division de *Cosmarium lundellii* n'est que de 5 % en présence des métabolites prélevés à j4 de culture d'*Arthrospira platensis*. Ce pouvoir stimulateur augmente linéairement pour se stabiliser autour de 40 % en présence de métabolites obtenus à partir de j16 à j21.

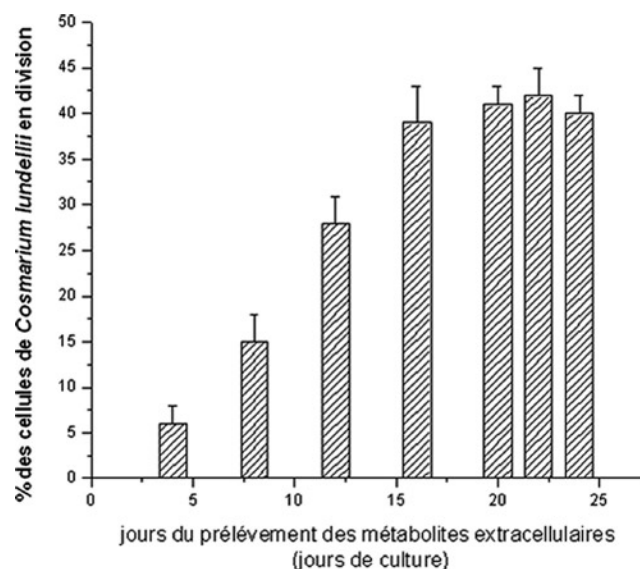


Fig. 5. Variation de l'effet stimulateur des métabolites extracellulaires sur la division cellulaire de *Cosmarium lundellii* en fonction du jour de prélèvement de ces métabolites (en jours de culture)

**Tableau 2.** Variation du diamètre de la zone d'inhibition en fonction de l'âge de la culture après l'addition de 60 µg/disc de métabolites extracellulaires

	Diamètres (mm) de la zone d'inhibition					Kanamycine (30 µg/disc)
	j4	j8	j12	j16	j20	
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	–	12 ± 1	14 ± 2	16 ± 1	30 ± 0,7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	–	–	11 ± 2,1	16 ± 1,3	17 ± 1,2	31 ± 0,5
<i>Micrococcus luteus</i>	–	–	–	13 ± 1	13 ± 1,5	25 ± 1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	–	–	–	–	24 ± 1,4
<i>Escherichia coli</i>	–	–	–	–	–	36 ± 1,1
<i>Salmonella paratyphi B.</i>	–	–	–	–	–	22 ± 0,9

(–) indique que le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 8 mm

De même, aucune activité antibactérienne n'est enregistrée en présence de métabolites extracellulaires prélevés avant le 12<sup>e</sup> jour de culture pour le cas des deux bactéries du genre *Staphylococcus* et avant le 16<sup>e</sup> jour pour le cas de *Micrococcus luteus*. Pour ces trois bactéries, l'intensité de l'activité reste stable à partir de j16. Pour le cas des trois bactéries Gram négatives l'activité est toujours absente quel que soit l'âge de la culture.

## Discussion

De nombreux travaux se sont intéressés, durant cette dernière décennie, aux substances actives sécrétées par les cyanobactéries comme une source potentielle de nouveaux produits d'intérêts pharmaceutique et médical. Les travaux portant sur les activités des métabolites extracellulaires d'*Arthrospira platensis* sont cependant relativement rares. Pourtant, les métabolites sécrétés par cette espèce présentent des avantages supplémentaires du fait que cette espèce soit largement exploitée à l'échelle industrielle et du fait qu'elle ne produit pas de substances toxiques [12,32] comme le confirment les résultats du présent travail.

Ce travail identifie chez ces métabolites deux types d'activité, l'une stimulatrice de la multiplication cellulaire et l'autre antibactérienne.

Il existe peu de travaux qui mettent en évidence l'effet stimulateur des métabolites extracellulaires chez *Arthrospira platensis*. Les effets stimulateurs de tels types de métabolites sont, cependant, largement démontrés chez d'autres cyanobactéries [26,31,34,44]. Les auteurs attribuent ces effets à la capacité de grand nombre de cyanobactéries de produire des phytohormones semblables à celles des plantes, dont certaines sont identifiées comme étant de type auxines ou cytokinines, d'où leurs nominations d'*auxin-like* ou de *cytokin-like*. L'existence de phytohormones de type auxines dans la composition des métabolites extracellulaires de la cyanobactérie *Arthrospira platensis* a été rapportée par Bronesk et al. [2] qui ont étudié l'effet stimulateur de ces métabolites sur la germination des cellules végétales. Par ailleurs, Rogers et Burns [31] étudiant

l'effet stimulateur des métabolites extracellulaires de la cyanobactérie *Nostoc muscorum* sur les cellules fongiques montrent que le spectre d'absorption de ces métabolites possède un pic d'absorption à 306 nm. L'analyse des spectres d'absorbance UV-Visible des métabolites extracellulaires d'*Arthrospira platensis* utilisée dans ce présent travail montre également un pic d'absorption à la même longueur d'onde. Rogers et Burns [31] attribuent cette absorbance à la présence d'une auxine : l'acide indolique.

L'activité antibactérienne des métabolites extracellulaires a été identifiée chez d'autres cyanobactéries (*Nostoc commune*). Ce travail montre que cette activité est également présente chez *Arthrospira platensis*. Elle serait cependant modérée en comparaison aux antibiotiques usuels, tels que la kanamycine. Toutefois, il faut rappeler que ces métabolites sont efficaces dans des traitements locaux d'infections épidermiques (œdème et eczéma), dans les utilisations traditionnelles par les peuplades du Ghanem au lac Tchad [3].

Il est important de constater, à ce niveau, l'action sélective de ces métabolites en fonction de la nature membranaire de la bactérie cible. En effet, sur les six souches étudiées l'activité antibactérienne n'est observée que sur les bactéries Gram positives alors qu'elle est totalement absente chez les bactéries *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Salmonella paratyphi B.* qui sont Gram négatives. Ces observations sont en accord avec les travaux de Chrost [6] qui décrivent une réduction significative des bactéries Gram positives dans des lacs en Allemagne durant les périodes de blooms cyanobactériens. La majorité des métabolites extracellulaires contiennent des glycopeptides [9,39], de plus il est connu que les antibiotiques de nature glycopeptidique sont préférentiellement actifs contre les bactéries Gram positives plutôt que contre les bactéries Gram négatives en raison de la différence dans la perméabilité membranaire des deux types de bactéries [39]. En effet, les bactéries du premier type sont plus perméables au glycopeptides que les bactéries Gram négatives.

On en conclut donc que les mêmes métabolites extracellulaires issus de la même culture peuvent générer des activités différentes et même antagonistes selon l'espèce

cible : prolifératrice pour les cellules de la microalgue *Cosmarium lundelli*, inhibitrice pour les bactéries Gram positives *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Micrococcus luteus* et inactive pour les bactéries Gram négatives *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Salmonella paratyphi* B.

Les résultats montrent également que la présence ou l'absence des activités, stimulatrice et antibactérienne, aussi bien que leur intensité, sont tributaires de l'âge de la culture et par conséquent de l'état physiologique de l'espèce productrice. En effet, les maxima de synthèse des métabolites extracellulaires sont associés à la phase stationnaire de croissance. De plus, les activités maximales, qu'elles soient stimulatrices ou antibactériennes, sont toujours inexistantes ou faibles pendant la phase exponentielle de croissance d'*Arthrospira platensis* et ne s'affirment qu'au sein de la phase stationnaire. Cela confirme le fait que ces métabolites sont des métabolites secondaires qui sont synthétisés pour jouer un rôle de défense et n'auraient aucune implication directe dans la reproduction et dans la croissance de l'espèce. En effet, il est bien connu que la phase stationnaire correspond à un état de stress occasionné par l'épuisement des nutriments dans le milieu de culture. Les conditions de stress inhibent la croissance et le catabolisme du carbone est surtout réorienté vers la synthèse de métabolites secondaires [39].

Par ailleurs, compte tenu du fait que les tests d'activités soient réalisés en utilisant la même quantité de métabolites extracellulaires, la variation de l'activité avec l'âge de culture serait indicatrice d'une modification de la composition des métabolites extracellulaires et plus précisément d'une intensification de la synthèse des principes actifs responsables de l'activité antibactérienne contre les trois bactéries Gram positives et de l'activité stimulatrice sur *Cosmarium lundellii* aux dépens d'autres métabolites. De telles variations sont d'ailleurs signalées par d'autres auteurs [35].

Il n'est pas à exclure de ce fait que de telles variations soient également tributaires des conditions dans laquelle l'espèce est cultivée. Nous rappelons que notre expérimentation est réalisée sur des cultures axéniques dans des conditions de température et de lumière constantes et dans un milieu de culture initialement prédéfini. Les travaux au sein de notre laboratoire (en préparation) montrent que la variation d'un ou de plusieurs paramètres de culture affecte considérablement l'activité biologique des métabolites extracellulaires en relation avec des variations dans leur composition biochimique.

On en déduit la capacité d'une même espèce de synthétiser une panoplie considérable d'actifs biologiques en fonction des conditions environnementales et des phases des croissances. La bibliographie relative à l'étude des métabolites extracellulaires confirme d'ailleurs cette grande diversité aussi bien dans l'activité que dans la composition. Une telle diversité est synonyme d'une grande capacité de l'espèce à modéliser son métabolisme pour survivre dans des conditions extrêmes. En effet, il est peu probable qu'une

même espèce aurait besoin de tous ces métabolites en même temps. La synthèse de ces métabolites obéirait vraisemblablement à une régulation permettant à l'espèce de sélectionner certains actifs et non d'autres.

Il n'est pas à exclure d'ailleurs, par analogie à ce qui est connu chez d'autres cyanobactéries, que ces métabolites extracellulaires soient autant des messagers chimiques impliqués dans le processus de reconnaissance inter- et intraspécifique (allélochimie) et qui jouerait un rôle important dans la compétition entre espèces.

## Bibliographie

1. Belay A (2002) the Potential application of Spirulina (Arthrospira) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. J Am Nutra Assoc 5: 27-48
2. Bronesk J, Frank H, Pulz O, Sandau E (2003) Microalgal applications in agriculture and horticulture. Biotechnology of microalgae. 5th European Workshop. Postdam Allemagne
3. Brouers M (2004) Traditional use of Spirulina (*Arthrospira platensis*) in Chad. International Symposium: CSSD "Cyanobacteria for health, Science and Development", Embiez Island France
4. Büdel B (1999) Ecology and diversity of rock-inhabiting cyanobacteria in tropical regions. Eur J Phycol 34: 361-70
5. Carmichael WW, Mahmood NA, Hyde EG (1990) Natural toxins from cyanobacteria (blue-green) algae. In: Hall S and Strichartz DCG (eds) Marine toxins pharmacology: origin, structure and molecular. American Chemical Society, Washington, pp 87-106
6. Chrost RJ (1975) Inhibitors produced by algae as an ecological factor affecting bacteria in water ecosystems. Acta Microbiol Pol Ser B 7: 125-33
7. Clément G, Rebeller M, Zarrouk C (1967) Compositions médicamenteuses, en particulier pour le traitement des plaies. Brevet spécial de médicament, 2 pages
8. Costa JAV, Colla LM, Duarte PF, et al. (2002) Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. World J Microbiol Biotechnol 18: 603-07
9. De Philippis R, Vincenzini M (1998) Exocellular polysaccharide from cyanobacteria and their possible applications. FEMS Microbiol Rev 22: 151-75
10. Douglas S (1998) Effects of alkaline earth metal ions on the growth of *Calothrix* strain RC3, a natural isolate from Rock Greek, British Columbia. Can J Microbiol 44: 128-39
11. Falch B (1996) What remains of cyanobacteria? Pharm Unserer Zeit 25: 311-9
12. Fox DR (1999) Spirulina. In: Fox DR (ed) Spirulina-Production and Potential. Edisud, Aix-En-Provence, France, pp 36-40
13. Girardin-Andreani C (2005) Spiruline: système sanguin, système immunitaire et cancer. Phytother 3: 158-61
14. Gorobets OB, Blinkova LP, Batur AP (2001) Stimulating and inhibiting effect of *Spirulina platensis* on microorganisms. ZH Microbiol Epidemiol Immunobiol 6: 20-4
15. Gorobets OB, Blinkova LP, Batur AP (2002) Action of *Spirulina platensis* on bacterial viruses. ZH Microbiol Epidemiol Immunobiol 6: 18-21
16. Healy FP (1973) Extracellular proteins. In: Pakers L and Glazer AN (eds) Methods in enzymology 167. Academic Press, San-Diego, California, p 603
17. Isamu T, Daisuke H, Munehiko A, et al. (1996) Restriction barrier composed of an extracellular nuclease and restriction endonuclease in the unicellular cyanobacterium *Microcystis* sp. FEMS Microbiol Lett 145: 107-11
18. Jaki B, Orjala J, Sticher O (1999) A novel extracellular diterpenoid with antibacterial activity from the cyanobacterium *Nostoc commune*. J Nat Prod 62: 502-3



19. Jaki B, Orjala J, Heilmann J, et al. (2000) A novel extracellular diterpenoid with biological activity from the cyanobacterium *Nostoc commune*. *J Nat Prod* 62: 339–43
20. Jaki B, Zerbe O, Heilmann J, Sticher O (2001) Two novel cyclic peptides with antifungal activity from the cyanobacterium *Tolyptrix byssoidea* (EAWAG 195). *J Nat Prod* 64: 1554–8
21. Lacap DC, Smith GJD, Warren-Rhodes K, Pointing SB (2005) Community structure of free-floating filamentous cyanobacterial mats from the Wonder Lake geothermal springs in the Philippines. *Can J Microbiol* 51: 583–9
22. Lakshmana RPV, Gupta N, Bhaskar ASB, Jayaraj R (2002) Toxins and bioactive compounds from cyanobacteria and their implications on human health. *J Environ Biol* 23: 215–24
23. Lefèvre M, Laporte G (1964) Nouveau produit thérapeutique à base d'algues cyanophycées. Brevet spécial de médicament n°2674MA61K
24. Mosman T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immun Meth* 65: 55–63
25. Onderka M (2007) Correlations between several environmental factors affecting the bloom events of cyanobacteria in Liptovska Mara reservoir (Slovakia)-A simple regression model. *Ecol Modell* 209: 412–6
26. Ördög V, Pulz O (1996) Diurnal changes of cytokinin-like activity in a strain of *Arthronema africanum* (cyanobacteria), determined by biomass assays. *Arch Hydrobiol Suppl Algol Stud* 82: 57–67
27. Parada JL, De Caire GZ, De Mulé MCZ, De Cano MS (1998) Lactic acid bacteria growth promoters from *Spirulina platensis*. *Int J Food Microbiol* 45: 225–8
28. Patterson GML, Larsen LK, Moore RE (1994) Bioactive natural products from blue-green algae. *J Appl Phycol* 6: 151–7
29. Rechter S, König T, Auerochs S, et al. (2006) Antiviral activity of *Arthrospira*-derived spirulan-like substances. *Antiviral Res* 72: 197–206
30. Rinehart KL, Namikoshi M, Choi BW (1994) Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *J Appl Phycol* 6: 159–76
31. Rogers SL, Burns RG (1994) Changes in aggregate stability, nutrient status, indigenous microbial populations, and seedling emergence, following inoculation of soil with *Nostoc muscorum*. *Biol Fertil Soils* 18: 209–15
32. Scott WE (1991) Occurrence and significance of toxic cyanobacteria in Southern Africa. *Water Sci Technol* 23: 175–80
33. Sheng GP, Yu HQ, Yu Z (2005) Extraction of extracellular polymeric substances from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas acidophila*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 125–30
34. Strik WA, Ördög V, Staden J (1999) Identification of cytokinin isopentenyladenine in a strain of *Arthronema africanum* (cyanobacteria). *J Phycol* 35: 89–92
35. Tillett D, Dittmann E, Erhard M, et al. (2000) Structural organization of microcystin biosynthesis. In: *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem Biol* 7: 753–64
36. Volk RB (2005) Screening of microalgal culture media for the presence of algicidal compounds and isolation and identification of two bioactive metabolites, excreted by the cyanobacteria *Nostoc insulare* and *Nodularia harveyana*, respectively. *J Appl Phycol* 17: 339–47
37. Volk RB, Furkert FH (2006) Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. *Microbiol Res* 161: 180–6
38. Volk RB (2008) Screening of microalgae for species excreting norharmane, a manifold biologically active indole alkaloid. *Microbiol Res* 167: 307–17
39. Von Döhren H, Kleinkauf H (2001) Peptide antibiotics In: Dörhen Von H and Kleinkauf H (ed). *Products of secondary metabolism*. Wiley-vch, Germany, pp 305–9
40. Wolk CP (1980) Nitrogen fixation. Newton WE and Grme-Johnson WH (eds). University Park Press, Baltimore, p 279
41. Wolk CP, Kraus J (1982) Extracellular proteins. In: Pakers L and Glazer AN (eds) *Methods in Enzymology* 167. Academic Press, San-Diego, California, p 603
42. Yeshaya O, Moshe SB (1991) Cyanobacterial flocculants. In: Pakers L and Glazer AN (eds) *Methods in Enzymology* 167. Academic Press, San-Diego, California, pp. 616–22
43. Zarrouk C (1966) Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* Geitler. Thèse de doctorat, université de Paris
44. Zulpa G, Zaccaro MC, Boccazzi F, et al. (2003) Bioactivity of intra- and extracellular substances from cyanobacteria and lactic acid bacteria on “wood blue stain”. *Fungi Biological Control* 27: 345–48