

DIFFERENTES TECHNIQUES UTILISEES EN MICROBIOLOGIE DANS LE BUT DE REALISER LE BACKUP D'UNE COLLECTION DE SOUCHES BACTERIENNES.

EPHREM-BRUGIERE, Chloé

**Stage effectué du 7 avril au 26 mai 2015 à l'Institut de Recherche et Développement
Pierre Fabre Langlade
3 avenue Hubert Curien 31035 Toulouse
Sous la direction de Mme CARLETTI Isabelle**



Remerciements.

J'aimerais tout d'abord remercier le groupe Pierre Fabre et le CNRS de m'avoir permis de réaliser un stage au sein des laboratoires du site Langlade.

François SAUTEL pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire de Chimie des Substances Naturelles.

Je souhaite également remercier Isabelle CARLETTI mon maître de Stage pour son encadrement.

Stéphanie NOGUES d'avoir pris le temps de me conseiller et de m'avoir expliqué avec patience son rôle et ses manipulations au sein du laboratoire. Natascha NOVOSAD et Marianne SPRUIJT de m'avoir montré quelques unes de leurs manipulations. Et de manière générale, je souhaite remercier l'ensemble des membres du laboratoires pour leur gentillesse et leur simplicité.

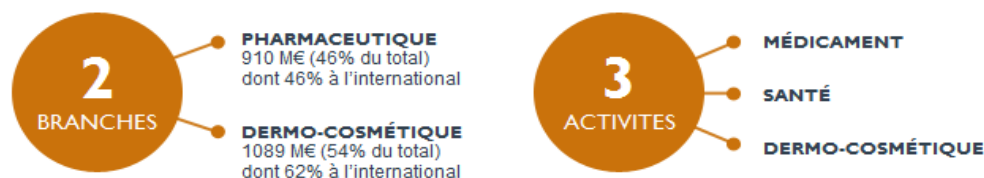


Figure 1. Diagramme des secteurs et des domaines d'activités des laboratoires Pierre Fabre en 2013 (pierre-fabre.com).

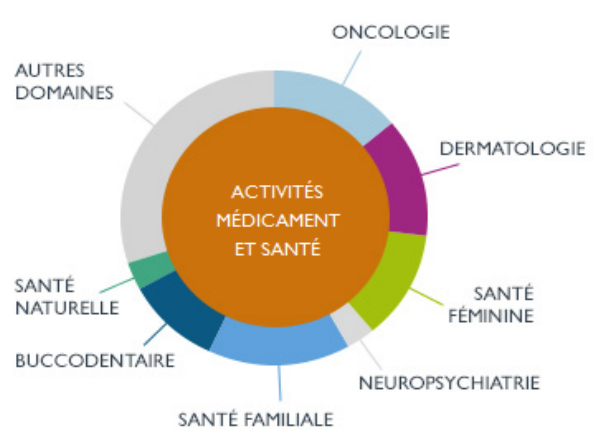


Figure 2. Proportion des différentes activités concernant les domaines de la pharmacie et de la santé en 2013.

CHIFFRE D'AFFAIRES GLOBAL EN 2013 : 2008M€

+1.6% par rapport à 2012 ; +40% depuis 2003

DÉPENSES R&D

207M€ (CHIFFRE 2013)

PHARMACEUTIQUE
156M€ (17% du CA Pharmaceutique)

DERMO-COSMÉTIQUE
49M€ (5% du CA Dermo-Cosmétique)

INVESTISSEMENTS

66M€ (CHIFFRE 2013)

Les investissements réalisés en 2013 ont porté notamment sur la poursuite des travaux d'extension de l'usine dermo-cosmétique de Soual (Tarn), la mise en place de nouvelles lignes de conditionnement de la *Cosmétique Stérile* (Avène, Soual) et l'équipement du centre de R&D situé sur la campus de l'Oncopole (Toulouse).

Figure 3. Données économiques de l'entreprise en 2013.

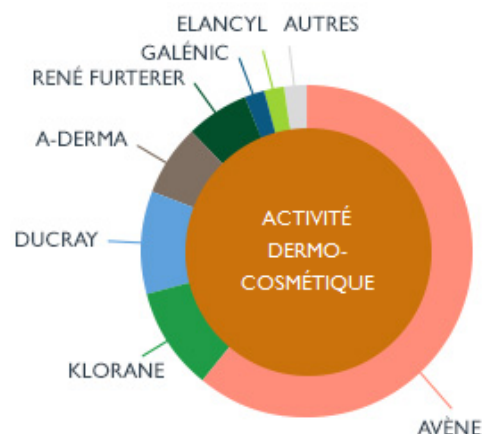


Figure 4. Proportion des différentes marques du groupe reflétant les différentes activités du domaine Dermo-Cosmétique en 2013.



Figure 5. Distribution des laboratoires Pierre Fabre à l'échelle mondiale.

BREVETS

	PORTFEUILLES DE BREVETS AU 31/12/2013	DÉPÔTS DE NOUVELLES DEMANDES AU 31/12/2013
PIERRE FABRE MÉDICAMENT	Famille de brevets : 187 Brevets/demandes de brevets : 2094	24
PIERRE FABRE DERMOCOSMÉTIQUE	Famille de brevets : 137 Brevets/demandes de brevets : 1216	10

Figure 6. Portefeuille des brevets de l'entreprise en 2013.

I. Avant Propos.

I.1. Présentation du site et de son thème d'étude.

Dans ce paragraphe, une vue d'ensemble sur la société Pierre Fabre sera proposée pour ensuite se concentrer sur les laboratoires de recherche et développement Pierre Fabre du site Langlade à Toulouse.

I.1.1. Les Laboratoires Pierre-Fabre.

Tout a commencé en 1959 lorsque Mr Pierre Fabre, pharmacien d'officine à Castres créa Cyclo3[®] un veinotonique¹ synthétisé grâce à *Ruscus aculeatus* (ou plus communément appelé petit Houx). En effet, son succès fulgurant amena Pierre Fabre à créer les laboratoires pharmaceutiques homonymes en 1961. Dès lors l'entreprise ne cessa de croître et s'articule aujourd'hui autour de deux secteurs principaux (Pharmaceutique et Dermo-Cosmétique), eux mêmes organisés autour de 3 domaines (Médicaments, Santé, Dermo-Cosmétique) (Cf. Figure 1).

Concernant le secteur pharmaceutique (Cf. Figure 2), Pierre Fabre Médicament (PFM) constitue le 2^{ème} laboratoire pharmaceutique français indépendant. Le laboratoire oriente son développement sur des axes thérapeutiques prioritaires ciblés tel que la cancérologie, la neuropsychiatrie et la dermatologie ainsi que sur l'urologie, la gynécologie et la rhumatologie et bien d'autres. Les Laboratoires Pierre Fabre sont aussi très engagés dans la santé familiale : Pierre Fabre Santé (PFS), Pierre Fabre ORAL CARE et Naturactive conçoivent, produisent et distribuent des médicaments de prévention et de santé publique.

Pour ce qui est du secteur Dermo-Cosmétique (Cf. Figure 4), Pierre Fabre Dermo-Cosmétique (PFCD) est le deuxième laboratoire Dermo-cosmétique européen en officine. Pionniers du concept, les Laboratoires Pierre Fabre imaginent et développent des solutions innovantes et pointues en matière d'hygiène, de soin, de beauté de la peau, du cuir chevelu et des cheveux en identifiant notamment des actifs d'intérêt à partir d'extraits naturels. Les laboratoires de Recherche et Développement (R&D) en Dermo-cosmétique privilégient actuellement 5 axes de recherche : hydratation, réactivité cutanée, hyper-pigmentation, amincissement et Biologie du cheveu, afin de fournir au public une gamme de produits cosmétologiques la plus complète possible.

Le domaine de la Recherche et du Développement (R&D) est un moteur de croissance pour les Laboratoires Pierre-Fabre. En effet, la découverte de nouvelles molécules qui y est associée et le dépôt de brevets correspondants (Cf. Figure 6) permet à l'entreprise de renforcer et d'accentuer son développement à l'échelle mondiale (Cf. Figure 5). Les Laboratoires Pierre Fabre consacrent une part importante de leur chiffre d'affaire afin de rechercher et développer des thérapies innovantes. (Cf. Figure 3)

¹ Les Veinotoniques ou Phlébotoniques sont des traitements utilisés lors d'insuffisance veineuse afin de stimuler la circulation du sang en limiter la dilatation des veines et le phénomène inflammatoire associé (Futura-sciences.com)



I.1.2. L'USR² Chimie des Substances Naturelles - Institut de Recherche et Développement Pierre Fabre (R&D) Langlade.

Le centre de recherche et développement Pierre Fabre à Toulouse est situé sur le campus de l'Oncopôle au Sud de la métropole. Il fut construit de manière symbolique sur le site de l'ancienne usine AZF suite à son explosion en 2001 (BOHINEUST A., 2012), et ce pour satisfaire plusieurs buts :

- En premier lieu dans un but de réhabilitation de ce site dévasté.
- En second temps, afin de faire face au plan Cancer lancé par Jacques Chirac le 24 mars 2003, qui souhaitait ainsi réduire de 20% la mortalité due aux cancers.
- Pour finir, le but était de réunir sur un même lieu l'ensemble des acteurs travaillant activement dans la lutte contre le Cancer afin d'optimiser celle-ci. En effet, le campus de l'Oncopôle rassemble notamment un centre de Recherche privé/public (R&D Pierre Fabre, CNRS), publique (INSERM), un établissement pharmaceutique, un Hôpital universitaire de proximité et un centre thérapeutique destiné aux essais cliniques. Ce regroupement de professionnels de la santé s'est fait dans le seul but de faciliter la collaboration entre chercheurs et soignants afin de proposer de nouvelles thérapies ciblées dans des délais de plus en plus courts et ce au « lit du patient ».

Le Centre de recherche et développement Pierre Fabre (CRDPF) regroupe principalement :

- Le Centre de recherche en oncologie expérimentale (CROE)
- Le Centre de Développement Pierre Fabre
- Le service de Pharmacocinétique clinique de Pierre Fabre Oncologie
- L'Unité mixte CNRS / Pierre Fabre (Unité de service et de recherche n°3388, dans lequel j'ai effectué mon stage).

L'USR 3388 ETaC «Epigenetic Targeting of Cancer» créé en janvier 2011 regroupe des chercheurs, techniciens et ingénieurs aux compétences complémentaires dans de nombreux domaines tels que la Chimie des Substances Naturelles (Equipe 1-USR avec laquelle j'ai suivi mon stage), du criblage pharmacologique (Equipe 2) et dans le domaine de l'identification et caractérisation de molécules chimiques inhibant les méthyltransférases d'ADN (DNMTs) (Equipe 3).

L'équipe de Chimie des Substances Naturelles dirigée par François SAUTEL, (Directeur de Recherche Pierre Fabre) fait partie intégrante de l'unité Mixte CNRS-Pierre Fabre USR 3388 et s'intéresse en particulier à la diversité chimique végétale et microbienne. En collaboration avec les deux autres équipes de l'unité, l'USR est à la recherche de nouvelles molécules bioactives à base d'extraits naturels afin de développer de nouvelles voies thérapeutiques innovantes dans le domaine de l'Épigénétique.

² USR : Unité de Services et de Recherche

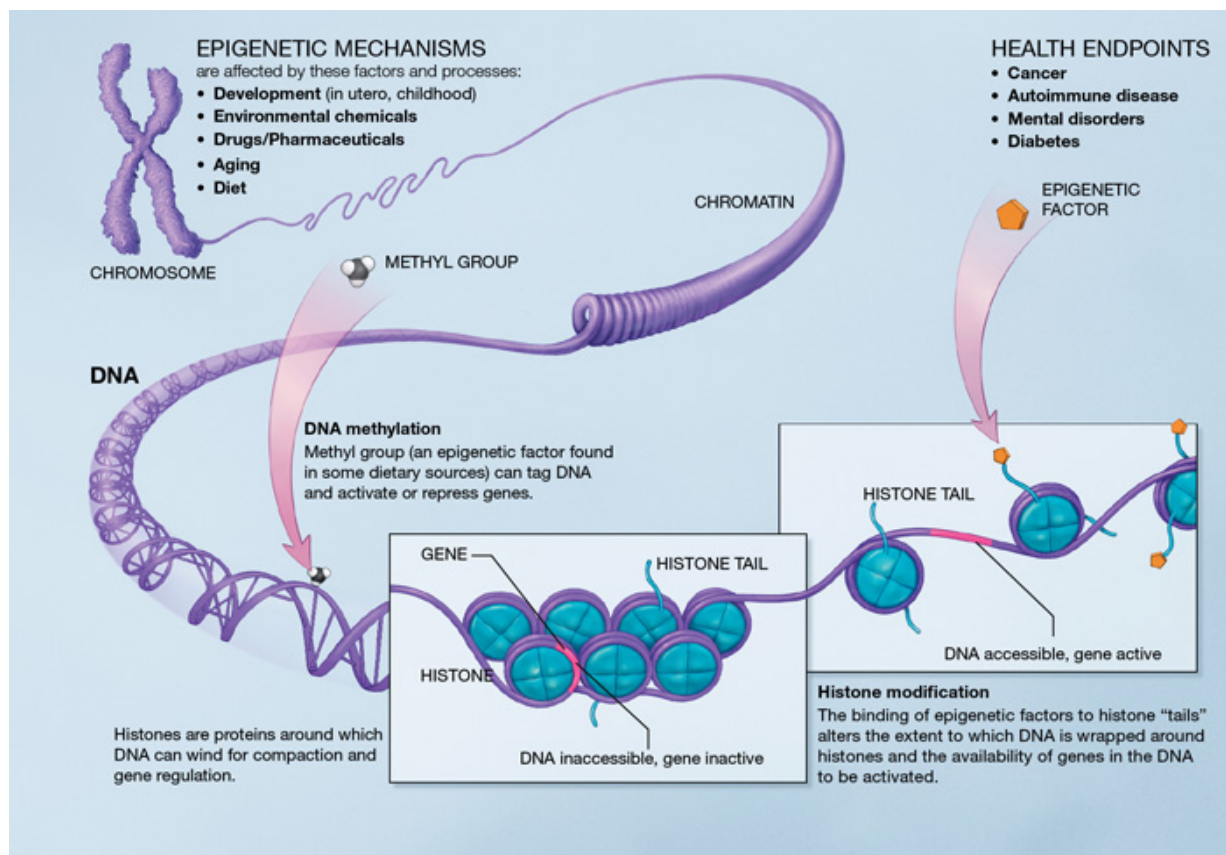


Figure 7. Structure de la molécule d'ADN et Epigénétique (wikipedia.fr)

Comme il a été mentionné plus haut, l'ensemble des équipes de l'USR 3388 concentre sa recherche sur un thème assez ciblé : l'Épigénétique et le Cancer.

I.1.3. Qu'est ce que l'épigénétique ?

Toutes nos cellules issues initialement d'une seule cellule œuf dupliquée par mitose, partagent exactement le même patrimoine génétique (46 chromosomes hérités de nos parents sur lesquels figurent environ 25 000 gènes), à l'exception près de rares mutations somatiques.

Cependant, même si toutes nos cellules contiennent la même information génétique, elles n'en font pas toutes le même usage. En effet, un neurone ne possède pas les mêmes propriétés et fonctions qu'une cellule pacemaker ou encore qu'un erythrocyte. C'est ainsi que l'on peut définir l'épigénétique comme étant « l'étude des changements réversibles dans l'activité des gènes » (BOURCHIS D., 2015) . Ces changements réversibles peuvent être transmis lors des divisions cellulaires et n'impliquent aucun changement de séquence d'ADN. Effectivement, les modifications dites épigénétiques, sont induites par l'environnement à son sens le plus large. Nous savons en effet, que la cellule reçoit de façon continue une multitude de signaux de toutes sortes l'informant sur son environnement, afin qu'elle puisse se spécialiser notamment au cours du développement, maintenir son type cellulaire ou simplement adapter son activité à la situation dans laquelle elle se trouve.

Ces signaux, y compris ceux pouvant être liés à nos traits d'histoire de vie (stress, tabagisme, alimentation, sommeil...) peuvent conduire à des modifications de l'expression de nos gènes, sans pour autant affecter leur séquence. Les modifications induites par l'environnement sont généralement transitoires mais il peut arriver que certaines d'entre elles persistent même une fois le signal inducteur disparu. Ce sont ces modifications que l'on nomme « modifications épigénétiques »

Ces dernières se manifestent par ce qu'on appelle des « marques biochimiques » apposées par des enzymes spécialisées sur l'ADN ou les histones (protéines structurant l'ADN). Les marques les plus étudiées actuellement sont les groupements méthyles (CH₃) déposés sur l'ADN ou les histones, ainsi que des modifications chimiques qui ont lieu sur les histones telles que l'acétylation et la méthylation.

Afin de saisir l'action des modifications épigénétiques, il est essentiel de rappeler le contexte dans lequel se trouve la molécule d'ADN (Cf. Figure 7). En effet, elle mesure environ 2m, or le noyau cellulaire mesure entre 10 et 100µm de diamètre. Afin d'être contenue dans le noyau, la molécule d'ADN sous forme de chromatine doit être condensée. Dès lors, elle s'enroule autour de complexes protéiques nommés histones dans le but de constituer les nucléosomes qui vont alors s'enrouler sur eux même pour rendre la molécule d'ADN plus ou moins dense. Sous sa forme d'hétérochromatine qui correspond à l'état le plus condensé de la molécule d'ADN, les gènes sont inaccessibles à la machinerie transcriptionnelle, et ne sont donc pas transcrits, pas exprimés. Sous la forme d'euchromatine, état le plus relâché de la molécule, les gènes sont accessibles, et donc exprimés car transcrits en ARNm puis traduits en protéine dans le cytosol.

C'est ici qu'interviennent les modifications épigénétiques. En effet, comme nous venons de le voir, pour qu'un gène soit transcrit, il doit être « lisible », c'est-à-dire accessible aux différents complexes protéiques nécessaires à l'étape de transcription. Les marques épigénétiques de méthylation apposées par les enzymes méthyles transférase (DNMTs³) sur la molécule d'ADN vont, dans la plupart des cas, empêcher la fixation des complexes de transcription empêchant ainsi l'expression des gènes concernés en les rendant ainsi inactifs. Cependant, l'accessibilité des gènes par les complexes de transcription ne se résume pas à cela. En effet, l'état de compaction de la molécule va elle aussi conditionner cette accessibilité. Ce sont les histones (protéines de structures) qui vont contrôler l'état de compaction de la molécule d'ADN. Or ces dernières sont sensibles elles aussi aux marques épigénétiques telles que les groupements méthyles ou acétyles déposés au niveau de leurs queues N-terminales dépassant du nucléosome. Les marqueurs ainsi déposés vont favoriser ou limiter l'accès aux gènes par les complexes de transcriptions. La méthylation au niveau des résidus de lysines va le plus souvent entraîner la compaction de la molécule d'ADN en favorisant l'enroulement de celle-ci autour des histones. Mais cela peut aussi être l'inverse, la méthylation est un mécanisme complexe. L'acétylation quant à elle, au niveau des résidus de lysines par une enzyme acétylase, va entraîner le relâchement de la molécule d'ADN, permettant ainsi la transcription des gènes. La désacétylation au contraire, par l'enzyme HDAC⁴ va contribuer à la compaction de l'ADN dans le but d'empêcher la transcription des gènes.

Ce ne sont cependant pas les seuls systèmes de régulations épigénétiques. En effet, il en existe d'autres comme les Si-RNA et une multitude qui demeurent encore inconnus.

I.1.4.Implications des modifications épigénétiques dans de nombreuses pathologies dont le Cancer.

Les processus épigénétiques interviennent au cours de nombreux événements tels que la différenciation cellulaire, la division, survie cellulaire et bien d'autres, mais il est désormais admis que des anomalies engendrées lors de ces processus de régulations épigénétiques seraient à l'origine de nombreuses maladies humaines notamment les cancers.

Durant de nombreuses années, nous pensions que le Cancer était essentiellement dû à des causes génétiques (mutations, translocations, amplifications,...). C'est plus récemment, que les chercheurs ont saisi l'implication des modifications épigénétiques dans le Cancer. Comme il est mentionné plus haut, les nucléosomes sont la cible des mécanismes de régulations épigénétiques. Lors d'anomalies au cours de ces mécanismes, notamment dans les cellules cancéreuses, on peut observer une hyperméthylation locale aberrante (au niveau de dinucléotides CpG et des histones) et une hypométhylation globale du génome. De cette façon, les gènes qualifiés comme étant suppresseur de tumeurs vont être hyperméthylés, donc inaccessibles à la machinerie transcriptionnelle, et les gènes participant à la cancérogénèse seront situés dans les zones hypométhylées et seront sur-exprimés (DELTOUR S. et al., 2005).

³ DNMTs : DNA Méthyltransférase.

⁴ HDAC : Histones Desacétylase.

La mission que se sont donné les chercheurs en Oncologie consiste à être capable de faire réexprimer les gènes réprimés en « reprogrammant » la cellule cancéreuse. Dans ce but, des substances naturelles vont être isolées afin de voir si elles ont une activité quelconque sur les enzymes liées aux cancer.

Des inhibiteurs de DNMTs ont déjà été trouvés tels que la 5-azacytidine et son dérivé la 5-aza-2'-désoxycytidine agissant pour la déméthylation de l'ADN. Des inhibiteurs d'HDACs ont aussi été trouvés tel que la Trichostatine (TSA). Cependant ces inhibiteurs sont dans la plupart des cas très instables en milieu aqueux et fortement cytotoxique pour la cellule. Le problème majeur de ces inhibiteurs, c'est qu'ils ne sont pas sélectifs, et qu'ils vont agir sur des zones ne devant pas être déméthylées, par exemple les transposons. Ainsi, les laboratoires Pierre Fabre tentent désormais de trouver de nouveaux inhibiteurs de ces enzymes participant activement à l'oncogénèse mais cette fois étant plus sélectifs, afin d'optimiser leur efficacité à faible dose dans le but d'induire une cytotoxicité la plus faible possible.

Pour ce faire, les chercheurs tentent de synthétiser des nouveaux inhibiteurs anticancéreux à partir de molécules bioactives de référence trouvées dans des extraits naturels de plantes (exemple de l'Acronycine) ou de métabolites secondaires synthétisés par des microorganismes (exemple de la Daunorubicin, la Bleomycin, ou la Mitomycin) (ZOTCHEV S.B., 2011). C'est ici qu'interviennent les bactéries que j'ai eu l'occasion de manipuler au cours de ce stage.

I. Avant Propos.	4
I.1. Présentation du site et de son thème d'étude.	4
I.1.1. Les Laboratoires Pierre-Fabre.	4
I.1.2. L'USR Chimie des Substances Naturelles - Institut de Recherche et Développement Pierre Fabre (R&D) Langlade.	5
I.1.3. Qu'est ce que l'épigénétique ?	7
I.1.4. Implications des modifications épigénétiques dans de nombreuses pathologies dont le Cancer.	8
II. Introduction.	12
II.1. Les souches bactériennes.	12
II.1.1. Classification des souches bactériennes.	12
II.1.2. Cycle de développement des <i>Streptomyces</i> .	13
II.1.3. Importance Ecologique des <i>Streptomyces</i> .	15
II.1.4. Importance Biologique des <i>Streptomyces</i> .	15
II.1.5. Isolement des <i>Streptomyces</i> à partir d'un échantillon de sol.	16
III. Matériels et Méthodes.	19
III.1. Matériels.	19
III.1.1. Les souches du laboratoire.	19
III.1.2. Les milieux de cultures :	19
III.2. Méthodes :	20
III.2.1. Préservation et maintenance des différentes souches de bactéries.	20
IV. Résultats et Discussion	23
IV.1 Résultats :	23
IV.1.1 Résultats de la conservation sur milieu gélosé :	23
IV.1.2 Résultats de la Cryopréservation :	25
IV.2 Discussion :	25
IV.2.1. Conservation sur milieu gélosé	25
IV.2.2. Cryopréservation :	27
IV.2.3. Conclusion :	27
IV.2.4. Utilisation de la collection de souches bactériennes dans la Recherche pour la lutte contre le Cancer :	28
V. Bibliographie	29
VI. Annexes.	31



Figure 8. Photographie d'une pomme de terre atteinte de la galle commune.

Tableau 1. Classification du genre *Streptomyces* (BERNARD M., 2011).

Règne	Bacteria
Embranchement	Actinobacteria
Ordre	Actinomycetales
Famille	Streptomycetaceae
Genre	<i>Streptomyces</i>

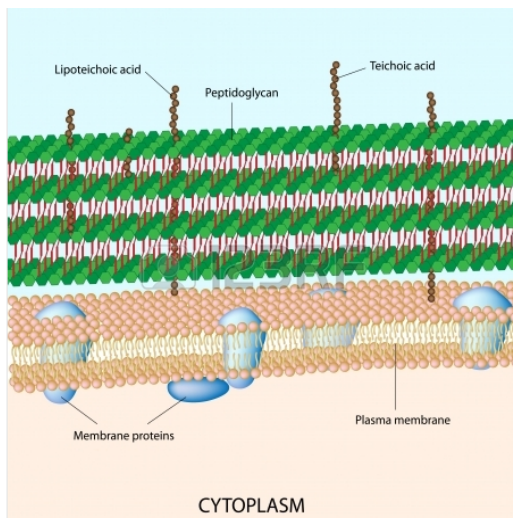


Figure 9. Schéma de la Paroi cellulaire d'une bactérie Gram-positive.

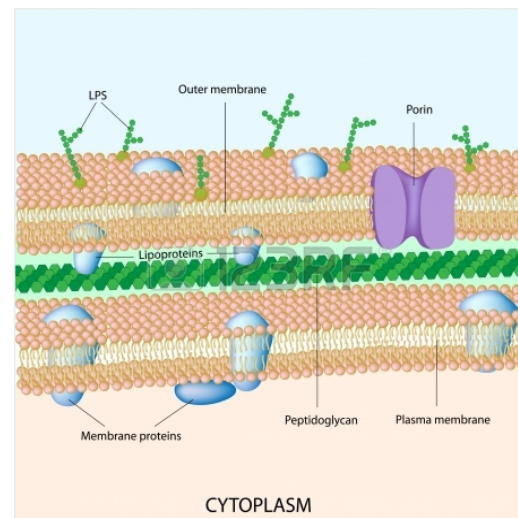


Figure 10. Schéma de la Paroi cellulaire d'une bactérie Gram-négative.

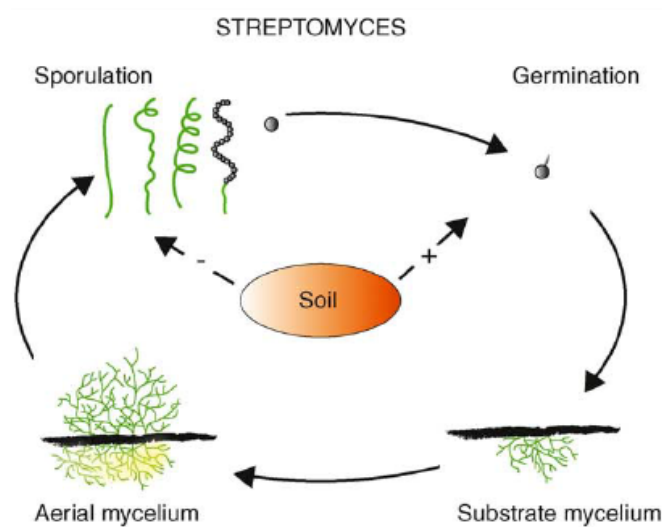


Figure 11. Cycle de développement des *Streptomyces* (SCHERR N. et NGUYEN L., 2009).

II. Introduction.

Les bactéries ne sont pas toutes pathogènes, la plupart ne représentent que peu ou pas de danger pour les organismes vivants. Beaucoup s'avèrent extrêmement utiles à l'Homme notamment dans le domaine de la Santé. Les bactéries sont présentes dans les laboratoires du monde entier dont celui de l'unité mixte de Pierre Fabre et du CNRS où elles font partie d'un vaste programme de recherche de molécules bioactives à investir dans de nouvelles voies thérapeutiques innovantes. Les métabolites secondaires produits par les bactéries de la collection de souches du laboratoire sont criblées sur des modèles biologiques, par exemple des cellules cancéreuses afin de tester leur activité pharmacologique sur ces dernières et plus particulièrement sur les marques épigénétiques apposées sur l'ADN et les histones. Toutes ces recherches ont un seul et unique but : lutter contre les nombreuses formes de cancers grâce à des nouvelles thérapies ciblées ayant une toxicité moindre.

Cependant, afin de se servir de ces métabolites actifs produits par les bactéries, il est nécessaire de les conserver et les préserver dans leur intégrité. La collection de souches étant déjà faite et préservée, mon rôle dans ce stage va être de renouveler les cultures afin de ne perdre aucune souche bactérienne de la collection. C'est ce que l'on va nommer un backup⁵. Pour ce faire, je vais utiliser deux méthodes : la conservation sur milieu gélosé et la cryopréservation.

II.1. Les souches bactériennes.

Ce paragraphe présente la classification des souches bactériennes manipulées lors de ce stage, leur cycle de vie et témoigne de l'importance du genre *Streptomyces* au niveau biologique et écologique.

II.1.1. Classification des souches bactériennes.

Les souches étudiées font partie de la famille des Streptomycetaceae, et plus particulièrement du genre *Streptomyces*, le plus important de cette famille. Les *Streptomyces* sont des bactéries aérobies strictes, chimioorganohétérotrophes, à paroi Gram positive (SINGLETON P., 2004). Elles appartiennent à l'ordre des **Actinomycétales** et à l'embranchement des **Actinobacteria**. (STACKEBRANDT et al., 1997). La famille des Streptomycetaceae fait partie des 10 familles les plus importantes de l'ordre des **Actinomycétales** (LARPENT J.P., 2000), et contiendrait dans les alentours de 150 espèces. L'ensemble de la classification des *Streptomyces* est résumé ci contre (Cf. Tableau 1).

La plupart de ces bactéries sont des saprophytes non pathogènes même s'il en existe certaines associées à des pathologies de plantes ou d'animaux, comme par exemple *Streptomyces scabies* provoquant l'apparition de galle commune chez la pomme de terre et la betterave (Cf. Figure 8). Une caractéristique importante des Actinomycètes, donc indirectement des *Streptomyces*, est la possession d'un GC% élevé (KIESER et al., 2000).

⁵ Backup : Nouveau cycle de cryovials

II.1.2. Cycle de développement des *Streptomyces*.

Les *Streptomyces* sont ubiquitaires, c'est-à-dire qu'on les trouve partout. En effet elles sont abondamment distribuées dans les sols de notre planète (RONG X., et al., 2013) qu'elles colonisent rapidement au cours de leur stade végétatif (KIESER et al., 2000). Elles représentent 1 à 20% de la population cultivable du sol. Elles jouent dans les sols un rôle primordial dans la dégradation de substances récalcitrantes comme la pectine, la lignine, la chitine, les composés aromatiques, etc. ...) (WILLEY J., 2013).

Le cycle de développement des *Streptomyces* est complexe et comprend 4 stades distincts : la germination, le développement végétatif du mycélium dans le substrat, ainsi que dans la partie aérienne, et pour finir un stade de sporulation (SCHERR N. et NGUYEN L., 2009).

L'élément ovale orange au centre de la figure représente le microenvironnement dans lequel les bactéries vont vivre et se développer mais aussi subir des altérations. En effet, lorsque les conditions du milieu dans lequel elles vivent leur sont défavorables (conditions environnementales, températures trop basses ou trop élevées, absence d'éléments nutritifs, dessiccation), elles vont entrer en stade de dormance afin de s'assurer une survie optimale.

Leur stade de dormance est matérialisé par la formation de conidies non mobiles (ou plus communément spores) qui constituent leur forme de résistance. Une fois que les conditions redeviennent favorables, les spores vont alors germer dans le but de produire des longs filaments que l'on appelle des mycéliums végétatifs, qui vont croître de manière syncytiale et non par fission binaire (WILLEY J., 2014). En effet, on va retrouver plusieurs noyaux enfermés dans une même cellule avec seulement quelques cloisons occasionnelles.

Lorsque les bactéries ont atteint la limite des éléments nutritifs, et grâce à des signaux intercellulaires, les hyphes végétatifs vont se développer non plus dans le substrat mais dans la partie aérienne. Afin d'obtenir des nutriments, ils vont « cannibaliser » les hyphes développés dans le substrat. Ces derniers vont survivre et se mettre à produire des antibiotiques ainsi que des métabolites secondaires (souvent caractérisés par l'apparition d'une couleur sur la boîte). Continuant de croître, les hyphes aériens se recroquevillent et commencent à se cloisonner à intervalles réguliers. Ainsi ils vont se transformer en chaîne de spores dans le but de commencer un nouveau cycle (germination, développement dans le substrat, développement aérien et ainsi de suite).

A la surface des milieux gélosés, la croissance donne souvent des colonies irrégulières d'aspect poudreux et coloré.

Tableau 2. Tableau présentant le nombre de molécules bioactives d'origine microbienne connues et classées selon leur type de propriétés (BERDY J., 2005).

Source	Bioactive secondary microbial metabolites				Total bioactive metabolites
	Antibiotics		Bioactive metabolites		
	Total	(with other activity)	no antibiotic activity	(antibiotics plus "other bioactives")	
Bacteria	2900	(780)	900	(1680)	3800
Eubacteriales	2170	(570)	580	(1150)	2750
<i>Bacillus</i> sp.	795	(235)	65	(300)	860
<i>Pseudomonas</i> sp.	610	(185)	185	(370)	795
Myxobacter	400	(130)	10	(140)	410
Cyanobacter	300	(80)	340	(420)	640
Actinomycetales	8700	(2400)	1400	(3800)	10100
<i>Streptomyces</i> sp.	6550	(1920)	1080	(3000)	7630
Rare actinos	2250	(580)	220	(800)	2470
Fungi	4900	(2300)	3700	(6000)	8600
Microscopic fungi	3770	(2070)	2680	(4750)	6450
<i>Penicillium/Aspergillus</i>	1000	(450)	950	(1400)	1950
Basidiomycetes	1050	(200)	950	(1150)	2000
Yeasts	105	(35)	35	(70)	140
Slime moulds	30	(5)	20	(25)	60
Total Microbial	16500	(5500)	6000	(11500)	22500
Protozoa	35	(10)	5	(45)	50

Tableau 3. Tableau présentant quelques métabolites bioactifs produits par des bactéries du genre *Streptomyces* (WILLEY J., 2013 et LARPENT J.P., 2000).

Famille	Nom vulgaire	<i>Streptomyces</i>	Applications observées
Tétracyclines	Tétracycline	<i>S. aureofaciens</i> <i>S. rimosus</i>	Inhibiteur de la synthèse protéique
Aminoglycosides	Streptomycine	<i>S. griseus</i> <i>S. spp</i>	Erreurs de lecture du code génétique
Aminoglycosides	Néomycine	<i>S. fradiae</i>	Actif surtout les Gram négatifs
Macrolides	Erythromycine Clindamycine	<i>S. erythreus</i> <i>S. lincolnensis</i>	Actif surtout sur les Gram positifs
Phénicolés	Chloramphénicol	<i>S. venezuelae</i>	Inhibe la formation des liaisons peptidiques
Polyenes	Nystatine	<i>S. noursei</i>	Fongicide : agit sur champignons et levures (Candida)
Ansamycin	Rifamycin	<i>S. mediterranei</i>	Inhibiteur de la transcription.
Anthracycline	Daunorubicin Doxorubicin Epirubicin Bleomycin	<i>S. peucetius</i> <i>S. verticillus</i>	Anti cancer

II.1.3. Importance Ecologique des *Streptomyces*.

Comme il a été mentionné plus haut, les *Streptomyces* ont un rôle important d'un point de vue écologique, grâce à la variété de biodégradations qu'elles effectuent. En effet, elles sont capables de dégrader des polymères complexes provenant de divers organismes (plantes, animaux, champignons) tels que la lignine ou la cellulose. Dans ce but, de nombreuses enzymes sont ainsi mises à contribution et sécrétées dans le sol : Peroxydases, oxygénases estérases, et bien d'autres. (PELMONT J., 1993). Ces dernières permettent aux bactéries qui les possèdent d'utiliser les ressources du sol comme nutriments. Les *Streptomyces* peuvent s'avérer extrêmement utiles dans le domaine la bio-protection de l'environnement. En effet, elles sont de plus en plus utilisées comme bio-remédiation dans des cas de pollutions environnementales du le plus souvent à des activités anthropiques, (utilisation de pesticides, de carburants, etc.) (WILLEY J., 2013). Certes, le plus souvent la dégradation est incomplète, mais elle suffit souvent à transformer le produit initial en un composé inoffensif qui sera ensuite éliminé par d'autres bactéries (comme les bactéries du genre *Arthrobacter*).

Nous pouvons donc conclure sur le fait que les *Streptomyces* sont d'importants agents participant à la biodégradation, à la bio-protection du sol ainsi qu'au recyclage des nutriments.

II.1.4. Importance Biologique des *Streptomyces*.

Les organismes vivants possèdent un métabolisme qualifié de « primaire » assurant leurs fonctions essentielles telles que la croissance et le développement, ainsi que l'assimilation de la nutrition. Cependant, plantes bactéries et champignons possèdent également un métabolisme secondaire que l'on va retrouver dans des compartiments spécifiques, à des moments précis de leur vie ne servant pas directement au développement des organismes mais plutôt dans les relations qu'ils entretiennent avec leur environnement. Les composés issus de ce métabolisme secondaire possèdent des rôles assez variés : défense (sécrétions toxiques contre les prédateurs), structure (lignine) et ils peuvent aussi permettre une certaine forme de communication.

Les microbes du sol représentent une importante source de métabolites biologiquement actifs (Cf. Tableau 2). Près de 45% des métabolites actifs ont été isolés à partir d'Actinomycetales, soit plus de 10 000 composés. Ces métabolites possèdent dans certains cas, une structure intéressante et une activité biologique potentielle pouvant agir comme inhibiteurs sélectifs de molécules cibles. Cette production est souvent la résultante de fermentation microbienne ou de modifications chimiques de produits microbiens. Tous les microorganismes ne sont pas capables de produire une telle gamme de métabolites secondaires chimiquement différents. Seuls quelques groupes de bactéries ou de microbes eucaryotes dont les Actinomycètes et plus particulièrement le genre *Streptomyces* en sont capables (DONADIO S. et Al, 2002). En effet, l'une des propriétés la plus importante et intéressante des bactéries du genre *Streptomyces* est leur capacité à produire une multitude de métabolites secondaires (Cf. Tableau 3) ayant des propriétés bioactives tel que les antifongiques, les antiviraux, anti tumoraux et principalement des antibiotiques (DE LIMA PROCOPIO R., 2012). A ce jour *Streptomyces* est le genre le plus producteur d'antibiotiques que l'on connaisse.

II.1.5. Isolement des *Streptomyces* à partir d'un échantillon de sol.

Les bactéries de la collection du laboratoire ont été collectées par des collaborateurs à partir de différents types de sols (sédiments, sols) provenant du Golf Persique. Les échantillons d'eau ou de terre servant de matériel de départ pour l'isolement des actinomycètes contiennent en général de nombreuses espèces bactériennes concurrentes à croissance rapide, mélangées à des champignons. Le nombre de bactéries présentes dans un échantillon de sol peut être extrêmement élevé, jusqu'à 10^9 g^{-1} de sol (DONADIO S. et al, 2002). La technique d'isolement doit défavoriser ces contaminants.

Dans un premier temps, il faut prendre une portion seulement de l'échantillon de sol (après l'avoir tamisé et concassé si besoin est) dont on veut extraire les bactéries, afin de la mettre en suspension dans de l'eau distillée stérile. L'étape qui suit consiste à séparer les spores et le mycélium des bactéries intimement liées aux particules du sol en les perturbant chimiquement, ce qui facilite leur dispersion et ainsi leur dissociation. Pour se faire, on va ajouter dans la suspension de la résine de Chelex-100 ainsi qu'un éluant, puis le tout est mis à agiter à l'aide d'un agitateur orbital. Ceci permet l'échange d'ions Na^+ pour des cations bivalents tels que Mg^{2+} et Ca^{2+} , maintenant ensemble les agrégats du sol (KIESER et al., 2002).

L'étape suivante consiste à centrifuger l'échantillon afin d'obtenir deux phases bien distinctes, les particules du sol se déposant dans le fond du tube, spores et mycélium étant en suspension dans la phase du haut. On laisse incubé à 28°C pendant environ une semaine et le surnageant est récupéré. S'en suit une série de dilution, la concentration des microorganismes étant excessivement élevée même dans une infime portion de sol (NIMAICHAND S. et al., 2012).

Il s'agit par la suite de prélever 50 à 100 μL de solution diluée que l'on va étaler sur un milieu d'isolement gélosé stérile contenant des sels et de la chitine comme seule source de carbone et d'azote. Les actinomycètes se développent par le biais de leur chitinase extracellulaire capable d'attaquer la chitine qui forme dans la gélose une suspension insoluble. L'élimination des bactéries concurrentes est cruciale car les actinomycètes ont un développement relativement lent par rapport à d'autres espèces. On peut faciliter l'isolement en traitant les échantillons par des méthodes agressives, comme une brève exposition au formol (dégradant les parois cellulaires fines) ou une période de chauffage à 44°C . L'addition de nystatine ou autre antifongique directement dans la gélose permet d'inhiber la croissance des champignons. On peut aussi ajouter des antibiotiques tournés contre les bactéries Gram négatives afin d'isoler les *Streptomyces* étant Gram positives (ALVES MARTINS ASSIS D. et al., 2014).

Une fois isolées, les souches sont ensuite transférées sur d'autres milieux contenant de la caséine ou de l'amidon. Les espèces de famille *Streptomyces* (répertoriées au nombre de 500) sont par la suite déterminées grâce à la forme des sporanges, l'observation des conidies et la pigmentation des filaments aériens.

Cette présentation des souches bactériennes du genre *Streptomyces* dans toute sa globalité, nous permet de nous rendre compte de son importance notamment aux niveaux écologique et biologique. En effet, comme nous venons de le voir, elles sont distribuées de manière importante dans les sols et sédiments de nombreux pays. Ainsi, elles sont capables de supporter des variations de conditions environnementales assez importantes, ce qui rend leur préservation et utilisation moins difficile que d'autres types bactériens. En effet, dès lors que les conditions environnementales ne leur sont plus favorables, elles vont entrer en phase de dormance en formant des spores, ce qui leur garantit une survie optimale.

Mais plus important encore, les *Streptomyces* constituent le genre le plus producteur de métabolites secondaires bioactifs. Elles sont capables de produire une gamme impressionnante de métabolites secondaire ayant des propriétés chimiques, biologiques et pharmacologiques des plus intéressantes les unes que les autres. Leur utilisation croissante dans de nombreux programmes de recherches, notamment ici dans les laboratoires Pierre Fabre prend ainsi tout son sens.

Tableau 4. Composition du milieu « 2 »

"2"= milieu A1BFe-ASW0,5 pour 1litre	
Composés	Quantité
Starch	10g
Yeast Extract	4g
Peptone	2g
CaCO ₃	1g
KBr 20g/l	5mL
Fe ₂ SO ₄ , 4H ₂ O 8g/l	5mL
ASW (Instant Ocean)	16g
Eau distillée	1L

Tableau 5. Composition du milieu TCG

TCG-ASW 0,5 (Pré culture) pour 1L de milieu.	
Composés	Quantité
Tryptone	3g
Casitone	5g
Glucose	4g
Instant Ocean	16g
Eau distillée	1L

Tableau 6. Composition du milieu ISP2

ISP2 pour 1L de milieu	
Composés	Quantité
Yeast extract	3g
Malt Extract	10g
Dextrose	4g
Agar	15g
Instant Ocean	15g
Eau distillée	1L

Tableau 7. Composition du milieu ISP2*

ISP2 pour 1L de milieu	
Composés	Quantité
ISP1 (Yeast extract + Casein)	8g
Malt Extract	10g
Dextrose	4g
Agar	15g
Instant Ocean	15g
Eau distillée	1L

III. Matériels et Méthodes.

III.1. Matériels.

Dans ce paragraphe va être détaillé le matériel utilisé lors du backup des souches de la collection. Le plus important étant les souches de la collection, pour finir sur les milieux de cultures utilisés.

III.1.1. Les souches du laboratoire.

Les souches dont j'ai du faire un backup font partie du genre *Streptomyces* décrit précédemment. Elles ont été fournies par une collaboration extérieure et ont été isolées à partir de différents substrats (sédiments, sols, etc...) du Golf Persique. Elles sont conservées dans des cryotubes de 2mL, eux même stockés dans des boîtes en cartons résistantes au froid. Ces boîtes peuvent contenir jusqu'à 81 cryotubes (9 cryotubes pour chacune des 9 souches de la boîte) et sont entreposées dans un congélateur à -80°C. La collection du laboratoire contient environ 600 souches bactériennes de *Streptomyces* mais j'ai fait le backup de seulement 57 d'entre elles.

III.1.2. Les milieux de cultures :

Au cours de ce stage, j'ai eu l'occasion d'utiliser à la fois des milieux de culture liquides et solides.

III.1.2.1. Les milieux liquides :

Deux types de milieux ont été utilisés au cours des manipulations :

- Le milieu « **2** » (ou M2) a été utilisé afin de remettre les souches cryopréservées en pré-culture. Sa composition est détaillée sur la page ci-contre (Cf. Tableau 4).
- Le milieu **Tryptone-Casitone-Glucose** (ou plus simplement TCG) a été utilisé lorsque les souches mises en pré-culture une première fois, avec le milieu précédent ne montraient aucun signe de croissance. La composition de ce milieu est présentée sur la page ci-contre (Cf. Tableau 5).

III.1.2.2. Les milieux solides :

- Le milieu **International *Streptomyces* Project medium 2** (ou plus communément appelé ISP2) a été utilisé lors du coulage de boîte de Pétri dans le but d'y inoculer des souches bactériennes. La composition de ce milieu est présentée ci-contre (Cf. Tableau 6).
- Le milieu **International *Streptomyces* Project medium 2 modifié** (ou ISP2*) a été utilisé lorsque les souches ne poussaient pas sur le milieu précédent. Sa composition est détaillée ci-contre (Cf. Tableau 7).

III.2. Méthodes :

Il s'agit ici de rendre compte des différentes méthodes employées lors de ce stage afin de préserver les souches bactériennes de la collection.

III.2.1. Préservation et maintenance des différentes souches de bactéries.

Il s'agit désormais de déterminer les avantages et inconvénients de chacune des méthodes employées afin de préserver et maintenir au mieux les différentes souches de *Streptomyces* isolées. Dans ce stage j'ai été confrontée à deux de ces méthodes de conservation : la Cryopréservation et la conservation sur milieu gélosé.

III.2.1.1. Préparation de cryovials.

La méthode d'extraction détaillée paragraphe II.1.5 est une méthode trouvée dans la bibliographie qui doit être réalisée au préalable lors de la création de la collection. Dès lors, un peu plus de 600 souches ont été extraites et isolées. La question de la préservation de ces nombreux microorganismes s'étant déjà posée antérieurement, la mission qui m'a été confiée n'a pas été de préparer les cryovials initiaux des bactéries isolées ceci ayant déjà été réalisé auparavant mais de faire ce que l'on appelle un backup.

En effet, à partir des cryovials initiaux, j'ai dû remettre les bactéries en culture afin de refaire une deuxième série de cryovials à mettre dans un second congélateur à -80°C au cas où le premier tomberait en panne. Il s'agit d'une sorte de mesure de sécurité afin de ne pas perdre les 600 souches de la collection du laboratoire. La cryoconservation consiste à conserver des souches bactériennes dans du glycérol à -80°C. En effet, à une telle température, toute activité biologique est stoppée, y compris celles menant à la mort cellulaire. Cette méthode de conservation offre une certaine forme d'immortalité aux cellules en conservant ses structures physico-chimiques conditionnant ses fonctions cellulaires. Cependant, le froid peut nuire à ces dernières en provoquant notamment, la cristallisation des parties aqueuses à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules. La cristallisation est responsable de lésions mécaniques importantes. Ainsi, le glycérol sert à protéger les constituants cellulaires du gel et de la déshydratation. En effet, la formation de glace, entraîne d'autre part, une augmentation de la concentration saline du milieu dans lequel baignent les cellules. Ainsi le peu d'eau restant sous forme liquide dans ces dernières va sortir dans le but de rétablir l'équilibre osmotique et la cellule va se déshydrater. Le glycérol joue donc l'important rôle de cryoprotectant.

Les cryoprotectants ou agents cryoprotecteurs permettent au cours du refroidissement de maintenir une quantité d'eau suffisante à l'état liquide dans les compartiments intra et extracellulaires. Etant aptes à former des liaisons hydrogènes avec l'eau de part leur importante solubilité, ils empêchent ainsi la cristallisation de cette dernière aux basses températures. L'eau est maintenue à l'état liquide pour des températures inférieures aux points de congélation. En abaissant le point de congélation de la solution extracellulaire, ils ralentissent la cinétique de sortie d'eau intracellulaire et évitent ainsi à la cellule d'atteindre son volume minimal critique.

En atténuant la concentration cellulaire, ils évitent aussi les hyper-concentrations salines (BAOKUN L. et al., 2011).

De plus, ils possèdent un deuxième intérêt pour la conservation, qui est leur faible toxicité intrinsèque vis-à-vis des cellules qu'ils « protègent ».

Afin de préparer un backup :

- Il s'agit dans un premier temps d'aller récupérer les cryovials datant d'il y a 3 à 5 ans au -80°C, de les laisser décongeler à température ambiante afin de les mettre en pré-culture, de sorte qu'à la fin on puisse à nouveau réaliser des cryovials à partir de ces pré-cultures. Le protocole est détaillé en annexe (Cf. Annexe 3). Les souches sont laissées en pré-culture pendant 2 à 3 jours seulement, de façon à ce que les cellules qui vont être mises en cryovials soient des cellules « jeunes » prêtes à entamer une nouvelle division cellulaire. En effet pour faire des cryovials, les cellules doivent être en phase de croissance exponentielle, afin de garantir une viabilité maximale.
- Dans un second temps, une fois que les souches ont bien poussé en pré-culture, il va falloir les transférer dans des cryotubes afin de les conserver dans un nouveau congélateur à -80°C. Le protocole est présenté en annexe (Cf. Annexe 6).

Il est important par la suite, de réaliser un suivi des pré-cultures. Il est bien de consigner dans un tableau, les souches ayant poussé et les souches n'ayant pas poussé en milieu liquide. Comme il a été mentionné plus haut, deux types de milieux sont utilisés lors des pré-cultures, le milieu M2 et le milieu TCG. Ce dernier est utilisé seulement lorsque les souches ne parviennent pas à pousser en milieu M2.

III.2.1.2. Préparation de cultures sur milieux gélosés.

Afin d'isoler les différentes souches bactériennes d'un échantillon de sol, si on se réfère au paragraphe II.1.5., une fois les dilutions faites, 50 à 100µL de solution diluée vont être déposés sur milieu gélosé. Plusieurs souches vont pousser sur la même boîte, il s'agit ensuite de les isoler définitivement. Dans ce but, chaque colonie bien distincte va être déposée sur une nouvelle boîte de milieu gélosé. Ceci ayant déjà été fait auparavant, mon rôle dans ce stage a été de renouveler ces cultures sur géloses. Dans ce but, le reste des cryovials initiaux a été utilisé, et étalé sur milieu gélosé. Une fois encore deux types de milieux ont été utilisés. Le milieu ISP2 et le milieu ISP2 modifié (ISP2*) lorsque les souches ne parvenaient pas à pousser sur ISP2. Pour se faire j'ai suivi un protocole précis détaillé en annexe (Cf. Annexe 4).

Les souches vont être laissées en culture jusqu'à la fin de mon stage dans un incubateur à 28°C. Durant cette période, j'ai réalisé un suivi de la croissance des souches. J'ai consigné dans un tableau les souches parvenant à pousser sur ISP2, celles n'y parvenant pas, et de ce fait les souches ayant été étalées le second milieu : ISP2*. En plus de récolter ces données dans un tableau, j'ai aussi consigné la forme, la couleur, l'aspect des colonies, si ces dernières formaient des spores et si la présence de métabolites secondaires était décelée.

Tableau 8. Suivi de la pousse des souches bactériennes sur ISP2 provenant des cryovials initiaux

Références des souches	Sur ISP2	Sur ISP2*
Souche M100-203 à M100-211	Croissance observée	X
Souche M100-833	Croissance observée	X
Souche M100-834	Croissance observée	X
Souche M100-835	Pas de croissance observée	Croissance observée
Souche M100-836	Croissance observée	X
Souche M100-837	Croissance observée	X
Souche 916	Pas de croissance observée	Pas de croissance observée
Souche 917	Croissance observée	X
Souche M100-840	Croissance observée	X
Souche M100-841	Croissance observée	X
Souche M100-842	Pas de croissance observée	Croissance observée
Souche M100-843	Croissance observée	X
Souche M100-844	Pas de croissance observée	Pas de croissance observée
Souche M100-845 à M100-848	Croissance observée	X
Souche M100-849 à M100-852	Croissance observée	X
Souche M100-853	Pas de croissance observée	Croissance observée
Souche M100-854	Croissance observée	X
Souche M100-855	Croissance observée	X
Souche M100-856	Pas de croissance observée	Pas de croissance observée
Souche M100-857	Croissance observée	X
Souche M100-858	Pas de croissance observée	Pas de croissance observée
Souche M100-859 à M100-866	Croissance observée	X
Souche M100-867 à M100-871	Croissance observée	X
Souche M100-212	Pas de croissance observée	X
Souche M100-213	Pas de croissance observée	X
Souche M100-215	Pas de croissance observée	X
Souche M100-217 à M100-222	Croissance observée	X

IV. Résultats et Discussion

IV.1 Résultats :

IV.1.1 Résultats de la conservation sur milieu gélosé :

Les souches ont été laissées en culture sur milieu gélosé dans un incubateur à une température de 28°C pendant plus d'un mois. J'ai pu réaliser un suivi de la croissance des souches au cours de mon stage (Cf. Tableau 8).

Parmi les souches étalées sur ISP2, on remarque que la majorité des souches a pu pousser sur le milieu ISP2 sauf les souches M100-835, M100-842, M100-844, M100-853, M100-856, M100-858, et les souches 916, 917 qui n'ont pas montré signe de croissance. J'ai donc décidé de les étaler sur des boîtes de Pétri contenant cette fois ci, le milieu ISP2 modifié (ou ISP2*) afin de voir si elles parviendraient à pousser sur ce dernier.

On remarque ainsi que les souches M100-835, M100-842 et M100-853 ont pu pousser sur le milieu ISP2*.

On peut remarquer par la suite deux phénomènes sur les boîtes. En effet, quelques unes des souches étalées sur géloses, comme par exemple les souches M100-203, M100-204, M100-205, M100-206, M100-207, M100-208, M100-209, M100-210 et M100-211, ont formé une épaisse croûte grisâtre ou blanchâtre. Cette croûte témoigne de la formation de spores.

On remarque de plus, l'apparition d'un ou plusieurs pigments dans les boîtes de certaines souches bactérienne telles que M100-211, M100-835, M100-836, M100-837, M100-854, qui confirme la production de métabolites secondaires par ces dernières.

Tableau 9 Suivi des pré-cultures des souches bactériennes provenant des cryovials initiaux

Références des souches	Pré-culture dans M2	Pré-culture dans TCG
Souche M100-203 à M100-211	Croissance observée	X
Souche M100-833 à M100-837	Croissance observée	X
Souche 916 et 917	Croissance observée	X
Souche M100-840 et 841	Croissance observée	X
Souche M100-842	Pas de croissance observée	Pas de croissance observée
Souche M100-843	Croissance observée	X
Souche M100-844	Pas de croissance observée	Pas de croissance observée
Souche M100-845 à M100-848	Croissance observée	X
Souche M100-849 à M100-855	Croissance observée	X
Souche M100-856	Pas de croissance observée	Pas de croissance observée
Souche M100-857	Croissance observée	X
Souche M100-858	Pas de croissance observée	Pas de croissance observée
Souche M100-859	Croissance observée	X
Souche M100-860	Pas de croissance observée	Croissance observée
Souche M100-861 à M100-866	Croissance observée	X
Souche M100-867	Croissance observée	X
Souche M100-868	Pas de croissance observée	Pas de croissance observée
Souche M100-869 et 870	Croissance observée	X
Souche M100-871	Pas de croissance observée	Pas de croissance observée
Souche M100-212 et 213	Croissance observée	X
Souche M100-215	Croissance observée	X
Souche M100-217 à M100-222	Croissance observée	X

IV.1.2 Résultats de la Cryopréservation :

Afin de se rendre compte de l'efficacité de la Cryopréservation, il faut regarder d'une part si les souches remises en pré-cultures ont poussé et d'autre part si les souches inoculées sur milieu gélosé ont poussé. Si les souches ont poussé, on peut affirmer que la Cryopréservation a relativement bien préservé les bactéries, qu'elles ont été maintenues stables puisqu'elles sont capables de pousser une nouvelle fois après décongélation. Concernant les cultures sur géloses, nous avons fait le point dans le paragraphe précédent, certaines ont particulièrement bien poussé d'autres n'ont pas encore montré signe de croissance.

Concernant les pré-cultures, un tableau récapitulatif est présenté sur la page ci-contre (Cf. Tableau 9).

Les résultats recueillis sont du même type que ceux de la conservation sur milieux gélosés. En effet, certaines souches ont été capables de pousser en pré-culture dans le milieu M2, d'autres non. Les souches M100-842, M100-844, M100-856, M100-858, M100-860, M100-868 et M100-871 n'ayant pas poussé en milieu M2 ont été remises en pré-culture dans du TCG. Dès lors, on observe la croissance d'une seule souche dans le TCG, la souche M100-860, les autres souches ne montrent toujours aucun signe de croissance.

IV.2 Discussion :

Il s'agit ici de développer une réflexion sur les hypothèses possibles issues des résultats obtenus à la suite des deux méthodes de conservation.

IV.2.1. Conservation sur milieu gélosé :

Certaines souches n'ont poussé ni dans ISP2 ni dans ISP2*. Cependant, il est admis que certaines peuvent mettre jusqu'à plus d'un mois pour montrer un signe de croissance. Une souche vient confirmer ceci : la souche M100-842. Cette souche n'ayant pas poussé sur ISP2 à été étalée sur ISP2*, cependant elle ne montrait toujours aucun signe de croissance jusqu'à il a peu. Elle a réussi à pousser, après trois semaines d'incubation de plus que les autres souches. Nous avons supposé que le temps d'incubation nécessaire à l'observation d'une croissance variait d'une souche à l'autre et que certaines nécessitaient un temps d'incubation plus long et qu'il y avait des chances qu'elles finissent par pousser. Malheureusement je n'aurai pas le temps de vérifier cette hypothèse par moi-même mon stage étant trop court. Si toutes les souches n'avaient pas poussé, nous aurions pu supposer qu'il y avait un problème avec les cryovials initiaux qui ont servis pour les différentes inoculations. Cependant ce n'est pas le cas.

De plus, les souches bactériennes sont soumises à un stress environnemental certain, qui pourrait expliquer le fait que quelques-unes n'aient pas poussé. Il en est de même pour la sporulation, toutes les souches n'ont pas été impactées de la même manière par le stress environnemental induit, certaines y ont répondu par la formation de spores, d'autres ont pu résister et continuer à se développer sans sporuler.

Tableau 10. Avantages et inconvénients des deux méthodes de conservation de souches bactériennes.

La conservation sur milieu gélosé	Avantages	Inconvénients
	Conservation longue durée si les souches en culture forment des spores	Si les souches en cultures ne forment pas de spores, les cellules auront tendance à être moins stable dans le temps.
	Utilisation d'un nouveau support 12 puits avec moins de gélose	La gélose va sécher plus vite, si on la met au frigo il y a un grand risque de contamination à l'humidité il faut la sceller au maximum
	Entretien régulier des souches, maximisation leur préservation.	La vérification de l'état de la collection doit se faire de manière plus régulière
	Coûts peu élevés	La boîte n'est jamais parfaitement scellée, la probabilité de contamination par l'humidité est élevée
	Si une coupure de courant à lieu et que les boites sont dans le frigo, le changement de température ne les gêne guère car elles sont le plus souvent sous forme de spores.	
La Cryopréservation	Avantages	Inconvénients
	Préservation et maintenance à long terme (3 à 5 ans)	Coût élevé d'un congélateur à -80°C
	Intérieur stérile tout le long de la manipulation, donc si la souche contenu dans le cryotube était propre avant d'être dans ce dernier, elle est propre une fois dedans.	
		Si coupure électrique du -80°C, les cryovials décongèlent. Or les bactéries ne forment pas de spores en solution. Elles peuvent supporter un changement de température pendant 24h mais pas plus car cela les déstabilise.

IV.2.2. Cryopréservation :

D'après les résultats obtenus lors de l'inoculation sur milieux gélosés et la remise en pré-culture des souches, on peut conclure que la Cryopréservation permet une bonne conservation des souches en les maintenant dans un état stable leur permettant de réactiver leur croissance une fois décongelées, de produire des métabolites secondaires et de sporuler. L'ensemble des fonctions cellulaires de ces bactéries semble intact. Concernant les souches n'ayant pas poussé en pré-cultures, nous pouvons supposer que les pressions environnementales auxquelles les souches devaient faire face étaient trop importantes pour que ces dernières puissent se développer.

IV.2.3. Conclusion :

Chacune des deux méthodes possède ses avantages et ses inconvénients (Cf. Tableau 10), mais toutes deux doivent être renouvelées de manière régulière afin d'éviter la perte des souches de la collection. Ainsi une DataBase doit être menée de manière précise dans le but de suivre le renouvellement des deux méthodes (Cf. Annexe 8), ce qui peut s'avérer fastidieux. Il ne faut pas en préférer une plutôt qu'une autre. En effet, lorsque l'on souhaite conserver des souches bactériennes tout en les maintenant dans un état stable, il est recommandé d'utiliser au moins deux modes de conservation au cas où il y aurait une panne de courant dans le bâtiment. Dans le laboratoire de microbiologie, deux modes de conservation sont donc utilisés : la cryopréservation, méthode à « moyen terme » et la culture sur boîte, méthode à court terme. Ce n'est pas un hasard. Nous pourrions penser que seule la cryopréservation est nécessaire ici, cependant si un jour, une coupure de courant assez longue venait à arriver, les cultures sur boîtes ne seraient pas impactées de manière aussi importante que les souches cryopréservées et ces dernières ne seraient donc pas perdues. Le temps de renouvellement de cette méthode étant assez court, cela permet aussi d'entretenir la collection de manière régulière et de s'assurer que la conservation est bonne.

Cependant ce ne sont pas les deux seules méthodes de conservation de souches bactériennes. En effet, il existe une troisième méthode qui s'appelle la conservation par lyophilisation. La lyophilisation consiste à éliminer toute présence d'eau à l'intérieur et à l'extérieur des cellules. De cette façon, les bactéries ne craignent pas le gel et peuvent être conservées pendant une durée allant de 20 à 30 ans.

La cryopréservation et la lyophilisation sont deux méthodes excellentes de conservation à plus ou moins long terme. Elles minimisent toutes deux les risques d'impacts négatifs sur les propriétés et le génome de nombreux types cellulaires tels que les bactéries (SMITH D. et al., 2011).

IV.2.4. Utilisation de la collection de souches bactériennes dans la Recherche pour la lutte contre le Cancer :

Au cours de ce paragraphe, une ouverture sur l'utilisation de ces microorganismes dans la recherche est proposée. L'importance d'une bonne méthode de conservation préservant les souches dans toute leur intégrité prend ici tout son sens.

Au tout début de la conception de la collection de souches bactériennes du laboratoire, l'ensemble des productions secondaires synthétisées par les bactéries a été criblé. Dès lors les chercheurs savent quels extraits bactériens sont biologiquement actifs sur les cellules cibles. Il s'agit ensuite, de réussir à purifier la ou les molécules de ces extraits ayant une activité biologique sur les cellules.

Dès lors que ces souches bactériennes sont maintenues stables dans le temps, elles sont utilisables à tout moment pour la Recherche d'où l'importance des backups. Les souches doivent être capables de croître et sécréter des métabolites secondaires à n'importe quel moment pour la Recherche. En effet, l'un des objectifs principaux de l'USR est de synthétiser de nouveaux inhibiteurs d'enzymes participant à la tumorigénèse à partir de molécules bioactives extraites des productions bactériennes de la collection de souches du laboratoire.

On va prendre un extrait bactérien d'intérêt dans lequel on veut purifier la ou les molécules responsables de l'activité. La souche bactérienne correspondante va être extraite du congélateur, décongelée puis mise en culture. La suspension est mise à agiter à 200 rpm sur un incubateur dans une chambre chaude de 37 à 38°C pendant plusieurs semaines en présence de résine XAD7 qui va permettre aux molécules produites par les bactéries de venir se fixer dessus. Une fois la période d'incubation finie, la culture va être filtrée selon le protocole détaillé en annexe (Cf. Annexe 7). Une fois l'extrait sec obtenu, il va être redonné aux pharmacologues afin de reconfirmer l'activité de l'extrait. Une empreinte de l'extrait va être réalisée en HPLC analytique afin d'obtenir un chromatogramme révélant son profil global (Cf. figure 9). Cette empreinte est ensuite comparée avec celle réalisée lors de la première extraction. Des fractions de l'extrait sont réalisées en HPLC analytique par zone de temps afin de repérer l'activité sur le chromatogramme. Ces fractions sont à nouveau données aux pharmacologues afin d'être testées pour savoir la ou lesquelles sont actives : c'est ce que l'on appelle le suivi bio-guidé.

Une fois testées, la ou les fractions actives sont désormais connues, ce qui permet d'isoler la ou les molécules d'intérêt en HPLC préparative. Une fois la molécule purifiée, cette dernière va subir de nouveaux tests pharmacologiques avant d'être éventuellement utilisée dans de nouvelles thérapies contre le cancer.

V. Bibliographie

ALVES MARTINS ASSIS D., PASSOS REZENDE R., CARLOS TEIXEIRA DIAS J., 2014. *Use of Metagenomics and Isolation of Actinobacteria in Brazil's Atlantic Rainforest Soil for Antimicrobial Prospecting*. ISRN Biotechnology, Article ID 909601, 7 p.

BAOKUN L., FENGWEI T., XIAOMING L., JIANXIN Z., HAO Z., WEI C., 2011. *Effects of cryoprotectants on viability of Lactobacillus reuteri CICC6226*. Applied Microbial Biotechnology, 92 : 609-616.

BERDY J., 2005. *Bioactive microbial metabolites*. J. antibiot, 58(1) : 1-26.

BERNARD M., 2011. *Mise en évidence de voies de biosynthèse de microorganismes à fort potentiel : une démarche stratégique pour les Laboratoires Pierre-Fabre*. Ecole d'ingénieur de Purpan, Toulouse, France. 132p.

BOHINEUST A., 2012. *Pierre Fabre, un laboratoire français ambitieux*.
<http://www.lefigaro.fr/societes/2012/08/16/20005-20120816ARTFIG00451-pierre-fabre-un-laboratoire-francais-ambitieux.php> (Consulté le 10 Avril 2015).

BOURCHIS D., en collaboration avec l'Inserm, 2015. *Epigénétique*.
<http://www.inserm.fr/thematiques/genetique-genomique-et-bioinformatique/dossiers-d-information/epigenetique> (Consulté le 27 Avril et le 11 Mai 2015).

DE LIMA PROCOPIO R. E, REIS DA SILVA I., KASSAWARA MARTINS M., DE AZEVEDO J. L., DE ARAUJO J. M., 2012. *Antibiotics produced by Streptomyces*. The Brazilian Journal of Infectious diseases, 16 (5) : 466–471.

DELTOUR S., CHOPIN V., LEPRINCE D., 2005. *Modifications épigénétiques et cancer*. Medecine Sciences, 21 : 405-11.

DONADIO S., MONCIARDINI P., ALDUINA R., MAZZA P., CHIOCCHINI C., CAVALETTI L., SOSIO M., PUGLIA A., 2002. *Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites*. Journal of Biotechnology, 99 : 187-198.

KIESER T., CHATER K.F., BIBB M.J., BUTTNER M.J., HOPWOOD D.A., 2000. *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation Norwich. Crowes Norwich, 613 p.

LARPENT J.P., 2000. *Introduction à la nouvelle classification bactérienne, les principaux groups bactériens*. Edition Tec&Doc, 280p.

NIMAICHAND S., ZHU W-Y., YANG L-L., MING H., NIE G-X., TANG S-K., NINGTHOUJAM D.S., LI W-J., 2012. *Streptomyces manipurensis sp. nov., a novel actinomycete isolated from a limestone deposit site in Manipur, India*. Antonie van Leeuwenhoek, 102 : 133–139.

PELMONT J., 1993. *Bactéries et environnement*. Presse Universitaire de Grenoble, 899p.

RONG X., DOROGHAZI J.R., CHENG K., ZHANG L., BUCKLEY D.H, HUANG Y., 2013. *Classification of Streptomyces phylogroup pratensis (Doroghazi and Buckley, 2010) based on genetic and phenotypic evidence, and proposal of Streptomyces pratensis sp. nov.* Systematic and Applied Microbiology, 36 : 401– 407.

SCHERR N. NGUYEN L., 2009. *Mycobacterium versus Streptomyces—we are different we are the same.* Current Opinion in Microbiology, 12 : 699–707.

SINGLETON P., 2004. *Bactériologie, Pour la médecine, la biologie et les biotechnologies.* 6^{ème} édition, 542.

SMITH D., RYAN M., 2011. *Implementing Best Practices and Validation of Cryopreservation Techniques for Microorganisms.* The Scientific World Journal, Volume 2012, Article ID 805659, 9 pages.

WILLEY J.M., SHERWOOD L.M., WOOLVERTON C.J., 2013. *Microbiologie.* Edition De Boeck, 4^{ème} édition, 1070p.

WILLEY J.M., SHERWOOD L.M., WOOLVERTON C.J., 2014. *Prescott's Microbiology.* Mc Graw Hill Education, 9^{ème} édition, 1014p.

ZOTCHEV S.B., 2011. *Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipelines.* Journal of Biotechnology, 158 (2012) : 168– 175.

VI. Annexes.

Table des Annexes :

Annexe 1 : Préparation de milieux de cultures gélosés pour boîtes de Pétri. _____	32
Annexe 2 : Préparation de boîtes gélosées. _____	34
Annexe 3 : Préparation de pré-cultures à des fins de backup. _____	35
Annexe 4 : Préparation de culture sur boîte de Pétri : _____	37
Annexe 5 : Préparation de milieux de cultures liquides. _____	39
Annexe 6 : Préparation de cryovials. _____	40
Annexe 7 : Protocole de filtration de culture bactérienne. _____	42
Annexe 8 : Extrait de la DataBase réalisée lors du processus de backup de la collection du laboratoire. _____	43
Annexe 9 : Exemple de Chromatogramme. _____	44
Annexe 10 : Répartition des différentes activités suivies au cours du stage. _____	45
Annexe 11 : Tableau des tâches lors des différentes manipulations observées ou réalisées au cours de ce stage. _____	46

Annexe 1 : Préparation de milieux de cultures gélosés pour boîtes de Pétri.

- **Matériel nécessaire :**

- Eprouvette graduée de 1000mL
- Bécher de 5000mL
- 8 bouteilles de 1000mL
- Coupelle en plastique
- Spatule stérile en inox
- Agitateur magnétique RCT basic Labortechnik
- Barreau magnétique
- Balance
- Indicateur adhésif de stérilisation
- Feutre résistant à la stérilisation
- Elements à incorporer (yeast extract, malt extract, dextrose, agar, instant ocean, ISP1)

- **Composition des milieux :**

Quantités pour 1L	Quantités pour 2L
IPS2 : - Yeast extract : 3g - Malt extract : 10g - Dextrose : 4g - Agar : 15g - Instant Ocean : 15g	ISP2 - Yeast extract : 6g - Malt extract : 20g - Dextrose : 8g - Agar : 30g - Instant Ocean : 30g
IPS2* : - ISP1 (yeast extract 3g+ casein 5g) : 8g - Malt extract : 10g - Dextrose : 4g - Agar 15g - Instant Ocean : 15g	IPS2* : - ISP1 (yeast extract 3g+ casein 5g) : 16g - Malt extract : 20g - Dextrose : 8g - Agar 30g - Instant Ocean : 30g

- Protocole détaillé :

- Ajouter 2x1L d'eau distillée dans un bécher de 5L à l'aide d'une éprouvette graduée d'1L.
- Déposer un barreau aimanté dans le bécher puis placer ce dernier sur un agitateur magnétique, le mettre en route.
- Allumer la balance, appuyer sur TARE.
- Placer une coupelle en plastique sur la balance et ré-appuyer sur TARE
- Prélever la masse souhaitée pour chacun des éléments composant ce milieu en changeant la coupelle pour chaque élément et en nettoyant à l'eau distillée la spatule en inox de manière intermédiaire.
- Laisser le tout homogénéiser.
- Une fois la solution homogène, verser l'équivalent de 500mL dans chacune des 4 bouteilles d'1L, ne pas fermer le bouchon entièrement.
- Placer un indicateur adhésif de stérilisation sur chacun des bouchons, écrire le nom du milieu, la date et ses initiales de la façon suivante : « ISP2 10/04/15 CB », une fois stérilisée, l'indicateur changera de couleur indiquant que celle-ci a bien eu lieu.
- Rincer le bécher à l'eau ainsi que le barreau aimanté, et répéter ce processus pour le deuxième type de milieu (ISP2 modifié ou ISP2*).

- Suivi de fabrication des milieux gélosés

Date	Type de milieu	Quantité
Jeudi 9 avril 2015	ISP2	2L
Jeudi 9 avril 2015	ISP2*	2L
Lundi 27 avril 2015	ISP2	2L

Annexe 2 : Préparation de boîtes gélosées.

Il s'agit ici de reliquéfier le milieu à l'aide d'un micro-ondes afin de pouvoir couler ce milieu dans une boîte de Pétri. Cela dit il est important d'utiliser des protections adéquates afin de faire face aux éventuelles projections chaudes.

- **Matériel nécessaire :**

- Bouteilles contenant 500mL de milieu de culture stérilisé au préalable
- Bac en plastique de forme rectangulaire pouvant résister aux micro-ondes
- Micro-Ondes
- Protection en silicone pour attraper les bouteilles chaudes
- PSM
- Boîtes de Pétri
- Sopalin

- **Protocole détaillé**

- Allumer la PSM puis prendre une bouteille contenant 500mL de milieu stérile, ouvrir le bouchon (pas en totalité).
- Attacher un morceau de papier sopalin autour du col de la bouteille, et en déposer quelques feuilles dans le micro-onde au cas où la solution coulerai.
- Mettre la bouteille dans le bac en plastique et mettre le tout au micro-ondes pendant un premier laps de temps de 1min30.
- Sortir le bac lentement, bouchon tourné dans le sens inverse de soi, regarder l'état de liquéfaction, s'assurer que tout est en ordre et remettre la bouteille au micro-ondes pendant 1min30 de nouveau.
- A partir de maintenant il est important de bien surveiller la bouteille, car il pourrait y avoir des projections si le liquide boue trop longtemps. Il faut donc procéder à des fractionnements de temps de chauffe de 30s par 30s afin que le liquide ait un temps de repos entre chaque chauffage.
- Continuer ainsi jusqu'à ce que la solution soit totalement homogène, qu'il n'y ait plus la moindre présence de phase solide dans la bouteille. Sortir le bac du micro-onde et le positionner sous la PSM.
- Sortir la bouteille du bac, ranger ce dernier, ouvrir le bouchon et remplir les boîtes de pétri au $\frac{3}{4}$ afin que les micro-organismes aient suffisamment de matière pendant l'incubation (celle-ci pouvant durer 2 à 3 semaines).
- Une fois sèche, annoter les boîtes avec le nom du milieu, la date et ses initiales.
- Mettre les boîtes sèches couvercle vers le bas dans la chambre chaude pendant une nuit afin de vérifier s'il y a eu ou non contamination du milieu. En effet, la chaleur va permettre d'accélérer la croissance d'éventuelles bactéries indésirables.

- **Suivi des préparations de boîtes gélosées**

Date	Type de milieu	Quantité
Lundi 13 avril 2015	ISP2	16 boîtes avec 1L de milieu
Lundi 13 avril 2015	ISP2*	16 boîtes avec 1L de milieu
Jeudi 23 avril 2015	ISP2	16 boîtes avec 1L de milieu

Annexe 3 : Préparation de pré-cultures à des fins de backup.

- **Matériel nécessaire :**

- PSM
- Cryovials
- Portoir à cryovials
- Bouteille d'1L de milieu de culture liquide
- 10 Erlenmeyers (avec bouchons) de 50mL stériles
- 1 Erlenmeyer de 100mL stérile
- 1 pipette graduée jetable de 25mL
- 1 pipette graduée jetable de 5 mL.
- Pipetman électrique
- Pro-pipette de 1mL (1000µL)
- Cônes en plastique (tips)
- Agitateur réglé sur 200 rpm
- Feutre noir

- **Protocole détaillé :**

- Allumer la PSM (20 min à l'avance).
- Aller chercher les cryovials dans le congélateur à -80°C, prendre la boîte et refermer rapidement le congélateur afin d'éviter qu'il monte en température. Attention aux brûlures par le froid.
- Se saisir des derniers tubes de chaque rangée (chaque rangée représente une souche).
- Mettre les cryovials sur le portoir adéquat afin de les transporter jusqu'au laboratoire de microbiologie.
- Ne pas oublier de vérifier que le frigo est bien fermé après avoir remis la boîte dedans.
- Placer le portoir sous la PSM, prendre une bouteille de milieu liquide stérile, la mettre sous la PSM et en prélever 50mL que l'on va ensuite déposer dans un erlenmeyer de 100mL afin de ne pas contaminer la bouteille de milieu en pipetant directement dedans. Cette étape est réalisée grâce à une pipette graduée de 25mL et d'un pipetman électrique.
- Répéter ce prélèvement une deuxième fois afin d'avoir un volume total de 50mL de milieu (en avoir un peu plus est l'idéal afin de prévenir les erreurs d'échantillonnage)
- Une fois les 50mL prélevés et déposés dans l'erlenmeyer, boucher et jeter la pipette graduée.
- Enlever le papier aluminium de chacun des 10 erlenmeyers de 50mL stériles.
- Prélever ensuite 5mL de milieu avec une autre pipette graduée stérile de 5mL et les déposer dans un des 10 erlenmeyer. Faire de même avec les 9 autres puis boucher.
- Une fois que les cryovials sont décongelés à température ambiante, prélever 1mL de chaque souche avec une pro-pipette de 1000µL réglée sur 950µL et les déposer dans les erlenmeyers correspondants (annoté au préalable).

- Suivi des préparations de pré-cultures

Date	Souches
Mercredi 15 avril 2015	Souche M100-203 à souche M100-211
Vendredi 17 avril 2015 (ap)	Souche M100-833 à Souche M100-837 + Souches 916 et 917
Lundi 20 avril 2015	Souches M100-840 à Souche M100-848
Mardi 21 avril 2015	Souche M100-849 à Souche M100-857
Mercredi 22 avril 2015	Remise en pré-culture des souches M100-842 et 844 + Souche M100-858 à Souche M100- 866
Vendredi 24 avril 2015	Remise en pré-culture des souches M100- 842, 844, 854,856,858,860
Lundi 27 avril 2015	Remise en culture des souches M100-842, 844, 856,858, 860 dans du milieu M2 TCG
Lundi 27 avril 2015	Souche M100-867 à Souche M100-871
Mardi 28 avril 2015	Souche M100-212, 213, 215,217,218,219,220,221,222

Annexe 4 : Préparation de culture sur boîte de Pétri :

- **Matériel :**

- Boîtes de milieu gélosé
- Anse d'inoculation en plastique jetable
- Pro-pipette
- Tips
- PSM
- Feutre noir

- **Protocole détaillé :**

- Après avoir mis les différentes souches en pré-cultures, il doit rester environ 0,5 mL de souche dans chacun des cryovials utilisés.
- Diviser une boîte de Pétri en un certain nombre de secteurs (relatif au nombre de souches à étaler) avec un feutre noir, écrire le numéro de la souche correspondante à chacun des secteurs.
- Grâce à la pro-pipette réglée sur 50µL, pipeter ce qu'il reste dans le cryotube et le déposer sur un des secteurs de la boîte de Pétri.
- A l'aide d'une anse d'inoculation en plastique, étaler le liquide dans le secteur correspondant en commençant par l'extérieur de la manière suivante (Cf. Figure 12):

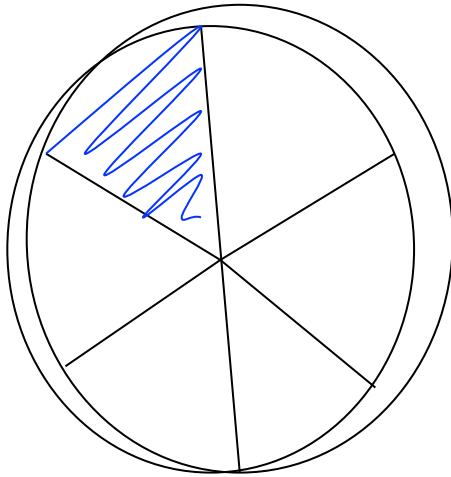


Figure 12. Schéma d'étalement sur boîte de Pétri divisée en 5 secteurs

- Jeter l'anse en plastique et en prendre une nouvelle pour la souche suivante.
- Répéter cette démarche pour le reste des souches, sans oublier de laisser un secteur de libre qui constituera le témoin.
- Ne pas oublier d'annoter les secteurs, du nom de chaque souche, ainsi que de marquer sur la boîte « Cryo Init » car ceci a été réalisé grâce à ce qu'il restait dans les cryotubes initiaux, la date et les initiales de l'expérimentateur.
- Déposer les boîtes de Pétri dans l'incubateur lui-même étant dans la chambre chaude.

- Suivi des différentes souches sur boîtes de Pétri :

Références des souches	Innocation sur ISP2 le :	2ème innocation sur ISP2* le :
Souche M100-203 à M100-209	Mercredi 15 avril 2015	
Souche M100-210	Mercredi 15 avril 2015	Mardi 21 avril 2015
Souche M100-211	Mercredi 15 avril 2015	Mardi 21 avril 2015
Souche M100-833 et M100-834	Vendredi 17 avril 2015 (ap)	
Souche M100-835	Vendredi 17 avril 2015 (ap)	Mardi 21 avril 2015
Souche M100-836 et M100-837	Vendredi 17 avril 2015 (ap)	
Souche 916 et 917	Vendredi 17 avril 2015 (ap)	Mardi 21 avril 2015
Souche M100-840 et M100	Lundi 20 avril 2015	
Souche M100-842	Lundi 20 avril 2015	Mercredi 22 avril 2015
Souche M100-843	Lundi 20 avril 2015	
Souche M100-844	Lundi 20 avril 2015	Mercredi 22 avril 2015
Souche M100-845 à M100-848	Lundi 20 avril 2015	
Souche M100-849 à M100-851	Mardi 21 avril 2015	
Souche M100-852 et M100-853	Mardi 21 avril 2015	Vendredi 24 avril 2015
Souche M100-854 et M100-855	Mardi 21 avril 2015	
Souche M100-856	Mardi 21 avril 2015	Vendredi 24 avril 2015
Souche M100-857	Mardi 21 avril 2015	
Souche M100-858	Mercredi 22 avril 2015	Vendredi 24 avril 2015
Souche M100-859	Mercredi 22 avril 2015	
Souche M100-860	Mercredi 22 avril 2015	Vendredi 24 avril 2015
Souche M100-861 à M100-866	Mercredi 22 avril 2015	
Souche M100-867	Lundi 27 avril 2015	
Souche M100-868	Lundi 27 avril 2015	Mercredi 29 avril 2015
Souche M100-869 et M100-870	Lundi 27 avril 2015	
Souche M100-871	Lundi 27 avril 2015	Mercredi 29 avril 2015
Souche M100-212 à M100-222	Mardi 28 avril 2015	

Annexe 5 : Préparation de milieux de cultures liquides.

- Matériel : (Pour préparer 6L soit 1L par bouteille)
 - 6 bouteilles de 100mL
 - Indicateur de stérilisation
 - Coupelle en plastique
 - Spatule en inox stérile
 - Eléments à incorporer
 - Barreau aimanté
 - Agitateur magnétique
 - Eprouvette d'1L
 - Bécher de 5000mL
 - Balance tarée
 - PSM
 - Feutre résistant à l'étape de stérilisation
- Composition du milieu :

Quantités pour 1L	Quantités pour 3L
TCG - Tryptone : 3g/litre - Casitose : 5g/litre - Glucose : 4g/litre - Instant Ocean : 16g/litre	TCG - Tryptone : 9g - Casitose : 15g - Glucose : 12g - Instant Ocean : 48g

- Protocole détaillé :

Identique à celui de préparation de milieux solides, seuls les éléments à incorporer diffèrent.

- Suivi des préparations de milieu de culture liquides.

Date	Type de milieu	Quantité
Jeudi 16 avril 2015	TCG	6L
Lundi 20 avril 2015	TCG	6L
Mardi 05 avril 2015	TCG	8L

Annexe 6 : Préparation de cryovials.

- Matériel :
 - 9 erlenmeyers contenant les pré-cultures préalablement préparées
 - 2 portoirs à cryovials
 - 9x9 = 81 Cryotubes ou Cryovials
 - Poche poubelle
 - Feutre résistant à la cryopréservation
 - Pro pipette de 1mL réglée sur 500µL
 - Glycérol à 50%
 - Ciseaux désinfectés
 - Eau de Javel
 - Tips (cônes)

- Protocole détaillé :
 - Allumer la PSM (20min en avance).
 - Se saisir des 9 erlenmeyers (le chiffre diffère selon le nombre de souches par boîte) contenant chacun une souche en culture laissée incubée pendant 2-3 jours.
 - Préparer 9 cryotubes pour chaque souche en les annotant de la référence de la souche, de la date du jour et de ses initiales.
 - Ouvrir une première rangée de 9 cryotubes correspondant à une seule et même souche, ouvrir l'erenmeyer de la souche correspondante et prélever 500µL de culture homogène et les transférer dans un cryotube.
 - Rajouter 500µL de glycérol à 50%⁶.
 - Répéter ce processus pour chacun des 8 autres cryotubes de la souche puis de manière générale, faire de même pour toutes les souches.
 - Déposer un « capuchon » vert sur le 1^{er} tube de chaque rangée de cryotubes, correspondant au premier cryotube de chaque souche.
 - Transférer les cryotubes du portoir dans une boîte en carton résistant à la cryopréservation (-80°C)
 - Amener la boîte dans le congélateur à -80°C.

⁶* protège les cellules contre le froid, les empêche d'éclater

- Suivi des préparations de cryovials

Date	Souches	Mise en Cryovials le :
Mercredi 15 avril 2015	Souche M100-203 à souche M100-211	Vendredi 17 avril 2015
Vendredi 17 avril 2015	Souche M100-833 à Souche M100-837 + Souches 916 et 917	Lundi 20 avril 2015 (matin)
Lundi 20 avril 2015	Souches M100-840 à Souche M100-848	Mercredi 22 avril 2015
Mardi 21 avril 2015	Souche M100-849 à Souche M100-857	Jeudi 23 avril 2015
Mercredi 22 avril 2015	Remise en pré-culture des souches M100-842 et 844 + Souche M100-858 à Souche M100- 866	Vendredi 24 avril 2015
Vendredi 24 avril 2015	Remise en pré-culture des souches M100- 842, 844, 854,856,858,860	Lundi 27 avril 2015 (matin)
Lundi 27 avril 2015	Remise en culture des souches M100-842, 844, 856,858, 860 dans du milieu M2 TCG	Mercredi 29 avril 2015
Lundi 27 avril 2015	Souche M100-867 à Souche M100-871	Mercredi 29 avril 2015
Mardi 28 avril 2015	Souche M100-212, 213, 215,217,218,219,220,221,222	Jeudi 30 avril 2015

Annexe 7 : Protocole de filtration de culture bactérienne.

- **Matériel :**

- Fiole à vide de 4L
- Fritté avec lit de sable
- Culture bactérienne
- Tuyau d'air pour faire le vide
- Solvant organique (Méthanol + Acétone)
- Méthanol
- Rotavapor

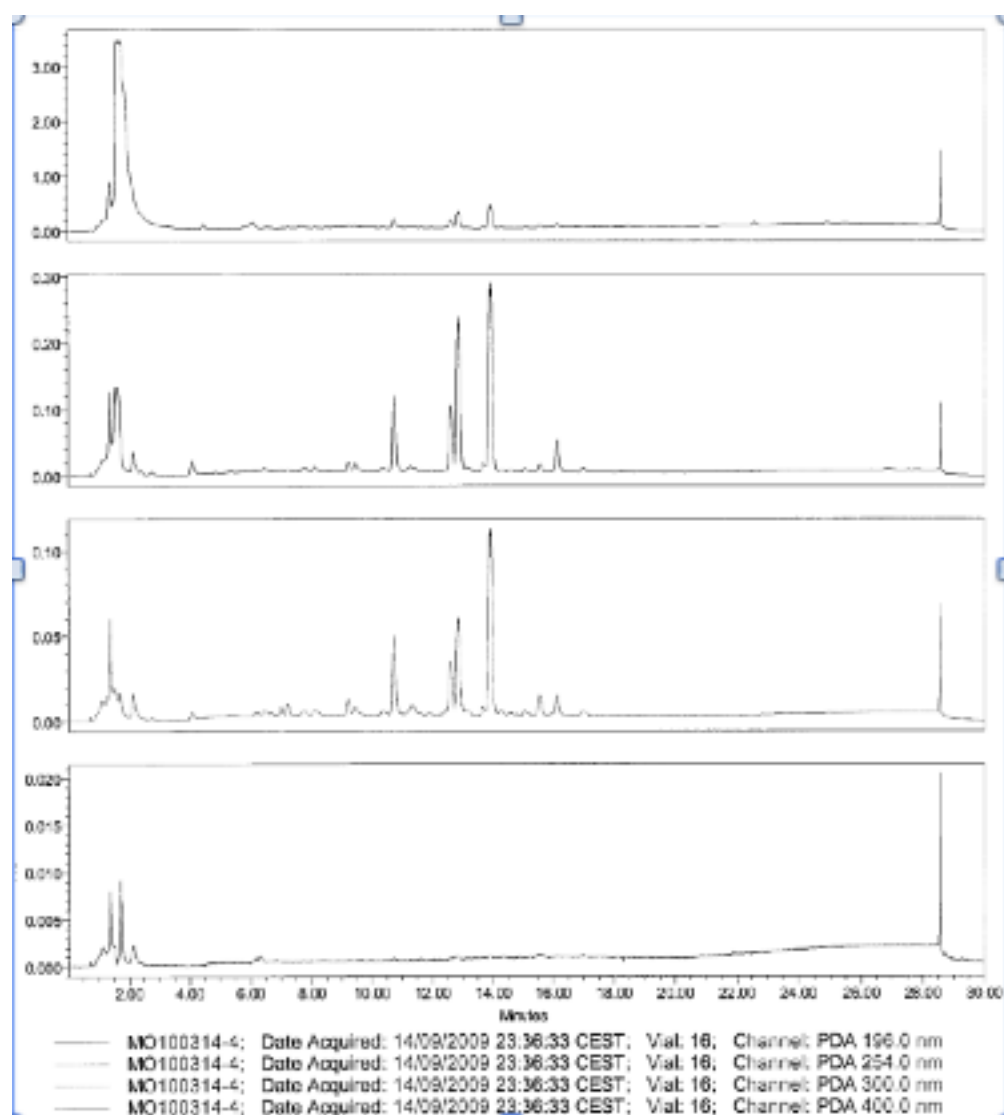
- **Protocole détaillé :**

- Assembler le fritté avec la fiole à vide et déposer le lit de sable permettant d'éviter le colmatage du fritté.
- Couler la culture bactérienne sur le fritté. Une fois la totalité de la culture versée, ouvrir le tuyau à vide afin de filtrer la culture. Ainsi, sur le lit de sable, il restera seulement la biomasse produite par les bactéries et la résine.
- Ensuite, rincer la résine avec un mélange eau-méthanol, et tirer à sec afin de bien assécher la résine et la biomasse.
- L'étape d'après consiste en la désorption de la résine par un solvant organique. Tous les métabolites que les bactéries ont produit se sont fixés sur la résine et se retrouvent désormais dans le filtrat.
- Sécher le filtrat récupéré à l'aide d'un rotavapor permettant l'évaporation des solvants. L'extrait sec final est ainsi obtenu.

Annexe 8 : Extrait de la DataBase réalisée lors du processus de backup de la collection du laboratoire.

Références des souches	Préculture	Innoculation sur ISP2 le :	Mise en Cryo le
Souche M100-203	Mercredi 15 avril 2015	Mercredi 15 avril 2015	Vendredi 17 avril 2015
Souche M100-204	Mercredi 15 avril 2015	Mercredi 15 avril 2015	Vendredi 17 avril 2015
Souche M100-205	Mercredi 15 avril 2015	Mercredi 15 avril 2015	Vendredi 17 avril 2015
Souche M100-206	Mercredi 15 avril 2015	Mercredi 15 avril 2015	Vendredi 17 avril 2015
Souche M100-207	Mercredi 15 avril 2015	Mercredi 15 avril 2015	Vendredi 17 avril 2015
Souche M100-208	Mercredi 15 avril 2015	Mercredi 15 avril 2015	Vendredi 17 avril 2015
Souche M100-209	Mercredi 15 avril 2015	Mercredi 15 avril 2015	Vendredi 17 avril 2015
Souche M100-210	Mercredi 15 avril 2015	Mercredi 15 avril 2015	Vendredi 17 avril 2015
Souche M100-211	Mercredi 15 avril 2015	Mercredi 15 avril 2015	Vendredi 17 avril 2015
Souche M100-833	Vendredi 17 avril 2015	Vendredi 17 avril 2015	Lundi 20 avril 2015 (matin)
Souche M100-834	Vendredi 17 avril 2015	Vendredi 17 avril 2015	Lundi 20 avril 2015 (matin)
Souche M100-835	Vendredi 17 avril 2015	Vendredi 17 avril 2015	Lundi 20 avril 2015 (matin)
Souche M100-836	Vendredi 17 avril 2015	Vendredi 17 avril 2015	Lundi 20 avril 2015 (matin)
Souche M100-837	Vendredi 17 avril 2015	Vendredi 17 avril 2015	Lundi 20 avril 2015 (matin)
Souche 916	Vendredi 17 avril 2015	Vendredi 17 avril 2015	Lundi 20 avril 2015 (matin)
Souche 917	Vendredi 17 avril 2015	Vendredi 17 avril 2015	Lundi 20 avril 2015 (matin)
Souche M100-840	Lundi 20 avril 2015	Lundi 20 avril 2015	Mercredi 22 avril 2015
Souche M100-841	Lundi 20 avril 2015	Lundi 20 avril 2015	Mercredi 22 avril 2015
Souche M100-842	Lundi 20 avril 2015	Lundi 20 avril 2015	Abandon
Souche M100-843	Lundi 20 avril 2015	Lundi 20 avril 2015	Mercredi 22 avril 2015
Souche M100-844	Lundi 20 avril 2015	Lundi 20 avril 2015	Abandon
Souche M100-845	Lundi 20 avril 2015	Lundi 20 avril 2015	Mercredi 22 avril 2015
Souche M100-846	Lundi 20 avril 2015	Lundi 20 avril 2015	Mercredi 22 avril 2015
Souche M100-847	Lundi 20 avril 2015	Lundi 20 avril 2015	Mercredi 22 avril 2015
Souche M100-848	Lundi 20 avril 2015	Lundi 20 avril 2015	Mercredi 22 avril 2015
Souche M100-849	Mardi 21 avril 2015	Mardi 21 avril 2015	Jeudi 23 avril 2015
Souche M100-850	Mardi 21 avril 2015	Mardi 21 avril 2015	Jeudi 23 avril 2015
Souche M100-851	Mardi 21 avril 2015	Mardi 21 avril 2015	Jeudi 23 avril 2015
Souche M100-852	Mardi 21 avril 2015	Mardi 21 avril 2015	Jeudi 23 avril 2015
Souche M100-853	Mardi 21 avril 2015	Mardi 21 avril 2015	Vendredi 24 avril 2015
Souche M100-854	Mardi 21 avril 2015	Mardi 21 avril 2015	Lundi 27 avril 2015
Souche M100-855	Mardi 21 avril 2015	Mardi 21 avril 2015	Jeudi 23 avril 2015
Souche M100-856	Mardi 21 avril 2015	Mardi 21 avril 2015	Abandon
Souche M100-857	Mardi 21 avril 2015	Mardi 21 avril 2015	Jeudi 23 avril 2015
Souche M100-858	Mercredi 22 avril 2015	Mercredi 22 avril 2015	Abandon
Souche M100-859	Mercredi 22 avril 2015	Mercredi 22 avril 2015	Vendredi 24 avril 2015
Souche M100-860	Mercredi 22 avril 2015	Mercredi 22 avril 2015	Mercredi 29 avril 2015
Souche M100-861	Mercredi 22 avril 2015	Mercredi 22 avril 2015	Vendredi 24 avril 2015
Souche M100-862	Mercredi 22 avril 2015	Mercredi 22 avril 2015	Vendredi 24 avril 2015
Souche M100-863	Mercredi 22 avril 2015	Mercredi 22 avril 2015	Vendredi 24 avril 2015
Souche M100-864	Mercredi 22 avril 2015	Mercredi 22 avril 2015	Vendredi 24 avril 2015
Souche M100-865	Mercredi 22 avril 2015	Mercredi 22 avril 2015	Vendredi 24 avril 2015
Souche M100-866	Mercredi 22 avril 2015	Mercredi 22 avril 2015	Vendredi 24 avril 2015

Annexe 9 : Exemple de Chromatogramme.



Annexe 10 : Répartition des différentes activités suivies au cours du stage.

Tableau 11 Proportion des différentes activités au cours des 7 semaines de stage

Activités\Semaines	Semaine n°1 (07/04/15- 14/04/15)	Semaine n°2 (14/04/15- 21/04/15)	Semaine n°3 (21/04/15- 28/04/15)	Semaine n°4 (28/04/15- 05/05/15)	Semaine n°5 (05/05/15- 12/05/15)	Semaine n°6 (12/05/15- 19/05/15)	Semaine n°7 (19/05/15- 26/05/15)
Lecture Réglementation							
Observation de manipulation							
Manipulation							
Bibliographie							
Rédaction							
Lecture rapports							
Répétition thèse							
Analyse des données récoltées							
Thèse							
Réunion							

Annexe 11 : Tableau des tâches lors des différentes manipulations observées ou réalisées au cours de ce stage.

Intervenant	Chromatographie en phase inverse HPLC, isolement de produits actifs et extraction	Bibliographie	Mise en place du protocole	Manipulation	Collecte de données	Analyse des résultats
Principal	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Secondaire	BC (BRUGIERE Chloé)			BC		

Intervenant	Séchage des échantillons (rotavapor)	Bibliographie	Mise en place du protocole	Manipulation	Collecte de données	Analyse des résultats
Principal	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Secondaire	BC			BC		

Intervenant	Préparation de vials	Bibliographie	Mise en place du protocole	Manipulation	Collecte de données	Analyse des résultats
Principal	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Secondaire	BC			BC		

Intervenant	Coulage d'un gel d'agarose pour électrophorèse	Bibliographie	Mise en place du protocole	Manipulation	Collecte de données	Analyse des résultats
Principal	NN	NN	NN	NN	NN	NN
Secondaire						

Intervenant	Electrophorèse et Radiophotographie	Bibliographie	Mise en place du protocole	Manipulation	Collecte de données	Analyse des résultats
Principal	NN	NN	NN	NN	NN	NN
Secondaire						

Intervenant	Préparation de milieux de cultures (solides + liquides)	Bibliographie	Mise en place du protocole	Manipulation	Collecte de données	Analyse des résultats
Principal	BC	BC	CI	BC	BC	BC
Secondaire	CI (CARLETTI Isabelle)					

Intervenant	Préparation de pré-cultures	Bibliographie	Mise en place du protocole	Manipulation	Collecte de données	Analyse des résultats
Principal	BC	BC	CI	BC	BC	BC
Secondaire						

Intervenant	Préparation de boîtes de cultures et inoculation	Bibliographie	Mise en place du protocole	Manipulation	Collecte de données	Analyse des résultats
Principal	BC	BC	CI	BC	BC	BC
Secondaire						

Intervenant	Préparation de cryovials	Bibliographie	Mise en place du protocole	Manipulation	Collecte de données	Analyse des résultats
Principal	BC	BC	CI	BC	BC	BC
Secondaire						

Intervenant	Chip et Q-PCR	Bibliographie	Mise en place du protocole	Manipulation	Collecte de données	Analyse des résultats
Principal	SM	SM	SM	SM	SM	SM
Secondaire						

COMMENT PRESERVER DES MICROORGANISMES DANS LE BUT DE REALISER UNE COLLECTION DE SOUCHES ?

Les microorganismes ont une place importante dans de nombreuses recherches. Une des raisons majeures de mener des études en bactériologie, est bien évidemment de lutter contre les maladies dont la plupart des bactéries sont la cause. La prévention et le contrôle de ces maladies souvent bénignes mais pouvant être grave, dépendent en majeure partie des efforts des bactériologistes, tant dans le domaine de la médecine humaine, vétérinaire sans oublier celui l'agriculture. Cependant, les bactéries pathogènes ne constituent en réalité qu'une faible partie de l'ensemble de la population bactérienne. En effet, la plupart des bactéries telles que les *Streptomyces*, ne représentent que peu ou pas de danger et beaucoup s'avèrent indéniablement utiles à l'Homme.

Etant donné l'importance croissante de l'utilisation de microorganismes du genre *Streptomyces* au sein des programmes de recherche de principes actifs, notamment ici dans les Laboratoires Pierre-Fabre pour la synthèse de nouveaux traitements thérapeutiques anti-cancéreux, il est nécessaire de maintenir et préserver ces microorganismes dans leur intégrité. Cette étude vise donc à déterminer les avantages et les inconvénients de chacune des méthodes de conservation rencontrées dans le laboratoire.

Mots clés : *Microbiologie, Streptomyces, cryopréservation, géloses, conservation, maintenance, Cancer, Epigénétique.*