

***Production de nouveaux antibiotiques
du groupe des dithioloxyrrolones par
Saccharothrix algeriensis après addition
de précurseurs dans le milieu de culture***

Mme MERROUCHE-BOUCENNA RABIAA

Soutenue le 14 Juin 2012 devant
M. SABAOU Nasseridine Professeur Directeur de thèse

le jury composé de: M. BELLAL Mohand Mouloud Professeur Président M. BENALLAOUA
Said Professeur Examineur M. AMMOUCHE Ali Professeur Examineur M. LEBRIHI Ahmed
Professeur Examineur

Table des matières

Dédicace . . .	5
REMERCIEMENTS . . .	6
RESUME . . .	7
SUMMARY . . .	8
ص خ لم . . .	10
Introduction générale . . .	11
Chapitre I : Revue bibliographique . . .	14
I.- GENERALITES SUR LES ACTINOMYCETES . . .	14
1.- Caractéristiques et position taxonomique des actinomycètes . . .	14
2.- Ecologie des actinomycètes . . .	15
3.- Intérêt des actinomycètes . . .	17
II.- LE GENRE SACCHAROTHRIX . . .	18
1.- Caractéristiques et position taxonomique du genre <i>Saccharothrix</i> . . .	18
2.- Espèces appartenant au genre <i>Saccharothrix</i> . . .	18
3.- Métabolites secondaires sécrétés par les espèces de <i>Saccharothrix</i> . . .	19
4.- Caractéristiques et position taxonomique de <i>Sa. algeriensis</i> . . .	20
5.- Spectre d'action de <i>Sa. algeriensis</i> . . .	20
III.- LES ANTIBIOTIQUES . . .	21
1.- Classification des antibiotiques . . .	21
2.- Microorganismes producteurs d'antibiotiques . . .	21
3.- Spectre d'action des antibiotiques . . .	24
4.- Mode d'action des antibiotiques . . .	24
5.- Biosynthèse des antibiotiques . . .	25
6.- Régulation de la biosynthèse des antibiotiques . . .	26
7.- Purification et détermination des structures chimiques des antibiotiques . . .	31
8.- Antibiotiques sécrétés par <i>Saccharothrix algeriensis</i> NRRL B-24137 . . .	34
IV.- LES ANTIBIOTIQUES DU GROUPE DES DITHIOLOPYRROLONES . . .	34
1.- Définition et classification . . .	35
2.- Propriétés physico-chimiques et spectroscopiques des dithiopyrrolones . . .	35
3.- Microorganismes producteurs de dithiopyrrolones . . .	36
4.- Spectre d'action des dithiopyrrolones . . .	39
5.- Mode d'action des dithiopyrrolones . . .	41
6.- Biosynthèse et synthèse chimique des dithiopyrrolones . . .	41
7.- Régulation de la biosynthèse des dithiopyrrolones . . .	44
8.- Domaines d'utilisation des dithiopyrrolones . . .	47
9.- Toxicité des dithiopyrrolones . . .	48
Chapitre II : Materiel et Méthodes . . .	49
I.- MATERIEL . . .	49
1.- Souche de <i>Saccharothrix algeriensis</i> . . .	49

2.- Souches de microorganismes-cibles . . .	49
3.- Conservation des microorganismes . . .	49
II.- METHODES . . .	50
1.- Mise en évidence de l'activité antibiotique sur milieu solide . . .	50
2.- Production des dithiopyrrolones en milieux liquides . . .	50
3.- Production et extraction des dithiopyrrolones . . .	53
4.- Mise en évidence des dithiopyrrolones par bioautographie . . .	54
5.- Semi purification des dithiopyrrolones . . .	55
6.- Purification finale des dithiopyrrolones par HPLC semi-préparative . . .	55
7.- Etudes spectroscopiques des nouvelles dithiopyrrolones . . .	56
8.- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des nouvelles dithiopyrrolones . . .	57
Chapitre III : Résultat et Discussion . . .	59
I.- MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANTIBIOTIQUE DE <i>SACCHAROTHRIX ALGERIENSIS</i> SUR MILIEU SOLIDE . . .	59
II.- CINETIQUES DE PRODUCTION DES ANTIBIOTIQUES DE <i>SACCHAROTHRIX ALGERIENSIS</i> SUR MILIEU SEMI-SYNTHETIQUE EN FONCTION DES ACIDES ORGANIQUES ET DES ACIDES AMINES . . .	61
1.- Résultats . . .	62
2.- Discussion . . .	78
III.- PRODUCTION, EXTRACTION ET PURIFICATION DES NOUVELLES DITHIOLOPYRROLONES INDUITES PAR L'AJOUT DE PRECURSEURS CHEZ <i>SA. ALGERIENSIS</i> . . .	81
1.- Résultats . . .	81
2.- Discussion et Conclusion . . .	94
VI.- ETUDES SPECTROSCOPIQUES ET DETERMINATION DES STRUCTURES CHIMIQUES DES DITHIOLOPYRROLONES . . .	96
1.- Résultats . . .	96
2.- Discussion et identification des structures chimiques des antibiotiques . . .	125
3.- Conclusion . . .	131
4.- Hypothèse sur les voies de biosynthèse des nouvelles dithiopyrrolones . . .	131
V.- DETERMINATION DES CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES DES DITHIOLOPYRROLONES . . .	138
conclusion générale . . .	142
Références Bibliographiques . . .	146
Annexes . . .	169
Annexe1 . . .	169
Annexe2 . . .	177

Dédicace

*Je remercie Dieu le Généreux pour m'avoir guidé vers la lumière de la recherche, du savoir et de la science. *A mes très chers parents qui m'ont tant soutenu tout au long de mes études par leurs sacrifices et leurs encouragements, qui ont toujours aimé me voir dans des hauts grades scientifiques et à qui j'exprime toute mon affection. *A mon mari pour son aide, son soutien et son amour. Qu'il reçoit à cette occasion l'expression de tout mon amour, de mes sentiments affectueux ainsi que ma reconnaissance pour sa patience et sa compréhension durant toute la période de la réalisation de cette thèse. *A mes deux enfants Maha et Anes. *A mes frères et soeurs. *A mes amies Hayet Neghliz et MALiKA Ajouti. *A la mémoire de mes deux enseignants de l'ENS de Kouba, Mr M. Rahali et Mr M. Zaoui. *A tous ceux qui me sont chers. Je dédie affectueusement ce travail. Rabiâa.*

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Recherche sur les Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse de l'Ecole Normale Supérieure d'Alger (LPBVB-ENS-Kouba) et au Laboratoire de Génie Chimique (UMR 5503, CNRS/INPT/UPS), au sein de l'équipe "Bioprocédés et Systèmes microbiens" de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (ENSAT-INPT).

Je tiens tout d'abord à exprimer à Mr le professeur N. Sabaou tous mes remerciements et toute ma gratitude pour m'avoir dirigé dans ce travail. C'est grâce à son aide, ses précieux conseils que ce document a pu aboutir.

Je voudrais également exprimer mes remerciements à M. le Professeur Ahmed LEBRIHI, pour son accueil bienveillant dans son laboratoire (INPT-ENSAT de Toulouse) dans le cadre de la bourse PNE, pour l'intérêt qu'il a continuellement porté à ce sujet, pour ses précieux conseils et aide et pour avoir accepté de juger ce travail.

J'exprime toute ma gratitude et mes remerciements à Monsieur le Professeur M.M. BELLAL qui m'a fait l'honneur de présider mon jury.

J'adresse mes vifs remerciements aux Professeurs, Monsieur S. BENALLAOUA et Monsieur A. AMMOUCHE qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Je tiens à remercier vivement les personnes qui ont contribué à la réalisation de la partie expérimentale de cette thèse: Messieurs Y. Coppel (CNRS de Toulouse) pour les spectres RMN et E. Leroy (Université P. SABATIER de Toulouse) pour les spectres de masse.

Je remercie également :

- Mr A. Zitouni et Mr N. Bouras pour leurs aides précieuses et leurs disponibilités durant la réalisation de cette étude.
- Mme Florence Mathieu pour son encouragement et sa gentillesse.
- Mes amis et collègues de l'ENS de Kouba: H. Neghliz, D. Boubetra, H. Boudjella, A. Meklat, L. Lamari, F. Boudjellal, M. Baha, B. Badji, S. Moukrane, S. Chaouch, M. Nebbali, S. Zebiri, K. Bouti, L. Saadi, S. Boumeridja, K. Ait Kaci, T. Benabdelkader, M. Touati, H. Rahali, F. Kadri, H. Nekhili, S. Krimat, R. Benyammi, K. Benmakhlouf, O. Toumatia, A. Yekkour, A. Aouiche, F. Rachedi, N. Khebizi, A. Matmoura, El-H. Driche et S. Belghit.
- Mes collègues et amis de laboratoire de Génie Chimique à Toulouse: S. Ben Maachia, R. Erakhi, M. Najar, F. Attia, N. Bacha, P. Nouvet et G. Vignaut.

Je remercie également tous les chercheurs du Laboratoire de Recherche sur les Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse, le Département des Sciences Naturelles et la Direction de la Post-Graduation de l'INA.

Je tiens à remercier la direction de l'ENS pour les facilités accordées tout le long de mon parcours universitaire.

Je voudrais exprimer mes remerciements à toute personne que j'ai oubliée de citer et qui aurait aidé ou contribué à la réalisation de cette thèse.

RESUME

La souche d'actinomycète *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 produit plusieurs antibiotiques à activité antifongique et antibactérienne et appartenant au groupe des dithiopyrrolones. Ce groupe d'antibiotiques est constitué par un bi-cycle (provenant de la cyclisation de la cystine) contenant de l'azote et du soufre, ainsi que d'une chaîne latérale qui résulte d'un accolement d'un acide organique au noyau cyclique par une liaison amide.

Sa. algeriensis produit sur milieu semi-synthétique (SS) plusieurs antibiotiques dont cinq ont été identifiés précédemment à la thiolutine, la tigloyl-pyrrothine, la sénécioyl-pyrrothine, la butanoyl-pyrrothine et l'isobutyryl-pyrrothine.

Notre travail a pour but d'obtenir de nouveaux dérivés de dithiopyrrolones, après addition au milieu SS d'acides organiques (acide valérique, acide sorbique et acide cinnamique) et d'acides aminés (cystine et arginine).

Une cinétique de croissance et de production des antibiotiques est réalisée en milieu SS témoin (sans précurseurs) et en milieu SS additionné d'acides organiques et aminés cités précédemment. L'évolution de la biomasse, du pH et de l'activité antimicrobienne, ainsi que le dosage par HPLC analytique de tous les antibiotiques nouvellement apparus, ont été effectués. L'activité antimicrobienne est plus intéressante après addition des précurseurs par rapport au milieu témoin.

L'analyse des extraits des milieux de culture additionnés de ces précurseurs par HPLC analytique sur colonne C18 a montré l'apparition de nouveaux pics différents de ceux produits dans le milieu témoin. Ainsi, l'acide valérique a induit chez *Sa. algeriensis* l'apparition de trois nouvelles molécules (PR3, PR4 et PR7), l'acide sorbique, de cinq nouvelles molécules (PR2, PR8, PR9, PR10 et PR11), l'acide cinnamique, d'une nouvelle molécule (PR5), la cystine, d'une nouvelle molécule (Cyst1) et l'arginine, de trois nouvelles molécules (Arg2, Arg3 et Arg4). La concentration de AJ0 (présente en petite quantité dans le témoin) a été augmentée en présence de précurseurs.

Les nouvelles molécules apparues ont été purifiées par HPLC semi-préparative sur colonne C18. Les structures chimiques de 11 dithiopyrrolones ont été déterminées par analyses spectroscopiques. La pyrrothine AJ0 a été identifiée à la formyl-pyrrothine, la PR3 à l'auréothricine, la PR4 à l'isovaléryl-pyrrothine, la PR7 à la valéryl-pyrrothine, la PR5 à la benzoyl-pyrrothine, la PR2 à la crotonyl-pyrrothine, la PR8 à la sorbyl-pyrrothine, la PR9 à la 2-hexonyl-pyrrothine, la PR10 à la méthyl-3-pentényl-pyrrothine, la PR11 à l'isopentyl-formyl-pyrrothine et enfin la Cyst1 à l'holomycine.

Toutes ces dithiopyrrolones sont nouvelles pour *Sa. algeriensis*. Deux d'entre elles (PR3 et Cyst1) sont connues pour être sécrétées par quelques espèces de *Streptomyces*, et huit autres (AJ0, PR2, PR4, PR7, PR8, PR9, PR10 et PR11) sont originales. Leurs voies de biosynthèses sont discutées.

Les concentrations minimales inhibitrices des nouvelles molécules ont été déterminées contre plusieurs germes phytopathogènes ou pathogènes ou toxigènes pour l'homme. Une activité forte contre les bactéries à Gram positif et forte à moyenne contre les champignons a été observée. Cette activité varie selon la structure des dithiopyrrolones.

Mots clés: *Saccharothrix algeriensis*, dithiopyrrolones, précurseurs, acides organiques, acides aminés, cinétique de production, concentrations minimales inhibitrices.

SUMMARY

The actinomycete strain *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 produces several dithiopyrrolone antibiotics with antibacterial and antifungal activities. This group of antibiotics contained two rings (synthesized from the cyclization of cystine) containing nitrogen and sulfur, linked to a side chain resulted from adding organic acid to the nucleus pyrrothine by an amide bond.

Sa. algeriensis produces on semi-synthetic medium (SS) five antibiotics which were characterized previously as thiolutin, tigloyl-pyrrothine, seneciroyl-pyrrothine, butanoyl-pyrrothine and isobutyryl-pyrrothine.

This work aimed to induce the biosynthesis of new dithiopyrrolone derivatives, after addition of organic acids (valeric acid, sorbic acid and cinnamic acid) and amino acids (cystine and arginine) to SS medium.

Kinetics of growth and antibiotic production were carried out in SS medium (without adding precursors) and in SS medium supplemented with organic and amino acids cited above. The evolution of the biomass, the pH, the antimicrobial activity, and the analysis of all new obtained antibiotics by analytical HPLC, were carried out in this study. The antimicrobial activity is more interesting after addition of the organic or amino acids (as precursors) by comparison to the basic SS medium.

The analysis of the extracts of the culture media supplemented with precursors, by analytical HPLC on C18 column, showed the appearance of new peaks different from those produced in the basic SS medium. Thus, the valeric acid added to *Sa. algeriensis* culture induced the appearance of three new molecules (named PR3, PR4 and PR7), sorbic acid induced the production of five new molecules (PR2, PR8, PR9, PR10 and PR11) and the cinnamic acid induced the new molecule PR5. Furthermore, cystine induced the new molecule Cyst1 and the arginine induced three new molecules (Arg2, Arg3 and Arg4). The concentration of AJ0 (presents in small quantity in the control) was increased in the presence of the precursors.

The new obtained molecules were purified by semi-preparative HPLC on C18 column. The chemical structures of the 11 dithiopyrrolones were determined by spectroscopic analyses. The molecule AJ0 was characterized as formyl-pyrrothine, PR3 as aureothricin, PR4 as isovaleryl-pyrrothine, PR7 as valeryl-pyrrothine, PR5 as benzoyl-pyrrothine, PR2 as crotonyl-pyrrothine, PR8 as sorbyl-pyrrothine, PR9 as 2-hexonyl-pyrrothine, PR10 as methyl-3-pentenyl-pyrrothine, PR11 as isopentyl-formyl-pyrrothine, and finally Cyst1 as holomycin.

All these dithiopyrrolones are new compounds from the cultures of *Sa. algeriensis*. Two of these compounds (PR3 and Cyst1) are known to be secreted also by some species of *Streptomyces*; however, height other compounds (AJ0, PR2, PR4, PR7, PR8, PR9, PR10 and PR11) are original, and never reported before in nature or prepared synthetically. Moreover, the biosynthetic pathway of these antibiotics has been discussed.

The minimum inhibitory concentrations of the new induced antibiotics were determined against several microorganisms (phytopathogenic, or human pathogenic, or toxinogenic). A strong activity against Gram positive bacteria and moderate to strong activity against filamentous fungi was observed. This antimicrobial activity is related to the structures of different dithiopyrrolone derivatives.

Key words: *Saccharothrix algeriensis*, dithiopyrrolones, precursors, organic acids, amino acids, kinetics of production, minimum inhibitory concentrations.

ص خ لم

تنتج عزلة *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 الحديد من المضادات الحيوية ذات الفعالية ضد الفطريات والبكتيريا، والتي تنتمي إلى عائلة Les dithiopyrrolones. تتكون عائلة المضادات الحيوية هذه من حلقتين تحتويان على الأزوت والكبريت، وعلى سلسلة جانبية تتجذع عن اتحاد حمضا عضويا بالنقوة الحلقية بواسطة رابطة ببتيدية. تنتج *Saccharothrix algeriensis* في وسط شبه مركب Milieu semi-synthétique (SS) الحديد من المضادات الحيوية، خمسة منها تم التعرف عليها سابقا، وهي: la sénéciol-pyrrothine · la butanoyl-pyrrothine · la thiolutine · l'isobutyryl-pyrrothine و la tigloyl-pyrrothine.

إن الهدف من هنا البحث هو الحصول على مشتقات جديدة لـ dithiopyrrolones، وذلك بعد إضافة الأحماض العضوية (acide valérique, acide sorbique et acide cinnamique) والأحماض الأمينية (cystine et arginine). لقد تم تتبع نمو وإنتاج المضادات الحيوية في الوسط الغذائي الشاهد والوسط الغذائي الذي أضيف له الأحماض العضوية والأحماض الأمينية سابقة الذكر. لقد تم تتبع أيضا الـ pH، الفعالية ضد الميكروبات ومعايرة كل المضادات الحيوية الجديدة الظهور بواسطة جهاز الـ HPLC التحليلي. لوحظ أن الفعالية ضد الميكروبات كانت أكثر أهمية بعد إضافة الأحماض العضوية والأحماض الأمينية مقارنة بالوسط الشاهد (دون أحماض).

إن تحليل مستخلصات الأوساط الغذائية التي أضيف لها هذه الأحماض بواسطة جهاز الـ HPLC التحليلي، وذلك باستعمال colonne C18، أبان عن ظهور تراكيب جديدة مختلفة عن تلك التي تنتج في الوسط الشاهد. حيث حقن حمض الفاليرييك (*Acide valérique*) عند *Saccharothrix algeriensis* ظهور ثلاثة مركبات جديدة (PR3 و PR4 و PR7)، حمض الصوريك (*Acide sorbique*) خمسة مركبات جديدة (PR2 و PR8 و PR9 و PR10 و PR11)، حمض السيناميك (*Acide cinnamique*) مركب واحد جديد (PR5)، السيستين (*Cystine*) مركب واحد جديد (Cyst1) والأرجينين (*Arginine*) ثلاثة مركبات جديدة (Arg2 و Arg3 و Arg4). ارتفع تركيز المركب (AJ0) (المترابج بكمية قليلة في الوسط الغذائي الشاهد) بعد إضافة مختلف الأحماض سالفة الذكر.

لقد تم تتبقة جميع المركبات الجديدة الظهور بواسطة جهاز HPLC semi-préparative كما تم تحديد التراكيب الكيميائية لـ 11 مضاد حيوي باستعمال التحليل الطيفي Analyses spectroscopiques. المركب (AJ0) حدد تركيبه الكيميائي بـ: la fomyl-pyrrothine · PR3 بـ: l'auréothincine · PR4 بـ: l'isovaléryl-pyrrothine · PR7 بـ: la valéyl-pyrrothine · PR2 بـ: la crotonyl-pyrrothine · PR8 بـ: la sorbyl-pyrrothine · PR9 بـ: la 2-hexonyl-pyrrothine · PR10 بـ: la méthyl-3-pentényl-pyrrothine · PR11 بـ: l'isopentyl-fomyl-pyrrothine · PR5 بـ: la benzoyl-pyrrothine و أخيرا Cyst1 بـ: l'holomycine.

كل هذه المضادات الحيوية جديدة بالنسبة لـ *Saccharothrix algeriensis*، إتان من بينها معروفة بأنها تفرز من طرف بعض أنواع *Streptomyces* و السبعة الأخرى (AJ0، PR2، PR4، PR7، PR8، PR9 و PR11) هي مضادات حيوية جديدة.

تم تحديد التراكيز المثبطة الدنيا Les concentrations minimales inhibitrices للمضادات الحيوية الجديدة ضد الحديد من الجراثيم الممرضة للثدييات و الممرضة أو السامة للإنسان. لوحظت فعالية عالية ضد البكتيريا الموجبة الغرام وعالية إلى متوسطة ضد الفطريات. تختلف هذه الفعالية حسب طبيعة المضاد الحيوي (La dithiopyrrolone).

الكلمات المفتاحية: *Saccharothrix algeriensis* · Les dithiopyrrolones · البدائل، أحماض عضوية، أحماض أمينية، حركة الإنتاج، التراكيز المثبطة الدنيا.

Introduction générale

Les microorganismes sont la source de nombreux médicaments, notamment, les antibiotiques antibactériens et antifongiques, les antiviraux, les antitumoraux, les antiparasitaires, les immunosuppresseurs, etc. De nombreux métabolites secondaires bioactifs sont produits par des microorganismes, mais seulement 150 d'entre eux sont utilisés dans la pharmacologie, l'agriculture ou d'autres domaines (Strohl *et al.*, 2001; Berdy, 2005). Plus de 10 000 de ces composés sont produits par les actinomycètes, et 80% sont utilisés dans la pratique (Sanglier, 1990; Berdy, 2005). Parmi les actinomycètes environ 7600 composés sont sécrétés par des espèces du genre *Streptomyces* (Berdy, 2005).

Les antibiotiques sont des substances d'origine naturelle ou synthétique capables d'empêcher la multiplication de certains microorganismes ou de les détruire. Ils sont classés en familles en fonction de leur structure chimique, leur origine, leur mécanisme d'action et leur spectre d'action (Berdy *et al.*, 1987; Bycroft, 1988; Yala *et al.*, 2001). Les antibiotiques d'origine naturelle sont produits par des microorganismes procaryotes, des champignons inférieurs, des végétaux et des animaux.

Même si la découverte des antibiotiques est loin de contrôler toutes les maladies infectieuses, elle a cependant constitué une véritable révolution thérapeutique et a permis de sauver des millions de vie. Pour cela, la recherche de nouvelles molécules actives reste l'une des priorités, surtout avec la prolifération des souches microbiennes pathogènes résistantes aux antibiotiques disponibles sur le marché mondial. Les microorganismes et les extraits végétaux ont été à cet effet très exploités (Bryskier, 1999; Wang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Bill *et al.*, 2009). Plusieurs stratégies de recherche ont été mises en oeuvre afin de garantir dans le futur la disponibilité d'antibiotiques efficaces (Stead, 1997). L'une d'elles vise la recherche de souches d'actinomycètes appartenant à des genres rares ou peu fréquents (autres que le genre *Streptomyces*) et provenant d'écosystèmes extrêmes ou particuliers (température, salinité, pH, etc.) (Donadio *et al.*, 2002; Gupte *et al.*, 2002). Pour s'adapter à ces environnements extrêmes, les actinomycètes rares disposeraient d'un système enzymatique et d'un métabolisme particuliers leur permettant de produire des métabolites secondaires originaux dont les antibiotiques. En effet, cette fraction d'actinomycètes s'est révélée être une source potentielle d'antibiotiques intéressants (Lazzarini *et al.*, 2000; Newman *et al.*, 2003; Gathogo *et al.*, 2004).

Les sols sahariens, particulièrement ceux des palmeraies algériennes, se sont révélés être très diversifiés en genres d'actinomycètes, y compris ceux connus pourtant pour être rares ou peu fréquents dans le monde. Plusieurs souches isolées diffèrent morphologiquement et physiologiquement des espèces connues et beaucoup sécrètent des substances à activités antifongiques et antibactériennes (Sabaou *et al.*, 1998). Parmi ces souches, *Saccharothrix* sp. SA233 a retenu l'attention par sa forte activité antibactérienne et antifongique. Cette souche d'actinomycète isolée par Boudjella (1994), a été déterminée par la suite comme étant une nouvelle espèce, nommée *Saccharothrix algeriensis* (Zitouni *et al.*, 2004c), laquelle a été déposée dans deux collections mondiales, NRRL et DSM, sous les numéros d'accèsion NRRL B-24137 et DSM 44581.

Sa. algeriensis produit des antibiotiques à spectre d'action large, ayant une activité antibactérienne et antifongique assez puissante *in vitro*, touchant plusieurs bactéries à Gram

positif, des champignons filamenteux (phytopathogènes et toxigènes) et des levures (Lamari, 2006).

Cette souche produit sur milieu organique complexe (ISP2) sept antibiotiques appartenant à la famille des dithiopyrrolones (Lamari, 2006). Cette famille de composés regroupe des dérivés possédant un bi-hétérocycle 1,2-dithiolo-[4,3-b]pyrrol-5(4H). Lamari *et al.* (2002b) ont déterminé la structure chimique de sept molécules dithiopyrrolones chez *Sa. algeriensis*: la thiolutine, l'isobutyropyrrrothine, la sénéciol-pyrrothine, la butanoyl-pyrrothine, la tigloyl-pyrrothine, la benzoyl-pyrrothine et la pentanoyl-pyrrothine (Lamari, 2006). La thiolutine est produite aussi par diverses espèces de *Streptomyces* (Celmer et Solomons, 1955 et 1963; Yamagishi *et al.*, 1971) et l'isobutyropyrrrothine par *Streptomyces pimprina* (Bhate *et al.*, 1960). Les autres molécules sont propres à *Sa. algeriensis*. Ces dithiopyrrolones sont constituées d'un noyau pyrrothine formé de deux cycles accolés et diffèrent entre elles par la nature de l'acide organique relié au noyau cyclique par une liaison amide (Lamari *et al.*, 2002a,b).

Bouras (2005) et Bouras *et al.* (2006a,b et 2007) ont étudié l'effet de 83 acides organiques et 20 acides aminés sur la production des dithiopyrrolones sécrétées par *Sa. algeriensis* dans un milieu semi-synthétique. Ces auteurs ont constaté qu'à une concentration optimale de 5 mM, certains de ces composés ont favorisé la production de dithiopyrrolones déjà existantes et d'autres, la production d'autres dithiopyrrolones détectées par HPLC et différenciées de celles pré-existantes par leurs temps de rétention et leur spectre UV-visible. La structure chimique de ces dithiopyrrolones nouvellement apparues n'a pas été déterminée.

Furumai *et al.*, (1982) et De la Fuente *et al.*, (2002) ont rapporté l'existence, chez certains microorganismes, d'une réaction d'acylation d'un noyau pyrrothine ou holothine par un acide organique activé sous forme d'acyl-CoA dans la formation des dithiopyrrolones.

Certains auteurs ont commencé à étudier les voies de biosynthèse des dithiopyrrolones et aussi la grande flexibilité de *Sa. algeriensis* dans l'utilisation de différents précurseurs pour la synthèse des dithiopyrrolones. Ainsi, Chorin *et al.* (2009) ont mis en évidence l'existence d'une activité enzymatique pyrrothine N-acyltransférase chez *Sa. algeriensis* envers deux substrats modèles: l'acétyl-CoA et le benzoyl-CoA. Cet auteur a pu réaliser une synthèse enzymatique de nouvelles dithiopyrrolones chez cette souche d'actinomycète.

L'objectif de ce travail est la production et la détermination des structures chimiques de nouvelles dithiopyrrolones produites par *Sa. algeriensis* après l'ajout de précurseurs au milieu de culture, ainsi que leur activité antimicrobienne. Pour cela, nous avons considéré les résultats de Bouras (2005) et Bouras *et al.* (2008) qui ont montré que les meilleurs composés ayant induit la formation de nouvelles dithiopyrrolones (constaté par HPLC, par l'apparition de nouveaux pics) sont l'acide valérique, l'acide sorbique, l'acide cinnamique, la cystine et l'arginine. Nous avons donc retenu ces composés comme précurseurs.

Le premier chapitre est consacré à une revue bibliographique sur les actinomycètes et le genre *Saccharothrix*, ainsi que sur les antibiotiques d'une manière générale et les dithiopyrrolones en particulier.

Le deuxième chapitre fait état de la description du matériel et des méthodes utilisés.

Le troisième chapitre est relatif aux résultats obtenus et à leur discussion. Ces résultats portent sur:

- La mise en évidence de l'activité antibiotique de *Sa. algeriensis* sur milieu solide.

- Les cinétiques de croissance de *Sa. algeriensis* et de production des dithiopyrrolones sur milieu semi-synthétique en fonction des trois acides organiques et deux acides aminés précédemment cités.
- La production, l'extraction et la purification de nouvelles dithiopyrrolones induites par l'addition de ces précurseurs chez *Sa. algeriensis*.
- La détermination des structures chimiques des dithiopyrrolones après analyses spectrométriques (spectrométrie de masse) et spectroscopiques (UV-visible et résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13).
- La détermination des concentrations minimales inhibitrices des nouvelles dithiopyrrolones contre plusieurs microorganismes dont des agents pathogènes et/ou toxigènes pour l'homme et des agents phytopathogènes.

Chapitre I : Revue bibliographique

I.- GENERALITES SUR LES ACTINOMYCETES

1.- Caractéristiques et position taxonomique des actinomycètes

Les actinomycètes sont des microorganismes procaryotes appartenant à l'Ordre des *Actinomycetales*. Dans les éditions de 1989, 1994 et 2004 du Manuel de Bergey, cet Ordre fut défini comme regroupant des bactéries à Gram positif, qui ont une tendance plus au moins prononcée à former un mycélium, qui possèdent un pourcentage en "guanine-cytosine" relativement élevé dans leurs ADN (supérieur à 55 %), et qui forment un groupe homogène sur la base des données de la biologie moléculaire (séquençage de l'ADN ribosomique 16S, hybridation ADN-ADN). Ce sont des microorganismes généralement aérobies, saprophytes et chimioorganotrophes. Leur cycle biologique est semblable à celui de certains champignons, mais leur structure procaryotique, sans noyau distinct, les a classés parmi les bactéries (Figure 1).

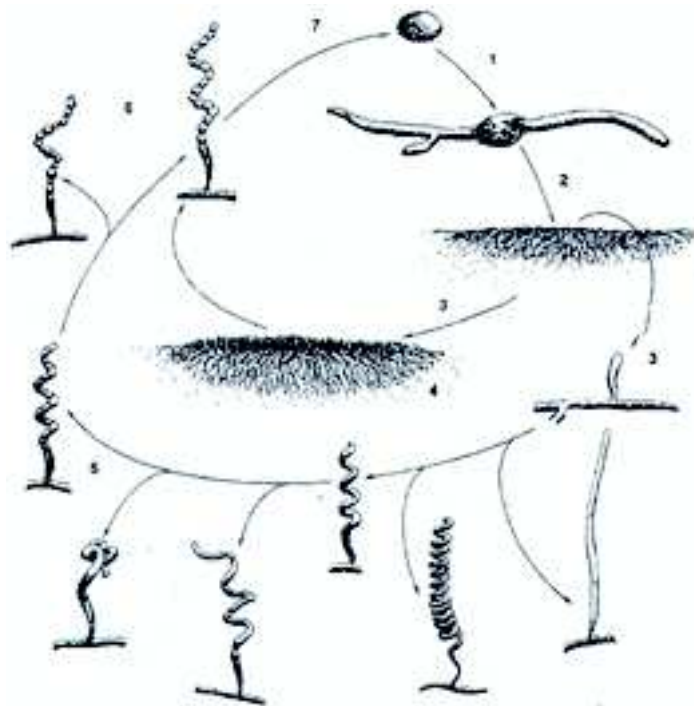


Figure 1. Cycle biologique des actinomycètes.

Le cycle décrit les apparences microscopiques d'une colonie d'actinomycète et montre les étapes de développement du mycélium et des spores. 1: germination de la spore; 2: formation du mycélium du substrat; 3 et 4: développement du mycélium aérien; 5: formation de chaînes de spores unicellulaires; 6: maturation des spores; 7: libération des spores (Kieser *et al.*, 2000).

L'Ordre des *Actinomycetales* regroupe des genres d'une grande variabilité morphologique, allant du cocci (ex.: *Micrococcus*), à un cycle bâtonnet-cocci (ex.: *Arthrobacter*), en passant par ceux qui produisent des hyphes qui se fragmentent soit totalement (ex.: *Rhodococcus*), soit partiellement (ex.: *Nocardia*) ou encore des hyphes persistantes formant un mycélium du substrat (ou végétatif) uniquement (*Micromonospora*, *Actinoplanes*, etc.) ou un mycélium du substrat surmonté par un mycélium aérien (*Streptomyces*, *Actinomadura*, *Nocardiopsis*, *Saccharothrix*, etc.).

La taxonomie des actinomycètes est basée sur plusieurs critères: morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. Les critères morphologiques font appel aux caractéristiques culturelles sur différents milieux de culture et aux caractéristiques micromorphologiques. La micromorphologie des principaux genres d'actinomycètes est illustrée dans la figure 2. Les caractères chimiques (chimiotaxonomie) consistent à mettre en évidence les constituants majeurs des actinomycètes qui se trouvent au niveau de la paroi cellulaire (présence des formes LL ou DL de l'acide diaminopimélique et présence ou non de glycine), de la membrane plasmique (phospholipides, ménaquinones et acides gras) et des cellules entières (sucres taxonomiquement importants: arabinose, galactose, madurose, rhamnose et xylose). Les critères physiologiques sont déterminées par l'étude de la capacité de l'actinomycète à utiliser ou non divers composés organiques (sources de carbone, sources d'azote, autres composés) et à tolérer ou non divers agents physiques (température, pH) et chimiques (antibiotiques et autres substances inhibitrices). Les études moléculaires sont très importantes pour retracer les parentés phylogénétiques des souches et pour déterminer les espèces. Les principales études sont le séquençage de l'ADN ribosomique 16S, l'hybridation ADN-ADN, et éventuellement la détermination du pourcentage en "guanine-cytosine". L'identification des genres est facilitée par les études morphologiques et chimiques tandis que les critères physiologiques et moléculaires séparent les espèces.

2.- Ecologie des actinomycètes

Les actinomycètes sont universellement répandus. Ils constituent en général 10 à 20% du total de la microflore tellurique (Dommergues et Mangenot, 1970; Ishizawa et Araragi, 1976). Ils sont présents dans l'air, le fumier et le compost, le foin et les pailles, les graines de céréales, les résidus fibreux de canne à sucre, le pollen des plantes et bien d'autres substrats (Lacey, 1973; Goodfellow et Williams, 1983). Ils sont retrouvés dans les débris végétaux et les litières, les sols glaciaires de l'Arctique, les déserts chauds et secs de divers continents, les sols pollués par du pétrole ou des métaux lourds, les lacs extrêmement alcalins et dans certains milieux très salés (Lechevalier, 1981; Moncheva *et al.*, 2002). Les actinomycètes sont présents aussi dans les milieux aquatiques: lacs, rivières, ruisseaux, mers et océans (Goodfellow et Williams, 1983; Bruns *et al.*, 2003).

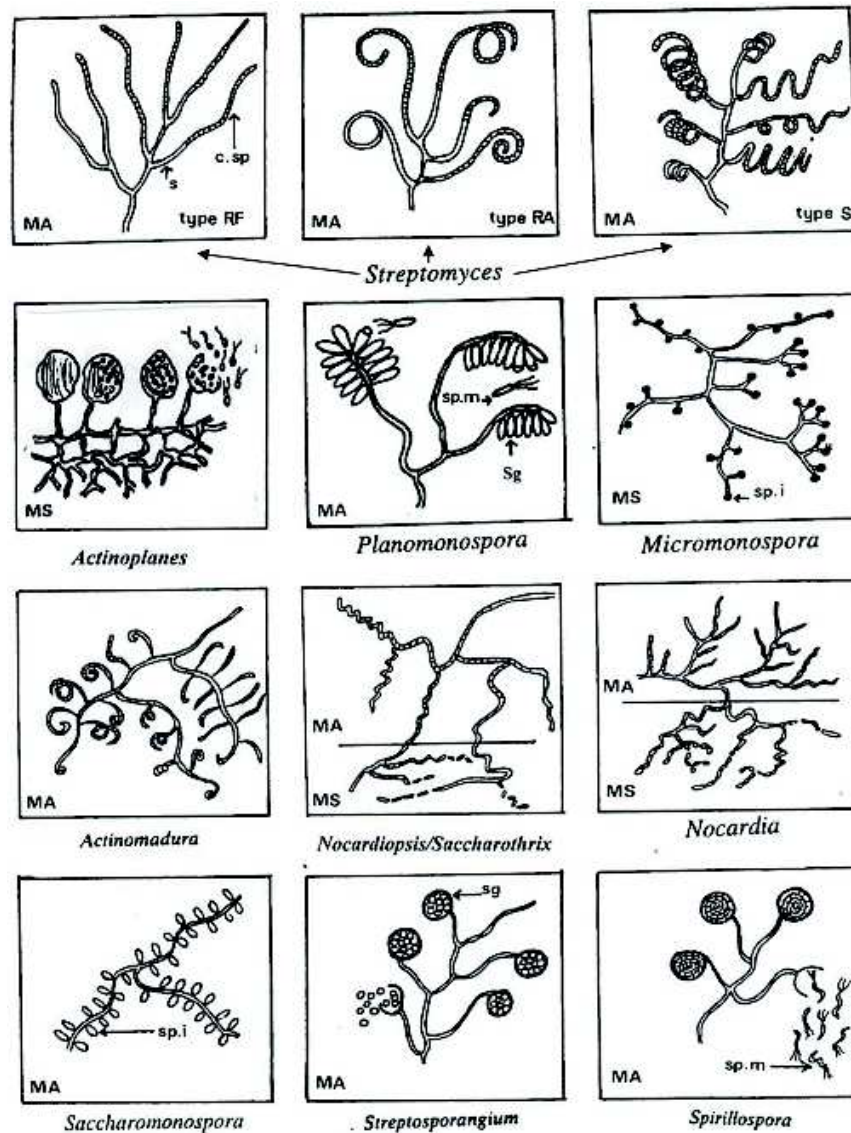


Figure 2. Micromorphologie des principaux genres d'actinomycètes (Sabaou, 1988).

MA, mycélium aérien; MS, mycélium du substrat; RF, *Rectus Flexibilis* (chaînes de spores droites à flexueuses); RA, *retinaculum Apertum* (chaînes en crochets ou en boucles fermées); S, *Spira* (chaînes spiralées); s, sporophores; c. sp., chaînes de spores; sp.i., spores isolées; sp.m., spores mobiles; sg., sporanges.

La majorité des actinomycètes est strictement saprophyte. Cependant, certains sont pathogènes pour l'homme et appartiennent à quelques espèces de *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Nocardiosis*, *Actinomyces* ou *Streptomyces* (Lacey, 1997; Peltola et al., 2001). D'autres sont pathogènes pour les plantes, tel que *Streptomyces scabies*, qui cause la galle de la pomme de terre et de la betterave (El-Sayed et al., 2000).

En Algérie, dans les sols sahariens, les actinomycètes constituent 15 à 60% de la microflore totale et parfois même jusqu'à 85%. Le pourcentage peut dépasser les 90% dans les horizons de sol des palmeraies situés entre 1 et 2 m de profondeur, avec une prédominance des *Streptomyces*, mais parfois même des *Micromonospora*, des *Actinomadura* ou des *Nocardioïdes* (Sabaou et al., 1980; Sabaou et al., 1992; Sabaou

et al., 1998). Des genres peu fréquents à rares dans le monde sont retrouvés parfois en quantités appréciables dans les sols des palmeraies, comme par exemple, *Nocardioopsis*, *Saccharothrix*, *Streptosporangium*, *Planomonospora*, etc. (Boudjella, 1994; Sabaou *et al.*, 1998).

Le genre *Saccharothrix* est isolé en très petits nombres à partir de divers substrats et écosystèmes. On le trouve dans les sols, les gisements de minéraux, les eaux usées, les eaux et les sédiments des océans, les sols sahariens, les sols salés et alcalins, etc. (Athalye *et al.*, 1985; Sabaou *et al.*, 1998). Ce genre, comme la majorité des actinomycètes, est saprophyte et aérobie stricte.

3.- Intérêt des actinomycètes

3.1.- Intérêt dans le domaine industriel

Les actinomycètes jouent un rôle très important dans le domaine industriel. Ils représentent la plus grande source d'antibiotiques (environ 70% des molécules actives d'origine microbienne) dont plusieurs sont utilisés dans la thérapeutique (Berdy, 2005; Zhao *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2010). Ils peuvent produire également des substances intéressantes, telles que les vitamines, les vasodilatateurs, les activateurs immunitaires, les antihistaminiques ainsi que diverses enzymes utilisées dans les industries; ils interviennent aussi dans la bioconversion des stéroïdes en dérivés plus intéressants (Asselineau et Zalta; 1973; Sallam *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2009). Parmi toutes les substances sécrétées, les antibiotiques sont ceux qui ont suscité le plus grand intérêt. Ils peuvent avoir une activité antibactérienne (streptomycine, kanamycine, vancomycine, etc.), antifongique (nystatine, primaricine, etc.), insecticide (avermicine, polyoxines, etc.) (Berdy *et al.*, 1987; Bycroft, 1988; Rokem *et al.*, 2007), antivirale (mutactimycines) et antitumorale (carcinostatine, adriamycine, anthramycine, daunomycine, dithiolopyrrolones, etc.) (Lombardi et Crisanti, 1997; Kim *et al.*, 1998; Minamiguchi *et al.*, 2001; Raty *et al.*, 2002).

Après les antibiotiques, les enzymes constituent le second grand groupe de produits industriels synthétisés par les actinomycètes. Ces derniers sont notamment producteurs d'une des plus importantes enzymes industrielles, la glucose isomérase, utilisée pour la fabrication d'isoglucose (mélange glucose-fructose) (Bhosale *et al.*, 1996). De plus, les actinomycètes ont la capacité de dégrader une grande variété de polymères comme les lignocelluloses (Niladevi et Prema, 2005) ou encore la chitine (Gomez *et al.*, 2000) et possèdent ainsi toute une variété d'enzymes intervenant dans ces dégradations: des chitinases, des endo-glucanases, des peroxydases, des cellulases (Grigorevski de Lima *et al.*, 2005) ou encore des xylanases et des estérases (Zimmermann *et al.*, 1988). Les actinomycètes produisent aussi plusieurs protéases (Patke et Dey, 1998; Vonothini *et al.*, 2008) qui peuvent trouver des applications dans l'industrie alimentaire ou celle des détergents (Moreira *et al.*, 2002). En outre, les enzymes issues d'actinomycètes sont aussi utilisées dans les procédés de bioconversion. Ainsi, la fabrication d'acrylamide à partir d'acrylonitrile fait intervenir la nitrile hydratase de *Rhodococcus rhodochrous* J1 (Kobayashi *et al.*, 1992).

3.2.- Intérêt dans le domaine agronomique

Les actinomycètes permettent le recyclage de la matière organique grâce à leur capacité de dégrader des substances très dures et incapables d'être décomposées par les bactéries non mycéliennes et les champignons: polymères complexes, polysaccharides, lignocelluloses,

chitine, etc. (Lechevalier, 1981; Goodfellow et Williams, 1983; McKenna *et al.*, 2002). Ils jouent par conséquent un rôle dans la fertilité des sols. Ils sont aussi capables de dégrader ou de recycler certaines toxines produites par des champignons toxigènes et de réduire aussi leur teneur dans les produits finaux en agroalimentaire (holzapfel *et al.*, 2002).

Les actinomycètes du genre *Frankia* sont des fixateurs symbiotiques de l'azote atmosphérique, formant des nodules chez de nombreuses plantes dicotylédones arbustives autres que les légumineuses (Becking, 1974). Ces plantes sont utilisées pour le reboisement des sols pauvres en matière organique et sont parfois utilisées comme brise-vert.

Les actinomycètes présentent un important potentiel de contrôle des maladies phytopathogènes. Ils peuvent agir par différents mécanismes d'action comme l'antibiose, la compétition nutritionnelle ou spatiale ou encore le parasitisme. Certains antifongiques non polyéniques sécrétés par des actinomycètes, comme la blasticine S, la kasugamycine et les polyoxines B et D, sont utilisés à grande échelle et depuis longtemps, contre des maladies du riz, dans l'agriculture japonaise (Misato, 1982). L'efficacité des souches d'actinomycètes et de leurs produits (antibiotiques et sidérophores) dans la lutte contre les champignons phytopathogènes a été signalée plusieurs fois (Trejo-Estrada *et al.*, 1988; Merrouche, 2000; Meklat 2004; Getha *et al.*, 2005).

II.- LE GENRE SACCHAROTHRIX

1.- Caractéristiques et position taxonomique du genre *Saccharothrix*

Le genre *Saccharothrix* a été décrit pour la première fois en 1984 par Labeda *et al.*, avec comme espèce-type *Saccharothrix australiensis*. Ce genre est classé dans la famille des *Actinosynnemataceae* (Labeda et Kroppenstedt, 2000), et ce, sur la base des parentés phylogénétiques.

Les colonies de *Saccharothrix* portent en général un mycélium aérien, lequel peut être abondant ou très peu produit selon les espèces et les souches. Les filaments du mycélium aérien se fragmentent de manière anarchique, souvent en "zig-zag", aboutissant à la formation de longues chaînes de spores ovoïdes ou en bâtonnets (1 à 2 µm x 0,7 à 1 µm) et non mobiles. Il n'y a pas de production de sporophores comme chez les *Streptomyces*. Le mycélium du substrat se fragmente souvent en éléments coccoïdes ou allongés, cette fragmentation pouvant être excessive ou, au contraire, assez réduite. Chimiquement, *Saccharothrix* est caractérisé par une paroi cellulaire de type IIIE (forme DL de l'acide diaminopimélique + rhamnose-galactose), par des phospholipides membranaires de type PII (présence de phosphatidyléthanolamine + hydroxy-phosphatidyléthanolamine) ou bien PIV (phosphatidyléthanolamine + phospholipides contenant de la glucosamine), par des ménaquinones de type MK-9(H4) et MK-10(H4) et par des acides gras à chaînes droites monoinsaturées, iso et antéiso (Labeda et Kroppenstedt, 2000; Labeda *et al.*, 2001).

2.- Espèces appartenant au genre *Saccharothrix*

Le genre *Saccharothrix* comprend actuellement 11 espèces décrites et deux sous-espèces (Tableau 1).

Espèces de <i>Saccharothrix</i>	N° d'accessibilité dans les collections	Références
<i>Sa. australiensis</i>	ATCC 31497	Labeda <i>et al.</i> (1984).
<i>Sa. texasensis</i>	ATCC 51593	Labeda et Lyons (1989).
<i>Sa. espanaensis</i>	ATCC 51144	Labeda et Lechevalier (1989).
<i>Sa. mutabilis</i> subsp. <i>mutabilis</i>	ATCC 31520	Labeda et Lechevalier (1989).
<i>Sa. mutabilis</i> subsp. <i>capreolus</i>	ATCC 23892	Grund et Kroppenstedt (1990).
<i>Sa. coeruleofusca</i>	ATCC 35108	Grund et Kroppenstedt (1990).
<i>Sa. longispora</i>	ATCC 35109	Grund et Kroppenstedt (1990).
<i>Sa. syringae</i>	ATCC 51364	Grund et Kroppenstedt (1990).
<i>Sa. algeriensis</i>	NRRL B-24137	Zitouni <i>et al.</i> (2004c).
<i>Sa. xinjiangensis</i>	AS 4.1731	Hu <i>et al.</i> (2004).
<i>Sa. violaceirubra</i>	NBRC 102064	Otoguro <i>et al.</i> (2009).
<i>Sa. variispora</i>	NRRL B-16296T	Kim <i>et al.</i> (2011).

Tableau 1. Liste des espèces de *Saccharothrix*.

3.- Métabolites secondaires sécrétés par les espèces de *Saccharothrix*

La majorité des antibiotiques sécrétés par les souches de *Saccharothrix* a été découverte durant les vingt dernières années. Le nombre de molécules actives dépassent actuellement la cinquantaine. Leur nature chimique est assez diversifiée. On peut ainsi trouver des macrolides (Gauze *et al.*, 1974; Horan *et al.*, 1977; Zitouni, 2004), des polyamines (Takahashi *et al.*, 1986), des benzoquinones (Isshiki *et al.*, 1989), des aromatiques hétérocycliques glycosylés (Bush *et al.*, 1987; Tsurumi *et al.*, 1995), des alcaloïdes (Suzuki *et al.*, 1991), des nucléosides carbocycliques (Bush *et al.*, 1993), des hétérocycles azotés et soufrés (Tsurumi *et al.*, 1995; Lamari *et al.*, 2002a,b), des composés phosphorés acides et hydrophiles (Takahashi *et al.*, 1995), des heptadécaglycosides (Singh *et al.*, 2000) ou encore des anthracyclines (Zitouni *et al.*, 2004a,b).

Certains antibiotiques sont doués d'une activité antibactérienne (bactéries à Gram positif et plus rarement à Gram négatif), comme les galacardines, ou antifongique comme le thiazolopyridine, ou encore antibactérienne et antifongique à la fois, comme les dithiopyrrolones, la dopsisamine et la formamycine. D'autres composés sécrétés présentent des activités antitumorales (ex.: ammocidine, pluraflavines), antivirales (fluvirucines), herbicides (phosphonothrixine et coformycine) ou inhibitrices de métalloprotéases ou d'autres enzymes (molécules WS75624). Le tableau 2 donne les principales substances bioactives synthétisées par le genre *Saccharothrix*.

Production de nouveaux antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis* après addition de précurseurs dans le milieu de culture

Substances	Activité	Origine	Références
Nocamycine	Antibactérienne, antitumorale	<i>Sa. zyringae</i>	Horvath <i>et al.</i> (1979).
Polymitoxine	Antibactérienne	<i>Sa. mutabilis</i>	Jain <i>et al.</i> (1982).
Dopsisamine	Antibactérienne, antifongique	<i>Sa. mutabilis</i>	Takahashi <i>et al.</i> (1986).
LL-C19004	Antibactérienne	<i>Sa. spanaensis</i>	Kirby <i>et al.</i> (1987).
Kinamycines (1 et 2)	Antibactérienne, antitumorale	<i>Saccharothrix</i> sp.	Isshiki <i>et al.</i> (1989).
Sakothrixide	Antitumorale	<i>Saccharothrix</i> sp.	Seto <i>et al.</i> (1992).
Tetrazomine	Antibactérienne, antitumorale	<i>Sa. mutabilis</i>	Suzuki <i>et al.</i> (1991).
Fluvirucines (A1, A2, B1, B2, B3, B4 et B5)	Antivirale	<i>Sa. mutabilis</i>	Tomita <i>et al.</i> (1991).
Galacardines (A et B)	Antibactérienne	<i>Saccharothrix</i> sp.	Takachi <i>et al.</i> (1992).
Coformycine	Herbicide	<i>Saccharothrix</i> sp.	Dancer <i>et al.</i> (1997).
WS75624 A et B	Inhibiteur d'enzyme, convertisseur de l'endothéline	<i>Saccharothrix</i> sp.	Yoshimura <i>et al.</i> (1995).
Phosphonothrixine	Herbicide	<i>Saccharothrix</i> sp.	Takahashi <i>et al.</i> (1995). Nakamura <i>et al.</i> (1999).
Thiazolypyridine	Antifongique	<i>Saccharothrix</i> sp.	Sugawara <i>et al.</i> (1999).
TMC 96	Inhibiteur de protéasome	<i>Saccharothrix</i> sp.	Koguchi <i>et al.</i> (1999).
Ammocidine	Antitumorale	<i>Saccharothrix</i> sp.	Murakami <i>et al.</i> (2001).
Pluraflavines (A, B et E)	Antitumorale	<i>Saccharothrix</i> sp.	Vértesy <i>et al.</i> (2001).
Saccharomicines (A et B)	Antibactérienne	<i>Sa. spanaensis</i>	Wang <i>et al.</i> (2001).
Dithiopyrrolones (AJ, C1, C2, A, D et F)	Antibactérienne, antifongique	<i>Sa. algeriensis</i>	Lamari <i>et al.</i> (2002a,b).
Pravastatine	Anti-cholestérolémique	<i>Sa. mutabilis</i>	Matsuo <i>et al.</i> (2003).
(GBC33-O)	Antiparasite, insecticide	<i>Saccharothrix</i> sp.	U.K. Pat., 1990, 2 232 668, CA, 115, 112815u. (Brevets)
(FZO32-W)	Antiparasite, insecticide	<i>Saccharothrix</i> sp.	U.K. Pat., 1990, 2 232 668, CA, 115, 112815u. (Brevets)

Tableau 2. Principales substances ayant une activité biologique et synthétisées par les souches appartenant au genre *Saccharothrix*.

4.- Caractéristiques et position taxonomique de *Sa. algeriensis*

Le mycélium aérien de *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 est abondant et de couleur jaune-orange. Le mycélium du substrat est jaune vif. Des pigments diffusibles de même couleur sont abondamment sécrétés. L'analyse des constituants cellulaires a montré que cette souche contient le couple "rhamnose-galactose" (sucres taxonomiquement importants), du mannose, du glucose et du ribose, de la phosphatidyl-éthanolamine et de l'hydroxy-phosphatidyl-éthanolamine (phospholipides caractéristiques) et des acides gras (iso-15:0, iso-16: 1 H, iso-16:0, iso-2-hydroxy-16:0, etc.) et ne possède pas d'acides mycoliques pariétaux (Zitouni *et al.*, 2004c). Une taxonomie numérique, incluant 77 tests physiologiques, ainsi qu'une analyse phylogénétique (séquençage de l'ADNr 16S, hybridation ADN-ADN) ont montré que la souche diffère nettement des espèces connues et a été nommée *Sa. algeriensis* (Zitouni *et al.*, 2004c).

5.- Spectre d'action de *Sa. algeriensis*

Sa. algeriensis NRRL B-24137 présente un spectre d'action assez large, qui touche aussi bien les bactéries à Gram positif (ex.: *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*) et à Gram négatif (ex.: *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*) que les levures (ex.: *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*) et les champignons filamenteux (ex.: *Mucor ramannianus*, *Pythium irregulare*, *Rhizoctonia solani* et *Thielaviopsis neocaledoniae*). L'action est plus forte contre les bactéries à Gram positif et les champignons, moyenne

contre les levures et moyenne, faible à nulle contre les bactéries à Gram négatif (Zitouni, 1995; Lamari, 2006).

III.- LES ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques sont des métabolites secondaires (appelés aussi idiolites), généralement synthétisés à la fin de la phase exponentielle (trophophase) et au début de la phase stationnaire (idiophase) (Bu'lock, 1965).

En plus des microorganismes, les antibiotiques ont été isolés également à partir des plantes et des animaux. Ils peuvent aussi être produits par voie d'hémi-synthèse (obtention par modifications chimiques ou enzymatiques des molécules naturelles) ou par synthèse chimique (Breton *et al.*, 1989; Sanglier, 1990).

1.- Classification des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classés en se basant sur plusieurs critères: structure chimique, spectre d'action, type d'action, mode d'action, origine et charge électrique. La classification la plus utilisée est celle basée sur la structure chimique (Berdy *et al.*, 1987, Yala *et al.*, 2001). Près de 17 000 molécules ont ainsi été classées dans 9 grandes familles et dans plusieurs sous familles chimiques (Tableau 3).

Les autres types de classification peuvent être utilisés surtout en médecine et en pharmacologie; Ils sont basés sur:

- Le spectre d'action: Voir page 15 paragraphe 3.

**Zones mesurées, selon la méthode des stries croisées, entre le bord de la colonie de l'actinomycète et ceux des microorganismes- cibles . Milieu utilisé ISP2.*

- le type d'action: bactériostatique (tétracycline, érythromycine, etc.), bactéricide en phase exponentielle uniquement (cyclosérine, pénicillines, etc.) ou bactéricide en phases exponentielle et stationnaire (polymyxines, gramicidines, etc.).
- le mode d'action: voir page 16 paragraphe 4.
- l'origine: les antibiotiques peuvent être d'origine fongique (pénicillines, griséofulvine, etc.), bactérienne (bactéries non mycélienne) (bacitracine, polymyxines, etc.) ou actinomycétale (la majorité des antibiotiques sécrétés surtout par *Streptomyces*). Ils peuvent être aussi élaborés par des microorganismes hybrides (clonage de gènes), par hémi-synthèse ou par synthèse.
- la charge électrique: les antibiotiques peuvent être à caractère acide (pénicilline, novobiocine, etc.), basique (aminosides, polymyxines, rifamycines, etc.) ou neutre (steffimicines, aldamycines, mutactimycines, etc.).

2.- Microorganismes producteurs d'antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être produits par divers microorganismes. Près de 70% de ces molécules actives sont synthétisées par des actinomycètes, environ 10% par des bactéries non mycéliennes et 10% par des champignons (Breton *et al.*, 1989; Sanglier, 1990).

Un même antibiotique peut être synthétisé par divers microorganismes taxonomiquement éloignés comme c'est le cas de l'acide fusidique (utilisé dans le traitement d'infection à staphylocoques résistants à la pénicilline) isolé à partir des genres *Fusidium*, *Cephalosporium*,

Microsporium, *Mucor* et *Chrysosporium* (Von Daehne *et al.*, 1984). Inversement, plusieurs antibiotiques peuvent être produits par un même microorganisme, comme c'est le cas de *Streptomyces hygrosopicus* qui synthétise 58 antibiotiques différents (Berdy *et al.*, 1987).

2.1.- Actinomycètes

Près de 80% des antibiotiques d'origine actinomycétale sont synthétisés par *Streptomyces*, le genre le plus répandu dans l'environnement (Watve *et al.*, 2001;Lazzarini *et al.*, 2000). Environ 15% de ces molécules actives sont sécrétés par les souches de *Nocardia*, *Micromonospora*, *Actinoplanes* et *Actinomadura*, tandis que les 5% restants le sont par les autres genres, peu répandus ou parfois même rares, tels que *Nocardiosis*, *Saccharothrix*, etc.

Familles	Principales sous-familles	Exemples d'antibiotiques
Antibiotiques contenant des glucides	- Glucides purs - Aminoglycosides - Glycopeptides	- Nojirimycine - Streptomycine, gentamicine, kanamycine - Vancomycine, risotocétine
Lactones macrocycliques	- Macrolides - Polyènes - Macrolactames	- Erythromycine, spiramycine - Nystatine, amphotéricine - Maytansine
Quinones et antibiotiques apparentés	- Composés polycycliques linéairement accolés - Anthraquinones - Naphtoquinones - Benzoquinones	- Tétracyclines - Anthracyclines - Rubomycine - Mitomycine, saframycine
Acides aminés et peptides	- Dérivés d'acides aminés - Homopeptides - Peptolides - Lipopeptides	- Pénicilline, cyclosérine - Bacitracine - Valinomycine - Polymyxines
Antibiotiques hétérocycliques contenant de l'azote	- Hétérocycles non accolés - Hétérocycles accolés	- Mildiomycine - Phénazines
Antibiotiques hétérocycliques contenant de l'oxygène	- Dérivés du furanne - Polyéthers	- Monensine
Antibiotiques aromatiques	- Composés benzéniques - Composés aromatiques accolés - Autres dérivés	- Chloramphénicol - Griséo fulvine - Novobiocine
Antibiotiques alicycliques	- Dérivés du cyclo-alcane - Terpènes - Oligoterpènes	- Cycloheximide - Acide marasmique - Acide fusidique
Antibiotiques aliphatiques	- Dérivés d'alcane - Dérivés des acides carboxyliques aliphatiques - Composés contenant du phosphore	- Elaiomycine - Cérulénine - Fosfomycine

Tableau 3. Classification des antibiotiques d'après leur structure chimique (Berdy et al., 1987; Berdy, 2005).

2.2.- Bactéries non mycéliennes

Près de 7% des antibiotiques d'origine bactérienne sont élaborés par les *Bacillaceae* (ex. : *Bacillus subtilis*), 1,3% par les *Pseudomonadaceae* (ex.: *Pseudomonas*) et 1,7% par d'autres bactéries de genres très divers, tels que *Micrococcus*, *Proteus*, *Chromobacterium*, etc. Ces antibiotiques sont souvent de nature peptidique (Vandamme, 1985) ou parfois aminoglycosidique, hétérocyclique, lipidique, phénazinique, etc. (ex.: bacitracine, polymyxine, phénazines, etc.) (Berdy et al., 1987).

2.3- Champignons

Environ 2000 espèces des champignons décrites sont productrices d'antibiotiques. Le nombre de ces molécules d'origine fongique est supérieur à 1200 (Berdy, 2005).

Parmi ces champignons producteurs, nous citerons les genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cephalosporium* et *Fusarium* (des ascomycètes ou des formes imparfaites) et aussi certains basidiomycètes et zygomycètes (Betina, 1983; Laskin et Lechevalier, 1984). Les antibiotiques les plus connus sont la pénicilline, la céphalosporine, l'acide fusidique et la griséofluline (Barrett *et al.*, 2001).

3.- Spectre d'action des antibiotiques

Les antibiotiques possèdent un spectre d'action qui s'étend aux bactéries à Gram positif, aux bactéries à Gram négatif et aux champignons. Leur action peut parfois s'étendre aux virus, aux protozoaires, aux helminthes, aux acariens, etc.

Ainsi, on distingue les antibiotiques à:

- Spectre très large: tétracyclines, chloramphénicol et céphalosporines.
- Spectre large: streptomycine, rifampicine et fosfomycine.
- Spectre moyen: surtout actifs contre les bactéries à Gram positif: pénicilline, érythromycine, lincomycine et novobiocine.
- Spectre étroit: - sur les bactéries à Gram positif: vancomycine.
- sur les bactéries à Gram négatif: polymyxines.
- sur les champignons: cycloheximide, amphotéricine B et nystatine.

4.- Mode d'action des antibiotiques

Le site d'action des antibiotiques dans la cellule microbienne peut être la membrane plasmique, la paroi cellulaire, les ribosomes, les acides nucléiques, etc. (Asselineau et Zalta, 1973; Deacon, 1984).

- Action sur la membrane plasmique: les polyènes (amphotéricine B, nystatine) sont des antifongiques caractérisés par la présence d'un grand cycle lactone (comprenant 12 à 37 atomes de carbones). Ils agissent sur les stérols de la membrane plasmique des cellules eucaryotes (champignons, animaux), ce qui entraîne une diminution de la perméabilité membranaire et la mort des cellules. D'autres antibiotiques, tels que les polypeptides, agissent également sur la membrane plasmique bactérienne en se fixant sur les phospholipides (polymyxines) ou en se comportant comme des ionophores (gramicidines).
- Inhibition de la synthèse de la paroi: parmi les antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi cellulaire, nous citons les β -lactamines, la cyclosérine, la fosfomycine, etc. Ils empêchent l'intégration des acides aminés formant le tétrapeptide muréique ou en empêchant celui-ci de se coller à la muréine.
- Inhibition de la synthèse des protéines: certains antibiotiques antibactériens peuvent se fixer sur les sous-unités ribosomiques 30S ou 50S (ex.: tétracyclines, macrolides et chloramphénicol), empêchant respectivement la fixation de l'ARN transférase porteur d'acides aminés, la translocation et la transpeptidation. Chez les eucaryotes, la synthèse des chaînes polypeptidiques est inhibée par la fixation de la kasugamycine sur la sous-unité 40S des ribosomes. La translocation des ribosomes sur l'ARN messager est bloquée par le cycloheximide qui se fixe sur la sous-unité ribosomique 60S. La synthèse des protéines est aussi inhibée par la blastidicine S qui bloque l'incorporation des acides aminés.

Action sur les acides nucléiques: certains antibiotiques tels que la mitomycine et l'acide nalidixique empêchent respectivement la réplication de l'ADN (en se fixant sur les deux brins d'ADN) et sa synthèse (par inhibition de l'incorporation de la thymine). L'actinomycine empêche la transcription de l'ADN en ARN messenger.

5.- Biosynthèse des antibiotiques

Les antibiotiques sont synthétisés pendant l'idiophase (phase stationnaire), succédant à la trophophase (phase de croissance) (Walker, 1974). Cependant, certains travaux ont montré que cette production peut débuter durant la phase exponentielle de croissance (Lebrihi *et al.*, 1987; Lamari *et al.*, 2002a; Zitouni *et al.*, 2004a). D'autres chercheurs ont montré la possibilité d'obtenir un couplage de la production de certains métabolites secondaires et de la croissance contrôlée du microorganisme en faisant varier la composition du milieu (Gray et Bhuwapathanapun, 1980; Untrau *et al.*, 1995).

Les antibiotiques naturels dérivent biochimiquement d'un nombre restreint de précurseurs fournis par le métabolisme primaire, tels que les acides aminés, les acides gras et les bases puriques et pyrimidiques. Cette variété structurale résulte non pas du nombre de voies de biosynthèse de départ (assez réduit), mais plutôt des chaînes de réactions enzymatiques terminales variées: polymérisation, méthylation, condensation, oxydation et réduction (Vinig, 1985; Martin et Liras, 1989; O'hagan, 1991). Le tableau 4 montre des exemples d'enzymes dirigeant la biosynthèse des antibiotiques.

A l'échelle génétique, chez les actinomycètes, les gènes codant pour la biosynthèse des antibiotiques et d'autres métabolites secondaires, sont généralement regroupés sous forme de cluster (de 15 à 100 Kb ou même plus) dans l'ADN génomique, mais parfois aussi dans les plasmides (Bibb, 2005). Cundliffe (2006) a signalé que la biosynthèse des antibiotiques, même à faibles poids moléculaires, est assez complexe. Communément, 10 à 15 gènes pourraient être nécessaires pour coder la synthèse d'une molécule d'antibiotique de masse inférieure à 1000. En revanche, un seul gène peut facilement encoder une protéine de 100 Kda.

Enzymes	Antibiotique biosynthétisé	Microorganismes producteurs	Références
- Amidinotransférase - Streptidine kinase	Streptomycine	<i>Streptomyces griseus</i> , <i>S. humidus</i> , <i>S. griseocarneus</i> , <i>S. galbus</i> , <i>S. ornatus</i> et <i>S. hygroscopicus</i>	Pass et Raczynska-Bojanowska (1969), Pensikovo et Levitov (1970), Khokhlov et Tovarova (1972).
- Phénoxazinone synthase	Actinomycine	<i>S. antibioticus</i>	Katz (1967).
- Tyrocidine synthétase	Tyrocidine	<i>Bacillus brevis</i>	Kurahashi <i>et al.</i> , 1969
- Oxydoréductase - Transméthylase - Valine déshydrogénase	Tylosine	<i>S. rimosus</i>	Tang <i>et al.</i> (1994).
- Guanosine Triphosphate formylhydrolase	Tubercidine	<i>S. showdoensis</i>	Elstner <i>et al.</i> (1975).
- Candicidine synthétase	Candicidine	<i>S. griseus</i>	Corcoran (1974).
- Bacitracine synthétase	Bacitracine	<i>Bacillus licheniformis</i>	Ishihara <i>et al.</i> (1975).
Gramidicine S synthétase	Gramidicine	<i>B. brevis</i>	Matteo <i>et al.</i> (1975).
- Acétyl CoA carboxylase - Phosphoénolpyruvate déshydrogénase - Oxaloacétate déshydrogénase - Anhydrotétracycline oxygénase	Tétracycline	<i>S. aureofaciens</i>	Behal <i>et al.</i> (1983).
- Cyclase - Expandase	Céphalosporine	<i>S. clavuligerus</i>	Braña <i>et al.</i> (1985).

Tableau 4. Exemples d'enzymes dirigeant la biosynthèse des antibiotiques.

6.- Régulation de la biosynthèse des antibiotiques

Les cinétiques de fermentation ont montré que les besoins nutritionnels (composition de milieu de culture) et les conditions de culture (pH, température, aération) d'un microorganisme ne sont pas généralement les mêmes pendant les phases de croissance et de production des métabolites secondaires. Pour cela, des milieux favorables ont dû être développés et certains paramètres d'ordre nutritionnel et environnemental ont été régulés pour répondre aux besoins optimaux de production d'antibiotiques (Larpent et Sanglier, 1989).

Les antibiotiques sont biosynthétisés à partir de précurseurs (acides aminés, acides organiques, bases puriques et pyrimidique, etc.) par des voies métaboliques très spécifiques. Cette biosynthèse est soumise à tout un ensemble de mécanismes de régulation intervenant aux niveaux anabolique, catabolique et énergétique de la cellule. La régulation peut s'exercer directement et spécifiquement sur les gènes ou les enzymes

de synthèse des métabolites secondaires et/ou indirectement sur les voies de biosynthèse des métabolites primaires précurseurs. Les différents mécanismes de régulation de la biosynthèse des métabolites secondaires, en particulier des antibiotiques, ont été abondamment répertoriés (Piret et Demain, 1988; Demain, 1998; Bouras, 2005; Strub, 2008).

6.1.- facteurs physico-chimiques

La production d'antibiotiques peut se faire sur milieux solides (rarement) ou majoritairement en milieux liquides (en général agités). Pour ces derniers, la culture en «batch» est beaucoup plus utilisée que la culture en continu (Hermans *et al.*, 1989). La fermentation est réalisée dans des fioles agitées ou dans des fermenteurs. Dans ces derniers, il est possible d'ajuster constamment les paramètres physico-chimiques.

Les facteurs physico-chimiques (pH, température, agitation et aération) jouent un rôle important dans l'initiation de la biosynthèse des métabolites secondaires et l'amélioration des rendements. Pfefferle (2000) a montré que la production de métabolites secondaires chez le genre *Streptosporangium* était meilleure avec une agitation de type «turbine-hélice» marine. Il apparaît que la concentration en oxygène dissous est un paramètre important dans la production de métabolites. Certains chercheurs ont montré que la production de l'antibiotique rouge «prodigiosine» chez *Serratia* sp. est favorisée par les valeurs faibles du pH (Williamson *et al.*, 2005). Lamari (2006) a signalé que le CaCO₃ ajouté au milieu de culture joue un rôle de tampon qui empêche les écarts importants et défavorables du pH et favorise ainsi la production de la biomasse et des antibiotiques.

6.2.- Inoculum

Certains chercheurs ont signalé l'importance quantitative et l'âge de l'inoculum. Cependant, la qualité de ce dernier, définie par des propriétés physiologiques et biochimiques, reste rarement évoquée (Brown et Zainudeen, 1978). Smith et Calam (1980), étudiant la production de la pénicilline et la griséofulvine, ont montré que les pelotes de mycélium denses conduisaient à de plus faibles diffusions de substrats que les pelotes ouvertes. Novikova et Makarevich (1984) ont montré une corrélation entre l'activité respiratoire de l'inoculum et la production en tétracycline de *Streptomyces aureofaciens*. La potentialité optimale de l'inoculum correspond ainsi à une activité respiratoire maximale.

6.3.- Facteurs nutritionnels

La régulation de la biosynthèse des antibiotiques est contrôlée par plusieurs facteurs nutritionnelles, tels que le métabolisme des sources de carbone, d'azote et de phosphate, et à un degré moindre, la quantité et la qualité des sels minéraux (Bouras, 2005; Strub, 2008). Ces facteurs jouent un rôle important dans l'induction ou la répression de la biosynthèse des antibiotiques, par activation ou inhibition des enzymes synthétases (Martin et demain, 1980).

6.3.1.- Régulation par les sources de carbone

Les sources carbonées peuvent agir comme des précurseurs directs (après glycosylation ou ajout de certains acides organiques), ou indirects (fourniture des précurseurs, induction ou production d'enzymes de biosynthèse, etc.) sur la production des antibiotiques.

6.3.1.1.- Les sucres

Les substrats glucidiques (glucose, saccharose, glycérol, amidon, dextrines, etc.) sont souvent utilisés pour la production d'antibiotiques.

Cependant, certains chercheurs ont signalé l'effet inhibiteur du glucose qui provoque une répression de la formation de plusieurs antibiotiques, dont des aminoglycosides et des macrolides produits par les actinomycètes (streptomycine, kanamycine, istamycine, néomycine et spiramycine), par inhibition des enzymes de biosynthèse (Demain, 1989; Piepersberg et Distler, 1997; Colombié, 2005). Cette répression catabolique semble être due à l'acidification du milieu de culture (instabilité du pH) après accumulation d'intermédiaires cataboliques, tels que les acides organiques (Solé *et al.*, 2000). D'autres sources carbonées peuvent exercer un effet à la fois inhibiteur et répresseur sur certains systèmes enzymatiques participant au métabolisme secondaire, tels que le glycérol qui a inhibé la D-cyclosérine synthétase chez *Streptomyces ambofaciens* (Svensson *et al.* 1983; Lounes *et al.*, 1995) et le citrate qui a inhibé la production de la novobiocine chez *S. niveus* (Martin et demain, 1980).

Par contre d'autres chercheurs ont montré que la présence dans le milieu de culture des sources carbonées lentement assimilées, permet une bonne production des antibiotiques, comme c'est le cas de la bacitracine sécrétée par *Bacillus licheniformis* (Haavik, 1974). Dans le même contexte Lebrihi *et al.* (1988) ont signalé que l'expression de la céphamycine C synthétase et de l'expandase chez *Streptomyces clavuligerus* est plus faible lorsque le glycérol est utilisé comme source de carbone plutôt que l'amidon.

6.3.1.2.- Les acides gras à courtes et longues chaînes

La présence des acides gras à courtes chaînes sous forme d'acyl-CoA auraient un effet stimulateur sur les acyl-transférases qui sont les enzymes qui permettent d'activer les précurseurs de la spiramycine chez *Streptomyces ambofaciens*. Le palmitate, l'oléate et le méthyloléate stimulent la biosynthèse de la spiramycine, alors que l'acétate et le propionate ont besoin d'être couplés au butyrate pour avoir un effet stimulateur (Khaoua, 1990; Khaoua *et al.*, 1992). Peroz-Collignon (1993) a montré que l'utilisation de l'hexanoate comme unique substrat carboné ne permettait pas de production de la spiramycine par *S. ambofaciens*. Cette production n'est possible qu'en présence d'autres sources de carbone. Ceci a été expliqué par un manque probable de certaines étapes de la néoglucogénèse à partir de cet acide gras, ce qui limite la formation des sucres aminés de la spiramycine. Marshall (1987) a montré que l'ajout de l'acide 2-méthylbutyrique au milieu de culture augmente la production de la polymyxine A; par contre l'ajout de l'acide isobutyrique, favorise la production de la polymyxine B chez *S. paulus*.

Melchior et Steim (1977) ont signalé que l'effet précurseur des acides gras exogènes pour la production d'un grand nombre d'antibiotiques est souvent lié à des changements de la composition lipidique des cellules et à une meilleure utilisation des acides gras. L'addition d'oléate, de palmitate ou de stéarate modifie souvent la composition de la membrane cellulaire en augmentant la teneur en acides gras suivant les espèces, et stimule ainsi la production de l'antibiotique (David *et al.*, 1992). Mouslim *et al.* (1993) ont noté que l'addition de méthyleoléate dans le milieu producteur améliorerait de plus de 700% la production de nigéricine. Cette action a été expliquée par une modification de la perméabilité cellulaire et par une solubilisation de cet antibiotique hydrophobe.

6.3.2.- Régulation par les sources azotées

6.3.2.1.- Les ions d'ammonium

Les sources d'azote jouent un rôle très important dans la biosynthèse des métabolites secondaires. L'ammonium est connu pour être un répresseur sur le métabolisme secondaire (Omura *et al.*, 1980; Demain, 1991; Litzka *et al.*, 1999). La répression catabolique par les ions ammonium peut réguler les métabolites secondaires en inhibant et/ou en réprimant des enzymes qui permettent la biosynthèse des précurseurs. Cela a été observé dans le cas de la production d'acide aminoadipique, un précurseur pour la production de la céphalosporine chez *Streptomyces clavuligerus* et *Cephalosporium acremonium* et la biosynthèse de la spiramycine par *S. ambofaciens* (Lebrihi *et al.*, 1992; Tang *et al.*, 1994; Lounes *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1997). L'ion ammonium inhibe également la biosynthèse de la leucomycine (Omura *et al.*, 1980), de la tylosine (Omura *et al.*, 1984b), etc. Son augmentation dans le milieu de culture entraîne le plus souvent une diminution de la production en antibiotiques, comme par exemple la production spécifique de β -lactames par *S. clavuligerus* qui diminue de 84% lorsque la concentration en ammonium augmente de 20 à 80 mM (Braña *et al.* 1985).

La répression catabolique peut affecter aussi le niveau des activités enzymatiques nécessaires dans les voies du métabolisme secondaire. Par exemple, l'ammonium inhibe la formation, chez *S. clavuligerus*, de la cyclase et l'expandase (enzymes intervenant dans la biosynthèse de la céphalosporine) (Braña *et al.*, 1985), l'anhydrotétracycline oxygénase responsable de la biosynthèse de la tétracycline (Behal *et al.*, 1983), et la macrocine 3'-O-méthyltransférase qui catalyse la conversion de la macrocine en tylosine (Vu-Trang et Gray, 1987).

Par contre, certains auteurs ont montré que la production de quelques antibiotiques tels que la néomycine, la streptomycine et la gentamicine est augmentée par l'addition d'ammonium au milieu de culture. Cet effet positif est dû à la conversion de l'ammonium en glutamine, utilisée dans la formation des précurseurs (Gonzalez *et al.*, 1995).

6.3.2.2.- Les acides aminés

L'importance des acides aminés comme sources d'azote dans la régulation de la biosynthèse des antibiotiques a été démontrée par plusieurs chercheurs. Cette biosynthèse est inhibée ou bien améliorée selon la nature et la concentration des acides aminés utilisés (Martín et Demain, 1980). Khaoua (1990) a montré que la production de la céphamycine C par *Streptomyces catteleya* est meilleure, comme source d'azote, en présence d'asparagine, par rapport à la glutamine et à l'ammonium. Cependant, un excès d'asparagine fait chuter la production de cet antibiotique. Martin et Demain (1980) ont rapporté l'effet stimulateur de la méthionine sur la biosynthèse de la céphalosporine C et l'effet inhibiteur de la glycine sur la production de l'érythromycine. Omura *et al.* (1984a,b) ont observé par utilisation de mutants de cosynthèse de *S. fradiae*, que la valine, la leucine, l'isoleucine, la thréonine ou leurs α -céto acides correspondants, favorisaient la production du protylonolide, contrairement à l'alanine, la sérine, la proline, le pyruvate ou l' α -cétoglutarate. Marshall *et al.* (1987) ont montré que l'addition de l'isoleucine, de méthionine et de thréonine augmente la production de la paulomycine A chez *S. paulus*, tandis que la valine favorise celle de la paulomycine B. Tang *et al.* (1994) ont constaté que la valine est la source de précurseurs pour la biosynthèse des macrolides chez *S. ambofaciens* et *S. fradiae*.

L'acide glutamique et l'acide aspartique sont considérés comme des sources riches en azote et sont utilisés préférentiellement par la cellule bactérienne (Da Silva *et al.*, 2001). L'ammonium, le glutamate et la glutamine sont eux utilisés préférentiellement par les champignons (Magasanik, 1992; Ter Schure *et al.*, 2000). Par exemple, le glutamate et

l'histidine favorisent la biosynthèse de la pénicilline chez *Penicillium chrysogenum* (Feng *et al.*, 1994).

6.3.3.- Régulation par la source de phosphore

La production de métabolites secondaires est soumise à une régulation par le phosphate inorganique chez plusieurs microorganismes (Liras *et al.*, 1990; Spížek et Tichý, 1995).

Le phosphate peut, à certaines concentrations, supprimer le métabolisme secondaire, inhibant par exemple les phosphatases et les oxygénases (Spížek et Tichy, 1995). Dans de nombreuses voies de biosynthèse des antibiotiques, une consommation complète du phosphate est nécessaire pour le démarrage de la biosynthèse, et c'est pourquoi, de nombreuses productions d'antibiotiques sont réalisées dans des conditions où le phosphate est limité pour la croissance. Le phosphate est ainsi épuisé avant l'initiation de la biosynthèse de la candicine chez *Streptomyces griseus* et de la tétracycline chez *S. aureofaciens* (Martin et demain, 1980). Beaucoup de métabolites secondaires nécessitent pour leur formation des concentrations faibles en phosphate (inférieures à 10 mM). Il existe toutefois des exceptions notables: la thiopeptide (Miyairi *et al.*, 1970) et la nocardicine (Aoki *et al.*, 1976) où la synthèse réclame une concentration élevée en phosphate inorganique (100 à 200 mM). Le phosphate régule la biosynthèse des antibiotiques peptidiques, des macrolides et de plusieurs autres antibiotiques bio-synthétiquement complexes (Martin et demain, 1980).

6.3.4.- Régulation par les sels et les oligoéléments

Plusieurs chercheurs ont signalé l'effet positif de certains sels comme le CaCO₃ qui joue un rôle de tampon pour maintenir le pH aux environs de la neutralité; le CaCO₃ augmente la biomasse cellulaire et la production des antibiotiques (Ikeda *et al.*, 1992; Lamsaif, 1992, Lamari, 2002a,b).

Küster et Neumeier (1981) ont montré que la production de la streptomycine et de la tétracycline est améliorée par l'addition respectivement de 0,5% et 1% de NaCl. Les auteurs pensent que le NaCl augmente la perméabilité de la membrane cellulaire et facilite donc l'approvisionnement de la cellule en précurseurs de l'antibiotique (Okazaki *et al.*, 1973). Certains composés naturels, tels les extraits de viande ou de levure, peuvent contenir des concentrations très appréciables en NaCl.

Les oligoéléments (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo), cofacteurs de la croissance des microorganismes, sont nécessaires à des concentrations très faibles (environ 10⁻⁷ M), pour la production des antibiotiques. Le manganèse, le fer et le zinc sont les ions métalliques les plus importants. Thayer *et al.* (1985) ont montré que le Fe₂(SO₄)₃ et le MnCl₂ stimulent la production de la monensine par *S. cinnamonensis*. Ninet et Verrier (1960) ont montré que les éléments Zn, Fe, Cu et Mn avaient une influence sur la proportion des différents types de spiramycines produites par *S. ambofaciens*.

6.4.- Facteurs génétiques

Les gènes responsables de la biosynthèse, de la régulation et de la résistance aux antibiotiques, sont organisés dans une même région sous forme de clusters. Ces dernières années, plusieurs clusters ont été isolés et identifiés à partir d'actinomycètes producteurs d'antibiotiques (surtout chez les *Streptomyces*). Par exemple, le cluster qui dirige la biosynthèse de la prodiginine (antibiotiques rouges tripyrrols, produits par plusieurs espèces

et genres d'actinomycètes et d'autres bactéries), a été identifié pour la première fois par Rudd et Hopwood (cités par Stanley, 2006). Mo *et al.* (2008) ont signalé que le même gène dirige la biosynthèse de la streptorubine B chez *Streptomyces coelicolor*. Un deuxième exemple particulièrement intéressant, le cluster qui dirige la biosynthèse de la tylosine chez *S. fradiae*, contient au moins 5 gènes de régulation de la biosynthèse de cet antibiotique, certains de ces gènes encodant pour des protéines de régulation (Bibb, 2005).

Reeves *et al.* (2004 et 2006) ont signalé que la surproduction de l'érythromycine par *Saccharopolyspora erythraea* et *Aeromicrobium erythreum* est réalisée par l'inactivation du gène qui code pour la méthylmalonyl-CoA mutase. Au cours de la biosynthèse des avermectines (antiparasitaires), deux unités de démarrage sont utilisées: l'isobutyryl-CoA et la 2-méthylbutyryl-CoA, qui sont produits par la dégradation des acides aminés ramifiés, l'isoleucine et la valine. L'inactivation du gène qui encode pour l'enzyme α -céto-acide-déshydrogénase conduit à l'arrêt de la production des avermectines (Cropp *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2006).

6.5.- Taux de croissance

Une bonne production d'antibiotiques est, la plupart du temps, associée à un faible taux de croissance. Les antibiotiques sont produits généralement dans la phase stationnaire des microorganismes, c'est-à-dire, lorsque le taux de croissance atteint une valeur de seuil souvent faible ou nulle (Gray et Bhuwathanapun, 1980; Trilli *et al.*, 1987). C'est le cas de l'acide clavulanique qui est produit à des taux de croissance inférieurs à $0,005 \text{ h}^{-1}$ alors qu'il n'est pas produit à des taux plus élevés ($0,1 \text{ h}^{-1}$) (Roubos *et al.*, 2001). Cependant, dans quelques cas, comme ceux de la synthèse d'érythromycine par *S. erythraeus* (Trilli *et al.* 1987) ou de la chlortétracycline par *S. aureofaciens* (Sikyta *et al.* 1961), la production d'antibiotiques en chemostat augmente avec le taux de croissance.

7.- Purification et détermination des structures chimiques des antibiotiques

7.1.- Purification

Avant d'entamer la purification des antibiotiques ou d'autres substances naturelles, une étape d'extraction est indispensable. A l'issue de la fermentation, les antibiotiques sont présents à des concentrations faibles dans un mélange polyphasique complexe comprenant les cellules et de nombreux métabolites. Une extraction liquide-liquide est donc effectuée à l'aide de solvants organiques non miscibles avec l'eau et de polarités différentes. Cette extraction présente une opération de purification partielle.

Par la suite les extraits bruts obtenus sont traités par chromatographie, soit sur papier (CP) ou sur couche mince (CCM), ou encore sur colonne à basse pression et/ou à haute pression (HPLC).

Après la séparation des différentes fractions, des révélations microbiologiques (antibiographies et bioautographies) et chimiques sont réalisées afin de repérer les différents antibiotiques et avoir certaines informations sur leur nature afin de faciliter leurs purifications.

Un exemple de protocole général de purification des antibiotiques est illustré par la figure 3.

Production de nouveaux antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis* après addition de précurseurs dans le milieu de culture

La purification totale de nombreux produits, y compris des isomères d'un mélange complexe, est rendue possible grâce à la performance de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

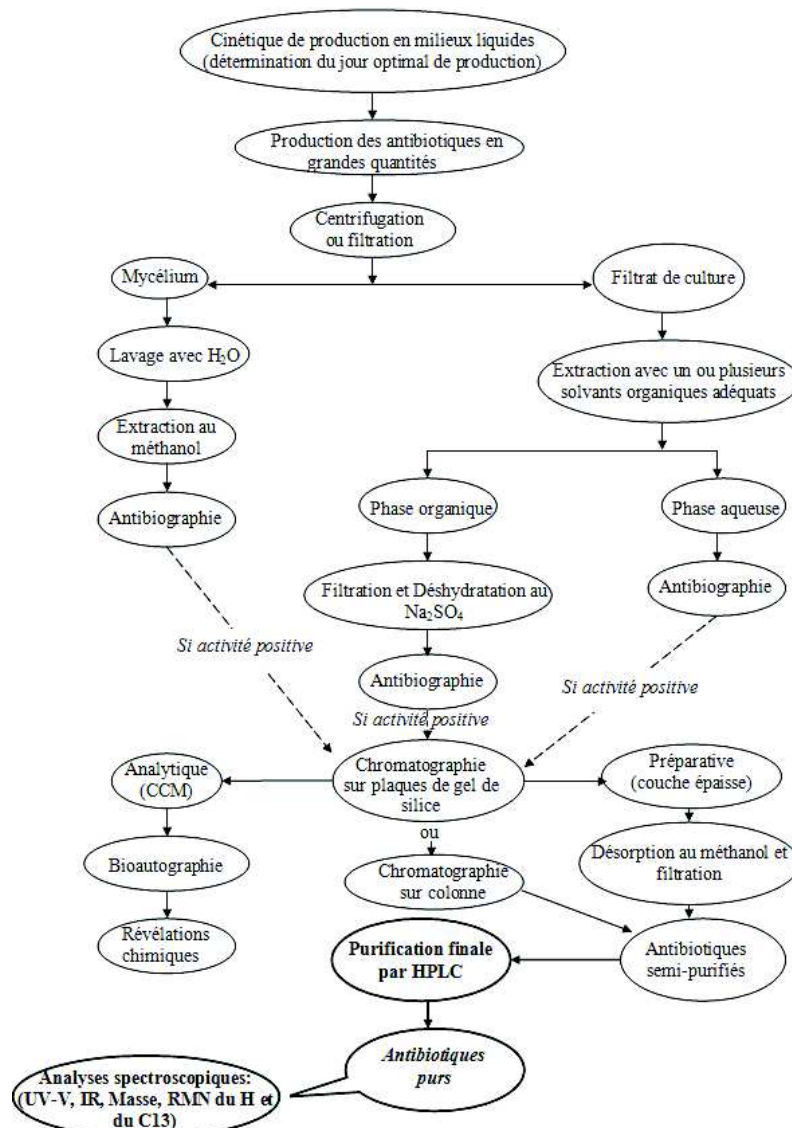


Figure 3. Protocole général de production, d'extraction, de purification et de caractérisation des antibiotiques.

* La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

C'est une technique de séparation analytique et préparative en fonction de l'hydrophobicité des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés.

L'échantillon à analyser est poussé par un liquide (phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie.

Les solvants utilisés sont des combinaisons miscibles d'eau et de divers liquides organiques (alcools, acétonitrile, dichlorométhane). La composition de la phase mobile peut souvent être modifiée au cours de l'analyse, c'est le mode dit "gradient" (en opposition au mode "isocratique", pour lequel la composition de la phase mobile reste la même tout au

long de l'analyse). Les phases liquides les plus utilisées sont les mélanges méthanol-eau et acétonitrile-eau.

L'HPLC peut être utilisée en phase normale ou en phase inverse selon le type de colonnes. Les colonnes en phase normale possèdent une phase stationnaire polaire et acide (ex.: colonne à base de gel de silice) et servent principalement à séparer des composés polaires.

Les colonnes en phase inverse possèdent une phase stationnaire composée majoritairement de petites particules de silice sur lesquelles ont été greffées des fonctions chimiques, le plus souvent des chaînes alkyles à 8 (colonne C8) ou 18 (colonne C18) atomes de carbone. Cette phase est dite "inverse" car de polaire et hydrophile (sans les "greffes"), la phase devient apolaire et hydrophobe. Les colonnes C18 sont utilisées très souvent pour la purification des antibiotiques (Zitouni, 2005; Lamari, 2006).

7.2.- Détermination des structures chimiques des antibiotiques

La caractérisation des structures chimiques des antibiotiques est le résultat de combinaison de plusieurs données obtenues par différentes analyses, principalement spectroscopiques (UV-Visible, Infra Rouge, masse et RMN du H et du C13), mais aussi chimiques, physicochimiques et chromatographiques.

7.2.1.- Spectroscopie UV-Visible

Les mesures sont réalisées dans l'UV (190 à 400 nm) et/ou dans le visible (400 à 800 nm).

Cette technique permet d'identifier la classe de l'antibiotique inconnu par comparaison avec les spectres d'absorptions connus et répertoriés. Elle permet aussi de détecter les composés aromatiques (absorption entre 240 et 260 nm), les polyènes (absorption entre 291 et 405 nm) (Dinya et Sztaricskai, 1986) et les substances insaturées (et aussi colorées) dont certaines absorbent même dans le visible.

7.2.2.- Spectroscopie Infra Rouge

Les absorptions dans l'Infra Rouge permettent de déterminer la présence de groupements et de fonctions dans une substance inconnue (CH₃, CH₂, CH, OH, NH₂, NH, CHO, COOH), d'aromatiques, etc., et ce, à l'aide des tables de corrélations (Williams et Fleming, 1989).

7.2.3.- Spectrométrie de masse

La **spectrométrie de masse** est une technique physique d' analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse mono-isotopique . De plus, la spectrométrie de masse permet de caractériser la structure chimique des molécules en les fragmentant. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Il existe différentes méthodes d'ionisation. Les plus utilisées pour l'étude des antibiotiques sont l'ionisation chimique (IC), l'ionisation par bombardement rapide des atomes (FAB), l'impact électronique et l'électrospray (Deshayes *et al.*, 1989).

7.2.4.- Résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est un phénomène par lequel un [noyau de l'atome](#) considéré absorbe les [rayonnements électromagnétiques](#) d'une [fréquence](#) spécifique en présence d'un fort [champ magnétique](#) .

Un spectre RMN se présente sous forme de pics caractérisant les déplacements chimiques (exprimés en ppm) et les constantes de couplages des protons ou des carbones. Le nombre de signaux et la valeur du déplacement chimique correspondant permettent d'identifier le nombre et la nature des groupes de protons et des carbones équivalents (en utilisant des tables de corrélations). L'intensité des signaux est proportionnelle au nombre du proton et la forme de chaque signal renseigne sur le nombre de protons voisins du proton étudié. La structure chimique des antibiotiques et autres composés peut ainsi être déterminée par RMN du proton et du carbone 13.

8.- Antibiotiques sécrétés par *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137

La chromatographie sur couche mince de l'extrait brut au dichlorométhane du filtrat de culture de *Sa. algeriensis* (provenant du milieu complexe ISP2), en utilisant le système de solvant "acétate d'éthyle-méthanol", a révélé la présence de deux taches visibles à l'œil nu, de couleur jaune vif, nommées AJ et PS, actives contre les bactéries, les champignons et les levures. Après analyse par HPLC, AJ s'est révélé être constitué par un seul antibiotique et PS, par un complexe de six antibiotiques nommés PSA, PSB, PSC1, PSC2, PSD et PSF (Zitouni, 1995; Lamari, 2006).

Après la purification finale par HPLC préparative et la réalisation des analyses spectroscopiques nécessaires, ces auteurs ont déterminé la structure chimique des 7 molécules. Ces antibiotiques appartiennent au groupe des dithiopyrrolones (hétérocycles soufrés et azotés). L'antibiotique majoritaire AJ est identifié à la thiolutine (*syn.* acétyl-pyrrothine, acéto-pyrrothine, farcinicine) et un second à l'isobutyropyrrhothine. Cinq autres molécules se sont révélées être de nouveaux antibiotiques (Lamari, 2002a,b et 2006). La structure chimique de ces antibiotiques est donnée par la figure 4. *Sa. algeriensis* est le seul taxon de *Saccharothrix* à produire des antibiotiques de la famille des dithiopyrrolones.

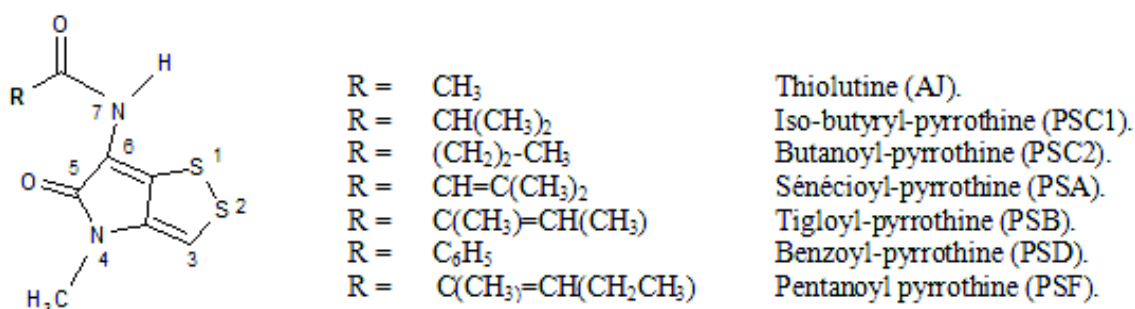


Figure 4. Antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones synthétisés par *Sa. algeriensis* (Lamari, 2002a,b et 2006).

IV.- LES ANTIBIOTIQUES DU GROUPE DES DITHIOPYRROLONES

1.- Définition et classification

Les dithiopyrrolones sont des dérivés d'un hétérocycle caractérisé par la présence d'un noyau appelé dithiopyrrolone (pyrrolinodithiole, pyrrolinonodithiole ou encore pyrroloisothiazole) de type 1,2-dithiolo-[4,3-*b*] pyrrol-5(4H)-one. Leur structure bi-cyclique est composée de deux cycles accolés de cinq atomes chacun: un cycle dithiole (contenant deux atomes de soufre) et un cycle pyrrole qui porte des radicaux reliés à l'azote n° 4 et à l'azote n° 7.

Plusieurs structures ont été décrites dans le groupe des dithiopyrrolones, mais deux groupes sont principalement distingués, selon la nature du groupement lié à l'azote n° 4: les holothines liées avec un H et les pyrrothines liées avec un CH₃ (Stachel *et al.*, 2002). Les différents dérivés appartenant à ces deux groupes de dithiopyrrolones diffèrent entre eux par la chaîne latérale liée à l'azote n° 7.

La figure 5 montre la structure générale des dithiopyrrolones.

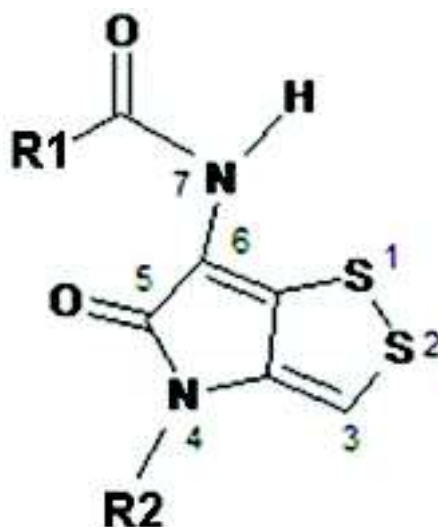


Figure 5. Structure générale des dithiopyrrolones.

R2 = H (holothines) ou CH₃ (pyrrothines) et R1 variable selon les dithiopyrrolones.

2. - Propriétés physico-chimiques et spectroscopiques des dithiopyrrolones

Les propriétés physico-chimiques et spectroscopiques de quelques dithiopyrrolones sont résumées dans le tableau 5.

Les spectres UV-Visible montrent trois maxima d'absorption caractéristiques à des longueurs d'ondes comprises entre 203 et 219, 287 et 311 et 386 et 406 nm. Ces maxima d'absorption sont caractéristiques du noyau pyrrolinonodithiole.

Les spectres en Infra Rouge font apparaître plusieurs maxima d'absorption correspondants aux différents groupes fonctionnels des dithiopyrrolones, c'est-à-dire, deux liaisons amides et deux liaisons C=C. Les maxima d'absorption entre 1530-1553 cm⁻¹ et entre 3205-3280 cm⁻¹ correspondent à des liaisons NH. Deux bandes C=O sont visibles

entre 1633-1661 cm^{-1} et 1645-1680 cm^{-1} . Par ailleurs une bande entre 1575-1600 cm^{-1} traduit la présence de liaisons C=C.

Les spectres de masse des dithiopyrrolones obtenus par impact électronique présentent un pic caractéristique à $m/z = 172$ ou 186 correspondant à la molécule après la perte du groupement acyl lié par une liaison amide à l'azote n° 7. Ce fragment caractéristique correspond à la pyrrothine ($m/z = 186$) qui contient un CH_3 lié à l'azote n° 4 ou à l'holothine ($m/z = 172$) qui contient par contre un H lié à cet azote.

	Thiolutine	Seneciolyl-pyrrothine	Tigloyl-pyrrothine	Butanoyl-pyrrothine	Holomycine	Propionyl-holothine
Couleur	Jaune	Jaune-Orange	Jaune-Orange	Jaune	Jaune	Jaune
Formule chimique	$\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$	$\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$	$\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$
Solubilité						
- soluble	MeOH, EtOH, CH_2Cl_2 , CHCl_3 , acétone, CH_3COOH , DMSO	MeOH, CH_2Cl_2 , CHCl_3 , DMSO, Me_2CO , H_2O , EtOAc, CH_3CN	MeOH, CH_2Cl_2 , CHCl_3 , DMSO	MeOH, CH_2Cl_2 , CHCl_3 , DMSO	MeOH, EtOH, CH_2Cl_2 , CHCl_3 , DMSO, acétone	MeOH, CH_2Cl_2 , CHCl_3 , DMSO
- moyennement soluble	H_2O	Me_2CO , H_2O , EtOAc, CH_3CN	Me_2CO , H_2O , EtOAc, CH_3CN	Me_2CO , H_2O , EtOAc, CH_3CN	H_2O	Me_2CO , H_2O , EtOAc, H_3CN
-peu soluble à insoluble	Ether, benzène, hexane	Hexane	Hexane	Hexane	Ether, benzène, hexane	Hexane
UV dans le MeOH: λ max en nm (log ϵ)	250 (3,80), 311 (3,75), 388 (4,04)	302 (3,87), 402 (3,97)	302 (3,85), 402 (3,96)	308 (3,70), 389 (3,92)	246 (3,81), 302 (3,49), 388 (4,05)	246 (3,89), 302 (3,63), 388 (4,16)

Tableau 5. Données physicochimiques et spectroscopiques de quelques dithiopyrrolones (d'après Celmer et Solomons, 1955; Lamari et al., 2002a,b).

Note: MeOH (méthanol), EtOH (ethanol), CH_2Cl_2 (dichlorométhane), CHCl_3 (chloroforme), CH_3COOH (acide acétique), Me_2CO (acétone), EtOAc (ethyl-acetate), CH_3CN (acétonitrile), DMSO (diméthylsulfoxyde), CDCl_3 (chloroforme deutérié) et KBr (bromure de potassium); EI-MS (masse en impact électronique).

3.- Microorganismes producteurs de dithiopyrrolones

Les dithiopyrrolones sont connues pour être produites par les espèces appartenant à quatre genres de microorganismes:

- Quelques espèces de *Streptomyces* (Celmers et Solomons, 1955; 1963; Yamagishi et al., 1971; Juhl et Chark, 1990; Naik et al., 2001).
- Quelques espèces de *Xenorhabdus*, *Enterobacteriaceae* vivant en symbiose avec certains nématodes pathogènes d'insectes nuisibles dans l'agriculture (Mc Inerney et al., 1991; Isaacson et Webster, 2002; Webster et al., 2002).
- une bactérie marine, *Alteromonas rava* (Shiozawa et al., 1993).
- *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137, qui représente la première souche d'actinomycète autre que *Streptomyces* pouvant produire des antibiotiques de ce groupe (Lamari et al., 2002a,b).

Une liste des microorganismes producteurs de dithiopyrrolones est donnée dans le tableau 6.

La thiolutine et l'auréothricine ont été isolées la première fois à la fin des années 1940 et au début des années 1950, à partir de différentes souches de *Streptomyces albus* et *S. kasugaensis*, respectivement (Umezawa *et al.*, 1949; Tanner *et al.*, 1950). Leur structure chimique a été déterminée pour la première fois par Celmer et Solomons en 1955. Par la suite, elles ont été isolées à partir d'autres espèces de *Streptomyces*: *S. celluloflavus*, *S. Kasugaensis*, *S. luteoreticuli*, *S. pimprina* et *S. thioluteus* (Yamagishi *et al.*, 1971; Furumai *et al.*, 1982).

Plusieurs autres dithiopyrrolones telles que l'holomycine, l'isobutyropyrrrothine et les xénorhabdines furent isolées de certaines espèces de *Streptomyces* citées précédemment, mais aussi de *S. cyanoflavus*, *S. griseus* et *S. clavuligerus* (Seneca *et al.*, 1952; Celmer *et al.*, 1952; Eisenman *et al.*, 1953; Ettlinger *et al.*, 1959; Bhate *et al.*, 1960; Von Daehne *et al.*, 1969; Yamagishi *et al.*, 1971; Okamura *et al.*, 1977) ou de bactéries non mycéliennes telles que *Xenorhabdus bovienii*, *X. luminescens* et *X. nematophilus* (Mc Inerney *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1996; Forst et Nealson, 1996 et Webster *et al.*, 2002).

Les thiomarinoles (A à G) sont d'autres dérivés plus complexes de dithiopyrrolones, isolés à partir de la bactérie marine *Alteromonas rava* (Shiozawa *et al.*, 1993; Shiozawa et Takahashi, 1994). La figure 6 montre la structure du thiomarinole A.

Production de nouveaux antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis* après addition de précurseurs dans le milieu de culture

Dithiopyrrolones	Formule et PM	R ₁	R ₂	Espèces productrices	Références
Pyrothina	C ₈ H ₁₀ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 186	CH ₃	H-N-H	<i>Streptomyces sp.</i>	Furumai <i>et al.</i> , 1982; Oliva <i>et al.</i> , 2001.
Thiolutina (syn.: acétyl-pyrothina, acéto-pyrothina, farcinicine)	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 228	CH ₃	H-N-CO-CH ₃	<i>Streptomyces thioluteus</i> , <i>S. celluloflavus</i> , <i>S. albus</i> , <i>S. pimprina</i> , <i>S. karugaensis</i> , <i>S. luteoreticuli</i> , <i>Saccharothrix algeriensis</i> .	Calmer et Solomons, 1955; Calmer et Solomons, 1963; Yamagishi <i>et al.</i> , 1971; Lamari <i>et al.</i> , 2002a,b.
Auréothricine (syn.: propionyl-pyrothina, propio-pyrothine)	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 242	CH ₃	H-N-CO-CH ₂ -CH ₃	<i>Streptomyces karugaensis</i> , <i>S. pimprina</i> , <i>S. farcinicus</i> , <i>S. thioluteus</i> , <i>S. luteoreticuli</i> , <i>S. celluloflavus</i> , <i>S. quavoflavus</i> (et aussi synthétisé chimiquement).	Umezawa <i>et al.</i> , 1949; Calmer <i>et al.</i> , 1952; Calmer et Solomons, 1955; Yamagishi <i>et al.</i> , 1971; Juhl et Clark, 1990; Naik <i>et al.</i> , 2001.
Iso-butryl-pyrothine (syn.: iso-buturo-pyrothina, 2-méthylpropanoyl-pyrothine)	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 256	CH ₃	H-N-CO-CH(CH ₃) ₂	<i>Streptomyces pimprina</i> , <i>Saccharothrix algeriensis</i> (et aussi synthétisé chimiquement).	Bhate <i>et al.</i> , 1960; Lamari <i>et al.</i> , 2002a,b.
Xénorhabdine VII (syn.: butanoyl-pyrothine, butyro-pyrothine)	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 256	CH ₃	H-N-CO-(CH ₂) ₃ -CH ₃	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. lutescens</i> , <i>X. bovienii</i> , <i>Saccharothrix algeriensis</i> .	Lamari <i>et al.</i> , 2002a,b; Webster <i>et al.</i> , 2002.
Senaciol-pyrothine (syn.: 3-méthyl-2-butanoyl-pyrothine)	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 268	CH ₃	H-N-CO-CH=C(CH ₃) ₂	<i>Saccharothrix algeriensis</i> .	Lamari <i>et al.</i> , 2002a,b.
Tigloyl-pyrothine	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 268	CH ₃	H-N-CO-C(CH ₃)=CH(CH ₃) ₂	<i>Saccharothrix algeriensis</i> .	Lamari <i>et al.</i> , 2002a,b.
Benzoyl-pyrothine	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 290	CH ₃	H-N-CO-C ₆ H ₅	<i>Saccharothrix algeriensis</i> (et aussi synthétisé chimiquement).	Lamari, 2006.
Xénorhabdine VI (syn.: 3-méthyl-butanoïl-pyrothine)	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 270	CH ₃	H-N-CO-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. lutescens</i> , <i>X. bovienii</i> .	Mc Inamey <i>et al.</i> , 1991; Webster <i>et al.</i> , 2002.
Xénorhabdine IV (syn.: hexanoïl-pyrothine)	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 284	CH ₃	H-N-CO-(CH ₂) ₄ -CH ₃	<i>Xenorhabdus spp.</i>	Mc Inamey <i>et al.</i> , 1991; Paik <i>et al.</i> , 2001; Webster <i>et al.</i> , 2002.
Pentényl-pyrothine	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 284	CH ₃	N-H-CO-C(CH ₃) ₂ CH(CH ₃) ₂	<i>Saccharothrix algeriensis</i> .	Lamari 2006.
Xénorhabdine V (syn.: 5-méthylhexanoïl-pyrothine)	C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 298	CH ₃	H-N-CO-(CH ₂) ₅ -CH(CH ₃) ₂	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. lutescens</i> , <i>X. bovienii</i> .	Mc Inamey <i>et al.</i> , 1991; Paik <i>et al.</i> , 2001; Webster <i>et al.</i> , 2002.
Holomycine (syn.: démétyl-)	C ₈ H ₁₀ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 214	H	H-N-CO-CH ₃	<i>Streptomyces sp.</i> P6621, <i>S. carissae</i>	Erlinger <i>et al.</i> , 1959; Okamura <i>et al.</i> , 1977; De la Fuente <i>et al.</i> , 2002.
Propionyl-holothine	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 228	H	H-N-CO-CH ₂ -CH ₃	<i>Streptomyces</i> P6621 (et aussi synthétisé chimiquement).	Okamura <i>et al.</i> , 1977.
Xénorhabdine I (syn.: hexanoïl-holothine)	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 270	H	H-N-CO-(CH ₂) ₄ -CH ₃	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. lutescens</i> , <i>X. bovienii</i> .	Li <i>et al.</i> , 1996; Forst et Neilson, 1996; Webster <i>et al.</i> , 2002.
Xanthydroï (dérivé de la Xénorhabdine I)	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 450	Xanthydryl	H-N-CO-(CH ₂) ₄ -CH ₃	Transformation chimique de la Xénorhabdine I.	Mc Inamey <i>et al.</i> , 1991.
Xénorhabdine II (syn.: 3-méthylhexanoïl-holothine)	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 284	H	H-N-CO-(CH ₂) ₅ -CH(CH ₃) ₂	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. lutescens</i> , <i>X. bovienii</i> .	Mc Inamey <i>et al.</i> , 1991; Paik <i>et al.</i> , 2001; Webster <i>et al.</i> , 2002.
Xénorhabdine III (syn.: octanoïl-holothine)	C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 298	H	H-N-CO-(CH ₂) ₆ -CH ₃	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> .	Mc Inamey <i>et al.</i> , 1991; Webster <i>et al.</i> , 2002.
Thiomaurine (syn.: arocomycine ou antibiotique VD 844)	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 214	H	CH ₂ -N-CHO	<i>Streptomyces sp.</i>	Von Dahnne <i>et al.</i> , 1969; Laskin et Lechevalier, 1984.
Antibiotique VD 846	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 200	H	H-N-CHO	<i>Streptomyces sp.</i>	Laskin et Lechevalier, 1984.
Thiomarinole A	C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 640	H	H-N-CO-C ₁₂ H ₁₈ O	<i>Ateromonas rana</i> .	Shiozawa <i>et al.</i> , 1993; Shiozawa et Takahashi, 1994.
Thiomarinole B	C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 672	H	H-N-CO-C ₁₂ H ₁₈ O ₂	<i>Ateromonas rana</i> .	Shiozawa <i>et al.</i> , 1995.
Thiomarinole C	C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 624	H	H-N-CO-C ₁₂ H ₁₈ O ₆	<i>Ateromonas rana</i> .	Shiozawa <i>et al.</i> , 1995.
Thiomarinole D	C ₁₇ H ₂₆ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 654	H	H-N-CO-C ₉ H ₁₄ O	<i>Ateromonas rana</i> .	Shiozawa <i>et al.</i> , 1997.
Thiomarinole E	C ₁₇ H ₂₆ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 668	H	H-N-CO-C ₉ H ₁₄ O	<i>Ateromonas rana</i> .	Shiozawa <i>et al.</i> , 1997.
Thiomarinole F	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 638	H	H-N-CO-C ₁₀ H ₁₆ O	<i>Ateromonas rana</i> .	Shiozawa <i>et al.</i> , 1997.
Thiomarinole G	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₅ S ₂ PM: 624	H	H-N-CO-C ₁₀ H ₁₆ O ₆	<i>Ateromonas rana</i> .	Shiozawa <i>et al.</i> , 1997.

Tableau 6. Différentes dithiopyrrolones sécrétées par les microorganismes

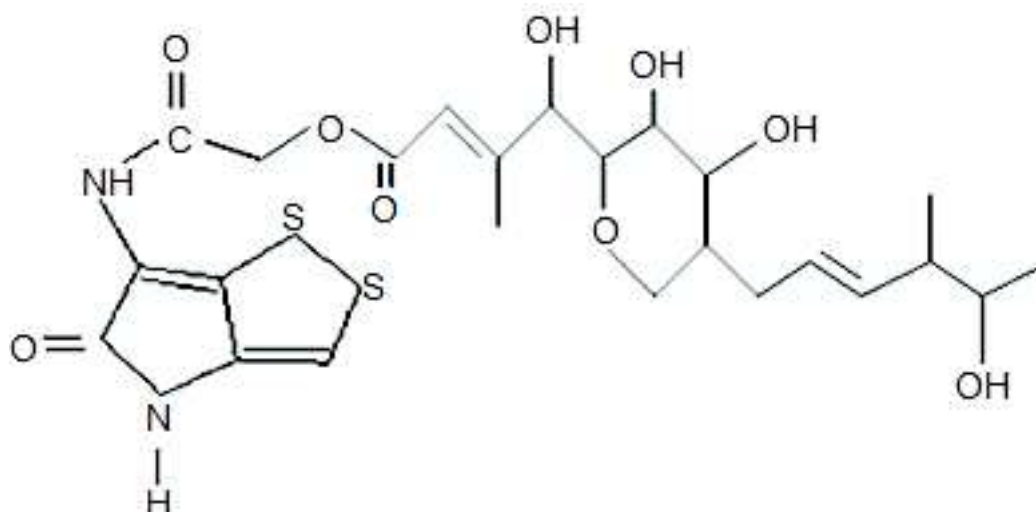


Figure 6. Structure d'une dithiopyrrolone complexe: le thiomarinole A.

4.- Spectre d'action des dithiopyrrolones

Les dithiopyrrolones possèdent un spectre d'action assez large, qui touche les bactéries (à Gram positif et à Gram négatif), les levures, les champignons microscopiques et même les protozoaires et les insectes (Cole et Rolinson, 1972; Webster *et al.*, 2002). L'activité antagoniste des dithiopyrrolones a été mise en évidence par plusieurs chercheurs: Gopalkrishnan et Jump (1952), Lewis et Michener (1954), Li et Webster (1995), Zitouni (1995), Yang *et al.* (1998), Yang *et al.* (2001), Merrouche (2000), Oliva *et al.* (2001), Meklat (2004) et Lamari (2006). Cependant, l'utilisation des dithiopyrrolones dans la lutte contre les bactéries pathogènes est limitée par leur forte toxicité, tout comme les anthracyclines (Niemi, 1995). Les microorganismes inhibés par la thiolutine ou par d'autres dithiopyrrolones sont cités dans le tableau 7.

Les dithiopyrrolones possèdent d'autres activités importantes, comme l'activité anticancéreuse qui a été mise en évidence depuis les années 1990. D'après les travaux de Minamiguchi *et al.* (2001), la thiolutine inhibe l'adhésion de certaines cellules endothéliales (Human Umbilical Veines Endothelial Cells) à la vitronectine. Ainsi, la thiolutine supprime l'angiogénie induite par les tumeurs *in vivo* ce qui lui confère une activité antitumorale. Par ailleurs, de nombreuses dithiopyrrolones sont cytotoxiques pour certaines lignées cellulaires cancéreuses, en particulier les cellules cancéreuses du colon, du cerveau et du sein (Webster *et al.* 2000). En outre, les activités anticancéreuses, tout comme les activités antimicrobiennes, s'avèrent dépendantes de la nature des radicaux.

Production de nouveaux antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis* après addition de précurseurs dans le milieu de culture

	Microorganismes-cibles
Bactéries à Gram positif	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium</i> sp., <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Mycobacterium phlei</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> et <i>Enterococcus faecalis</i> .
Bactéries à Gram négatif	<i>Aerobacter aerogenes</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Erwinia amylovora</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Neisseria catarrhalis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>Salmonella paratyphi</i> , <i>S. schottmulleri</i> , <i>S. typhi</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Sh. sonnei</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> et <i>Serratia marcescens</i> .
Champignons filamenteux ou levuriformes pathogènes pour l'homme	<i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>C. kefyr</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Endomyces albicans</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Microsporon audouini</i> , <i>M. fulvum</i> , <i>Mucor ramannianus</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , et <i>T. rubrum</i> .
Champignons filamenteux phytopathogènes	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>B. fabae</i> , <i>Cercospora arachidicola</i> , <i>Chaetomium globosum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> , <i>F. o. ciceri</i> , <i>F. o. lentis</i> , <i>F. o. lini</i> , <i>F.o. lycopersici</i> , <i>Myrothecium verrucaria</i> , <i>Peronospora tabacina</i> , <i>Phytophthora boehmeriae</i> , <i>P. cinnamomi</i> , <i>P. infestans</i> , <i>Plasmopora viticola</i> , <i>Puccinia recondita</i> , <i>Pyricularia oryzae</i> , <i>Pythium ultimum</i> , <i>P. irregulare</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Venturia inaequalis</i> , <i>Verticillium albo-atrum</i> et <i>Aspergillus niger</i> .
Champignons filamenteux et levuriformes non pathogènes	<i>Penicillium notatum</i> , <i>P. purpureum</i> , <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> .
Protozoaires parasites pour l'homme	<i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Leishmania donovani</i> , <i>L. tropica</i> , <i>Sporotrichum schenkii</i> , <i>Trichomonas fetus</i> et <i>Trypanosoma cruzi</i> .
Larves et insectes	<i>Heliothis punctigera</i> et <i>Lucilia sericata</i> .

Tableau 7. Liste des microorganismes inhibés par les dithiopyrrolones (liste non exhaustive).

Note:

- Liste établie d'après, Gopalkrishnan et Jump (1952), Lewis et Michener (1954), Li et Webster (1995), Yang *et al.* (1998), Yang *et al.* (2001), Oliva *et al.* (2001), Webster *et al.* (2002) et Lamari (2006).
- l'activité est généralement très forte contre les bactéries à Gram positif, forte contre les champignons, moyenne à forte contre les levures et moyenne, faible à nulle contre les bactéries à Gram négatif (selon les dithiopyrrolones testées).

Li *et al.* (2007) ont ainsi montré que la présence d'un groupement aromatique sur l'azote du noyau pyrrolone (n° 4) et sur la liaison amide exocyclique entraîne une cytotoxicité accrue contre les cellules cancéreuses du sein, du foie et des poumons. De tels composés dithiopyrrolones ont été synthétisés et montrent des activités anticancéreuses prometteuses à la fois *in vitro* et *in vivo*.

De plus, les dithiopyrrolones inhibent les allergies (Stahl *et al.*, 1988) et l'agrégation des plaquettes (Ninomiya *et al.*, 1980). Enfin, il a été rapporté que les dithiopyrrolones ont la capacité de stimuler la production des globules blancs. Ces composés pourraient donc être utilisés pour la prévention et le traitement des infections associées au virus du sida (VIH) et des maladies sanguines ou comme médicaments auxiliaires pour limiter la décroissance des globules blancs lors des radiothérapies et chimiothérapies (Guo *et al.*, 2008; Guoping et Quanhai, 2009).

5.- Mode d'action des dithiopyrrolones

Le mode d'action de la thiolutine et de l'holomycine a été étudié par plusieurs chercheurs.

L'action de la thiolutine a été démontrée chez les procaryotes, comme *Escherichia coli* (Sivasubramanian et Jayaraman, 1976 et 1980; O'Neill *et al.*, 2000), *Salmonella typhimurium* (Joshi *et al.*, 1982) et *Staphylococcus aureus* (O'Neill *et al.*, 2000) et chez les eucaryotes, comme *Saccharomyces cerevisiae* (Herrick *et al.*, 1990; Adams et Gross, 1991; Lee *et al.*, 1996; Webster *et al.*, 2002). L'action principale de la thiolutine concerne surtout l'ARN messager et la synthèse des protéines. Cet antibiotique, à des concentrations qui varient entre 5 et 40 µg/mL, inhibe la synthèse de la β-galactosidase et l'élongation de l'ARN messager (Khachatourians et Tipper, 1974a,b). La thiolutine empêche aussi d'une façon réversible la synthèse de l'ARNm chez *Saccharomyces cerevisiae* à des concentrations inférieures à 2 µg/mL (Jimenez *et al.*, 1973). En revanche, cette synthèse est bloquée immédiatement, et d'une façon irréversible, à des concentrations comprise entre 2 et 4 µg/mL et le blocage de la synthèse protéique se fait après 20 min (Webster *et al.*, 2002). La thiolutine peut agir aussi sur la membrane plasmique de certaines bactéries avec pour conséquence, l'empêchement de l'entrée de certains composés du milieu, comme l'uridine exogène, à l'intérieur des cellules de *Salmonella typhimurium* (Joshi *et al.*, 1982), ou du glucose et d'autres sources carbonées à l'intérieur des cellules d'*Escherichia coli* (Bergman, 1989).

Pour l'holomycine, Oliva *et al.* (2001) ont montré que cet antibiotique inhibe la synthèse de l'ARN chez *Escherichia coli*, mais que cette inhibition peut être une conséquence secondaire de l'inhibition de l'amino-acylation de l'ARNt. En revanche, cet antibiotique n'a pas d'activité contre les microorganismes eucaryotes, tels *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida kefyr*.

6.- Biosynthèse et synthèse chimique des dithiopyrrolones

6.1.- Biosynthèse des dithiopyrrolones

Peu d'études ont été effectuées sur la voie de biosynthèse des dithiopyrrolones. Les informations sont données généralement sous forme d'hypothèse, comme le montre la figure 7.

Le noyau de base des dithiopyrrolones proviendrait de la condensation de deux cystéines et de la cyclisation de la cystine (Adelberg et Rabinovitz, 1956; Ettliger *et al.*, 1959; et Ellis *et al.*, 1977). Ces auteurs soulignent qu'après formation du noyau pyrrothine, une acétylation de ce noyau à l'aide de l'acétyl-CoA conduit à la formation de la thiolutine. Furumai *et al.* (1982) ont montré que l'accumulation de la cystine chez *Streptomyces kasugaensis* aboutirait à la formation du noyau pyrrothine, et une réaction de ce noyau avec le propionyl-CoA conduirait à la production de l'auréothricine (propionyl-pyrrothine). Ces

mêmes auteurs pensent que les gènes responsables de cette biosynthèse sont d'origine chromosomique. De la Fuente *et al.* (2002), étudiant la biosynthèse de l'holomycine dans des extraits cellulaires de mutants de *S. clavuligerus*, mettent en évidence l'existence d'une activité enzymatique catalysant l'acylation de l'holothine avec de l'acétyl-CoA.

Des travaux récents réalisés par Chorin *et al.* (2009) ont montré la présence dans l'extrait cellulaire de *Sa. algeriensis* d'une activité enzymatique qui catalyse l'acylation du noyau pyrrothine sur l'azote n°7 en utilisant des acyls-CoA comme donneurs de groupement acyls, plus particulièrement, l'acétyl-CoA et le benzoyl-CoA qui sont respectivement les substrats d'une activité enzymatique pyrrothine N-acétyltransférase et pyrrothine N-benzoyltransférase.

Des travaux plus récents réalisés par Li *et al.* (2010) et Huang *et al.* (2010) ont identifié le groupe de gènes qui dirige la biosynthèse de l'holomycine dans l'ADN génomique de *S. clavuligerus*.

6.2.- Synthèse chimique des dithiopyrrolones

En raison de la possibilité de l'utilisation des dithiopyrrolones dans les domaines agronomique et médical, où elles ont montré des activités intéressantes, de nombreuses recherches sont consacrées à trouver de nouvelles formes de dithiopyrrolones par synthèse chimique.

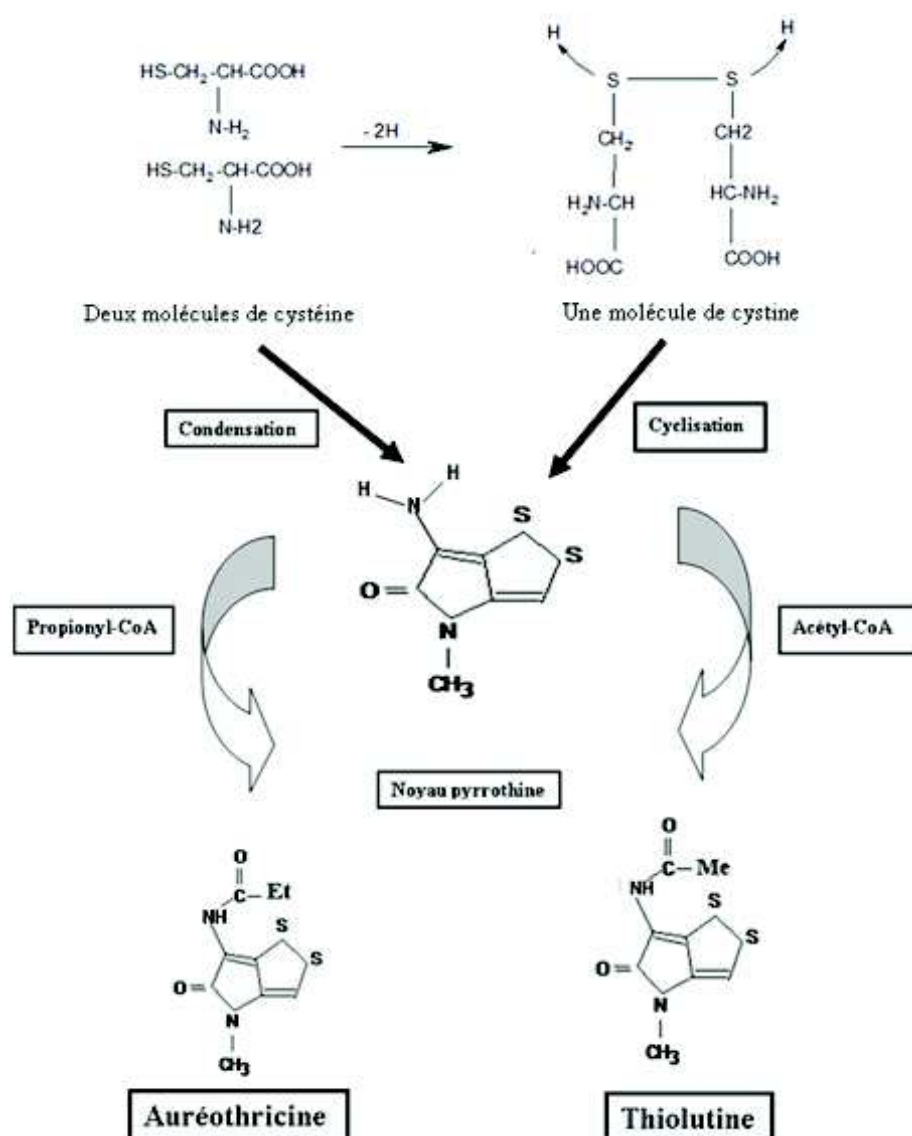


Figure 7. Hypothèse de la biosynthèse de la thiolutine (acétyl-pyrrothine) et de l'auréothricine (propionyl-pyrrothine) à partir de la condensation de deux cystéines (d'après Furumai *et al.* 1982). Me = groupement méthyl et Et = groupement éthyl.

Les premiers essais ont été réalisés par Schmidt et Geiger en 1963 qui ont pu synthétiser la thiolutine et l'holomycine (Büchi et Lukas, 1964). Par la suite, plusieurs analogues autres que la thiolutine et l'holomycine (l'auréothricine, la xenorhabdine I, la benzoyl-pyrrothine et des dérivés de thiomarinols) ont été synthétisés par des voies de synthèses complexes (7 étapes au moins) par plusieurs chercheurs (Büchi et Lukas, 1964; Hagio et Yoneda, 1974; Ellis *et al.*, 1977; Khan *et al.*, 1999; Schachtner *et al.*, 1999; Pregolato *et al.*, 2000; Seepersaud *et al.*, 2002; Elgazwy, 2003; Stachel *et al.*, 2003a,b; Hjelmgaard *et al.*, 2007). Des voies de synthèse simplifiées permettant par ailleurs de multiplier les composés synthétisés ont été rapportées plus récemment (Hjelmgaard *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Marion, 2009). Les travaux de Hjelmgaard *et al.* (2007) fournissent ainsi une voie de synthèse en six étapes permettant de synthétiser différentes dithiopyrrolones ($\text{R}_1 = \text{H}$, R_2 variable) grâce à l'acylation de l'intermédiaire holothine à l'aide de chlorures d'acyle. La voie de synthèse en six étapes de Li *et al.* (2007) permet

quant à elle de diversifier à la fois les radicaux R1 et R2 fixés sur le noyau pyrrolinonodithiole mais nécessite l'usage de l'acétate de mercure, composé à la fois toxique et polluant. Chorin *et al.* (2009) ont réalisé la synthèse chimique de la pyrrothine (90 mg) par adaptation du protocole décrit par Hjelmgaard *et al.* (2007).

7.- Régulation de la biosynthèse des dithiopyrrolones

La régulation de la biosynthèse des dithiopyrrolones a été étudiée par certains auteurs. Sturdikova *et al.* (1990) ont montré que la L-méthionine et la DL-éthionine provoquent une baisse de la production de l'auréothricine et de la thiolutine chez *S. kasugaensis*. Plusieurs travaux ont été réalisés sur la régulation de la production des dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis*, soit par l'influence de la nature de milieu de culture (Bouras, 2005; Lamari, 2006; Strub 2008), soit par l'ajout de précurseurs (Bouras, 2005; Lamari, 2006) ou encore par voie enzymatique (Chorin, 2009).

7.1.- Régulation par la nature du milieu de culture

Des études approfondies des grandes caractéristiques de la nutrition et de la croissance de *Sa. algeriensis* en milieu liquide ont été réalisées pour permettre de dégager l'importance des différents facteurs nutritionnels du milieu de culture dans la régulation de la production des dithiopyrrolones (Bouras, 2005; Lamari, 2006; Strub 2008).

Bouras (2005) a mis au point un milieu semi-synthétique (SS) qui a permis une bonne croissance et une production significative des dithiopyrrolones. La composition du milieu SS est donnée dans la page 54 paragraphe 2.1.

Lamari (2006) a réalisé une étude comparative entre des milieux complexes (ISP2, GYEA et Bennett) et le milieu SS. Le résultat obtenu par cet auteur montre une bonne production des dithiopyrrolones dans le milieu ISP2 additionné de CaCO₃. Le carbonate de calcium ajouté à une concentration de 5 g/L favorise à la fois la croissance et la production des dithiopyrrolones. Cet effet est probablement attribuable à son pouvoir tampon qui empêche l'acidification au cours de la fermentation et à sa capacité de séparer les pelotes de mycélium, ce qui favorise les transferts de matière (Lamari 2006). Cependant, il rend la détermination de la masse sèche bactérienne plus laborieuse. Les milieux SS et ISP2 contiennent le glucose et l'extrait de levure. Le glucose s'est avéré être une meilleure source de carbone pour la production des dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis* que les dextrans et l'amidon (Lamari, 2006). Enfin l'extrait de levure ajouté à une concentration de 2 g/L est nécessaire à la croissance et à la production des antibiotiques par *Sa. algeriensis* (Bouras, 2005; Lamari, 2006).

Par la suite, Strub (2008) a utilisé le milieu SS avec quelques modifications pour faciliter à la fois la détermination de la matière sèche (MS) et le travail en fermenteur. La composition chimique du milieu SS est conservée, mais le carbonate de calcium a été remplacé par du MOPS (acide 3-(N-morpholino) propanesulfonique) à une concentration de 20 g/L. Ce milieu a stimulé la croissance de *Sa. algeriensis* (obtention de 2 g/L et de 2,25 g/L de MS après 50 à 150 h de culture respectivement).

Différents milieux synthétiques ont été testés pour la croissance de *Sa. algeriensis* (Strub 2008). Leur composition est celle du milieu SS-MOPS mais l'extrait de levure a été substitué tour à tour par des acides aminés, des bases azotées et des oligoéléments. En

effet, sans extrait de levure (milieu SS-ELneg) la croissance de *Sa. algeriensis* s'avère très faible: la MS est inférieure à $0,5 \text{ g L}^{-1}$ après 150 h de culture.

L'ajout d'acides aminés au milieu SS-ELneg a permis d'améliorer la croissance par rapport à un milieu sans extrait de levure. La croissance est également meilleure sur un milieu sans extrait de levure, s'il est supplémenté en bases azotées. Enfin, seul l'ajout d'oligoéléments au milieu SS-ELneg permet d'égaliser le poids sec maximal obtenu sur milieu SS-MOPS ($2,25 \text{ g L}^{-1}$).

Enfin Strub (2008) a rapporté que la production des dithiopyrrolones n'est pas complètement découplée à la croissance. Les résultats obtenus par cet auteur montrent que la concentration de la thiolutine produite par *Sa. algeriensis* sur le milieu SS-MOPS est maximale (32 mg/L après 40 h de fermentation) à l'issue de la phase de ralentissement de la croissance.

7.2.- Régulation par les précurseurs

L'effet de l'ajout des précurseurs, plus particulièrement des acides aminés et des acides organiques, a été étudié, afin de mieux connaître les paramètres nutritionnels qui influencent la biosynthèse des dithiopyrrolones (Bouras *et al.*, 2006a,b; Bouras *et al.*, 2007; Bouras *et al.*, 2008).

7.2.1- Influence des acides aminés soufrés

La cystine, acide aminé soufré, est le précurseur dans la formation du noyau pyrrothine (Furumai *et al.*, 1982). La cystine peut être synthétisée par deux voies différentes: la première est une voie de condensation de deux cystéines en une molécule de cystine et la seconde est une conversion de la méthionine en cystine (Furumai *et al.*, 1982; Chang et Vining, 2002). Les acides aminés soufrés sont donc des précurseurs potentiels des dithiopyrrolones.

Les travaux réalisés par Bouras *et al.* (2006a,b) ont montré que selon la nature et la concentration de l'acide aminé soufré utilisé, la production des dithiopyrrolones est plus ou moins importante. L'addition de la cystéine (à 5 mM) et de la cystine (à 10 mM) a augmenté d'une façon remarquable la production spécifique de la sénécioyl-pyrrothine, la tigloyl-pyrrothine, l'iso-butyryl-pyrrothine et la butanoyl-pyrrothine. En revanche, la production spécifique maximale de la thiolutine est enregistrée en présence de la cystine (5 mM) et sans addition de la cystéine. Par contre l'ajout de l'arginine à 5 mM inhibe complètement la production de la thiolutine mais favorise la production d'autres dithiopyrrolones. Enfin, la méthionine, tout comme son analogue l'éthionine, a un effet négatif sur la production spécifique de l'ensemble des dithiopyrrolones à 5 mM sans inhibition de la croissance.

7.2.2- Influence des acides organiques

Les dithiopyrrolones sont formées d'un noyau pyrrothine sur lequel est fixé un radical carboxylé (CO-R). L'acylation du noyau pyrrothine à partir d'acides organiques activés sous formes d'acyls-CoA aboutirait à la formation de différents dérivés de dithiopyrrolones selon le type de radical greffé (Furumai *et al.*, 2002; Bouras, 2005). Les acides organiques sont donc de potentiels précurseurs des dithiopyrrolones. Les travaux de Bouras *et al.* (2007 et 2008) ont montré que l'ajout des acides organiques à une concentration optimale de 5 mM dans le milieu SS influence non seulement la quantité des dithiopyrrolones déjà produites

dans le milieu SS basal, mais aussi la production de nouvelles dithiopyrrolones (observées par HPLC), qui ne sont pas connues pour être produites par *Sa. algeriensis*.

D'après les mêmes auteurs, l'effet des acides organiques sur la production des dithiopyrrolones se fait selon deux manières différentes:

- Les acides organiques jouent un rôle de précurseurs directs dans la production des dithiopyrrolones correspondantes, c'est-à-dire, la structure de l'acide organique correspond au radical R. La biosynthèse est dirigée par l'ajout des précurseurs dans le milieu. Il s'agit d'un procédé de contrôle de la production des métabolites secondaires et d'obtention de nouveaux métabolites bioactifs. Ce procédé aussi appelé PDB (ou «precursor-directed biosynthesis») a déjà été mis en œuvre pour la production de différents analogues de métabolites secondaires (Yajima *et al.*, 1975; Lam *et al.*, 2001). Parmi les acides organiques qui ont joué un rôle de précurseur direct, certains ont permis d'augmenter la production des dithiopyrrolones produites dans le milieu SS basal (tels que l'acide butyrique et l'acide tiglique qui ont permis d'augmenter respectivement la production spécifique des dithiopyrrolones correspondantes, butanoyl-pyrrothine et tigloyl-pyrrothine) et d'autres ont permis d'obtenir de nouveaux pics de dithiopyrrolones détectés par HPLC.
- Les acides organiques ne jouent pas un rôle de précurseurs directs dans la production des dithiopyrrolones. L'ajout des acides sorbique, crotonique et 4-bromobenzoïque dans le milieu de culture ont entraîné l'augmentation de la production spécifique de la butanoyl-pyrrothine, iso-butyryl-pyrrothine et sénéciol-pyrrothine respectivement.

7.3.- Régulation par voie enzymatique

7.3.1.- Identification des activités N-acyltransférase chez *Sa. algeriensis*

Pour avoir la capacité de produire différentes dithiopyrrolones avec une grande diversité structurale, *Sa. algeriensis* doit posséder non seulement les précurseurs correspondants mais aussi un système enzymatique adapté ayant une flexibilité suffisante pour transférer une grande variété de radicaux R sur l'azote n° 7.

Chorin (2009) a pu mettre en évidence une activité enzymatique pyrrothine N-acyltransférase impliquée dans la biosynthèse des dithiopyrrolones dans l'extrait cellulaire de *Sa. algeriensis* obtenu sur milieu semi-synthétique SS, supplémenté ou non en acide organique. En particulier, le transfert du groupement acétyl- sur la pyrrothine catalysé par une activité enzymatique pyrrothine N-acétyltransférase aboutit à la formation de la thiolutine (acétyl-pyrrothine). Le transfert du groupement benzoyl- sur la pyrrothine catalysé par une activité enzymatique pyrrothine N-benzoyltransférase entraîne la synthèse de la benzoyl-pyrrothine. Ces résultats suggèrent que la réaction enzymatique d'acylation du noyau pyrrothine fait partie de la voie de biosynthèse des dithiopyrrolones chez *Sa. algeriensis*. Ainsi cette souche est capable d'utiliser des acyls-CoA avec des structures très différentes (acétyl-CoA et benzoyl-CoA) pour produire les dithiopyrrolones correspondantes (thiolutine et benzoyl-pyrrothine).

7.3.2.- Synthèse enzymatique des différents dérivés de dithiopyrrolones chez *Sa. algeriensis*

La synthèse de nouveaux dérivés dithiopyrrolones par acylation de molécules acceptrices (holothine, pyrrothine) avec différents groupements acyls a été réalisée avec un extrait

cellulaire de *Sa. algeriensis*, qui a été utilisé comme catalyseur enzymatique, sous sa forme brute ou sous une forme semi-purifiée (Chorin, 2009). Cet auteur a ainsi pu synthétiser sept dérivés pyrrothines: la thiolutine, la benzoyl-pyrrothine, la butanoyl-pyrrothine, la crotonoyl-pyrrothine, l'acétoacétyl-pyrrothine, l'hexanoyl-pyrrothine et l'hydroxybutyryl-pyrrothine.

La structure chimique des nouvelles dithiopyrrolones synthétisées a été proposée par l'auteur en se basant sur la masse des produits uniquement. D'autres études spectroscopiques, particulièrement les RMN du H et du C13 doivent être réalisées pour la confirmation des structures chimiques de ces nouvelles molécules.

8.- Domaines d'utilisation des dithiopyrrolones

8.1.- Utilisation dans le domaine agronomique

Sans être utilisée à grande échelle dans la protection des cultures, la thiolutine a fait l'objet de plusieurs travaux lesquels ont tous abouti à des résultats assez prometteurs (Leben et Keitt, 1954; Schaffner, 1954; Dell *et al.*, 1992; Merrouche, 2000; Meklat, 2004).

Gopalkrishnan et Jump (1952) ont obtenu une protection totale de la tomate contre la fusariose vasculaire due à *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en trempant des racines de plants pendant quatre jours dans une solution aqueuse de thiolutine à 10 ppm avant de les mettre en présence de l'agent pathogène.

Murneek (1952) et Winter et Young (1955) ont montré que le traitement du pommier par la thiolutine permet de réduire de 80% la maladie du «feu bactérien» due à *Erwinia amylovora*, alors que cette réduction n'est que de 55% avec la streptomycine, puissant antibactérien de la famille des aminosides.

Grosso (1954) a constaté que la pulvérisation des feuilles de tabac par des solutions aqueuses de 0,8 à 7,2 ppm de thiolutine protège totalement la plante contre la moisissure bleue du tabac, due à *Peronospora tabacina*.

Zentmyer (1955) a montré que la thiolutine, à 50 ppm, a une action fongicide totale sur *Phytophthora cinnamomi* dans un sol autoclavé.

D'autres dithiopyrrolones, comme les xénorhabdines, ont montré des activités insecticides (Mc-inerney *et al.*, 1991; Paik *et al.*, 2001).

Dell *et al.* (1992) ont obtenu une activité protectrice de la vigne contre le mildiou, dû à *Plasmopara viticola* et contre la fonte des semis due à *Pythium ultimum*, en utilisant la thiolutine à raison de 3 à 25 ppm. Les mêmes auteurs obtiennent, avec 10 ppm, une action fongicide *in vitro* contre *Phytophthora infestans*, *Cercospora arachidicola*, *Venturia inaequalis*, *Pyricularia oryzae* et *Puccinia recondita*.

Merrouche (2000) a montré que l'utilisation de la thiolutine à raison de 5 mg pour 100 g de sol, fait baisser la population des agents pathogènes *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* et

F. o. f. sp. lini, de 113 et de 8,5 fois respectivement, et l'utilisation de la même dose fait diminuer nettement la fusariose vasculaire du lin.

Meklat (2004) a constaté que la thiolutine à une concentration de 1 mg/mL, et à raison de 1,2 ml par plant de fève, fait baisser de 40% la maladie "tache chocolat" de cette plante, due à *Botrytis fabae*.

Par ailleurs la thiolutine est un inhibiteur de la croissance de certaines plantes (mauvaises herbes) comme *Lemna minor* (Nickell et Finlay, 1954).

De plus, la thiolutine possède une activité larvicide contre les larves des insectes nuisibles, comme *Lucilia sericata* (Cole et Rolinson, 1972).

8.2.- Utilisation dans d'autres domaines

La thiolutine possède des propriétés antihistaminiques (Cole et Rolinson, 1972; Budavari *et al.*, 1989).

D'après le NCI (*National Cancer Institute*) des Etats Unis d'Amérique, la thiolutine a un rôle préventif contre les effets des substances carcinogènes des cellules épithéliales (Arnold *et al.*, 1995); le même effet est constaté pour les cellules des poumons, du colon, de la prostate, de la peau, des reins et du cerveau (Webster *et al.*, 2000).

L'équipe japonaise de Masaaki Ishizuka, à l'Institut de Chimiothérapie de Shizuoka, a montré l'activité antiangiogénique de la thiolutine (Minamiguchi *et al.*, 2001). De plus, d'après le même institut, la thiolutine inhibe une protéine appelée l'intégrine $\alpha\beta 3$ alors que des études précédentes avaient prouvé que les inhibiteurs de l'intégrine $\alpha\beta 3$ empêchent la croissance des tumeurs (Brooks *et al.*, 1995).

Minamiguchi *et al.* (2001) ont également montré que d'autres dithiopyrrolones (auréothricine, holomycine, thioaurine, propiopyrrothine, etc.) possèdent les mêmes propriétés antitumorales.

Li *et al.* (2007) ont pu synthétiser des dérivés de dithiopyrrolones chimiquement, à partir de 1,3-bis (tert-butylsulfanyl) propan-2-one, en six étapes. Ces dérivés ont démontré, *in vitro*, une activité cytotoxique importante chez l'homme.

9.- Toxicité des dithiopyrrolones

La thiolutine est un antibiotique toxique pour les animaux, au vu de sa DL₀: 5-10 mg/Kg en sous-cutanée et 10 mg/Kg par voie orale, et de sa DL₅₀ qui est de 25 mg/Kg, par voie orale ou sous-cutanée, chez la souris (Seneca *et al.*, 1952). Ceci peut donc l'exclure de toute possibilité d'utilisation dans la thérapeutique. Mais en terme de toxicité aiguë, la thiolutine est environ cent fois moins toxique que certaines toxines algales (phycotoxines).

Malgré cette toxicité relative sur les animaux, la thiolutine, grâce à son spectre d'action intéressant, a vu son utilisation orientée dans le domaine agronomique (voir paragraphe 8.1). Il fallait cependant éviter d'éventuels effets phytotoxiques. Murneek (1952), Grosso (1954) et Dell *et al.* (1992) sont arrivés à protéger le pommier, le tabac, la vigne, etc., en utilisant la thiolutine à des doses non toxiques pour ces plantes. Gopalkrishnan et Jump (1952) ont constaté qu'une dose de 80 ppm de thiolutine réduit la croissance de la tomate de 23% (mesure du poids frais), que des doses de 60 ppm n'ont aucun effet sur sa croissance et que 10 ppm seulement suffisent à la protéger totalement de la fusariose.

Ces résultats montrent que l'utilisation de ce composé dans l'agriculture devrait se faire avec une certaine précaution, en tenant compte de la sensibilité de l'agent pathogène, de la toxicité de l'antibiotique sur la plante à traiter, etc. Plusieurs expérimentations préliminaires devraient, dans tous les cas, être effectuées.

Chapitre II : Matériel et Méthodes

I.- MATERIEL

1.- Souche de *Saccharothrix algeriensis*

La souche d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 (= DSM 44581), a été isolée à partir d'un sol saharien de la palmeraie d'Adrar (Boudjella, 1994). Cette souche est productrice d'antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones (Lamari *et al.*, 2002a,b).

2.- Souches de microorganismes-cibles

Les microorganismes-cibles utilisés sont des bactéries (Gram⁺ et Gram⁻), des champignons et des levures. Certains d'entre eux sont catalogués dans des collections mondiales.

Ces microorganismes ont été utilisés pour déterminer le spectre d'action de *Sa. algeriensis*, de déterminer les concentrations minimales inhibitrices des nouvelles dithiopyrrolones que nous avons étudiées et d'effectuer les cinétiques de production des antibiotiques.

- Bactéries à Gram positif: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus coagulans* (CIP 6625), *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus* (ATCC 9314) et *Staphylococcus aureus* (CIP 7625).
- Bactéries à Gram négatif: *Agrobacterium tumefaciens* (n° 2410), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Klebsiella pneumoniae* (CIP 82.91), *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* (CIP A22), *Salmonella enterica* CIP 81.3 et *Serratia marcescens*.
- Levures: *Candida albicans* (IPA 200) et *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 4226).
- Champignons filamenteux: *Aspergillus alliaceus* G334, *A. carbonarius* M333, *A. flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*, *F. o. lentis*, *F. o. lini* (Foln 3-5), *F. o. lycopersici*, *Mucor ramannianus* (NRRL 1829), *Penicillium expansum* (B 932) et *P. glabrum* A1215.

3.- Conservation des microorganismes

La souche d'actinomycète, les bactéries et les levures sont conservées à 4°C par repiquages successifs sur milieu solide ISP2 (Shirling et Gottlieb, 1966). Les champignons sont conservés à 4°C par repiquages réguliers sur milieu PDA (Rapilly, 1969).

La composition des milieux est la suivante:

- Milieu ISP2
 - Extrait de levure: 4 g
 - Extrait de malt: 10 g
 - Glucose: 4 g

- Agar: 18 g
- Eau distillée: 1000 mL
- pH: 7,2
- Milieu PDA
 - Filtrat de pomme de terre : 500 mL
 - Glucose: 20 g
 - Agar: 18 g
 - Eau distillée: 500 mL
 - pH: 6,5

Les milieux de culture sont stérilisés à 120°C à l'autoclave pendant 20 min puis coulés en boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre ou conditionnés dans des tubes à vis (milieux inclinés).

II.- METHODES

1.- Mise en évidence de l'activité antibiotique sur milieu solide

L'activité antimicrobienne de *Saccharothrix algeriensis* sur milieu solide est évaluée par la méthode des stries croisées. La souche est ensemencée en un seul trait à la surface du milieu ISP₂. Après incubation pendant 7 jours à 30°C, les microorganismes-cibles sont inoculés par stries perpendiculaires à l'actinomycète. La lecture des résultats est effectuée après 24 à 48 h d'incubation et consiste en la mesure de la zone d'inhibition entre le bord de l'actinomycète et le germe cible.

2.- Production des dithiopyrrolones en milieux liquides

2.1.- Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour la production est le milieu semi-synthétique (SS) préconisé par Bouras (2005), dont la composition est la suivante:

- (NH₄)₂ SO₄ : 2 g
- NaCl: 2 g
- KH₂PO₄: 0,5 g
- K₂HPO₄: 1 g
- MgSO₄, 7 H₂O: 0,2 g
- D(+) Glucose (anhydre): 10 g
- Extrait de levure: 2 g
- Ca CO₃: 5 g
- Eau distillée : 1000 mL
- pH : 7

Des acides aminés et des acides organiques sont ajoutés au milieu SS à une concentration de 5 mM, afin d'étudier leur effet sur la production de nouvelles dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis*.

Ces composés sont les suivants:

- Acides aminés: arginine et cystine.
- Acides organiques: acide valérique, acide sorbique et acide cinnamique.

Ces acides aminés et organiques (à 5 mM) ont été choisis en fonction des résultats de Bouras (2005) qui a constaté l'apparition par HPLC de nouveaux pics de dithiopyrrolones en présence de ces composés.

2.2. - Cinétique de production des dithiopyrrolones en fonction des acides organiques et des acides aminés ajoutés au milieu de culture

Les cinétiques de production des antibiotiques ont été réalisées en vue de déterminer le temps de production optimale dans des conditions déterminées et de détecter les nouvelles dithiopyrrolones induites par l'ajout des différents acides aminés et organiques.

A partir d'une culture mure âgée de 10 jours et poussant sur milieu solide ISP2, une anse pleine de spores de *Sa. algeriensis* est prélevée etensemencée dans des fioles erlenmeyers de 250 mL contenant chacun 50 mL de milieu SS liquide. Les fioles sont incubées à 30°C pendant 2 jours et servent de précultures.

Les pré-cultures ainsi obtenues sont inoculées dans des erlenmeyers de 500 mL contenant chacun 100 mL de milieu SS, à raison de 1 mg ($\pm 0,2$ mg) d'actinomycète contenu dans 3 mL de la pré-culture. L'incubation a lieu à 30°C dans un shaker, dans des conditions d'agitation permanente à 240 rpm, pendant 10 jours.

L'évolution de l'activité antibiotique, du pH et du poids sec du mycélium est suivie quotidiennement. Le dosage des antibiotiques par HPLC analytique a été aussi effectué chaque jour durant tout le temps d'incubation.

2.2.1. - Mesure du poids sec

Elle consiste à peser la biomasse cellulaire contenue dans un volume de culture connu. La méthode de Pfefferle *et al.* (2000) a été utilisée avec quelques modifications comme décrit par Bouras *et al.* (2006a). Pour chaque échantillon, 4 mL de culture sont prélevés et mis dans 2 tubes Eppendorf (2 mL par tube) préalablement séchées (24 h à 105°C) et tarés. Les tubes sont ensuite centrifugés à 16 000 x g pendant 15 min. Le culot est lavé deux fois avec du HCl (0,35 N) et à l'eau distillée pour éliminer le CaCO₃. Par la suite, Les Eppendorfs contenant les culots cellulaires sont placés dans une étuve à 105°C pendant 24 h, puis pesés après refroidissement dans un dessiccateur. L'expérience est réalisée deux fois de manière à effectuer une moyenne et minimiser les erreurs. Le résultat est exprimé en gramme de matière sèche par litre de milieu de culture.

2.2.2.- Mesure du pH

Le surnageant obtenu lors de la centrifugation pour la mesure du poids sec est utilisé immédiatement pour enregistrer les variations de pH au cours du temps d'incubation.

2.2.3.- Evolution de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne est déterminée par la méthode de diffusion des puits d'agar. Pour cela, les germes-cibles, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pour l'activité antibactérienne et *Mucor ramannianus* NRRL 1829 pour l'activité antifongique, sont ensemencés dans le milieu « gélose nutritive » ou GN (contenant 12 g/L d'agar) stérilisé à 120°C à l'autoclave pendant 20 min puis maintenu en surfusion à 45°C, lequel est coulé par la suite dans des boîtes de Pétri stériles de 90 mm de diamètre. La composition du milieu GN est la suivante:

- peptone : 5 g
- Extrait de viande : 1 g
- Extrait de levure : 2 g
- NaCl : 5 g
- Agar : 12 g
- Eau distillée : 1000 mL
- pH : 7,2

Après solidification du milieu, 4 à 5 puits de 9 mm de diamètre sont effectués par boîte, dans le milieu GN. Chaque puits reçoit 200 µL du surnageant de culture de l'actinomycète (prélevé quotidiennement). Les boîtes sont mises durant 2 h à 4°C afin de permettre la diffusion des antibiotiques tout en inhibant momentanément la croissance des germes-cibles. Elles sont ensuite incubées à 30°C pendant 24 à 36 h. Les diamètres d'inhibition autour des puits sont alors mesurés.

2.2.4.- Dosage des dithiopyrrolones par HPLC analytique

Les dithiopyrrolones sont dosées par HPLC analytique en phase inverse. Cette technique permet de déterminer précisément les concentrations des antibiotiques.

- Appareillage

L'HPLC analytique (Bio-Tek Instruments) est équipé d'éléments suivants:

- Injecteur automatique (auto-sampler 465 BIO-TEK, Milan, Italie) relié à une boucle d'injection de 80 µL.
- Système de pompe 525.
- Détecteur (UV-Vis 545V à barrette de diode à longueur d'onde UV-visible variable).
- Thermostat 582.

Colonne analytique en phase inverse C₁₈-ODB, Zorbax SB, Uptisphere, 5 µm de granulométrie, 150 mm de longueur et 4,6 mm de diamètre intérieur (DI). Cette colonne est précédée d'une pré-colonne de garde de 10 x 4 mm.

- Le contrôle du gradient du solvant d'éluion, la collection des données et l'intégration des pics sont assurés par un ordinateur de type IBM personal system/2 modèle 70 386 équipé d'un logiciel d'exploitation et d'analyse (Kroma 3000, BIO-TEK).
- Conditions expérimentales

Les dithiopyrrolones produites par *Sa. algeriensis* (lors des cinétiques) sont dosées quotidiennement par HPLC selon la méthode de Bouras (2005). Pour cela, 4 mL de chaque culture sont extraits par 4 mL de dichlorométhane, évaporés à sec, puis repris dans 1 mL de méthanol dans des ampoules HPLC pour être analysés.

La phase mobile est constituée par un éluant dégazé de deux solvants, l'acétonitrile (solvant A) et de l'eau bidistillée (solvant B). La détection se fait à 390 nm. Cette longueur

d'onde ne permet de détecter dans l'extrait au dichlorométhane que les dithiopyrrolones (Lamari *et al.*, 2002a). Les conditions de séparation optimisées sont rapportées dans le tableau 8. Le débit d'élution utilisé est fixé à 0,8 mL/min et la température de la colonne, à 30°C. Avant l'injection des échantillons, la phase stationnaire (colonne) est conditionnée et équilibrée (conditions initiales) pendant 7 min. Par la suite, 60 µL de l'échantillon sont injectés (injecteur automatique) et analysés.

	Temps (min)	Débit (mL/min)	Acétonitrile (solvant A%)	Eau bidistillée (solvant B%)
<i>Pre-run</i> (équilibre de la colonne)	- 7,00	0,8	0	100
	0,00	0,8	0	100
<i>Run</i> (analyse: gradient linéaire)	0,00	0,8	0	100
	5,00	0,8	30	70
	30,00	0,8	100	0
<i>Post-run</i> (lavage de la colonne)	30,00	0,8	100	0
	32,00	0,8	0	100

Tableau 8. Conditions d'élution des dithiopyrrolones par HPLC.

Les différentes dithiopyrrolones sont chimiquement proches entre elles et ne diffèrent qu'au niveau du radical R par des groupements CH, CH₃, CH₂, etc. Elles se séparent souvent dans l'ordre de leur degré d'hydrophobicité et sont reconnues par leurs temps de rétention (Lamari 2002a). D'après cet auteur, dans les mêmes conditions utilisées, les temps de rétention de la thiolutine, de l'isobutyryl-pyrrothine, de la butanoyl-pyrrothine, de la tigloyl-pyrrothine et de la sénéciol-pyrrothine sont respectivement de 11,03, 13,42, 14,02, 15,39 et 16,32 min.

Pour évaluer la concentration des dithiopyrrolones, nous avons établi une courbe d'étalonnage en fonction de l'aire du pic correspondant (voir résultats). Pour cela, une série de concentrations de la thiolutine comprise entre 1 et 100 µg/mL a été réalisée. Une courbe d'étalonnage (droite) du type $Y = ax$, a été établie à partir de la concentration de la thiolutine et de la surface du pic correspondant. Le coefficient de réponse de la thiolutine est déterminé à partir de l'analyse en triple de trois gammes distinctes. Ce coefficient de réponse est utilisé pour la quantification de la thiolutine dans les extraits. Comme la thiolutine et les autres dithiopyrrolones ont un coefficient d'extinction molaire très proche ($\epsilon_{390} = 8317-9333 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Lamari *et al.* 2002b), cette même courbe étalon est utilisée pour quantifier l'ensemble des dithiopyrrolones produites. Les échantillons sont injectés deux fois de manière à obtenir une moyenne et minimiser ainsi les erreurs.

3.- Production et extraction des dithiopyrrolones

Afin d'obtenir des quantités appréciables des dithiopyrrolones nouvellement apparues, et ce, pour pouvoir déterminer leur structure chimique, plusieurs cultures ont été entreprises sur milieu SS (100 mL de milieu par erlenmeyer de 500 mL), dans les mêmes conditions que celles citées précédemment (voir le paragraphe 2.2.). Les cultures sont incubées jusqu'au jour optimal de production, déterminé lors des cinétiques.

Les cultures de *Sa. algeriensis* (au total 20 L) sont centrifugées afin d'éliminer la masse mycélienne qui ne contient pas (ou très peu) de substances actives (Lamari, 2006). Lesurnageant obtenu est extrait avec du dichlorométhane (solvant non miscible avec l'eau) dans une ampoule à décanter, à raison d'un volume de filtrat pour un volume de solvant

organique. Le dichlorométhane est le meilleur solvant d'extraction des dithiopyrrolones (Lamari *et al.*, 2002a).

Les substances actives, de couleur jaune, sont récupérées en grande majorité lors de la première extraction de sorte qu'une re-extraction du filtrat n'est pas nécessaire. La phase organique est récupérée et filtrée sur papier filtre (Whatman n° 1) plissé contenant du sulfate de sodium anhydre, pour éliminer les traces d'eau résiduelles contenant les contaminants hydrophiles. Les extraits au dichlorométhane sont ensuite concentrés et évaporés sous vide à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu obtenu est solubilisé dans du méthanol (1 mL pour un volume initial de 100 mL de culture).

4.- Mise en évidence des dithiopyrrolones par bioautographie

4.1.-Préparation des plaques de gel de silice

Les plaques de gel de silice sont préparées après mélange de 50 g de gel de silice G60 (Merck) dans 100 mL d'eau distillée dans un Erlenmeyer de 500 mL. Après une agitation vigoureuse, la pâte obtenue est immédiatement étalée de manière rapide et régulière, sous forme de couche fine (0,25 mm d'épaisseur) sur des plaques en verre (précédemment lavées et dégraissées à l'éthanol) placées sur l'étaioir de Desaga. Les plaques de gel de silice sont ensuite séchées à 40°C pendant une nuit avant d'être utilisées.

4.2.- Développement des plaques

Après le dépôt par spot de 10 à 20 µL d'extrait organique, les plaques sont mises dans des cuves de chromatographie dont l'atmosphère a été saturée durant 2 h avec le système de solvants de migration « acétate d'éthyle – méthanol » (AM) (100/15; v/v) (Lamari, 2006).

Après migration jusqu'à environ 2 cm du bord supérieur, les plaques sont retirées des cuves et séchées à température ambiante. Elles sont tout d'abord observées à l'œil nu pour repérer les dithiopyrrolones de couleur jaune, puis aux U.V. à 254 nm (absorption) et 365 nm (fluorescence) pour détecter tous les composés autres que les dithiopyrrolones (ceci facilitera ultérieurement le processus de purification).

La bioautographie permet la détection des antibiotiques en employant non pas des révélateurs chimiques, comme c'est souvent le cas, mais des « révélateurs microbiologiques », après utilisation de microorganismes sensibles ensemencés dans des milieux gélosés.

Les plaques de CCM dont les extraits organiques ont déjà subi une migration sur AM (voir paragraphe 4.2.) sont placées durant une nuit à l'étuve, à 37°C, pour évaporer le solvant qui empêcherait les microorganismes de croître lors de la réalisation de la bioautographie.

Le chromatogramme est déposé sur des supports en verre dans un bac en plastique nettoyé avec de l'éthanol à 95° et contenant en son fond du papier filtre imbibé d'eau stérile et ce, afin de maintenir une atmosphère humide et éviter une dessiccation prématurée du milieu gélosé au cours de l'incubation. Le dispositif est alors stérilisé sous lumière U.V. pendant 45 min. Parallèlement, une gélose molle constituée par de l'ISP2 avec 7 g/L d'agar, est maintenue en surfusion à 50°C puis ensemencée avec les microorganismes (*Mucor ramannianus* et *Bacillus subtilis*).

Après homogénéisation, le milieu est réparti avec une pipette stérile sur toute la surface du chromatogramme de façon à obtenir une couche uniforme et fine. Après solidification du milieu, le dispositif est mis 2 h à 4°C, puis incubé à 30°C pendant 48 h. Le microorganisme va croître sur toute la surface de la plaque sauf à l'endroit où ont migré les antibiotiques. Le R_f (rapport frontal) de chaque antibiotique est déterminé selon la formule suivante:

Distance de migration entre dépôt et tâche active

R_f =

Distance de migration entre dépôt et front du solvant

5.- Semi purification des dithiopyrrolones

Elle est effectuée sur des plaques épaisses de gel de silice.

Cette technique nous permet de purifier partiellement des quantités appréciables de dithiopyrrolones pour les études ultérieures. Les plaques de gel de silice G60 utilisées sont préparées de la même manière que celles évoquées précédemment (voir paragraphe 4.1.), à l'exception de l'épaisseur de la couche qui est de 0,5 mm au lieu de 0,25 mm. Avant la chromatographie, les plaques de gel silice sont activées à 100°C pendant 1 h. Après refroidissement, 300 à 400 µL de l'extrait brut au dichlorométhane sont déposés non pas par spot, mais par ligne continue (bande) sur de nombreuses plaques. Celles-ci sont développées grâce au système de solvant AM. Une fois la migration terminée, la silice correspondant aux zones actives est alors grattée en évitant les bandes inactives précédemment délimitées aux U.V. (voir paragraphe 4.2.). La silice est par la suite éliminée après filtration sur verre fritté n° 4 (sous vide). Le filtrat méthanolique limpide est recueilli, puis évaporé à sec et conservé à - 30°C, pour pouvoir procéder à la purification finale par HPLC.

6.- Purification finale des dithiopyrrolones par HPLC semi-préparative

6.1.- Appareillage

L'appareil HPLC utilisé est un chromatographe de type Waters constitué d'éléments suivants:

- Injecteur de type Rheodine 7725i relié à une boucle d'injection de 500 µL.
- Contrôleur: type Waters 600 controller.
- Système de pompe: type Waters 60F.
- Détecteur UV-Visible dual bande type Waters 2487.
- Colonne semi-préparative Waters XBridge C18, 5 µm (granulométrie), 10 x 200 mm (diamètre et longueur respectivement).
- Pré-colonne Waters XBridge C18, 5 µm, 10 x 10 mm.
- Logiciel de pilotage, d'acquisition et d'intégration des données: Empower 2.

6.2.- Conditions expérimentales

L'extrait semi-purifié par chromatographie sur plaques épaisses de gel de silice est solubilisé dans 2 mL de méthanol, ultrafiltré (filtre à 0,2 µm), puis injecté (0,5 à 1 mL par injection).

Les conditions de séparation utilisées sont les suivantes:

- la phase mobile est constituée d'un mélange méthanol-eau ultra pure précédemment dégazé pendant 15 min avec de l'hélium.
- Le gradient de séparation diffère selon la nature de l'extrait purifié. Le choix est fait après plusieurs essais préliminaires. Cependant, dans tous les cas, nous avons utilisé un gradient continu linéaire qui varie entre 20 et 100% MeOH/eau bidistillée.
- Le débit de la phase mobile est de 2 mL/min et la longueur d'onde de détection dans l'UV est de 220 et 390 nm. A 220 nm, tous les composés (dithiopyrrolones et autres composés) sont détectés mais à 390 nm, seules les dithiopyrrolones (de couleur jaune) sont repérables.

Les différentes fractions obtenues (jaunes et incolores) sont récupérées séparément puis concentrées à sec sous air comprimé. Elles sont testées par antibiographie afin de localiser l'activité. Une deuxième et éventuellement une troisième injection sont nécessaires pour la purification totale des dithiopyrrolones.

7.- Etudes spectroscopiques des nouvelles dithiopyrrolones

7.1.- Etudes des spectres UV-visible

Un spectromètre Shimadzu 260 a été utilisé pour l'enregistrement des spectres UV-visible (absorption entre 200 et 500 nm). Toutes les molécules étudiées sont solubilisées dans du méthanol pur et introduites dans une cuve en quartz. Un blanc (témoin) a été réalisé, en utilisant le méthanol pur.

7.2.- Etudes des spectres de masse

Les analyses des dithiopyrrolones par spectrométrie de masse ont été réalisées par prestation de service au laboratoire de Spectrométrie de Masse de l'Université Paul Sabatier de Toulouse, France.

7.2.1.- Spectrométrie de masse par impact électronique

La méthode utilisée est l'ionisation par impact électronique. Ce mode d'ionisation, est utilisé pour des molécules organiques de taille petite. L'ionisation est provoquée par l'impact des électrons sur des molécules gazeuses de l'échantillon dans la source avec apparition d'ions secondaires; les fragments neutres ne sont pas détectés. La méthode par impact électronique est préconisée pour les dithiopyrrolones, comme l'a souligné Lamari (2006) rapportant les travaux de plusieurs auteurs. L'enregistrement est effectué avec un spectromètre Nermag R-10-10 C à 70 eV.

7.2.2.- Spectrométrie de masse à haute résolution

C'est une méthode qui permet la détermination de la masse d'un ion avec une grande précision qui peut mener directement à la formule brute. Celle-ci est comparée avec celles déterminées expérimentalement proposant ainsi la formule brute la plus probable en fonction de la masse trouvée. Le spectromètre utilisé est un GCT Premier System et la méthode est la haute résolution par impact électronique.

7.3.- Etude des spectres de RMN H et C13

Ces expériences ont été réalisées par prestation de service au Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC, CNRS) de Toulouse.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) protonique et du carbone 13 ont été enregistrés avec un spectromètre Bruker Avance 500 équipé d'une sonde de 5 mm de résonance inverse triple Z-gradient (TBI 1H, 31P, BB), avec les signaux de solvants comme références ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$: DMSO 2,50/40,36) ou ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$: CDCl_3 7,28/77,45) à 300 MHz (pour RMN ^1H) et 75 MHz (pour RMN ^{13}C). Les déplacements chimiques du proton et du carbone sont par rapport au TMS (tétraméthylsilane) en utilisant 1H (résiduelle) ou C13 déplacements chimiques des solvants comme un étalon secondaire. La température a été fixée à 298 K. Les signaux du 1H et du C13 ont été attribués sur la base des déplacements chimiques, constantes de couplage, et les intensités du signal, en utilisant les expériences 1H-1H COSY45, 1H-13C HMQC et 1H-13C HMBC.

8.- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des nouvelles dithiopyrrolones

La détermination des CMI est réalisée par la méthode de diffusion dans l'agar selon la méthode préconisée par Oki *et al.* (1990).

8.1.- Préparation des suspensions de spores des microorganismes-cibles

Chaque microorganisme-cible est ensemencé sur milieu solide ISP2, coulé en pente dans un tube à essai, puis mis à incuber durant 7 jours à 30°C. Après l'obtention d'une bonne croissance, 3 mL d'eau distillée stérile sont ajoutés sur la culture du microorganisme-cible. Une agitation mécanique vigoureuse permet d'obtenir une suspension dense de spores ou de cellules. La suspension mère est diluée de manière à avoir une concentration de 3×10^6 CFU/mL pour les bactéries et 5×10^3 CFU/mL pour les champignons filamenteux et les levures, déterminée à l'aide d'un hématimètre de Malassez.

8.2.- préparation des solutions mères des dithiopyrrolones

Les dithiopyrrolones sont moyennement solubles dans l'eau. Avant de les incorporer dans le milieu ISP2, il est nécessaire de les dissoudre dans un minimum de solvant miscible avec l'eau. Pour cela 2,5 mg de chaque dithiopyrrolone sont entièrement solubilisés dans 2,5 ml de méthanol. La concentration de la solution-mère ainsi obtenue est de 1 mg/mL.

8.3.- Détermination des concentrations minimales inhibitrices

Des volumes précis de la solution mère de chaque nouvelle dithiopyrrolone sont ajoutés à des lots de 5,4 mL de milieu ISP2, de telle sorte que les concentrations finales des dithiopyrrolones dans chacun des lots soient de 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75 et 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Chaque lot de milieu est coulé dans une boîte de Pétri stérile de 9 mm de diamètre. Les témoins (sans dithiopyrrolones) sont réalisés de la même manière en utilisant les mêmes volumes de méthanol à la place des solutions-mères des dithiopyrrolones.

Les microorganismes-cibles sont ensemencés en spot en déposant 2 μl de la suspension mère des spores ou des cellules à la surface du milieu, soit un inoculum

de 10^6 CFU pour les bactéries et 10^3 CFU pour les champignons filamenteux et les levures. Les spots sont réalisés en double et les lectures sont effectuées en comparaison avec des boîtes témoins après 24 à 36 h d'incubation à 30°C pour les bactéries et après 36 à 48 h d'incubation pour les champignons. Elles consistent à évaluer la croissance des microorganismes-cibles et à déterminer ainsi la concentration minimale qui inhibe totalement leur croissance.

Chapitre III : Résultat et Discussion

I.- MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANTIBIOTIQUE DE SACCHAROTHRIX ALGERIENSIS SUR MILIEU SOLIDE

Les résultats des tests d'antagonisme *in vitro* par la méthode des stries croisées sur milieu ISP2 sont donnés dans le tableau 9.

La souche *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 a été testée contre plusieurs microorganismes saprophytes, pathogènes ou toxigènes pour l'homme (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Penicillium expansum*, *Aspergillus flavus*, etc.), ou pathogènes pour les plantes (quelques espèces de *Fusarium*, *Botrytis cinerea*, etc.).

Les résultats obtenus ont montré que l'activité est particulièrement importante contre la majorité des bactéries à Gram positif testées, forte, moyenne à faible contre les champignons et les levures et faible à nulle contre les bactéries à Gram négatif.

Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres souches et espèces de *Saccharothrix* productrices d'antibiotiques tels que la formamicine (Igarashi *et al.*, 1997) et les saccharomicines (Singh *et al.*, 2000), lesquelles ont montré une forte activité contre les bactéries à Gram positif et faible contre les bactéries à Gram négatif. L'activité antifongique est parfois signalée chez ce genre (Igarashi *et al.*, 1997). Plusieurs travaux réalisés dans le monde ont montré que l'activité des molécules produites par les souches de *Saccharothrix* est surtout dirigée contre les bactéries à Gram positif, parfois contre les champignons et rarement contre les bactéries à Gram négatif (Gerber, 1969; Braznikova *et al.*, 1977; Horvath *et al.*, 1979; Isshiki *et al.*, 1989; Takeuchi *et al.*, 1992; Kinoshita *et al.*, 1999; Sugawara *et al.*, 1999; Schumacher *et al.*, 2002; etc.).

Saccharothrix algeriensis sécrète des antibiotiques appartenant au groupe des dithiopyrrolones (Lamari *et al.*, 2002b et Lamari, 2006). En comparant son spectre d'action avec celui d'autres microorganismes producteurs de dithiopyrrolones, nous remarquons que les cultures de *Streptomyces* ssp. productrices des dithiopyrrolones présentent un spectre d'action très large qui touche les bactéries à Gram positif (ex.: *Bacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, etc.), les bactéries à Gram négatif (ex.: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Haemophilus*, *Moraxella*, *Morganella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, etc.), les champignons filamenteux (*Botrytis*, *Fusarium*, *Plasmopora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, etc.) et les levures (ex.: *Candida* et *Saccharomyces*) (Gopalkrishnan et Jump 1952; Joshi *et al.*, 1982; Oliva *et al.* 2001). Les espèces de *Xenorhabdus* productrices des dithiopyrrolones présentent aussi un large spectre d'activité qui touche les bactéries à Gram négatif (ex.: *Escherichia*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Erwinia*, *Flavobacterium* et *Pseudomonas*), les bactéries à Gram positif (ex.: *Micrococcus*, *Staphylococcus* et *Bacillus*), les champignons filamenteux (ex.: *Botrytis*, *Fusarium*, *Mucor*, *Pythium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Trichoderma* et *Verticillium*) et les levures (ex.: *Candida* et *Saccharomyces*) (Akhurst, 1982 et Chen *et al.*, 1994). La bactérie marine *Alteromonas rava*

Production de nouveaux antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis* après addition de précurseurs dans le milieu de culture

productrice des thiomarinoles (dérivés des dithiopyrrolones), possède une forte activité contre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif (Shiozawa *et al.*, 1993).

La figure 8 montre l'action antibiotique de *Sa. algeriensis* contre deux champignons phytopathogènes, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* et *F.o. lini*.

Microorganismes - cibles		Activité (en mm)
Bactéries à Gram positif	<i>Bacillus coagulans</i> CIP 6625	14
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	15
	<i>Enterococcus faecalis</i>	09
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9314	23
	<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 7625	23
Bactéries à Gram négatif	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> n° 2410	00
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	06
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> CIP 82.91	02
	<i>Proteus vulgaris</i>	05
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CIP A22	04
	<i>Salmonella enterica</i>	00
	<i>Serratia marcescens</i>	06
Levures	<i>Candida albicans</i> IPA 200	07
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226	12
Champignons filamenteux	<i>Aspergillus alliaceus</i> G334	08
	<i>Aspergillus carbonarius</i> M333	10
	<i>Aspergillus flavus</i>	09
	<i>Aspergillus niger</i>	09
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	00
	<i>Botrytis cinerea</i>	11
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	11
	<i>F. o. lentis</i>	05
	<i>F. o. lini</i>	08
	<i>F.o. lycopersici</i>	10
	<i>Fusarium culmorum</i>	04
	<i>Fusarium equiseti</i>	15
	<i>Fusarium graminearum</i>	04
	<i>Fusarium moniliforme</i>	01
	<i>Mucor ramannianus</i> NRRL 1829	20
<i>Penicillium expansum</i> B932	01	
<i>Penicillium glabrum</i> A1215	13	

Tableau 9. Action antibiotique de *Sa. algeriensis* contre les bactéries et les champignons sur milieu ISP2 par la méthode des stries croisées.

Note: Les valeurs représentent les zones d'inhibition entre le bord de l'actinomycète et ceux des microorganismes-cibles.

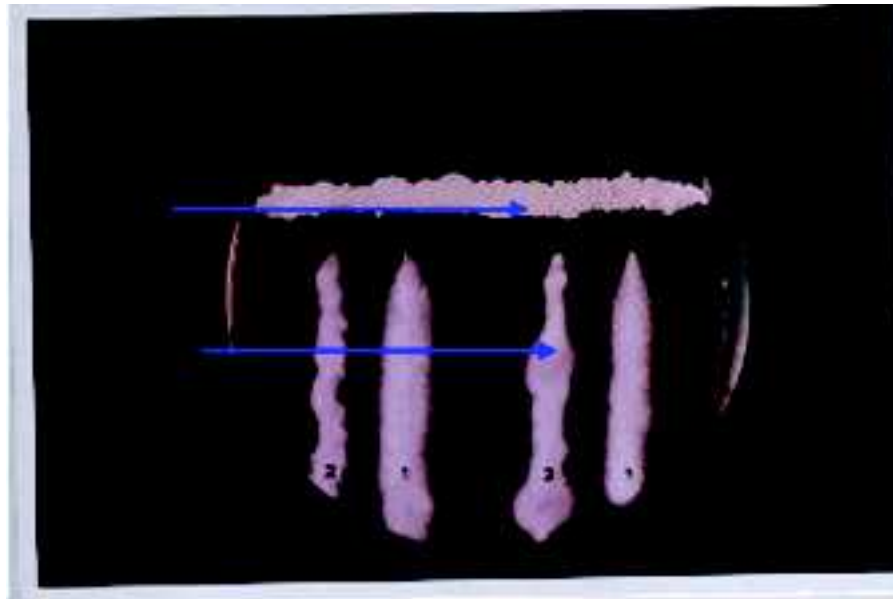
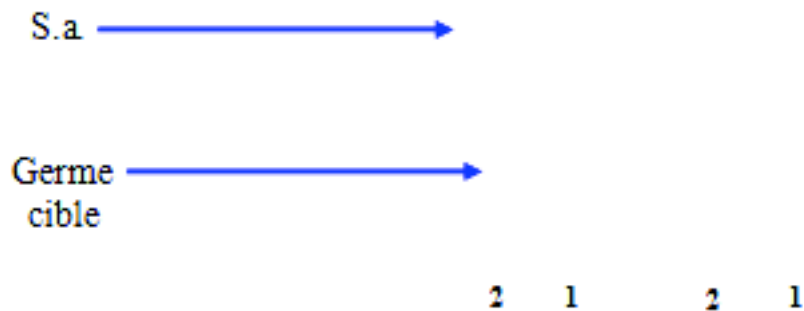


Figure 8. Action antibiotique de *Sa. algeriensis* (S.a.) contre *F.o. albedinis* (1) et *F.o. lini* (2) par la méthode des stries croisées.

Note: Stries croisées: mesure de la zone d'inhibition (en mm) entre le bord de l'actinomycète et celui du germe-cible.



II.- CINÉTIQUES DE PRODUCTION DES ANTIBIOTIQUES DE *SACCHAROTHRIX ALGERIENSIS* SUR MILIEU SEMI-SYNTHÉTIQUE EN FONCTION DES ACIDES ORGANIQUES ET DES ACIDES AMINES

Des cinétiques de croissance et de production des antibiotiques sont réalisées pendant 10 jours d'incubation à 30°C sur milieu semi-synthétique (SS) témoin (sans précurseurs) et sur milieu SS additionné d'acides organiques (valérique, sorbique et cinnamique) et d'acides aminés (cystine et arginine). Au cours de la fermentation, l'évolution du poids sec du mycélium, du pH du milieu et de l'activité antimicrobienne est suivie quotidiennement. Les antibiotiques produits par l'actinomycète ont été dosés par HPLC analytique sur colonne C18 du 1^{er} au 10^{ème} jour d'incubation.

1.- Résultats

1.1.- Evolution de la biomasse

La figure 9 présente les cinétiques de croissance de *Sa. algeriensis* dans le milieu SS témoin et en présence d'acides organiques et d'acides aminés ajoutés.

L'observation de ces cinétiques montre la présence d'une croissance diauxique, à l'exception du milieu SS + cystine. La croissance de *Sa. algeriensis* peut ainsi être subdivisée en plusieurs phases.

- La croissance débute par une courte phase exponentielle, d'une durée de 24 h en général et qui peut parfois durer 48 h (cas du milieu SS + acide valérique). Une phase de ralentissement peut parfois être observée entre 24 et 48 h (SS + acide sorbique) ou entre 48 et 72 h (SS + acide valérique ou cystine). La biomasse obtenue durant cette phase est généralement plus importante en présence d'acides organiques et aminés par rapport au milieu témoin.
- Une phase stationnaire est ensuite observée (sauf dans le cas de la cystine) d'une durée de 24 h (ou 48 h pour SS + acide cinnamique).
- Une seconde phase exponentielle a lieu après le 2^{ème}, le 3^{ème} ou le 4^{ème} jour selon les cas. La biomasse maximale est obtenue le 3^{ème} jour après ajout de cystine (0,75 g/L), le 5^{ème} jour pour le témoin (0,65 g/L) et les milieux SS + acide cinnamique (0,50 g/L) et SS + acide sorbique (0,70 g/L), et enfin, le 6^{ème} jour dans les milieux SS + acide valérique (0,45 g/L) et SS + arginine (0,65 g/L).
- Une deuxième phase stationnaire est notée mais uniquement dans le milieu SS + arginine.
- Une phase de déclin d'une durée de 2 à 5 jours est observée, d'abord lente puis brusque dans le cas du témoin ou au contraire, brusque puis lente après ajout de certains acides organiques et de cystine.
- La fermentation s'achève de nouveau par une phase stationnaire (témoin ou après ajout de cystine) ou une phase stationnaire suivie d'une autre phase de déclin (pour les autres cas).

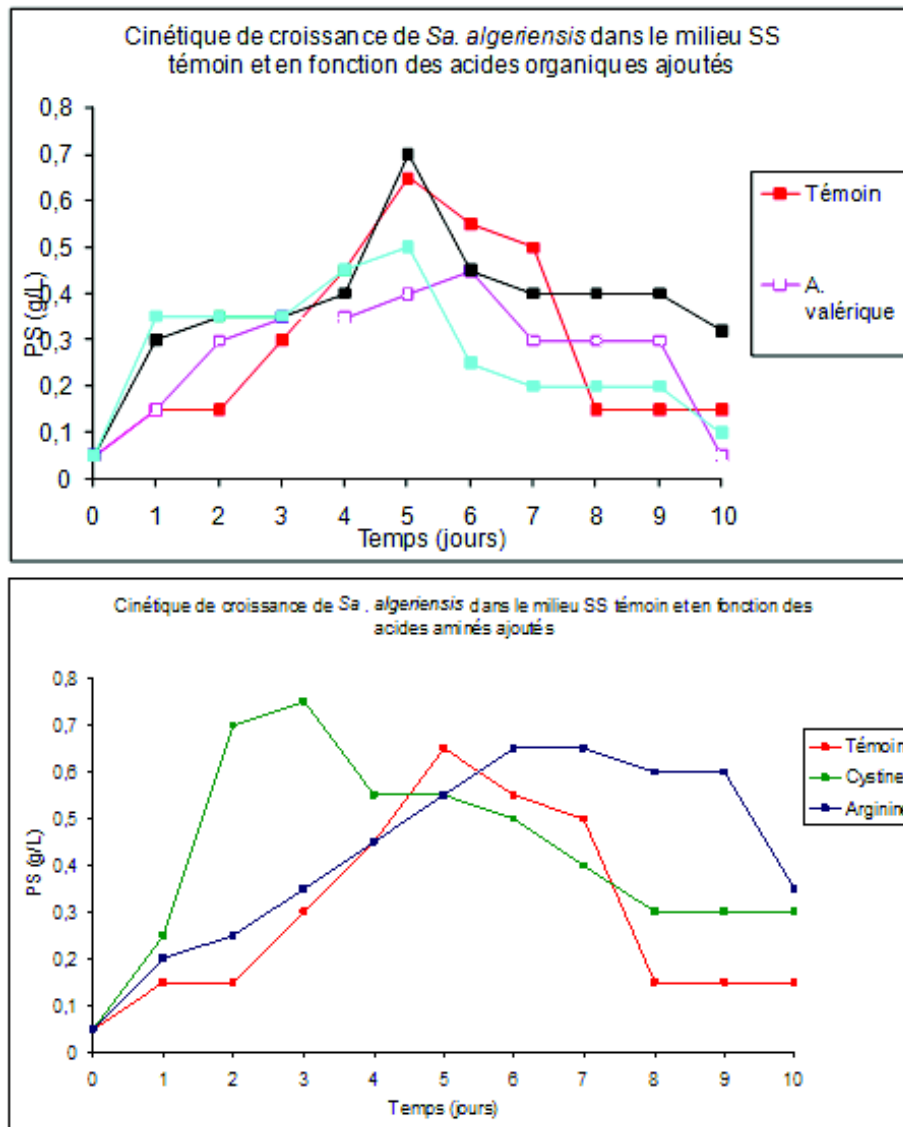


Figure 9. Evolution de la biomasse sur milieu SS au cours de la culture de *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 dans le milieu témoin (sans acides) et après ajout d'acides organiques (a) et d'acides aminés (b).

1.2.- Evolution du pH

Dans tous les cas, le pH augmente sensiblement (de 7 à 8 - 8,3) durant les premières 24 h (première phase exponentielle), pour plus au moins se stabiliser (pH entre 8 et 8,5) jusqu'au 8^{ème} jour avant de diminuer légèrement dans certains milieux (pH entre 7,7 et 8,2) (Figure 10).

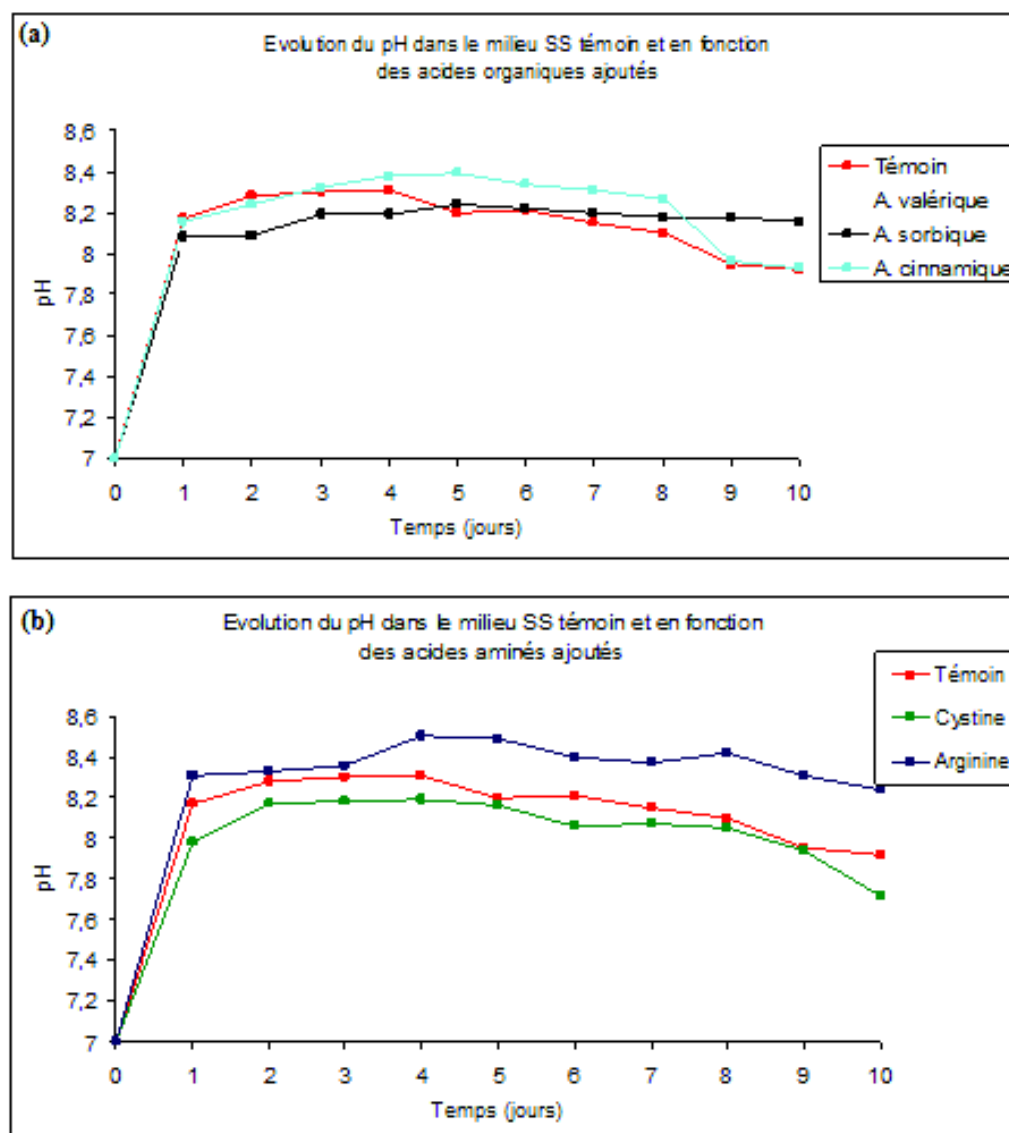


Figure 10. Evolution du pH sur milieu SS au cours de la culture de la souche de *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 dans le milieu témoin et après ajout d'acides organiques (a) et d'acides aminés (b).

1.3.- Evolution de l'activité antimicrobienne

Les microorganismes-cibles choisis sont *Bacillus subtilis* (activité antibactérienne) et *Mucor ramannianus* (activité antifongique). La mesure des diamètres d'inhibition (en mm) est effectuée par la méthode des puits (y compris le diamètre du puits = 9 mm) (Figure 11).

Les résultats illustrés sur la figure 12 montrent que l'activité antibactérienne ne débute qu'au 6^{ème} jour pour le témoin et dès le 4^{ème} jour en présence d'acide valérique, d'acide sorbique et de cystine. En revanche elle n'apparaît qu'à partir du 7^{ème} jour en présence d'acide cinnamique et d'arginine. Cette activité est maximale entre le 7^{ème} et le 9^{ème} jour selon les fermentations et est meilleure en présence d'acides organiques et d'acides aminés (par rapport au témoin) sauf en présence d'acide cinnamique.

L'activité antifongique ne débute qu'au 7^{ème} jour pour le témoin. Cependant, son apparition en présence des acides organiques et aminés dépend de la nature du composé ajouté: 2^{ème} jour en présence d'arginine, 3^{ème} jour en présence d'acide sorbique, 4^{ème} jour en présence d'acide valérique et cystine et 7^{ème} jour en présence d'acide cinnamique. Le maximum de production est atteint après huit jours de fermentation dans le témoin et entre le 7^{ème} et le 9^{ème} jour en présence des acides organiques et des acides aminés.

Nous remarquons que l'activité antimicrobienne est majoritairement plus intéressante après l'addition des précurseurs (acides organiques et aminés) que dans le milieu témoin (sans précurseurs).

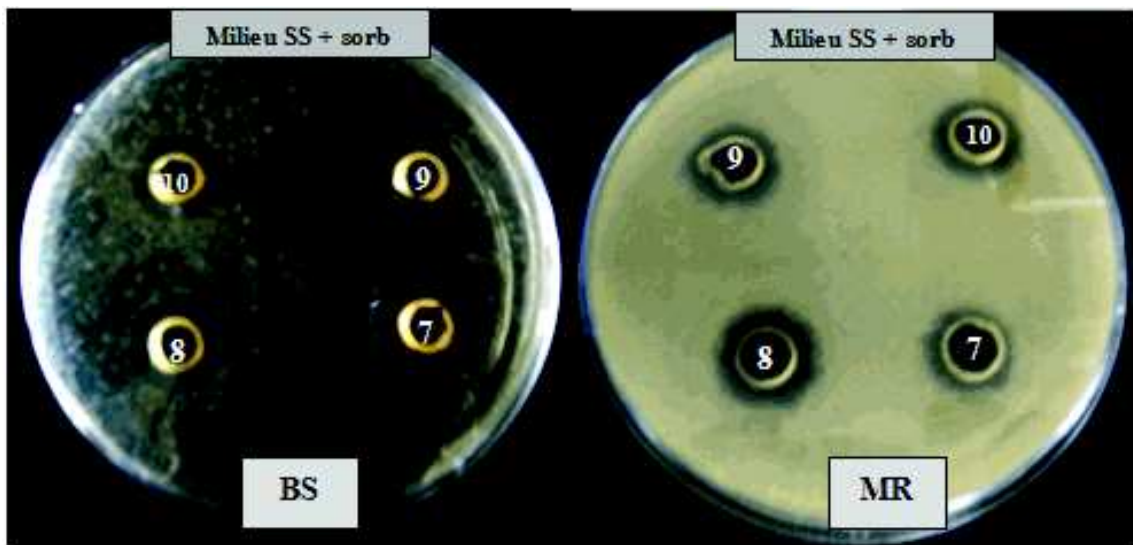


Figure 11. *Activité antibactérienne et antifongique contre Bacillus subtilis (BS) et Mucor ramannianus (Mr) respectivement, par la méthode des puits, aux jours 7, 8, 9 et 10 de fermentation.*

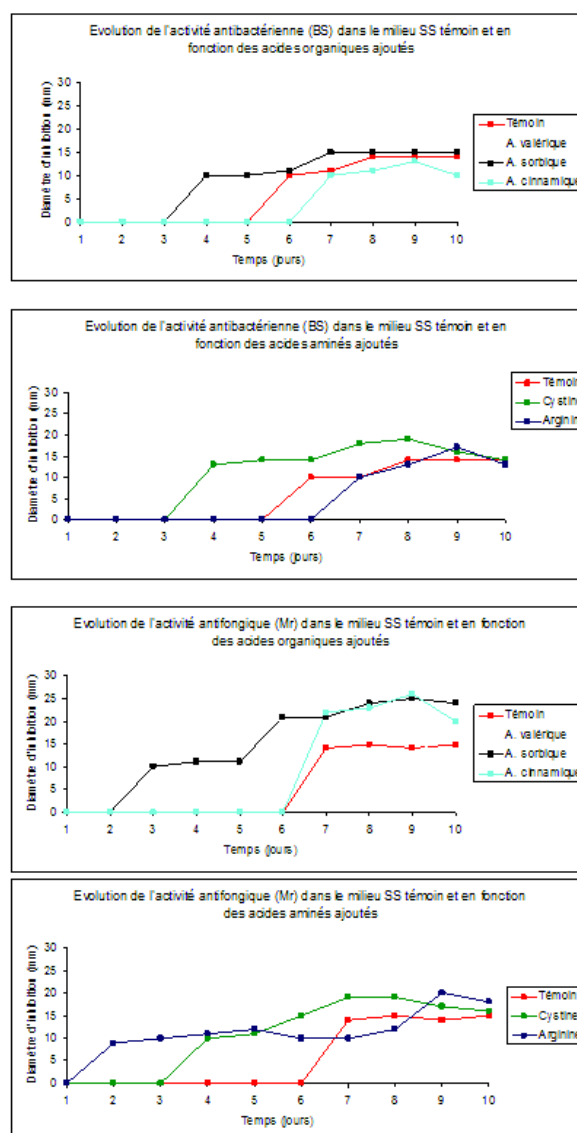


Figure 12. Cinétique des activités antibactériennes et antifongiques sur milieu SS témoin et après ajout des acides organiques et aminés chez *Sa. algeriensis*. Bs: *B. subtilis*, Mr: *Mucor ramannianus*.

1.4.- Dosage des dithiopyrrolones par HPLC analytique et cinétique de production

Les dithiopyrrolones produites par *Sa. algeriensis* dans le milieu SS témoin et après addition d'acides organiques et aminés ont été dosées par HPLC analytique sur colonne C18 en phase inverse.

Pour calculer la concentration des dithiopyrrolones, nous avons établi une courbe d'étalonnage en fonction de l'air du pic correspondant (chapitre II: paragraphe 2.2.1.4). Nous avons réalisé trois gammes. Les courbes d'étalonnage obtenues sont illustrées sur la figure 13.

Les concentrations de différentes dithiopyrrolones produites sont calculées à partir de la formule suivante: concentration = air du pic/coefficient de réponse.

Le coefficient de réponse de la thiolutine est déterminé à partir de l'analyse des trois gammes distinctes: $28998 + 37893 + 31911 = 32934 \mu\text{V}\cdot\text{min}/\mu\text{g}$.

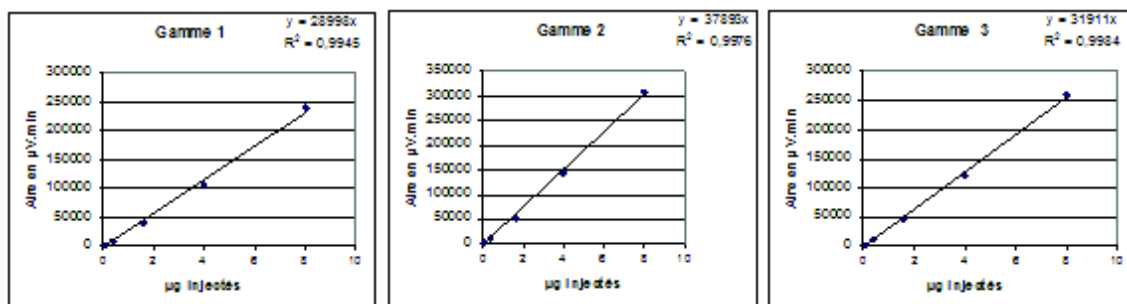


Figure 13. Courbes d'étalonnage pour le dosage de la thiolutine par HPLC (à 390 nm) déterminées en considérant l'aire du pic de la pyrrothine en fonction de sa concentration.

1.4.1.- Cinétique de production des dithiopyrrolones dans le milieu SS témoin

La figure 14 montre le profil d'éluion en HPLC analytique des dithiopyrrolones produites par *Sa. algeriensis* dans le milieu SS témoin. Six dithiopyrrolones sont détectées. L'identification de cinq d'entre elles a été faite grâce à leurs temps de rétention et à leurs spectres UV-visible (donnés par le détecteur à barrettes de diode de l'HPLC), en se basant sur les travaux de Lamari *et al.* (2002a,b), Bouras (2005) et Lamari (2006).

Cinq dithiopyrrolones sont identifiées à la thiolutine (temps de rétention = TR = 12,5 min), l'isobutyryl-pyrrothine ou ISP (TR = 17,02 min), la butanoyl-pyrrothine ou BUP (TR = 17,80 min), la tigloyl-pyrrothine ou TIP (TR = 18,68 min) et la sénécyoïl-pyrrothine ou SEP (TR = 19,09 min).

Une sixième pyrrothine notée AJ0t, à structure non encore déterminée, est détectée juste avant la thiolutine, à un temps de rétention de 12,03 min.

Le pic majoritaire est celui de la thiolutine, suivi de la SEP, de la BUP puis de AJ0.

Nous remarquons l'existence d'autres pics, à l'état de traces, et qui semblent aussi être des dithiopyrrolones (TR entre 12 et 14 min et entre 20 et 22 min).

Les résultats illustrés sur la figure 15, montre la cinétique de production des dithiopyrrolones (AJ0t, thiolutine, ISP, BUP, TIP et SEP) par *Sa. algeriensis* dans le milieu SS témoin. Cette production débute dès le 3^{ème} jour de fermentation et augmente avec le temps pour atteindre un maximum entre le 8^{ème} et le 9^{ème} jour d'incubation. Les quantités obtenues, au jour optimal, sont de 0,89 mg/L pour la thiolutine, 0,64 mg/L pour la SEP, 0,22 mg/L pour la TIP, 0,09 mg/L pour AJ0t et 0,01 mg/L pour l'ISP et la BUP.

La production des dithiopyrrolones débute durant la seconde phase exponentielle (entre le 2^{ème} et le 5^{ème} jour). Elle se poursuit durant la phase de déclin (entre le 5^{ème} et le 8^{ème} jour) pour atteindre des maxima durant la phase stationnaire (entre le 8^{ème} et le 10^{ème} jour) qui suit la phase de déclin.

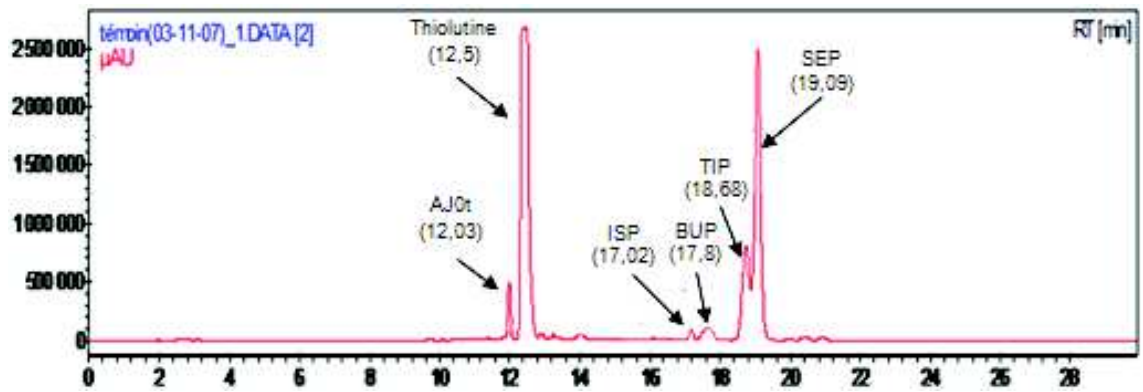


Figure 14. Profil d'éluion en HPLC analytique (longueur d'onde $\lambda = 390 \text{ nm}$) montrant la présence des dithiopyrrolones synthétisées par *Sa. algeriensis* dans le milieu SS témoin.

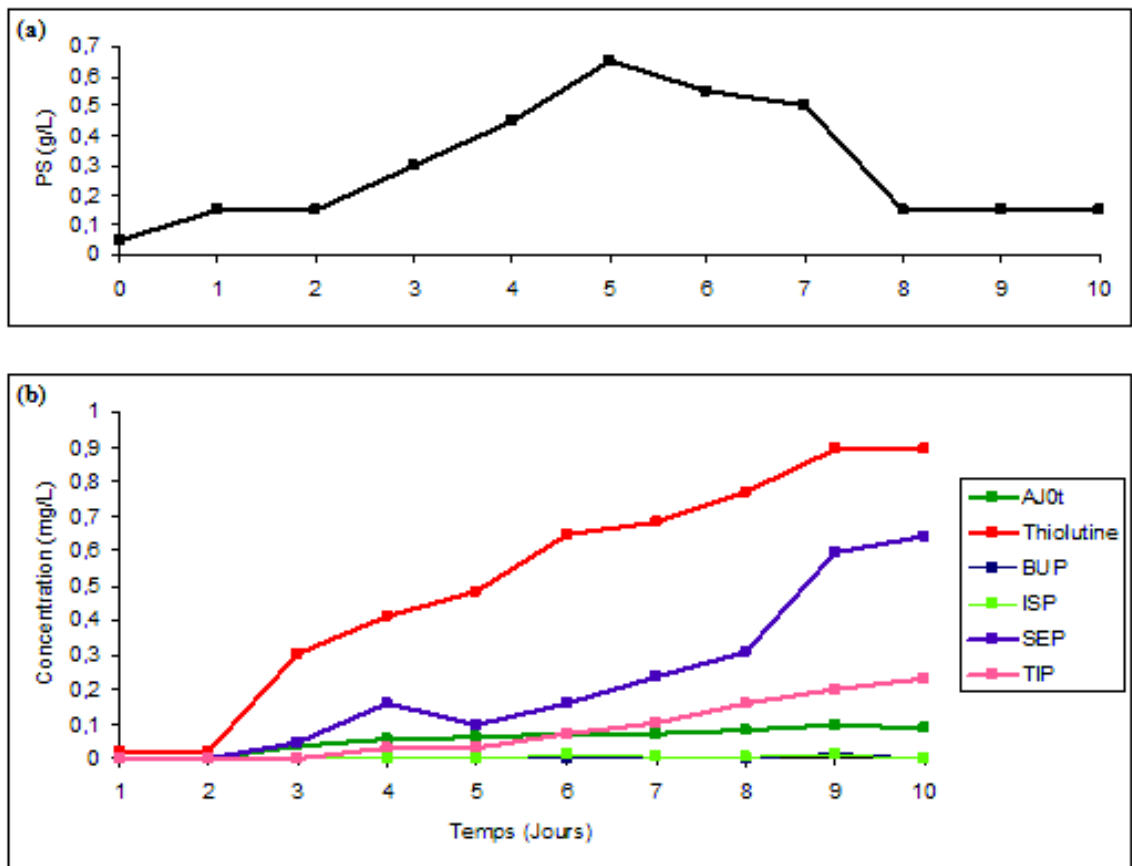


Figure 15. Cinétiques de production des dithiopyrrolones produites par *Sa. algeriensis* dans le milieu SS témoin.

(a): Evolution de la biomasse. (b): Dithiopyrrolones détectées dans le milieu SS témoin

1.4.2.- Cinétique de production des dithiopyrrolones dans le milieu SS additionné d'acide valérique

Après addition de l'acide valérique au milieu SS, les dithiopyrrolones AJ0 (notée AJ0v), thiolutine, TIP et SEP sont également détectées (avec des traces de BUP et absence de l'ISP). Cependant, de nouveaux pics de dithiopyrrolones (identifiées grâce à leur spectres UV-visible) sont apparus à des temps de rétention différents; les nouvelles molécules détectées sont PR3 (TR = 13,92 min), PR4 (TR = 16,84 min) et PR7 (TR = 19,33 min) qui est majoritaire (Figure 16).

La figure 17 montre les cinétiques de production des dithiopyrrolones déjà détectées auparavant dans le milieu SS témoin (Figure 17b) et des dithiopyrrolones nouvellement apparues en présence d'acide valérique (Figure 17c).

Les maxima de production sont obtenus le 5^{ème} jour pour la thiolutine (0,77 mg/L) et la SEP (0,27 mg/L), le 5^{ème} et le 8^{ème} jour pour la TIP (0,17 mg/L et 0,16 mg/L respectivement) et le 8^{ème} jour pour AJ0v (0,20 mg/L).

Ces maxima correspondent à la seconde phase exponentielle de croissance de *Sa. algeriensis* (en présence d'acide valérique) pour la thiolutine, la SEP et à un degré moindre la TIP, et à la phase stationnaire pour AJ0v.

La production des trois nouvelles dithiopyrrolones est tardive. Les maxima ne sont obtenus qu'au 8^{ème} jour: 1,31 mg/L pour PR7 (majoritaire), 0,35 mg/L pour PR4 et 0,25 mg/L pour PR3.

Les maxima sont dans ce cas notés durant la phase stationnaire.

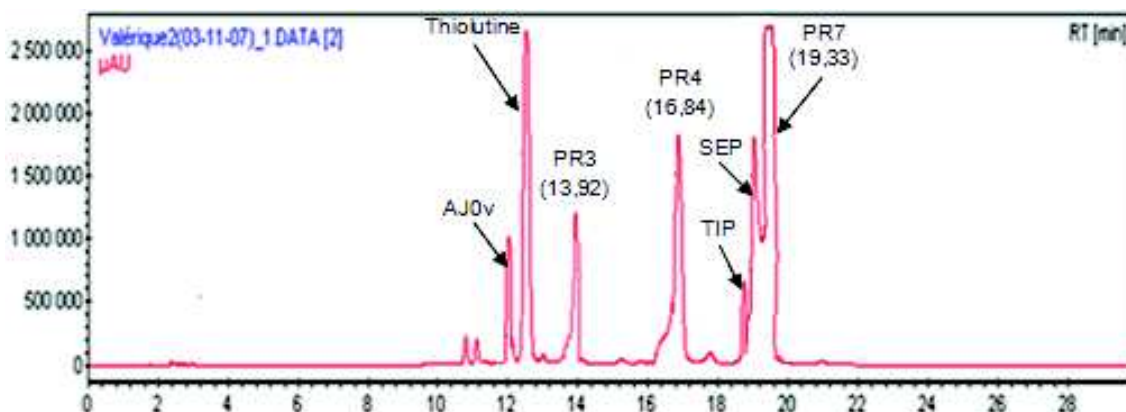


Figure 16. Profil d'élution en HPLC analytique ($\lambda = 390 \text{ nm}$) montrant la présence des dithiopyrrolones synthétisées par *Sa. algeriensis* après ajout d'acide valérique dans le milieu SS.

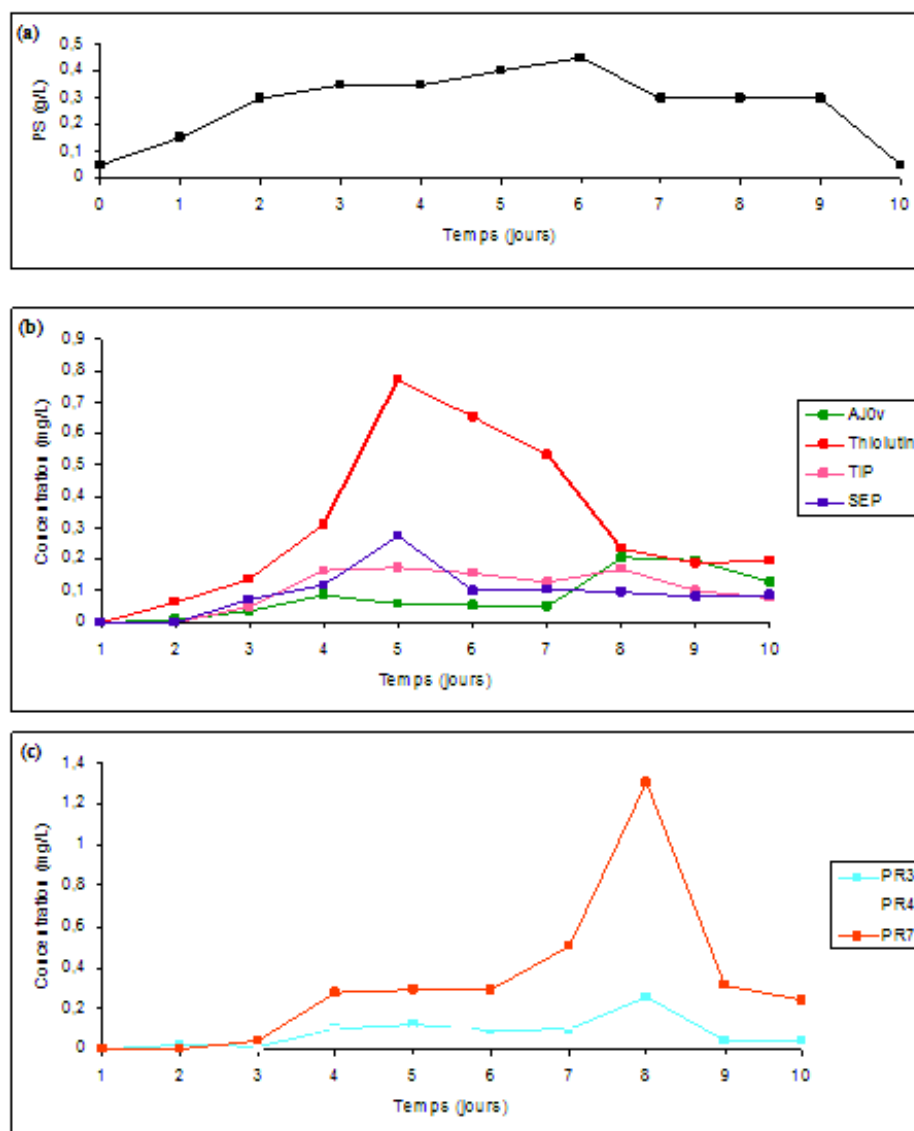


Figure 17. Cinétiques de production des dithiopyrrolones produites par *Sa. algeriensis* dans le milieu SS après addition d'acide valérique.

(a): Evolution de la biomasse. (b): Dithiopyrrolones déjà détectées dans le milieu SS témoin. (c): Nouvelles dithiopyrrolones apparues après addition d'acide valérique.

1.4.3.- Cinétique de production des dithiopyrrolones dans le milieu SS additionné d'acide sorbique

Après addition d'acide sorbique au milieu de culture, les dithiopyrrolones déjà présentes dans le milieu SS témoin (AJ0s, thiolutine, BUP, ISP, TIP et SEP) sont également détectées. Cependant, cinq nouvelles dithiopyrrolones sont apparues: PR2 (TR = 14,02 min), PR8 (TR = 19,40 min), PR9 (TR = 19,72 min), PR10 (TR = 20,10 min) et PR11 (TR = 20,92 min) (Figure 18).

La figure 19 montre les cinétiques de production des dithiopyrrolones déjà détectées auparavant dans le milieu SS témoin et des dithiopyrrolones nouvellement apparues en présence d'acide sorbique.

Tout comme dans le cas de l'acide valérique, la production de certaines anciennes dithiopyrrolones (AJ0s, thiolutine, SEP et TIP) est précoce et celle des nouvelles dithiopyrrolones, tardive.

Les maxima de production sont notés le 4^{ème} jour pour la thiolutine (0,29 mg/L), la SEP (0,22 mg/L), la TIP (0,08 mg/L) et AJ0s (0,03 mg/L), ce qui coïncide avec la première phase stationnaire de croissance. La production est tardive (au 7^{ème} jour) pour l'ISP (0,06 mg/L) et la BUP (0,25 mg/L). La production de cette dernière est nettement favorisée par rapport au milieu témoin et au milieu avec acide valérique.

Les maxima de production de toutes les nouvelles dithiopyrrolones sont obtenus (comme pour l'acide valérique) au 8^{ème} jour: 0,21 mg/L pour PR8, 0,13 mg/L pour PR9, 0,09 mg/L pour PR10, 0,08 mg/L pour PR2 et 0,06 mg/L pour PR11. Ces maxima coïncident avec la seconde phase stationnaire.

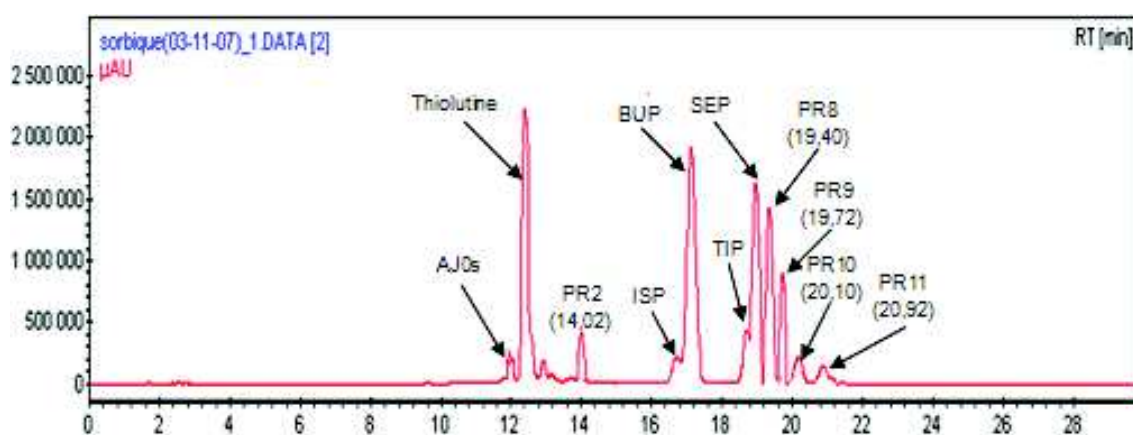


Figure 18. Profil d'éluion en HPLC analytique ($\lambda = 390 \text{ nm}$) montrant la présence des dithiopyrrolones synthétisées par *Sa. algeriensis* après ajout d'acide sorbique dans le milieu SS.

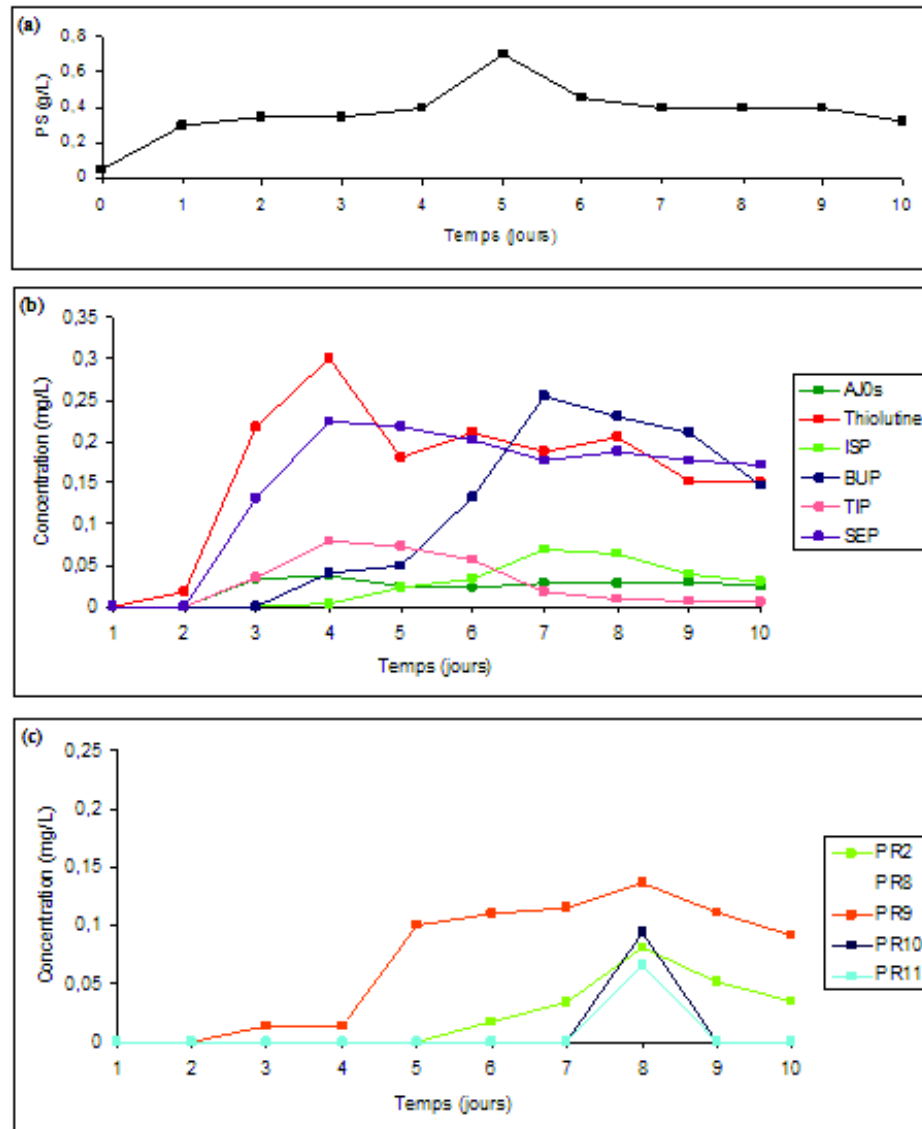


Figure 19. Cinétiques de production des dithiopyrrolones produites par *Sa. algeriensis* dans le milieu SS après addition d'acide sorbique.

(a): Evolution de la biomasse. (b): Dithiopyrrolones déjà détectées dans le milieu SS témoin. (c): Nouvelles dithiopyrrolones apparues après addition d'acide sorbique.

1.4.4.- Cinétique de production des dithiopyrrolones dans le milieu SS additionné d'acide cinnamique

L'addition d'acide cinnamique au milieu de culture a induit l'apparition d'une nouvelle molécule nommée PR5 à un temps de rétention de 19,27 min (Figure 20). Elle est produite à une concentration maximale de 0,93 mg/L au 8^{ème} jour; cette concentration reste stable jusqu'au dixième jour. Nous notons aussi une production de AJOc, de thiolutine, de la SEP et de la TIP à des concentrations maximales de 0,19 mg/L (au 7^{ème} jour), 0,55 mg/L et 0,39 mg/L (au 9^{ème} jour) et 0,25 mg/L (au 8^{ème} jour) respectivement (Figure 21).

Les maxima de production de toutes les dithiopyrrolones (anciennes et nouvelle) sont obtenus dans ce cas assez tardivement (après 7 à 8 jours), ce qui coïncide avec la phase stationnaire de croissance qui fait suite à la phase de déclin. L'ISP et la BUP sont soit absentes, soit produites à l'état de trace.

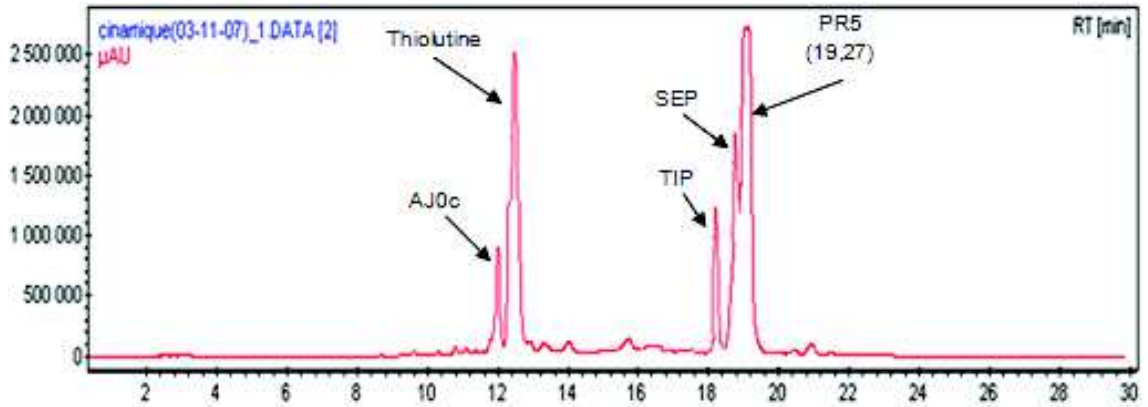


Figure 20. Profil d'éluion en HPLC analytique ($\lambda = 390 \text{ nm}$) montrant la présence des dithiopyrrolones synthétisées par *Sa. algeriensis* après ajout d'acide cinnamique dans le milieu SS.

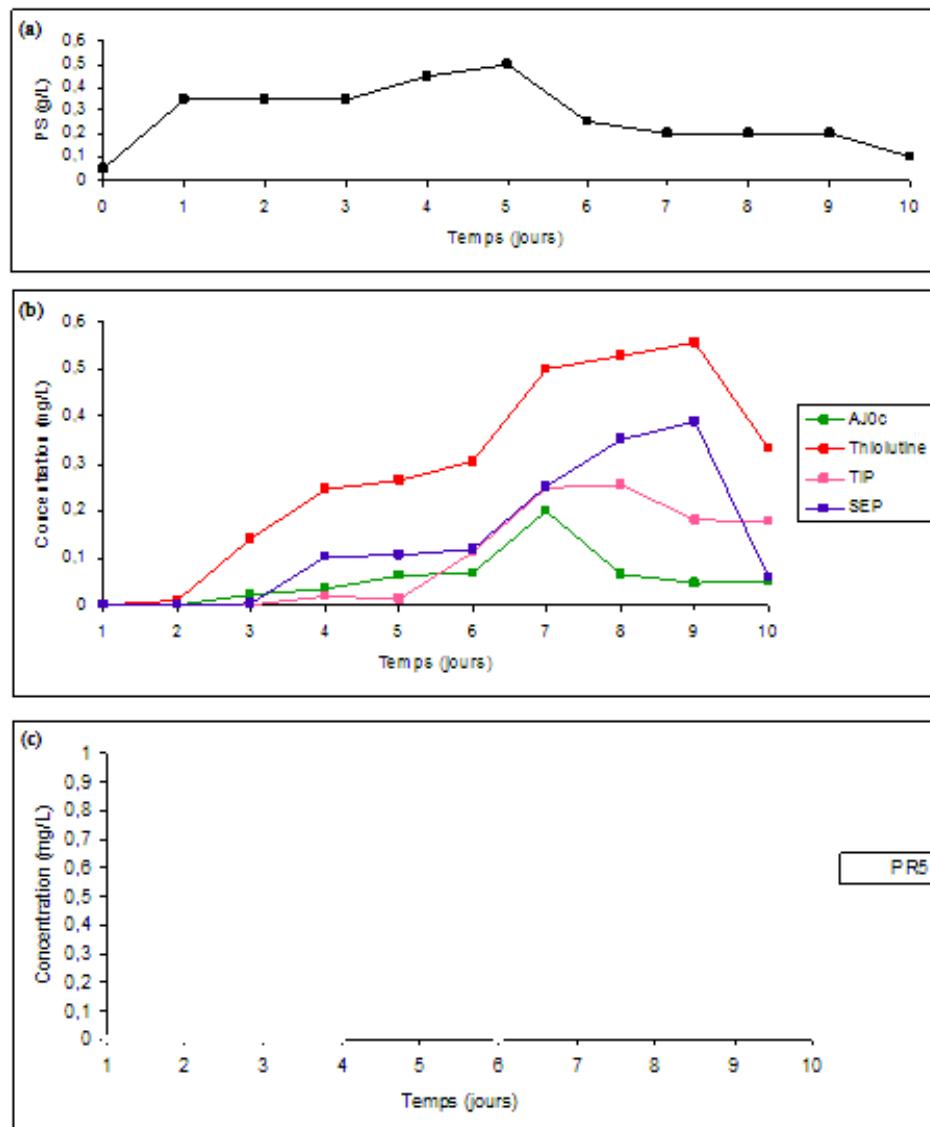


Figure 21. Cinétiques de production des dithiopyrrolones produites par *Sa. algeriensis* dans le milieu SS après addition d'acide cinnamique.

(a): Evolution de la biomasse. (b): Dithiopyrrolones déjà détectées dans le milieu SS témoin. (c): Nouvelle dithiopyrrolone apparue après addition d'acide cinnamique.

1.4.5.- Cinétique de production des dithiopyrrolones dans le milieu SS additionné de cystine

L'addition de cystine au milieu de culture a induit l'apparition de deux nouveaux pics, Cyst1 et Cyst2, à des temps de rétention de 11,19 et 11,73 min respectivement (Figure 22). Ces deux molécules se distinguent de AJ0 (détectée dans les autres milieux et présentant un temps de rétention voisin) par leurs spectres UV-visibles. Les molécules Cyst1 et Cyst2 sont produites à des concentrations maximales de 0,21 mg/L (au 4^{ème} jour) et 0,26 mg/L (au 8^{ème} jour) respectivement. La concentration maximale de la thiolutine (1,06 mg/L) a été augmentée par rapport au témoin, tandis que les concentrations maximales de la SEP

(0,4 mg/L) et de la TIP (0,13 mg/L) ont été diminuées (Figure 23). Nous notons l'absence de l'ISP et de la BUP.

Les productions maximales de toutes les dithiopyrrolones (entre le 4^{ème} et le 8^{ème} jours) coïncident avec la phase de déclin qui est assez lente.

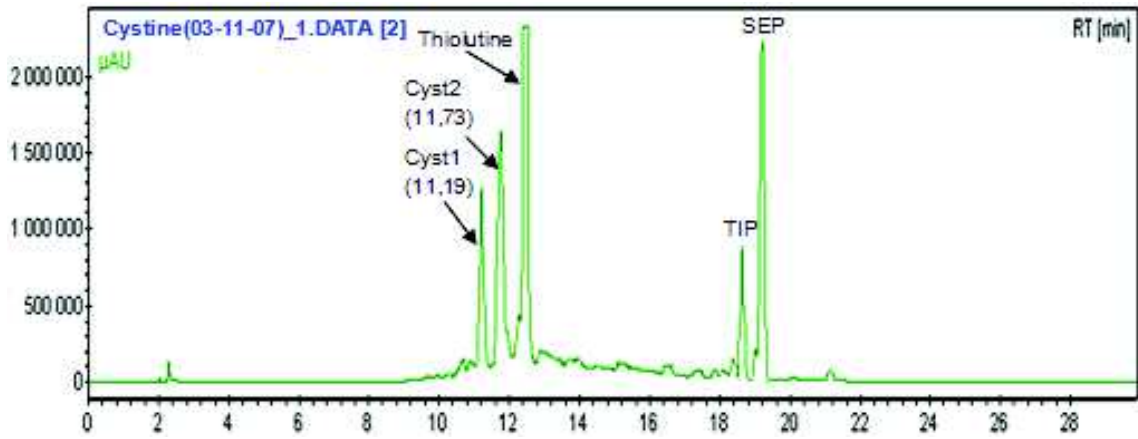


Figure 22. Profil d'éluion en HPLC analytique ($\lambda = 390$ nm) montrant la présence des dithiopyrrolones synthétisées par *Sa. algeriensis* après ajout de cystine dans le milieu SS.

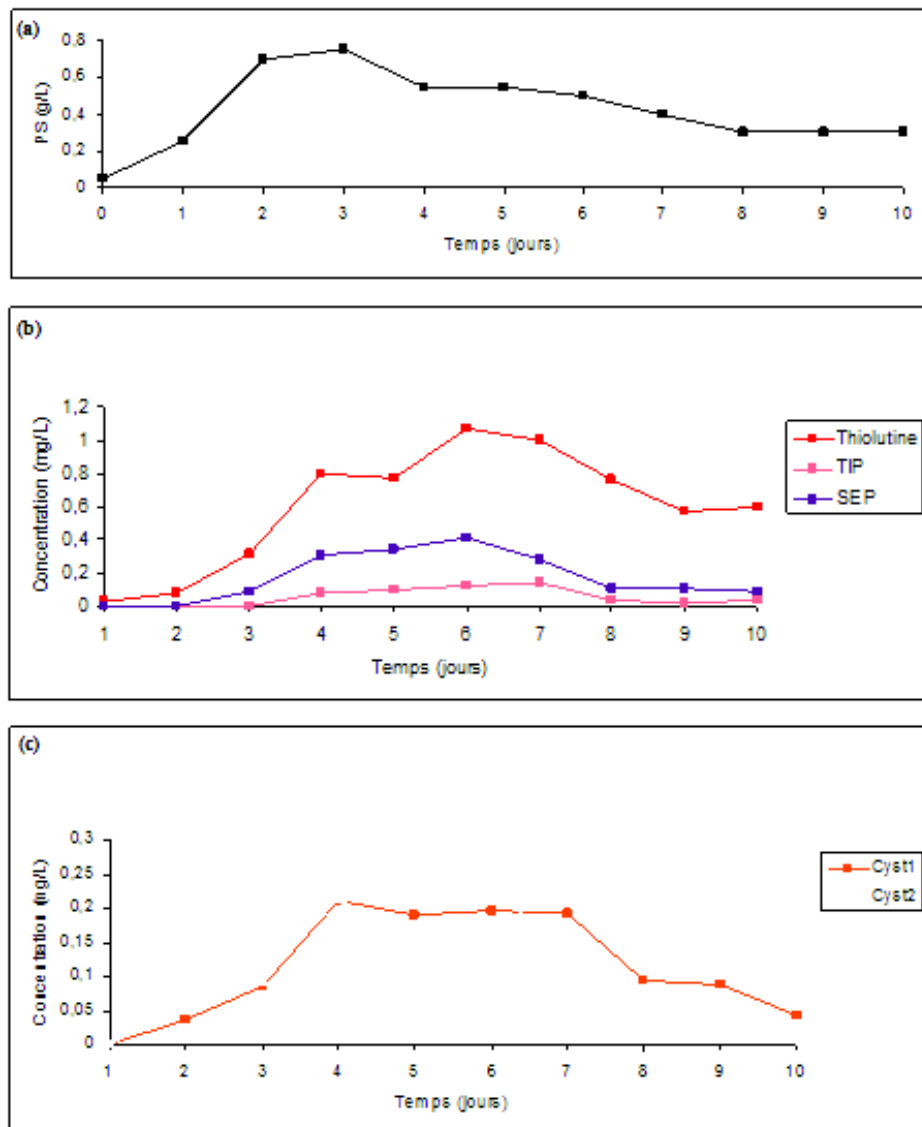


Figure 23. Cinétiques de production des dithiopyrrolones produites par *Sa. algeriensis* dans le milieu SS après addition de cystine.

(a) : Evolution de la biomasse. (b) : Dithiopyrrolones déjà détectées dans le milieu SS témoin. (c) : Nouvelles dithiopyrrolones apparues après addition de cystine.

1.4.6.- Cinétique de production des dithiopyrrolones dans le milieu SS additionné d'arginine

Les résultats illustrés sur la figure 24 montrent l'apparition de trois nouveaux pics après addition d'arginine, qui ont un temps de rétention proche de la thiolutine (absente dans ce cas) mais qui se distinguent par leur spectre UV-visible. Ces nouvelles molécules sont Arg2 (TR = 12,82 min), Arg3 (TR = 12,90 min) et Arg4 (TR = 13,08 min) avec des concentrations maximales de 0,91 mg/L, 1,61 mg/L et 0,28 mg/L respectivement au 9^{ème} jour de fermentation. Nous remarquons aussi la production des dithiopyrrolones AJ0a, SEP et TIP avec des concentrations maximales de 0,20, 0,22 et 0,16 mg/L respectivement,

au 9^{ème} jour de fermentation (Figure 25), et l'absence de la thiolutine, comme nous l'avons déjà signalé.

Les productions maximales de toutes les dithiopyrrolones coïncident avec la phase stationnaire de croissance de *Sa. algeriensis*.

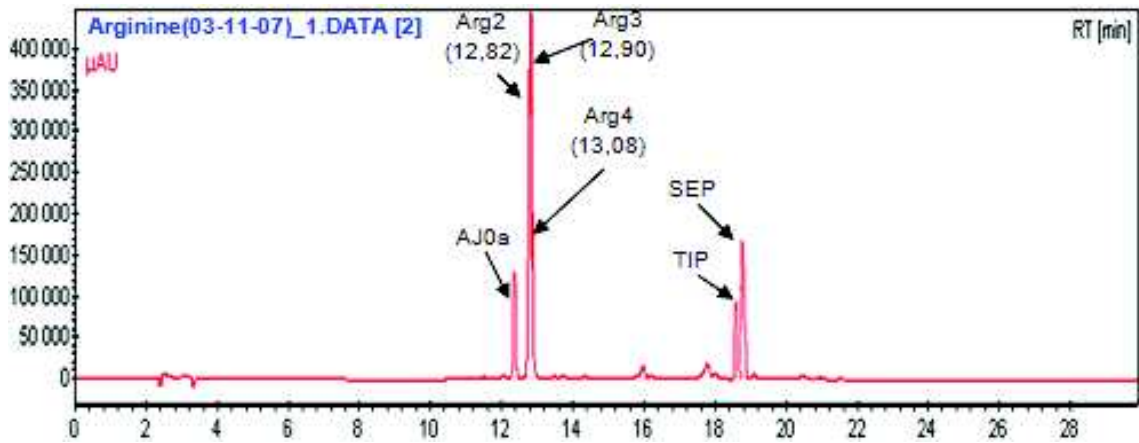


Figure 24. Profil d'éluion en HPLC analytique ($\lambda = 390 \text{ nm}$), montrant la présence des dithiopyrrolones synthétisées par *Sa. algeriensis* après ajout d'arginine dans le milieu SS.

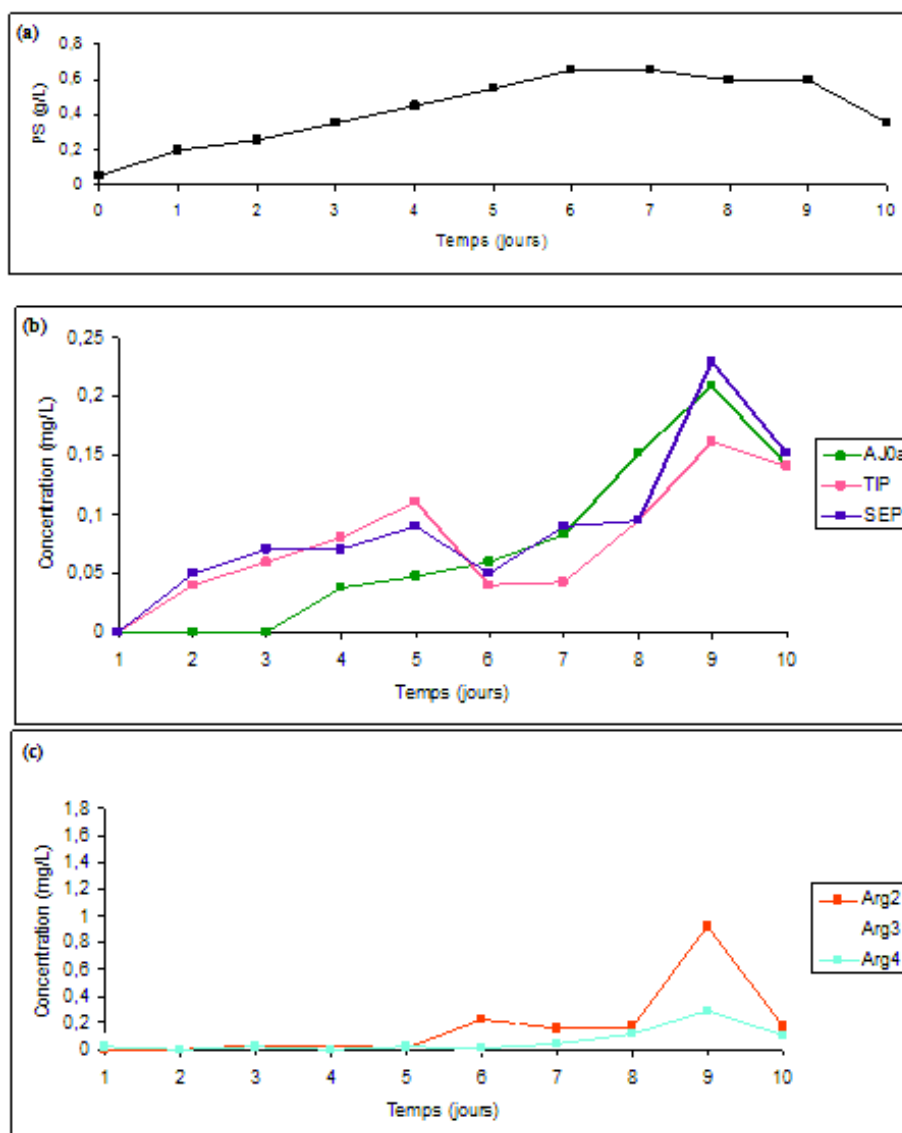


Figure 25. Cinétiques de production des dithiopyrrolones produites par *Sa. algeriensis* dans le milieu SS après addition d'arginine.

(a) : Evolution de la biomasse. (b) : Dithiopyrrolones déjà détectées dans le milieu SS témoin. (c) : Nouvelles dithiopyrrolones apparues après addition d'arginine.

2.- Discussion

Les courbes de croissance de *Sa. algeriensis* dans le milieu SS témoin et en présence des acides organiques et aminés ajoutés se caractérisent par le phénomène de diauxie avec une présence de deux phases exponentielles et une phase de déclin. Ce phénomène, décrit par Lee *et al.* (2003), correspond au temps d'adaptation des microorganismes aux nouvelles conditions de culture. Il est généralement observé dans les milieux comportant deux sources de carbone osidique, le glucose et le lactose ou le galactose ou encore le xylose (Prescott *et al.*, 2002). Cependant, il peut parfois se manifester dans des cultures avec une seule source osidique et une source azotée. Strub (2008) a montré que la croissance de *Sa. algeriensis* est diauxique sur un mélange de substrats. Les acides aminés (en particulier ceux chargés

négativement et ceux de faible poids moléculaire) sont dans un premier temps préférés par l'actinomycète pour sa croissance. Ces acides aminés sont utilisés au cours de la première phase exponentielle et le glucose, majoritairement au cours de la deuxième phase exponentielle. Le même résultat a été obtenu dans nos expériences avec *Sa. algeriensis*, ce qui confirme le phénomène de diauxie chez cette souche d'actinomycète.

Les cinétiques de croissance et de production des dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis* dans le milieu SS témoin et en présence des acides organiques et aminés ajoutés montrent que les maxima de production des dithiopyrrolones sont obtenus au cours de la phase stationnaire qui fait suite à la phase de déclin (entre le 7^{ème} et le 10^{ème} jour). Les travaux de Strub (2008) ont montré que la production de la thiolutine apparaît découplée de la croissance et interviendrait après un ralentissement significatif de la croissance, le maximum étant obtenu en phase stationnaire. La production des métabolites secondaires (dont les dithiopyrrolones) est sous l'influence du métabolisme primaire (Drew et Demain, 1977).

Dans tout les cas, le pH du milieu SS de *Sa. algeriensis* devient alcalin au cours des fermentations (avec ou sans acides organiques et aminés). Cette alcalinisation a lieu surtout durant les 24 premières heures. Les variations du pH deviennent faibles au delà du 1^{er} jour (entre J1 et J10). Le CaCO₃ présent dans le milieu SS joue un rôle de tampon. Il empêche les écarts importants et défavorables qui peuvent surgir sur la valeur du pH. Plusieurs travaux ont rapporté l'utilisation bénéfique du CaCO₃ en fermentation par les actinomycètes, entre autre le genre *Saccharothrix* (Isshiki *et al.*, 1989; Igarashi *et al.*, 1997; Lamari *et al.*, 2002a). L'évolution basique du pH semble être due à la dégradation des acides aminés présents dans l'extrait de levure, qui sont désaminés pour libérer de l'ammonium. L'accumulation de ce dernier provoque à la basification du milieu. De telles constatations ont été énoncées par Strub (2008) pour expliquer l'augmentation du pH dans la culture de *Sa. algeriensis*.

Les courbes de suivie des activités antimicrobiennes montrent une activité antibactérienne et une activité antifongique dans le milieu SS témoin. Ces activités dans les milieux additionnés d'acides organiques et d'acides aminés sont plus importantes que celles du témoin, ce qui suggère la production d'une plus grande quantité d'antibiotiques.

Dans le milieu SS additionné d'acide valérique l'activité antimicrobienne est maximale les 7^{ème}-8^{ème} jours, ce qui correspond en fait à une production maximale des nouvelles dithiopyrrolones induites par l'addition d'acide valérique, et qui sont PR3, PR4 et PR7, et aussi AJ0.

Dans le milieu SS additionné d'acide sorbique, l'activité antimicrobienne maximale, notée entre les 7^{ème}-9^{ème} jours, correspond à une bonne production des nouvelles dithiopyrrolones (PR2, PR8, PR9, PR19 et PR11) avec un maximum de production au 8^{ème} jour de fermentation. D'autres dithiopyrrolones (sécrétées dans le témoin) sont aussi produites durant cette période avec des concentrations moyennes.

Dans le milieu SS additionné d'acide cinnamique, l'activité antimicrobienne est tardive. Elle débute le 7^{ème} jour de fermentation et atteint son maximum le 9^{ème} jour. Cette bonne activité correspond à une concentration élevée de la nouvelle dithiopyrrolone PR5. D'autres dithiopyrrolones (sécrétées déjà dans le milieu témoin) sont produites durant la même période, mais à des concentrations moins importantes.

Dans les milieux SS additionnés de cystine et d'arginine, les activités antimicrobiennes intéressantes correspondent également à des concentrations élevées des nouvelles dithiopyrrolones produites par *Sa. algeriensis*.

Les corrélations observées entre les activités antimicrobiennes et la production des nouvelles dithiopyrrolones montrent l'implication de ces dernières dans l'activité contre les deux microorganismes-cibles utilisés, à savoir, *Bacillus subtilis* et *Mucor ramannianus*. Les concentrations minimales inhibitrices de chaque nouvelle dithiopyrrolone contre plusieurs microorganismes seront ultérieurement déterminées.

Les cinétiques de production ont montré que les nouvelles dithiopyrrolones sont généralement produites tardivement par rapport aux anciennes (sécrétées dans le milieu SS témoin). Les précurseurs (acides organiques et acides aminés) additionnés au milieu SS joueraient donc dans un premier temps un rôle dans la croissance de *Sa. algeriensis* et dans un deuxième temps dans la production des nouvelles dithiopyrrolones.

La production des anciennes dithiopyrrolones (présentes dans le milieu SS témoin) est induite deux fois au cours des cinétiques (les premiers et les derniers jours de fermentation). Strub (2008) a rapporté que la production de thiolutine est induite plusieurs fois, en condition de culture batch, à cause de l'utilisation séquentielle des substrats par le microorganisme. Selon cet auteur, chaque ralentissement de la croissance (provoqué par une limitation nutritionnelle ou un stress divers) de *Sa. algeriensis* provoquerait la production de la thiolutine.

Les courbes de cinétique de production ont montré que l'ajout de précurseurs (acides organiques et acides aminés) augmente la production de certaines dithiopyrrolones sécrétées dans le milieu SS témoin et défavorise la production d'autres. Ainsi, l'addition de cystine à une concentration de 5 mM a augmenté la production de la thiolutine, mais a diminué les concentrations de la SEP et la TIP. Les mêmes résultats ont été obtenus par Bouras (2005) qui a signalé que la production spécifique maximale de la thiolutine est enregistrée en présence de cystine (5 mM), alors que l'addition de cystéine (à 5 mM) et de cystine (à 10 mM) a augmenté d'une façon remarquable la production spécifique de la SEP, de la TIP, de l'ISP et de la BUP. Furumai *et al.* (1982) ont rapporté que la cystine ajoutée comme précurseur peut être transformée en pyrrothine (le noyau de base des dithiopyrrolones) chez *Streptomyces kasugaensis*. Slininger et Jackson (1992) ont rapporté que l'addition de la cystine stimule fortement la production de la phénazine-1-acide carboxylique (antibiotique hétérocyclique azoté) chez *Pseudomonas fluorescens*.

Pour l'effet des acides organiques sur la production des dithiopyrrolones sécrétées dans le milieu SS témoin (thiolutine, SEP, TIP, ISP, BUP et AJ0), nous remarquons que les trois acides organiques ajoutés ont diminué la quantité de ces antibiotiques, à l'exception de la production de AJ0 qui a été augmentée par l'addition d'acide valérique et d'acide cinnamique, la TIP qui a été augmentée par l'addition d'acide cinnamique et la BUP et l'ISP qui ont été aussi augmentées par l'addition d'acide sorbique. Bouras (2005) a signalé que l'acide tiglique et l'acide butyrique (à 2,5 mM) favorisent fortement la production de la TIP et de la BUP, respectivement. Ces résultats concordent aussi avec ceux cités pour la production des monensines A et B chez *Streptomyces cinnamomensis*, des antibiotiques APHE-1 et APHE-2 chez *S. griseocarneus*, de l'érythromycine chez *S. erythreus* et de la spiramycine chez *S. ambofaciens*. Ces antibiotiques ont été tous favorisés par le propionate et le butyrate comme précurseurs (Raczynska-Bojanowska *et al.*, 1973; Pospíšil *et al.*, 1985; Khaoua *et al.*, 1991; Cruz *et al.*, 1999).

Bouras (2005) a constaté que la production des dithiopyrrolones dépend de la concentration des acides organiques ou des acides aminés utilisés. D'une manière générale, cette production est diminuée lorsque la concentration de n'importe quel substrat (acide aminé ou acide organique) est augmentée. Plusieurs auteurs ont constaté l'effet négatif des fortes concentrations de sources d'azote (acides aminés ou sels d'ammonium) sur la production des antibiotiques, comme la céphamycine C chez *Streptomyces clavuligerus* (Lebrihi, 1988), la thiénamycine chez *S. cattleya* (Lilley *et al.*, 1981), le chloramphénicol chez *S. venezuelae* (Shapiro, 1989) et la tylosine chez *S. fradiae* (Tanaka *et al.*, 1985).

Cet effet négatif sur la production des antibiotiques en présence de concentrations élevées des substrats ajoutés peut être dû à la répression ou à l'inhibition d'une ou de plusieurs enzymes responsables de la biosynthèse des dithiopyrrolones. Dans ce cas, l'effet de l'ammonium pourrait par exemple être mis en cause (Drew et Demain, 1977; Shapiro, 1989). Plusieurs chercheurs ont rapporté des exemples de l'effet négatif sur la répression d'une ou de plusieurs enzymes de la voie de biosynthèse des antibiotiques, comme la répression de l'expandase (déacétoxcéphalosporine C synthétase) et de la cyclase (isopénicilline N synthétase) par l'ammonium chez *S. clavuligerus* producteur de la céphamycine C (Braña *et al.*, 1985; Lebrihi, 1988), ou encore de la glutamate déshydrogénase, de la glutamine synthétase, de la valine déshydrogénase (VDH), de la thréonine déshydratase et de l'alanine déshydrogénase (Aharonowitz et Demain, 1979; Lebrihi *et al.*, 1992; Lounes *et al.*, 1995). Cette répression est d'autant plus grande que la concentration d'ammonium est plus élevée. De même, l'excès de la source employée pourrait entraîner une répression de la transcription ou de la traduction des gènes codant pour la biosynthèse d'une ou de plusieurs enzymes de la voie de biosynthèse.

Les cinétiques de production des dithiopyrrolones montrent aussi que l'ajout des acides organiques et des aminés comme précurseurs au milieu de culture SS à une concentration de 5 mM, permet à *Sa. algeriensis* de produire de nouvelles molécules différentes de celles produites dans le milieu SS témoin. Ces molécules, matérialisées par l'apparition de nouveaux pics détectés par HPLC analytique, ont des temps de rétention différents de ceux des dithiopyrrolones produites dans le milieu SS témoin et avec des spectres UV-visible légèrement différents.

La production des dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis* est donc influencée quantitativement et qualitativement selon la nature et la concentration des acides aminés ou des acides organiques utilisés. Les nouvelles molécules apparues seront purifiées par HPLC semi-préparative afin d'étudier leurs caractéristiques spectroscopiques et déterminer leur structure.

III.- PRODUCTION, EXTRACTION ET PURIFICATION DES NOUVELLES DITHIOLOPYRROLONES INDUITES PAR L'AJOUT DE PRECURSEURS CHEZ SA. ALGERIENSIS

1.- Résultats

1.1.- Production des dithiopyrrolones

Le milieu de culture choisi pour la production des dithiopyrrolones chez *Sa. algeriensis* est le milieu semi-synthétique (SS). Des cultures en Erlenmeyers de 500 ml sur milieu SS sans précurseurs (témoin) ou après l'ajout de précurseurs (acides organiques et acides aminés à une concentration de 5 mM) sont entreprises, afin de recueillir le maximum de culture. Ainsi, 12 à 20 L de culture de chaque essai ont été obtenus. L'extraction des dithiopyrrolones à partir des filtrats de cultures est effectuée le jour de l'activité maximale, déterminé lors des expériences antérieures. Durant l'incubation, la couleur des milieux de cultures initialement beige-brunâtre clair, vire vers le jaune à la suite de la production du pigment bioactif jaune vif.

1.2.- Extraction des dithiopyrrolones

L'extraction des dithiopyrrolones a été effectuée à partir des filtrats de culture en utilisant le dichlorométhane, tel que décrit par Lamari (2006). Après extraction avec ce solvant et déshydratation avec le sulfate de sodium anhydre, les phases organiques obtenues sont évaporées à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif. Les extraits bruts obtenus ont un aspect poudreux de couleur jaune vif à jaune orangé vif.

1.3.- Mise en évidence des dithiopyrrolones par bioautographie

Une bioautographie a été effectuée pour localiser les antibiotiques. Pour cela, nous avons réalisé une chromatographie sur couche mince des extraits brut en utilisant le système de solvants "acétate d'éthyl-méthanol" ou AM (100-15 v/v). Tous les extraits ont montré la présence de deux taches visibles à l'oeil nu, de couleur jaune vif. Elles sont dénommés AJ pour la tache la plus basse ($R_f = 0,52$) et PS pour celle du dessus ($R_f = 0,59$). La tache AJ apparaît plus intense que PS et semble de ce fait présente en plus grande quantité (Figure 26). Selon Lamari (2002b et 2006), dans l'extrait brut sans précurseurs (témoin), la tache AJ correspond à un seul antibiotique (la thiolutine), tandis que la tache PS représente un complexe de plusieurs antibiotiques.

La réalisation des bioautographies en utilisant les microorganismes-cibles *Mucor ramannianus* et *Bacillus subtilis*, a montré que dans tous les cas, les zones actives ne sont détectées qu'autour des deux tâches AJ et PS. Aucune autre tâche active n'a de ce fait été notée.

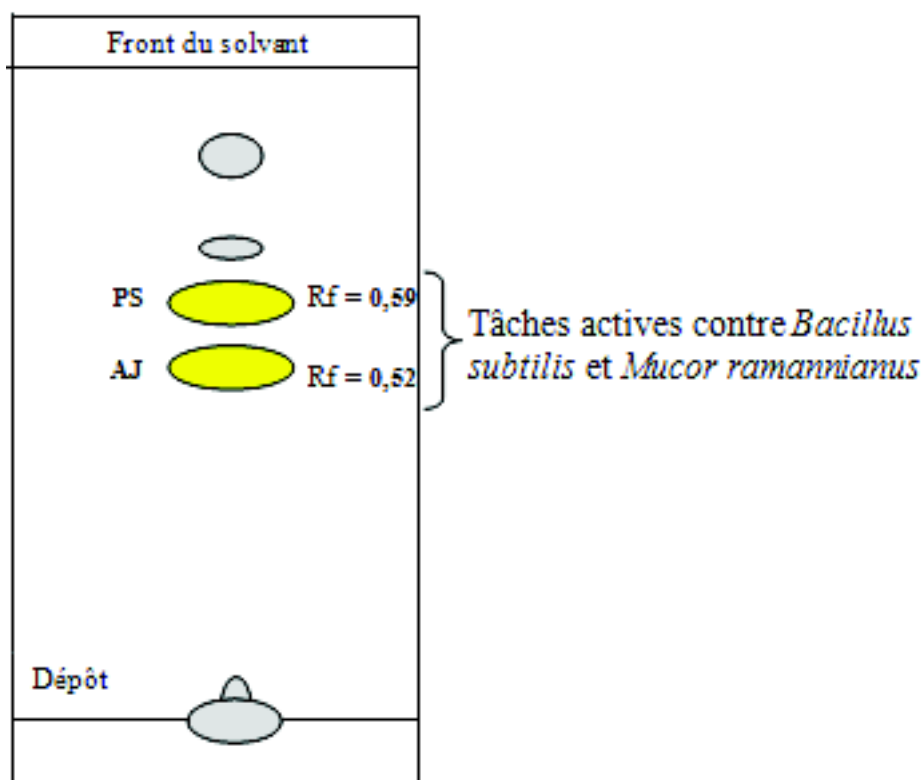


Figure 26. Schéma montrant la bioautographie de l'extrait au dichlorométhane du filtrat de culture de *Sa. algeriensis*.

Note: Les tâches grises représentent des impuretés inactives.

1.4.- Semi-purification des dithiopyrrolones

Le développement des extraits bruts (spotés en traits continus) par le système de solvants AM, en utilisant des plaques épaisses de gel de silice, a permis d'obtenir dans chaque extrait deux bandes, AJ et PS facilement repérables par leur couleur jaune vif et leur Rf (Figure 27). Des bandes sont délimitées, grattées avec la silice et récupérées séparément. Les deux produits de chaque culture sont ensuite désorbés au méthanol, filtrés, séchés, puis analysés par HPLC pour la poursuite de la purification.

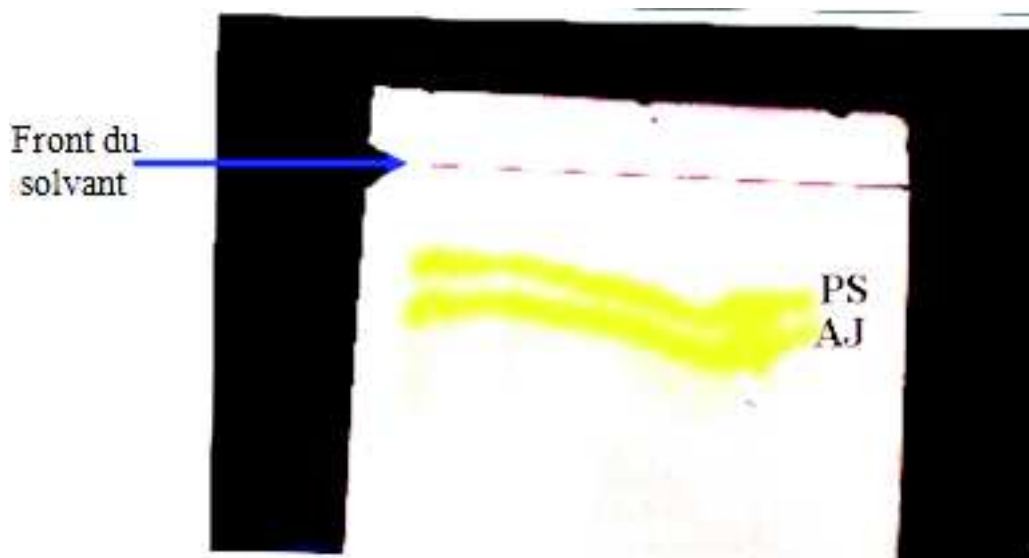


Figure 27. Semi-purification des bandes actives AJ et PS de *Sa. algeriensis* sur plaques épaisses de gel de silice.

1.5.- Purification des nouvelles dithiopyrrolones induites pas addition d'acides organiques et aminés par HPLC semi-préparative

Des conditions analytiques et semi-préparatives sont utilisées respectivement pour la détection et la purification des nouvelles dithiopyrrolones induites par l'ajout d'acides organiques et d'acides aminés.

Dans le cas de l'utilisation d'une colonne C18 semi-préparative, l'extrait sec est tout d'abord humecté avec du méthanol puis solubilisé dans du dichlorométhane (pour accroître sa solubilité) avant d'être injecté dans le système HPLC. La phase mobile est constituée par une solution de méthanol-eau avec un gradient qui diffère selon l'extrait purifié. En effet, chaque extrait nécessite une mise au point particulière pour bien séparer les dithiopyrrolones entre elles. Le débit utilisé est 2 ml/min et la détection se fait simultanément à des longueurs d'ondes de 220 nm et 390 nm. A 220 nm, tous les composés sont détectés, ce qui permet de purifier les dithiopyrrolones en évitant les contaminants inactifs. A 390 nm, seuls les dithiopyrrolones, de couleur jaune, sont détectées, ce qui permet de bien les visualiser et de les distinguer des autres produits.

1.5.1.- Dithiopyrrolones produites dans le milieu SS témoin

Le profil d'élution en HPLC semi-préparative des dithiopyrrolones sécrétées par *Sa. algeriensis* dans le milieu SS témoin est présenté dans la figure 28.

Lamari (2002b et 2006) a déterminé les structures chimiques des dithiopyrrolones présentes dans l'extrait témoin: la thiolutine (AJ), l'isobutyryl-pyrrotine (ISP), la butanoyl-pyrrothine (BUP) et la tigloyl-pyrrothine (TIP). La structure chimique de l'antibiotique AJ0t qui est présent en très petite quantité, n'a pas été déterminée.

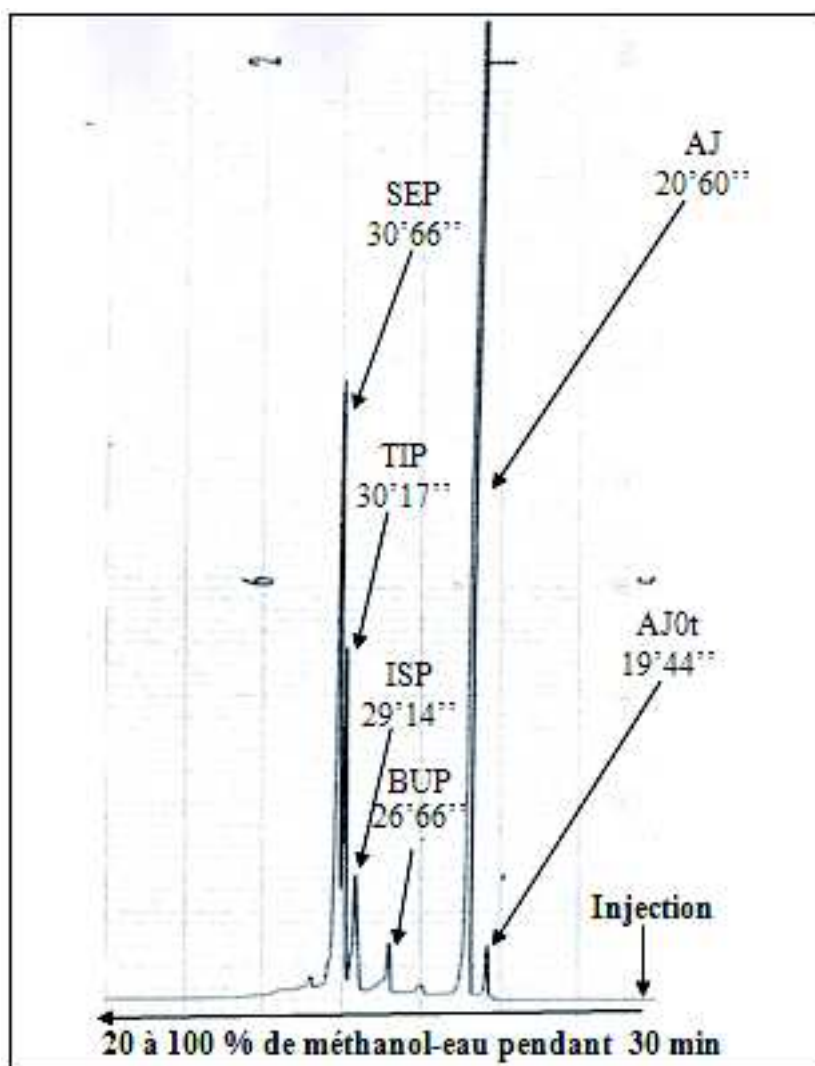


Figure 28. Profil d'éluion en HPLC semi-préparative de l'extrait brut au dichlorométhane effectué à partir d'une culture témoin (sans précurseurs) de *Sa. algeriensis*.

Note: - l'extrait a été solubilisé dans un mélange méthanol-dichlorométhane. - La colonne utilisée est de type C18 semi-préparative. - Détection à 390 nm. - le profil se lit de droite à gauche.

1.5.2.- Purification des nouvelles dithiopyrrolones induites par l'ajout de l'acide valérique

Pour mieux séparer les dithiopyrrolones, le gradient de la phase mobile a été modifié: gradient continu de 50 à 100% méthanol-eau pendant 30 min. Ce gradient a été choisi après plusieurs essais préliminaires.

Le chromatogramme obtenu à partir de l'extrait additionné d'acide valérique montre l'apparition de trois nouveaux pics par rapport à l'extrait témoin: PR3 à un temps de rétention de 13'85'', PR4 à un temps de rétention de 25'02'' et PR7 à un temps de rétention de 28'37''. (Figure 29).

Les fractions PR3 et AJ0v sont colorées en jaune et PR4 et PR7, en jaune orangé. Toutes ces fractions sont fortement actives contre *B. subtilis* et *M. ramannianus*. Elles sont recueillies séparément et séchées au rotavapor.

Les fractions AJ0v, PR3, PR4 et PR7 sont re-injectées pour les purifier. Le gradient de la phase mobile est modifié selon la fraction purifiée.

La figure 30 montre la molécule PR7 pure après la troisième injection.

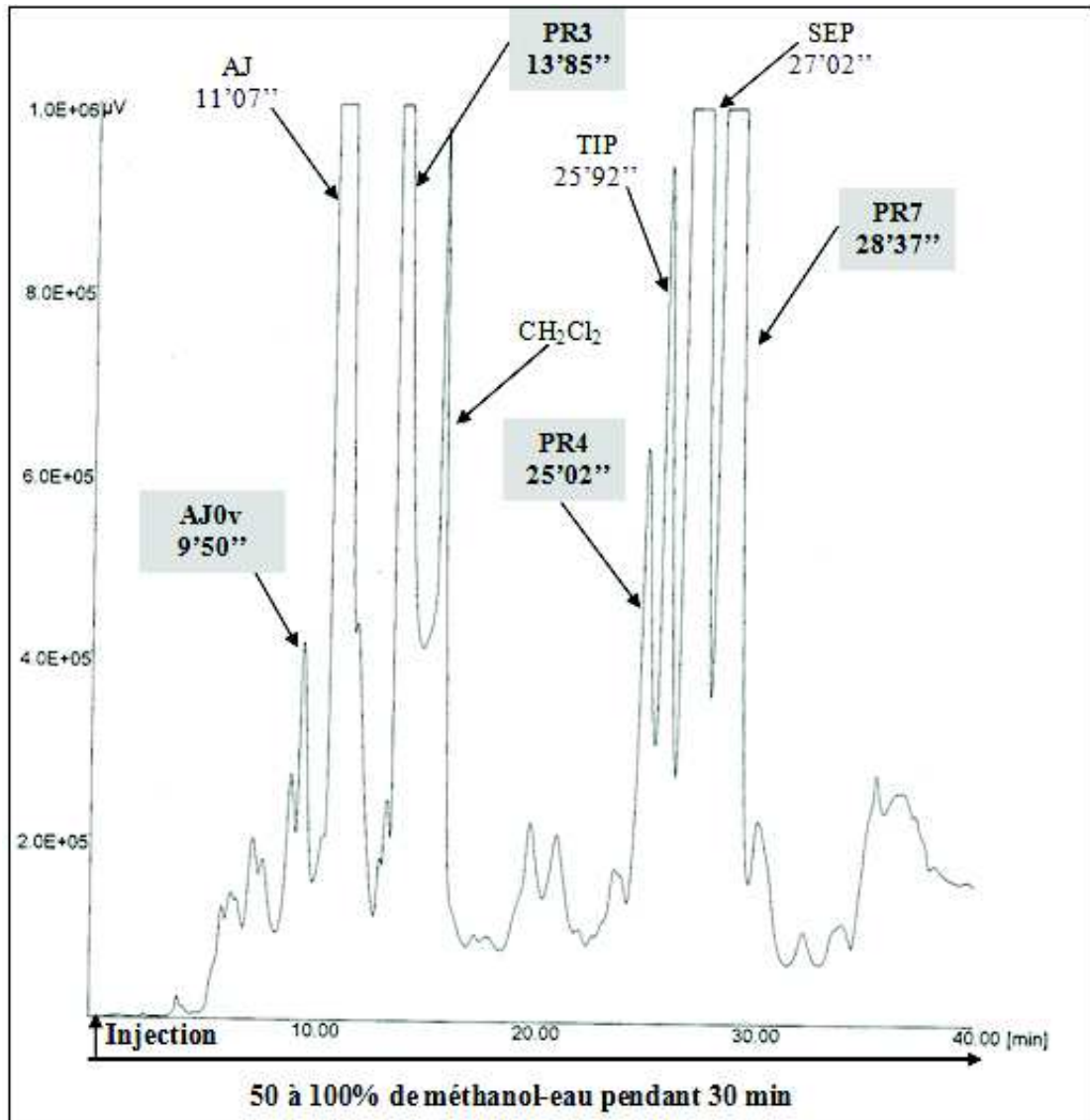


Figure 29. Profil d'élution en HPLC semi-préparative de l'extrait au dichlorométhane à partir d'une culture de *Sa. algeriensis* contenant de l'acide valérique.

Note: - Les nouvelles dithiopyrrolones induites sont PR3, PR4 et PR7 (la quantité de AJ0 est augmentée par rapport à la culture témoin).

- L'extrait est solubilisé dans un mélange méthanol-dichlorométhane.
- La colonne est du type C18 semi-préparative.
- La détection se fait à 220 nm (détection des dithiopyrrolones et d'autres produits non colorés et inactifs).

- CH_2Cl_2 = dichlorométhane (dans lequel ont été solubilisés les antibiotiques).
- Le profil se lit de gauche à droite en raison d'un changement de l'enregistreur de l'HPLC.

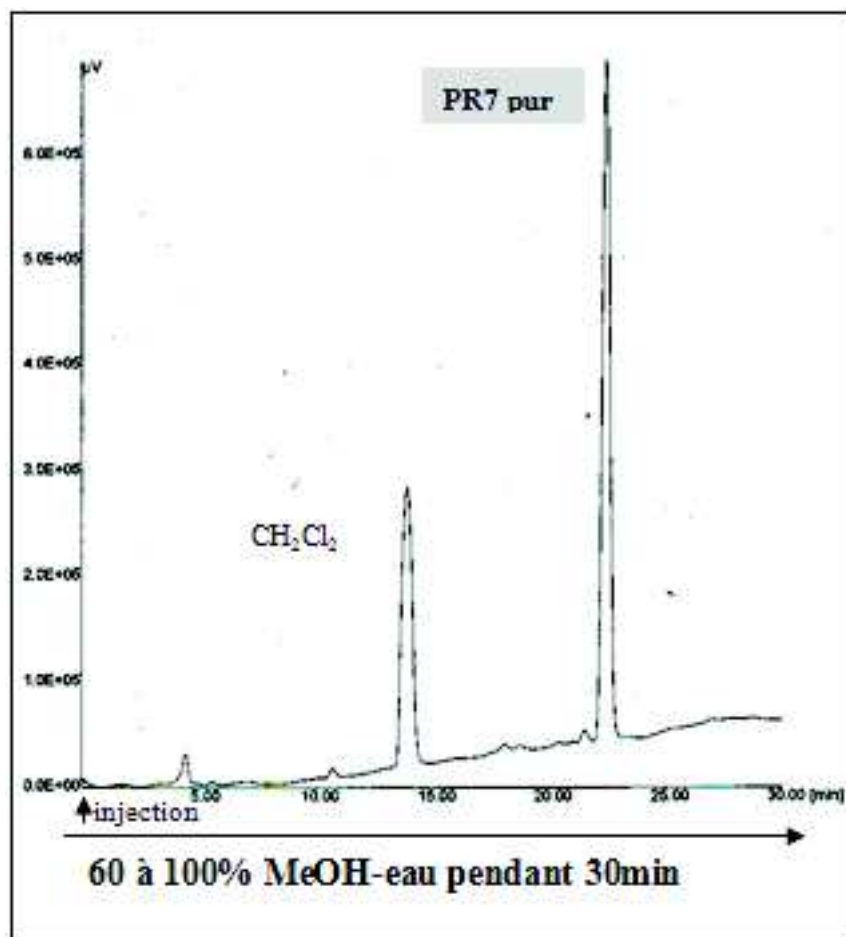


Figure 30. Profil d'éluion en HPLC montrant la purification de la fraction PR7.

Note: - La purification de PR7 est obtenue après re-injection de la fraction PR7 obtenue dans le profil de la figure 30. - Les conditions sont les mêmes que celles énoncées dans la figure 29 (sauf pour le gradient). - CH_2Cl_2 = dichlorométhane.

1.5.3.- Purification des nouvelles dithiopyrrolones induites par l'ajout d'acide sorbique

Le chromatogramme illustré sur la figure 31 montre que l'ajout d'acide sorbique au milieu SS a induit l'apparition de nouveaux pics: le complexe A qui sort à un temps de rétention (TR) de 28'24" et qui semble être composé de plusieurs molécules (au vu de l'instabilité de l'absorbance indiquée sur le détecteur de l'appareil HPLC), le complexe B (plusieurs molécules aussi) qui sort à 100% MeOH (TR = 37'16") et la nouvelle molécule PR8 (TR = 36'86").

Une deuxième injection des complexes A et B, en changeant les conditions de séparation, ont montré que le complexe A est composé de trois pics, dont un seul est

nouveau (nommé PR2), les deux étant la BUP et l'ISP présentes déjà dans le témoin. Le complexe B est composé de trois nouveaux pics: PR9, PR10 et PR11 (Figure 32).

Les fractions PR2, PR8, PR9, PR10 et PR11 sont de couleur jaune orangé. Elles sont actives contre *M. ramannianus* et *B. subtilis*. Elles sont alors purifiées et évaporées à sec.

Le produit AJ0s (TR = 14'25") est aussi recueillie et purifié.

Dans le profil, nous notons également la présence de la thiolutine (AJ), la tigloyl-pyrrothine (TIP) et la sénécioyl-pyrrothine (SEP), produites aussi dans le milieu SS témoin.

La figure 33 montre les fractions PR2 et PR9 pures.

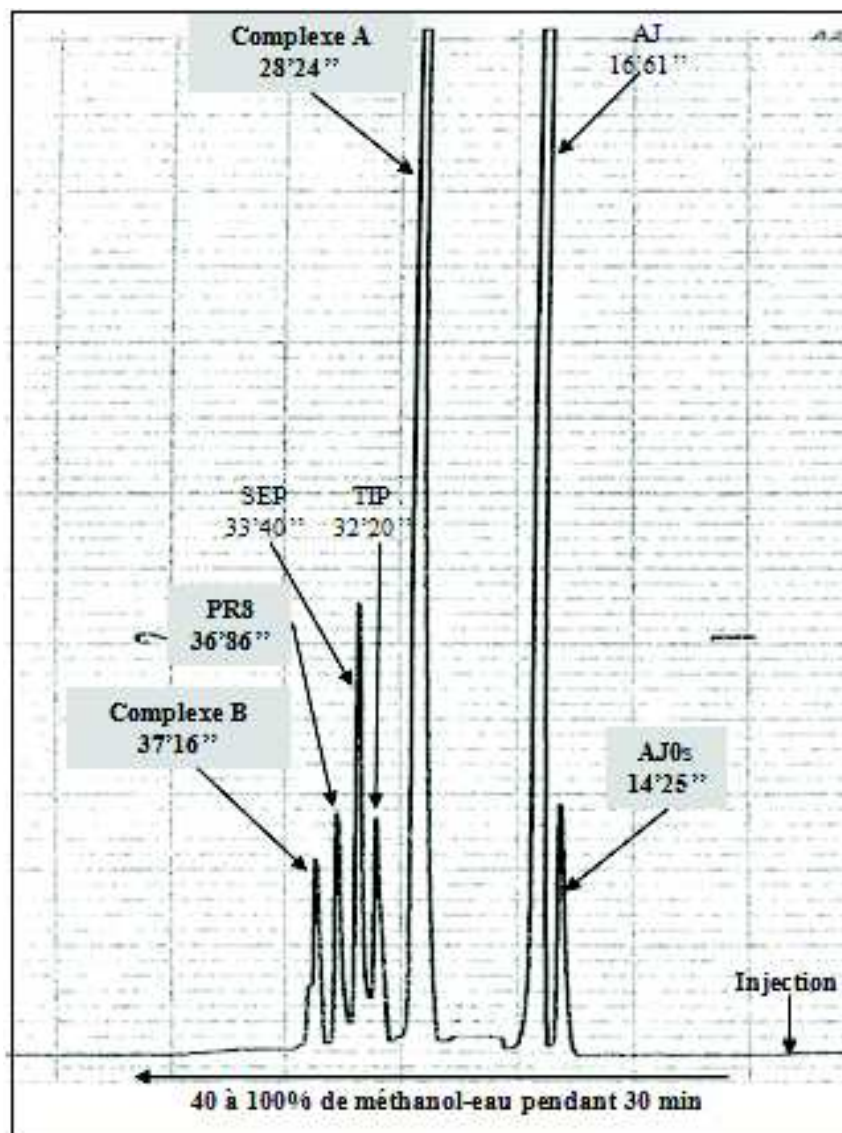


Figure 31. Profil d'élué en HPLC semi-préparative de l'extrait au dichlorométhane à partir d'une culture de *Sa. algeriensis* contenant de l'acide sorbique.

Note: - l'extrait a été solubilisé dans un mélange méthanol-dichlorométhane. - La colonne utilisée est de type C18 semi-préparative. - Détection à 390 nm.

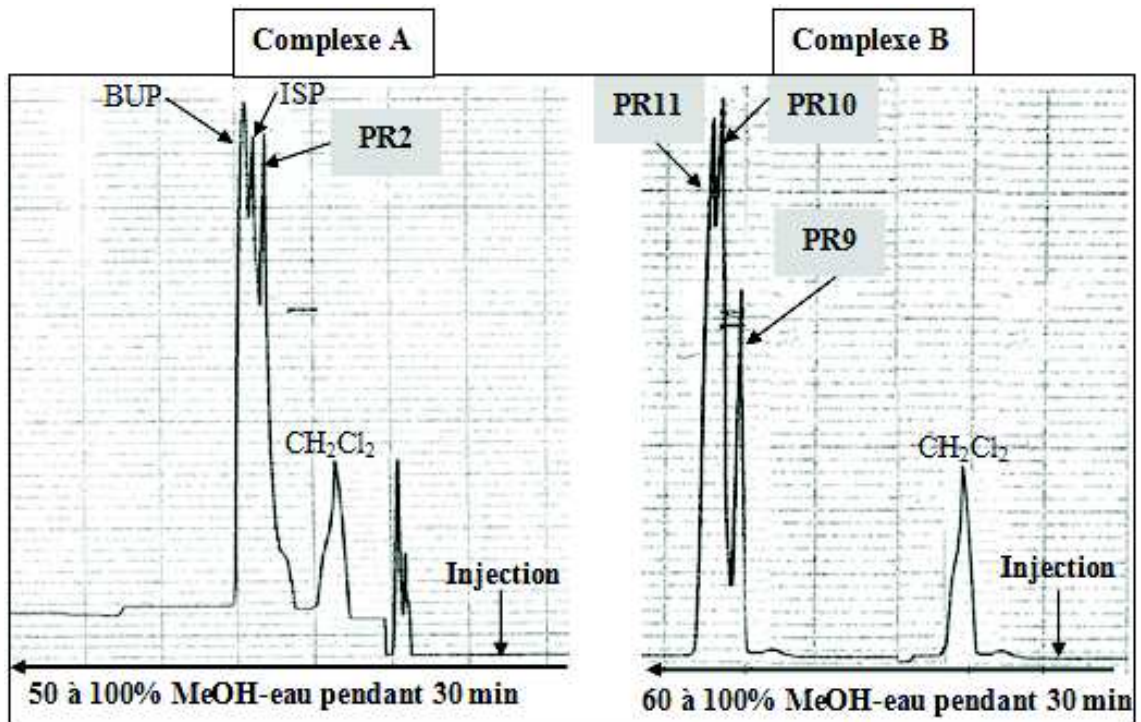


Figure 32. Profil d'éluion en HPLC après la re-injection des complexes A et B.

Note: - Les conditions sont les mêmes que celles énoncées dans la figure 29 (sauf pour les gradients). CH_2Cl_2 = dichlorométhane.

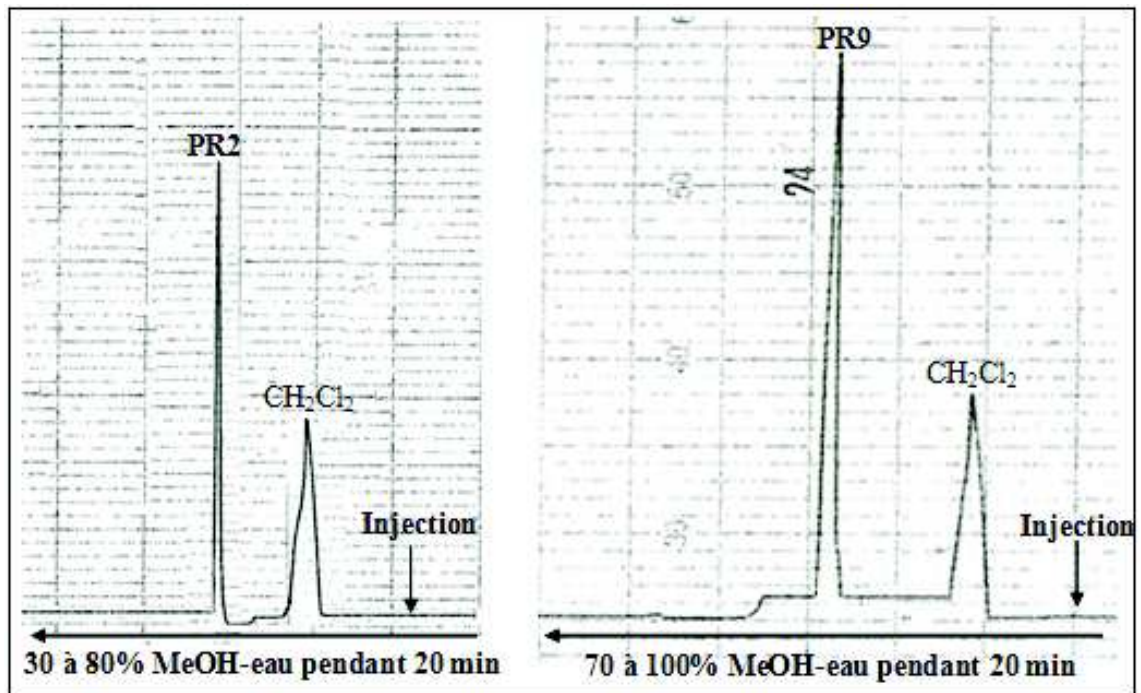


Figure 33. Profil d'éluion en HPLC des fractions PR2 et PR9 purifiées.

Note: - La purification de PR2 et PR9 est obtenue après re-injection des fractions PR2 et PR9 respectivement obtenues dans le profil de la figure 32. - Les conditions sont

les mêmes que celles énoncées dans la figure 29 (sauf pour les gradients). - CH_2Cl_2 = dichlorométhane.

1.5.4.- Purification d'une nouvelle dithiopyrrolone induite par l'ajout d'acide cinnamique

Le chromatogramme illustré sur la figure 34 montre que l'ajout d'acide cinnamique au milieu SS provoque la production d'une nouvelle molécule, la PR5, qui sort à un temps de rétention de 22'68". Les fractions PR5 et AJ0c de couleur jaune sont actives contre *M. ramannianus* et *B. subtilis*. Elles sont alors purifiées et sécher. AJ (thiolutine), SEP, et TIP sont aussi présentes. La figure 35 montre la fraction PR5 purifiée.

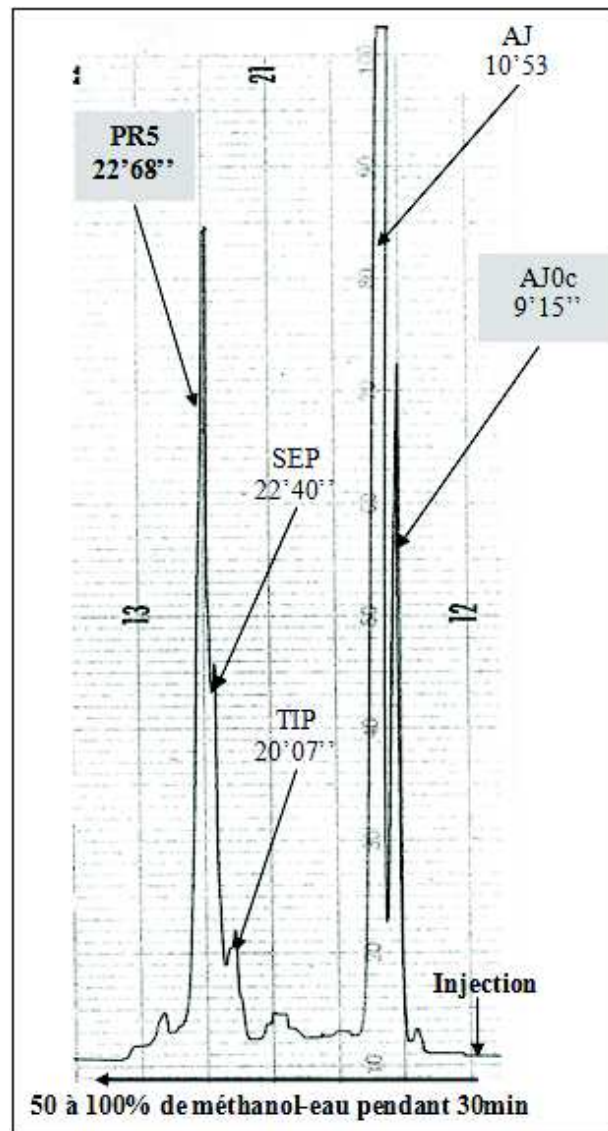


Figure 34. Profil d'éluion en HPLC semi-préparative de l'extrait au dichlorométhane à partir d'une culture de *Sa. algeriensis* contenant de l'acide cinnamique.

Note: - La nouvelle dithiopyrrolone induite est PR5 (la quantité d'AJ0 est augmentée par rapport à la culture témoin). - Les conditions sont les mêmes que celles énoncées dans la figure 31 (sauf pour le gradient).

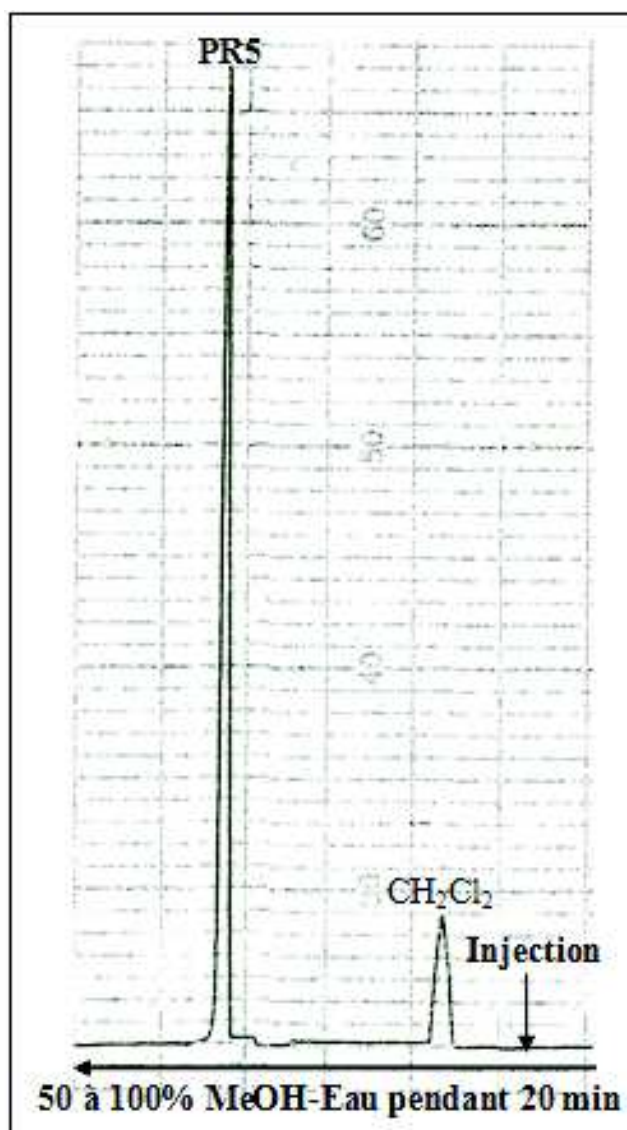


Figure 35. Profil d'éluion en HPLC de la fraction PR5 purifiée.

Note: - La purification de PR5 est obtenue après re-injection de la fraction obtenue dans le profil de la figure 34. - Les conditions sont les mêmes que celles énoncées dans la figure 29. - CH_2Cl_2 = dichlorométhane.

1.5.5.- Purification des nouvelles molécules induites par l'ajout de cystine

Le chromatogramme obtenu à partir de l'extrait additionné de cystine montre l'apparition de deux nouveaux pics par rapport à l'extrait témoin: Cyst1 à un temps de rétention de 16'00" et Cyst2 à un temps de rétention de 18'35" (Figure 36). Les deux nouvelles molécules, de couleur jaune vif, sont actives contre *M. ramannianus* et *B. subtilis*. Elles sont par la suite purifiées et séchées au rotavapor.

La figure 37 montre la fraction Cyst1 purifiée.

Le produit Cyst2 s'est révélé instable. Lors des re-injections nécessaires pour la purification, il se décompose en plusieurs produits. Il n'a donc pas été retenu pour la suite des études.

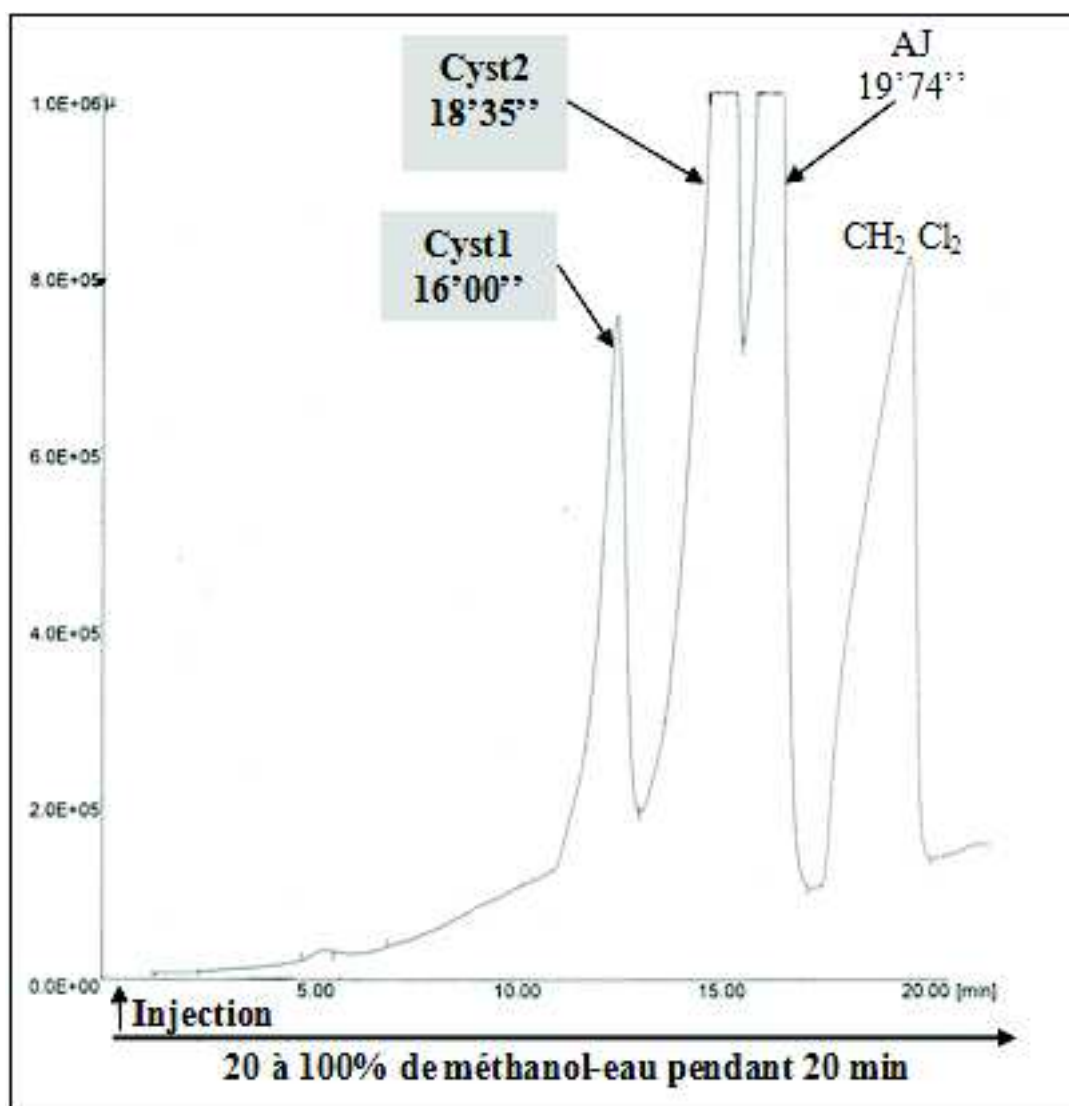


Figure 36. Profil d'élution en HPLC semi-préparative de l'extrait au dichlorométhane à partir d'une culture de *Sa. algeriensis* contenant de la cystine.

Note: - Les nouvelles dithiopyrrolones induites sont cyst1 et cyst2 (la fraction cyst2 est instable). Les conditions sont les mêmes que la figure 29 (sauf pour le gradient).

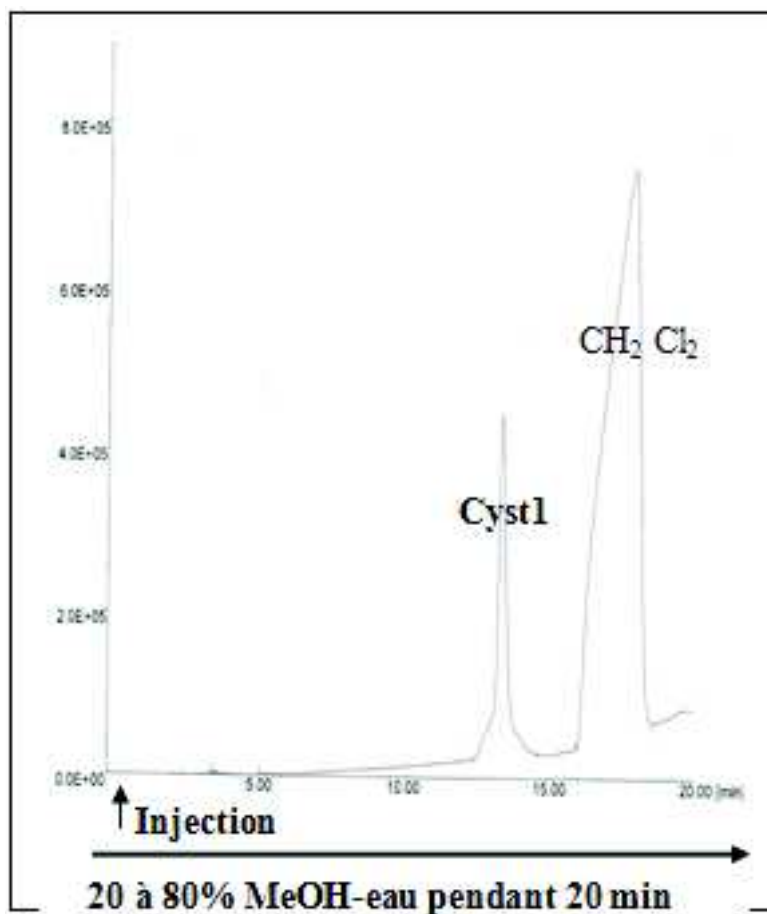


Figure 37. Profil d'éluion en HPLC de la fraction Cyst1.

Note: - La purification de cyst1 est obtenue après re-injection de la fraction obtenue dans le profil de la figure 36. - Les conditions sont les mêmes que celles énoncées dans la figure 29 (sauf pour les gradients).

1.5.6.- Purification des nouvelles molécules induites par l'ajout d'arginine

Le chromatogramme illustré sur la figure 38 montre l'apparition de trois nouveaux pics: Arg2, Arg3 et Arg4 à des temps de rétention de 10'85", 10'93" et 11'02" respectivement. Ces trois molécules sont toutes actives contre *M. ramannianus* et *B. subtilis*, elle sont récupérées, purifiées et séchées. Le produit AJ0a est aussi détecté (avec la TIP et la SEP), contrairement à la thiolutine (absente). Arg2, Arg3 et Arg4 ont des temps de rétention très proches de la thiolutine, mais ils diffèrent, comme nous allons le voir ultérieurement, par leur spectre UV-visible et leur masse.

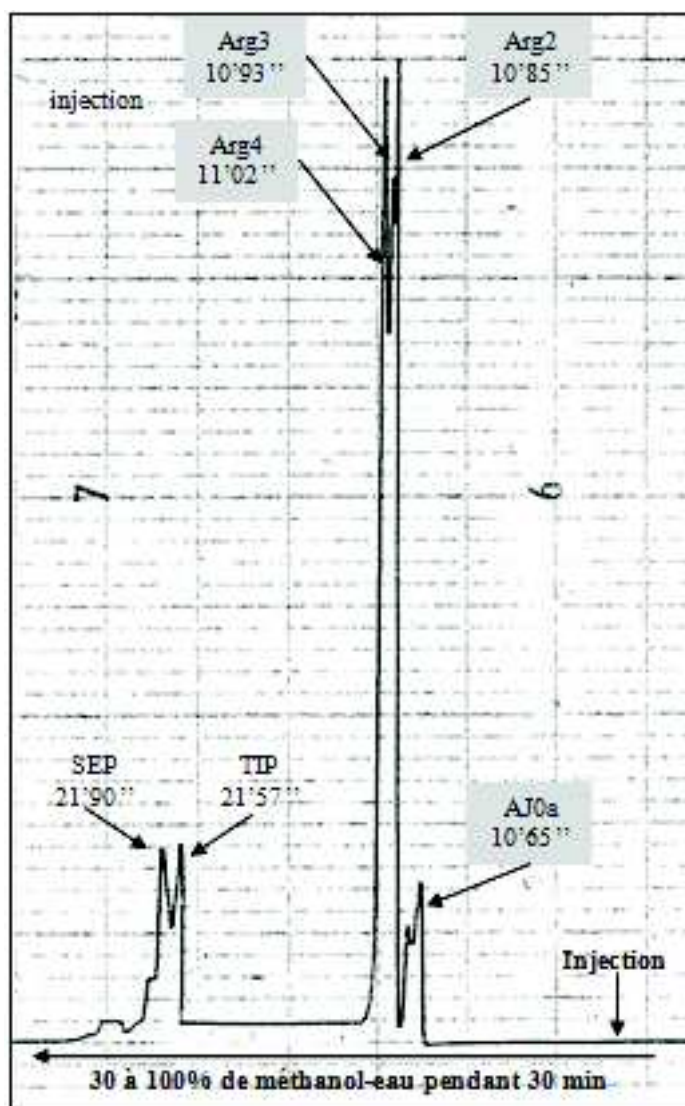


Figure 38. Profil d'éluion en HPLC semi-préparative de l'extrait au dichlorométhane à partir d'une culture de *Sa. algeriensis* contenant l'arginine.

Note: - Les nouvelles dithiopyrrolones induites sont Arg2, Arg3 et Arg3 (AJ0 est aussi produite). - Les conditions sont les mêmes que celles énoncées dans la figure 31 (sauf pour le gradient).

2.- Discussion et Conclusion

L'extraction des antibiotiques sécrétés par la souche *Sa. algeriensis* se fait au dichlorométhane. D'après Lamari (2002a) le dichlorométhane est le meilleur solvant d'extraction des dithiopyrrolones. Il extrait mieux et moins d'impuretés que les autres solvants.

La bioautographie de l'extrait au dichlorométhane, en utilisant l'acétate d'éthyle-méthanol (AM) comme solvant de migration, a permis de détecter deux taches de couleur jaune vif: AJ (Rf = 0,52) et PS (Rf = 0,59) actives contre *M. ramannianus* et *B. subtilis*. La

chromatographie sur plaques épaisses de gel de silice a permis de récupérer séparément les deux complexes d'antibiotiques, AJ et PS.

La purification par HPLC semi-préparative de l'extrait témoin (sans précurseurs) a montré que la souche *Sa. algeriensis* produit dans le milieu SS 06 antibiotiques (AJ0t à structure indéterminée, thiolutine, ISP, BUP, TIP et SEP).

L'ajout des précurseurs (acides organiques et acides aminés) à raison de 5 mM au milieu de culture SS a permis la production de nouvelles dithiopyrrolones (nouveaux pics détectés par HPLC analytique).

La purification des extraits obtenus à partir des cultures additionnées d'acides organiques (acide valérique, acide sorbique et acide cinnamique) et d'acides aminés (cystine et arginine) a été réalisée en utilisant une C18 semi-préparative. La phase mobile est constituée par une solution du méthanol-eau avec un gradient qui diffère selon l'extrait purifié. Les temps de rétentions des différentes fractions changent selon le gradient utilisé.

En plus de ces nouvelles molécules, il y'a le cas de AJ0. Celle-ci est produite dans le milieu SS témoin (notée AJ0t) mais aussi en présence des précurseurs (notées AJ0v, AJ0s, AJ0c et AJ0a). Au vu de leurs temps de rétention et de leur spectre UV-visible (donné par le détecteur à barrettes de diode de l'HPLC analytique), il semblerait que se soit la même molécule.

La figure 39 résume la production des nouvelles molécules (au nombre de 14) induites par l'ajout de ces précurseurs, ainsi que des molécules AJ0.

La détermination de la structure chimique des nouvelles molécules induites par l'ajout des acides organiques et des acides aminés (ainsi que celles des AJ0) sera effectuée après des études spectroscopiques et spectrométriques (UV-visible, masse, RMN du H et du C13).

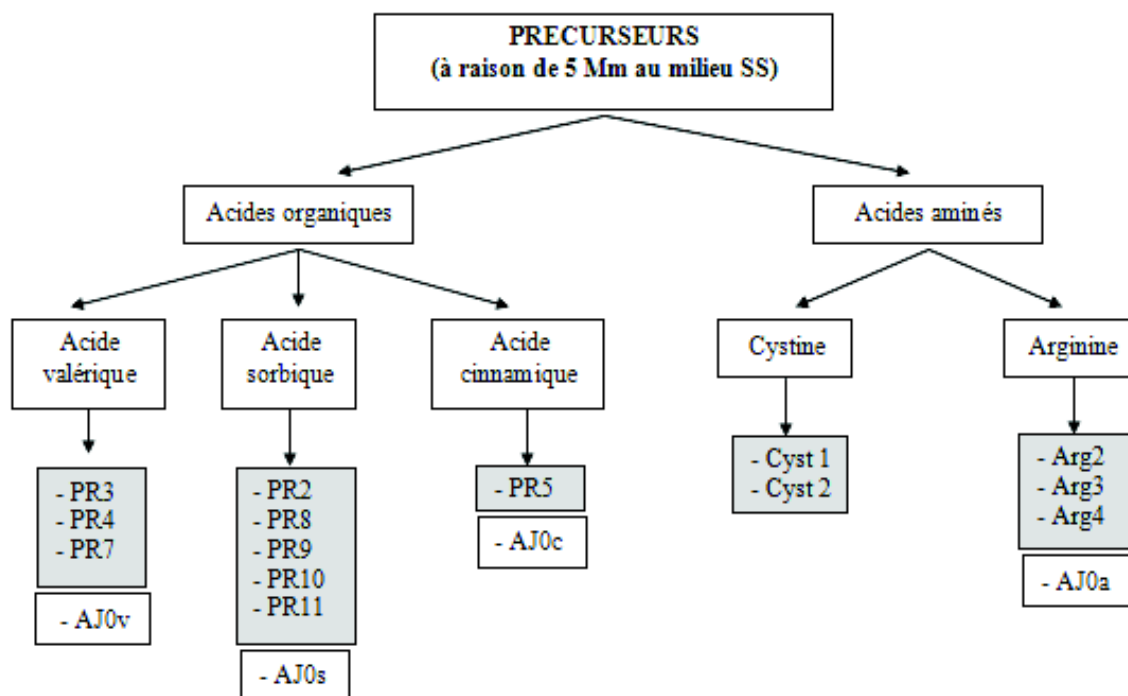


Figure 39. Nouvelles dithiopyrrolones induites par l'ajout d'acides organiques et d'acides aminés chez *Sa. algeriensis*.

Note : à ces nouvelles dithiopyrrolones s'ajoutent les AJ0 à structure non connue et présentes en petites quantités dans le témoin (AJ0t) et en plus grande quantité en présence de la majorité des précurseurs (AJ0v, AJ0s, AJ0c et AJ0a).

VI.- ETUDES SPECTROSCOPIQUES ET DETERMINATION DES STRUCTURES CHIMIQUES DES DITHIOPYRROLONES

1.- Résultats

1.1.- Spectres dans l'UV-visible

Les spectres dans l'UV-visible des dithiopyrrolones pures (solubilisées dans du méthanol) produites dans le milieu SS témoin (AJ0t, AJ, BUP, ISP, TIP et SEP) et celles induites par l'ajout d'acide valérique (AJ0v, PR3, PR4 et PR7), d'acide cinnamique (AJ0c et PR5), d'acide sorbique (AJ0s, PR2, PR8, PR9 et PR10), de cystine (Cyst1) et d'arginine (AJ0a, Arg2, Arg3 et Arg4) sont représentés au niveau des figures 40, 41, 42, 43, 44 et 45 respectivement.

Les spectres présentent la même allure; ils possèdent trois maxima d'absorption, avec un épaulement pour certains. Le 1^{er} maximum varie entre 202 et 207 nm, le deuxième est entre 300 et 314 nm, à l'exception de la molécule PR8 (270 et 304 nm) et le 3^{ème} entre 389 et 413 nm.

Les molécules AJ0v, AJ0s, AJ0c et AJ0a, obtenues après addition de l'acide valérique, l'acide sorbique, l'acide cinnamique et l'arginine respectivement, présentent le même spectre UV-visible, ce qui laisse penser qu'on est en présence d'une même molécule (d'autant plus que les temps de rétention en HPLC sont similaires).

Les spectres des molécules Arg2, Arg3 et Arg4 induites par l'ajout d'arginine se ressemblent beaucoup entre eux et diffèrent légèrement de celui de AJ (thiolutine) qui possède un temps de rétention voisin de celui des trois molécules.

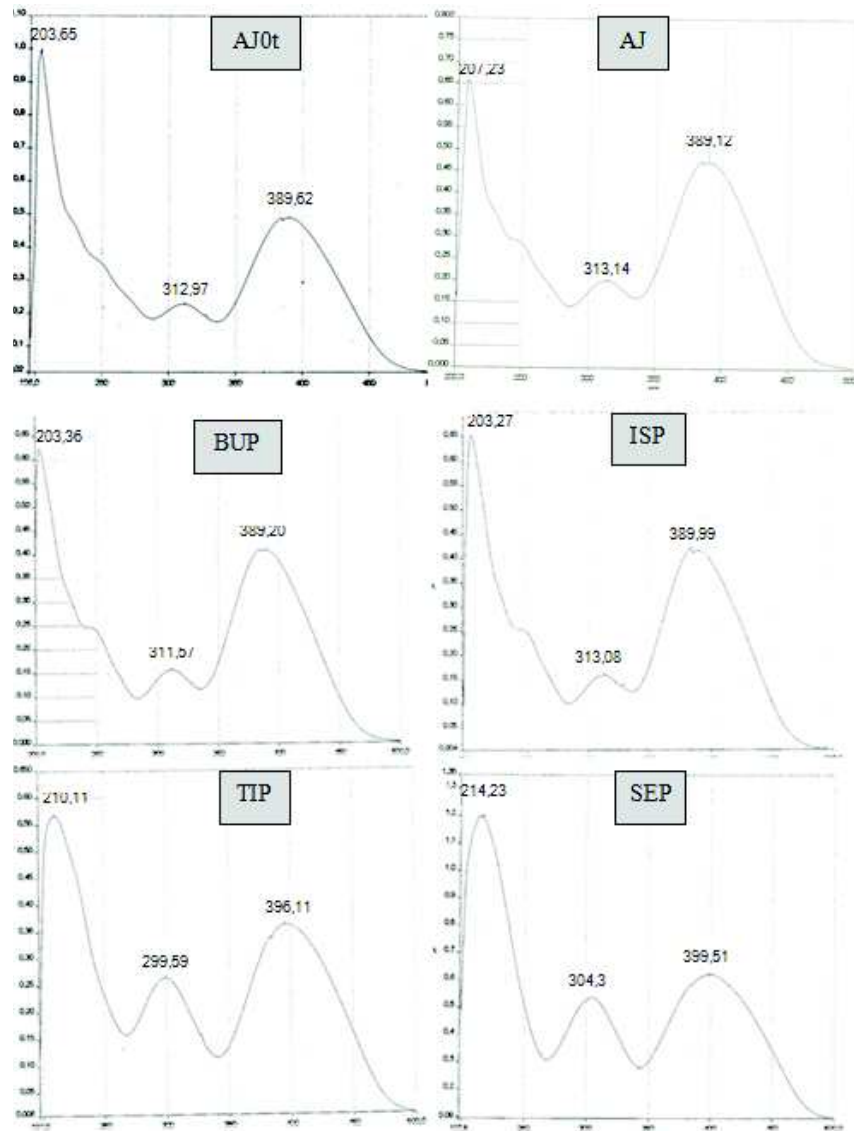


Figure 40. Spectre dans l'UV-visible des dithiopyrrolones AJ0t, AJ, TIP, SEP, BUP et ISP produites dans le milieu SS témoin. Les maxima d'absorption sont exprimés en nanomètres.

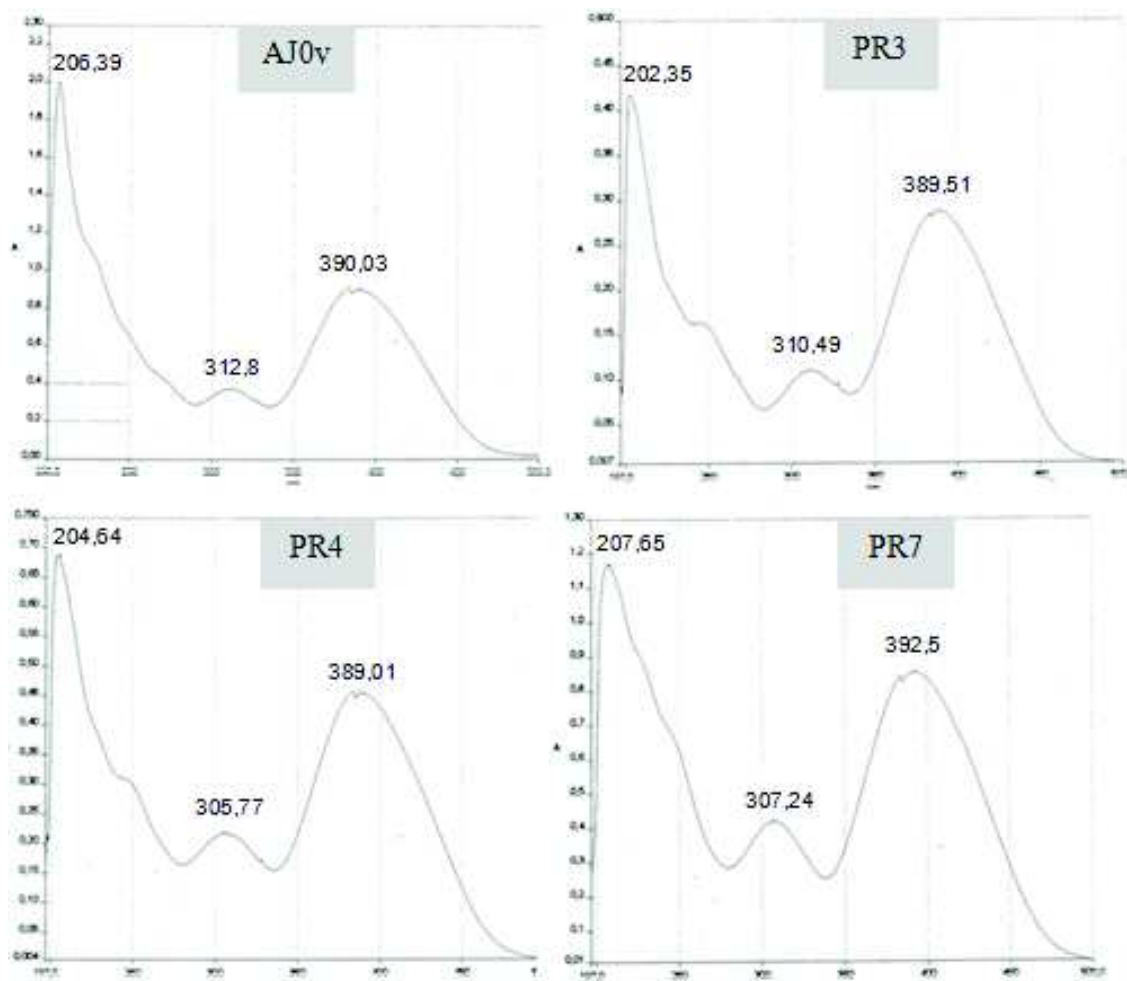


Figure 41. Spectres dans l'UV-visible des nouvelles dithiopyrrolones AJ0v, PR3, PR4 et PR7 induites par l'addition de l'acide valérique. Les maxima d'absorption sont exprimés en nanomètres.

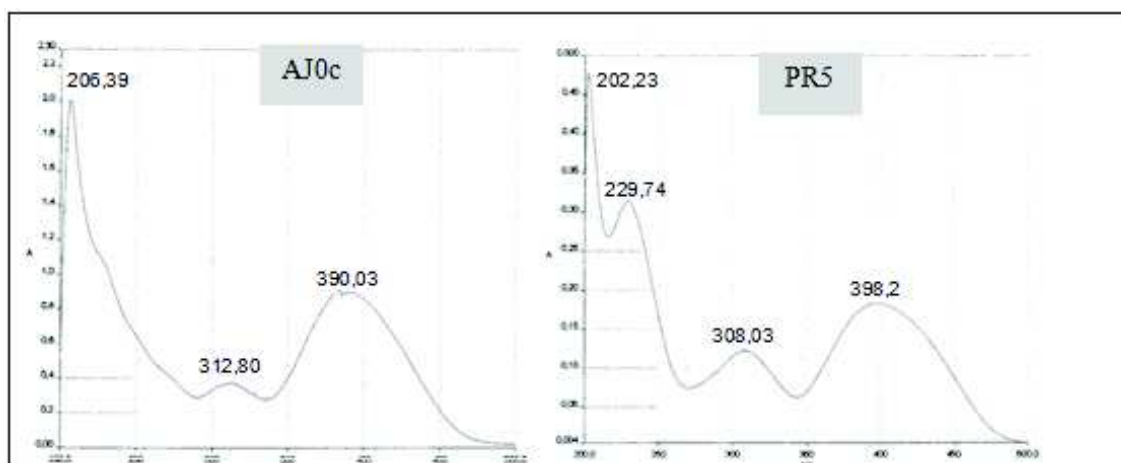


Figure 42. Spectres dans l'UV-visible des nouvelles dithiopyrrolones AJ0c et PR5 induites par l'addition de l'acide cinnamique. Les maxima d'absorption sont exprimés en nanomètres.

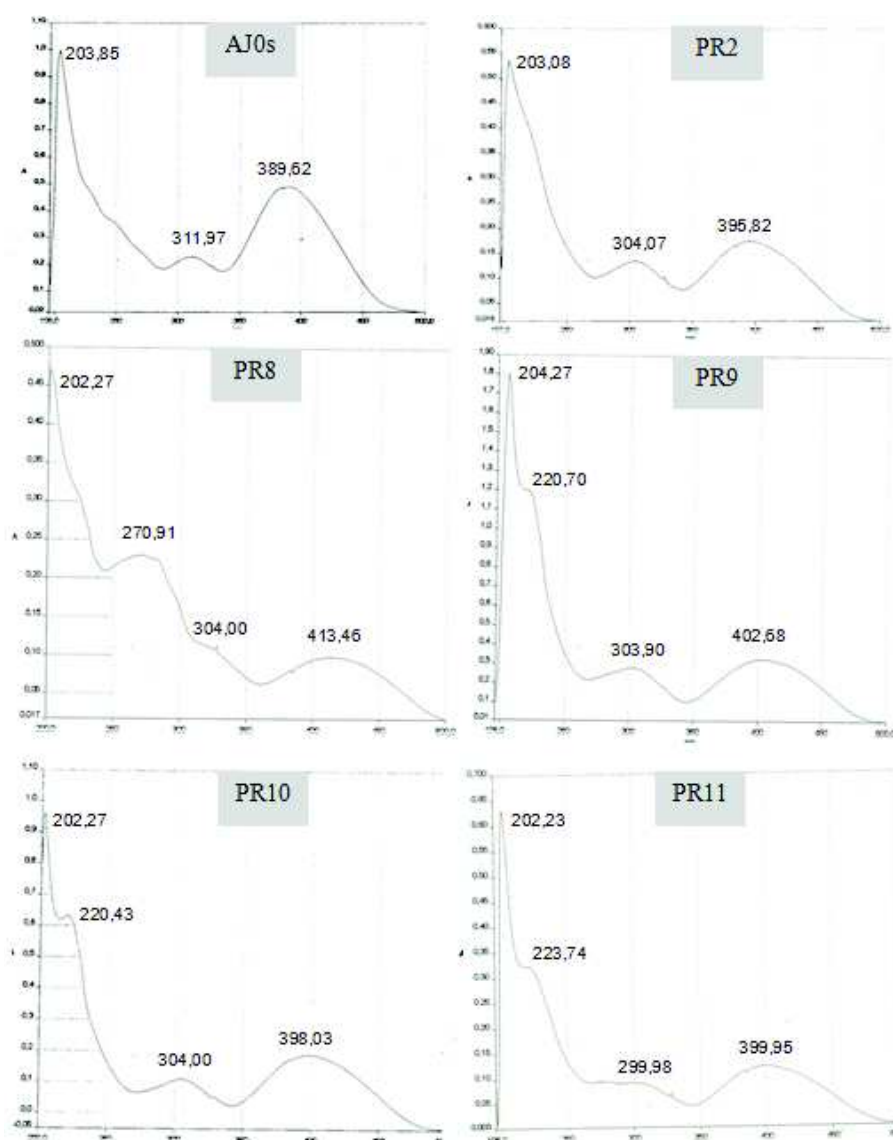


Figure 43. Spectres dans l'UV-visible des nouvelles dithiopyrrolones AJ0s, PR2, PR8, PR9 et PR10 induites par l'addition de l'acide sorbique. Les maxima d'absorption sont exprimés en nanomètres.

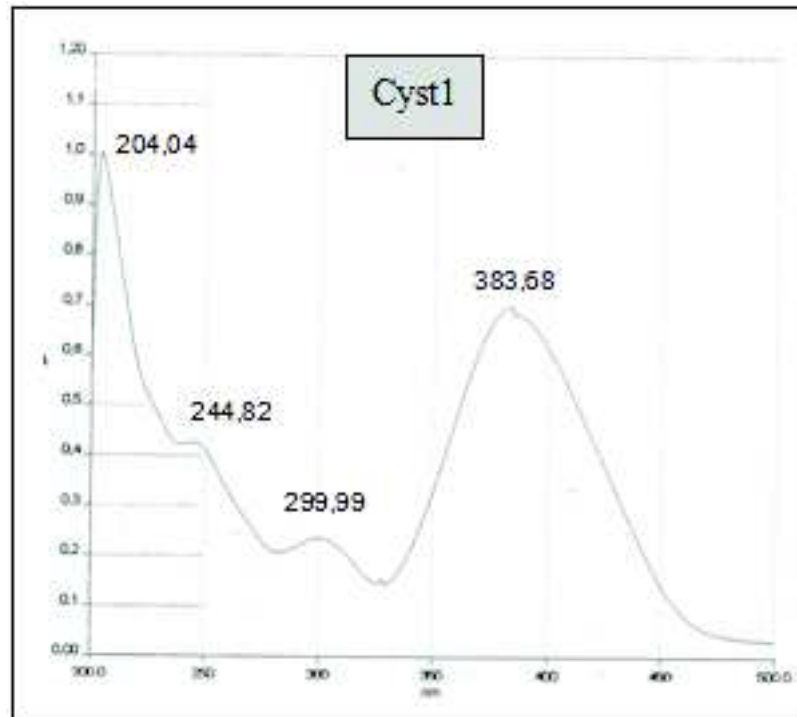


Figure 44. Spectre UV-visible de la nouvelle dithiopyrrolone Cyst1 induite par l'addition de la cystine. Les maxima d'absorption sont exprimés en nanomètres.

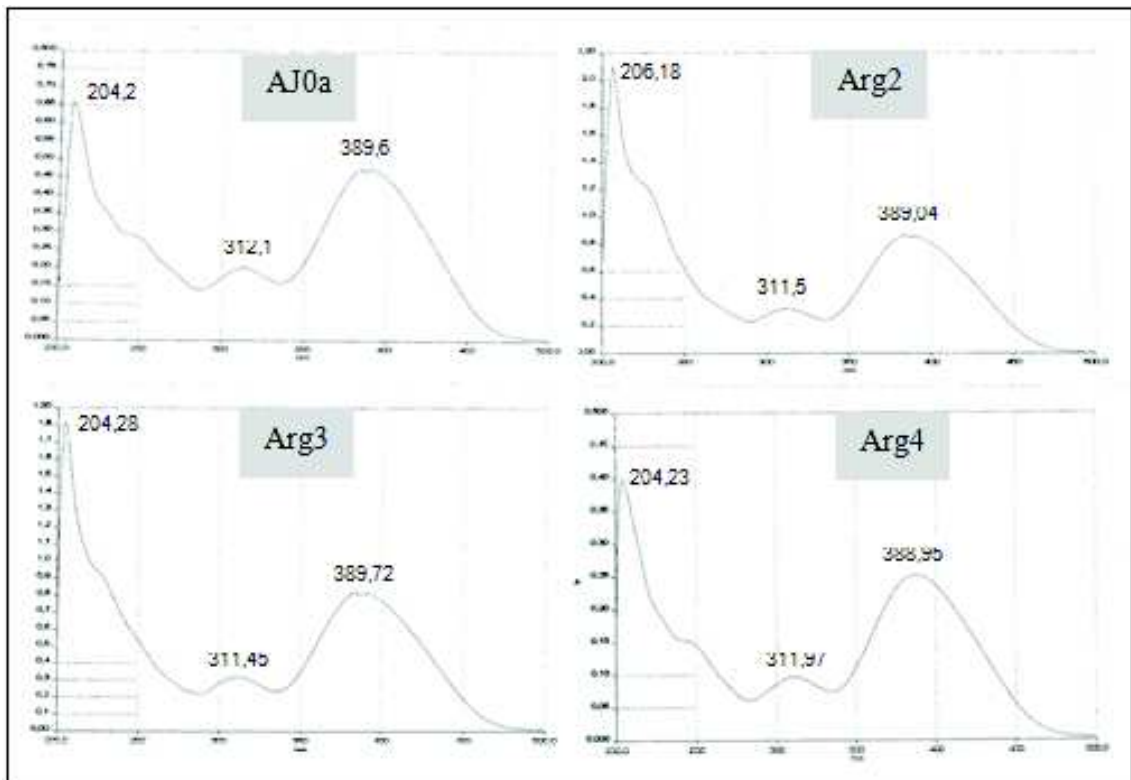


Figure 45. Spectres dans l'UV-visible des nouvelles dithiopyrrolones AJ0a, Arg2, Arg3 et Arg4 induites par l'addition de l'arginine. Les maxima d'absorption sont exprimés en nanomètres.

1.2.- Spectres de masse

La masse moléculaire (en impact électronique direct), a été déterminée pour les dithiopyrrolones produites dans le milieu SS témoin, ainsi que pour les nouvelles molécules induites par l'ajout des acides organiques et aminés. Les spectres sont représentés par les figures 46, 47, 48, 49, 50 et 51.

La masse moléculaire à haute résolution a été déterminée pour les nouvelles molécules AJ0v, PR4 et PR7. Les spectres sont représentés par la figure 52.

Les molécules AJ0t, AJ0v, AJ0s, AJ0c et AJ0a possède le même poids moléculaire (PM = 214) et les mêmes fragments de masse. Ceci montre que l'on est en présence d'un même antibiotique, d'autant plus que ces molécules possèdent également le même spectre UV-visible et le même temps de rétention en HPLC.

La molécule Cyst1 possède le même poids moléculaire que la molécule AJ0 (PM = 214), mais avec un fragment de 172 au lieu de 186 comme le cas de toutes les autres molécules de dithiopyrrolones. Ceci montre que Cyst1 est différente de AJ0. Les deux molécules semblent être des isomères de position.

Nous remarquons qu'il y'a des molécules qui sortent à des temps de rétention différents en HPLC, mais qui possèdent le même poids moléculaire; c'est le cas de PR4 et PR7 (PM = 270), PR9 et PR10 (PM = 282), Arg2, Arg3 et Arg4 (PM = 279). Ces molécules (ayant le même PM) semblent également être des isomères de position.

Les dithiopyrrolones Arg2, Arg3 et Arg4, dont le temps de rétention (HPLC) est similaire à celui de AJ (thiolutine), diffèrent de cette dernière par leur poids moléculaire (279 au lieu de 228 pour AJ).

Le tableau 10 résume les maxima d'absorbances en UV-visible et le poids moléculaire avec les fragments de toutes les molécules étudiés.

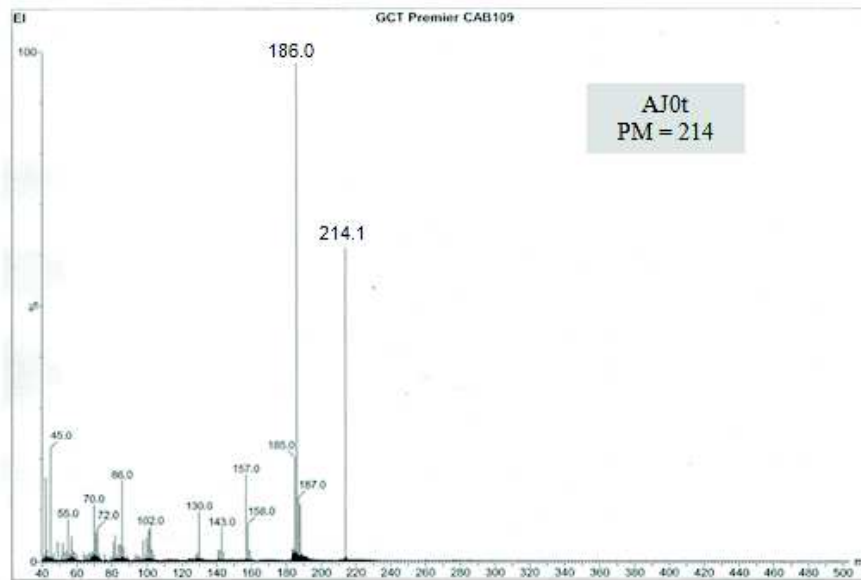
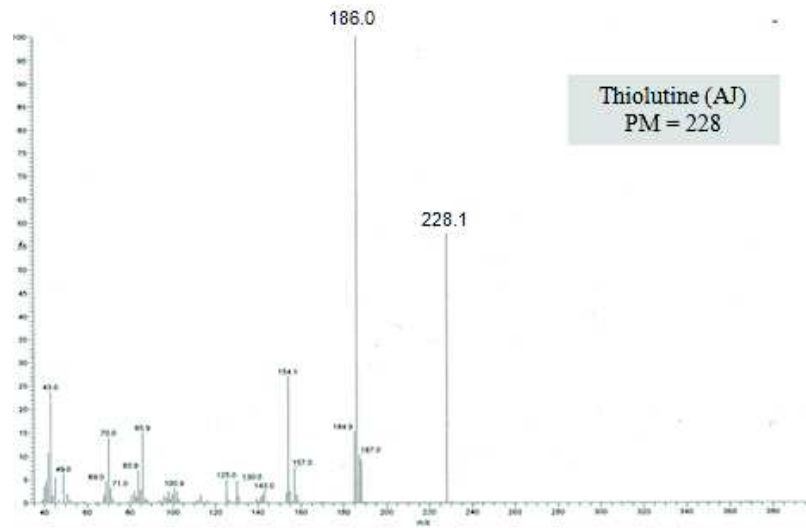
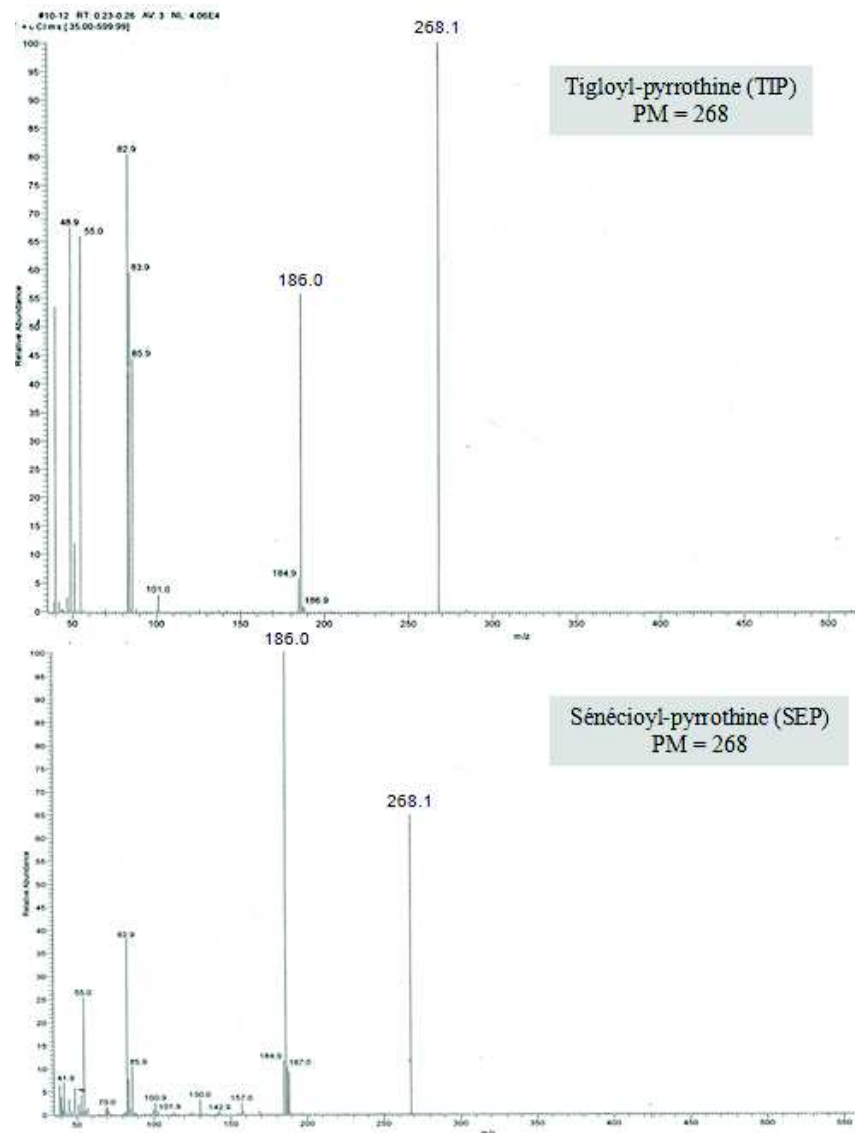
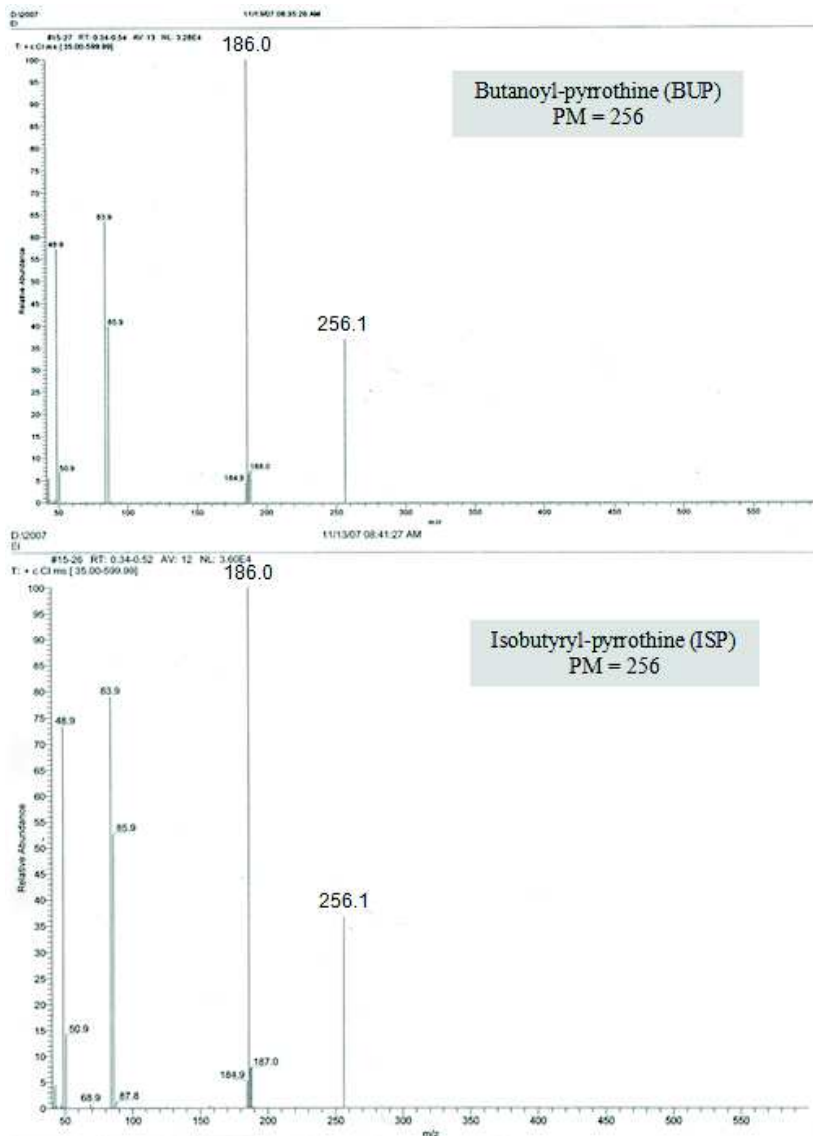


Figure 46. Spectres de masse des dithiopyrrolones AJ (thiolutine) et AJ0t produites dans le milieu SS témoin.

Production de nouveaux antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis* après addition de précurseurs dans le milieu de culture



(Suite de la figure 46). Spectres de masse des dithiopyrrolones TIP et SEP produites dans le milieu SS témoin.



(Suite de la figure 46). Spectres de masse des dithiopyrrolones BUP et ISP produites dans le milieu SS témoin.

Production de nouveaux antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis* après addition de précurseurs dans le milieu de culture

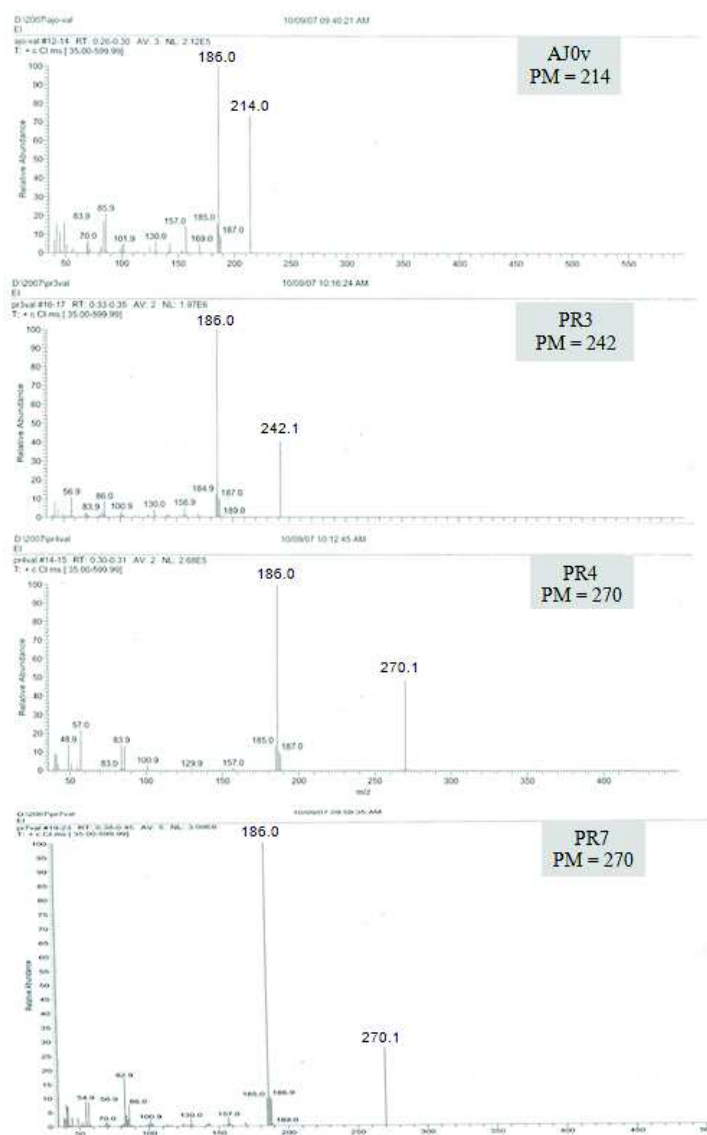


Figure 47. Spectres de masse des nouvelles dithiopyrrolones AJ0v, PR3, PR4 et PR7 induites par l'addition de l'acide valérique.

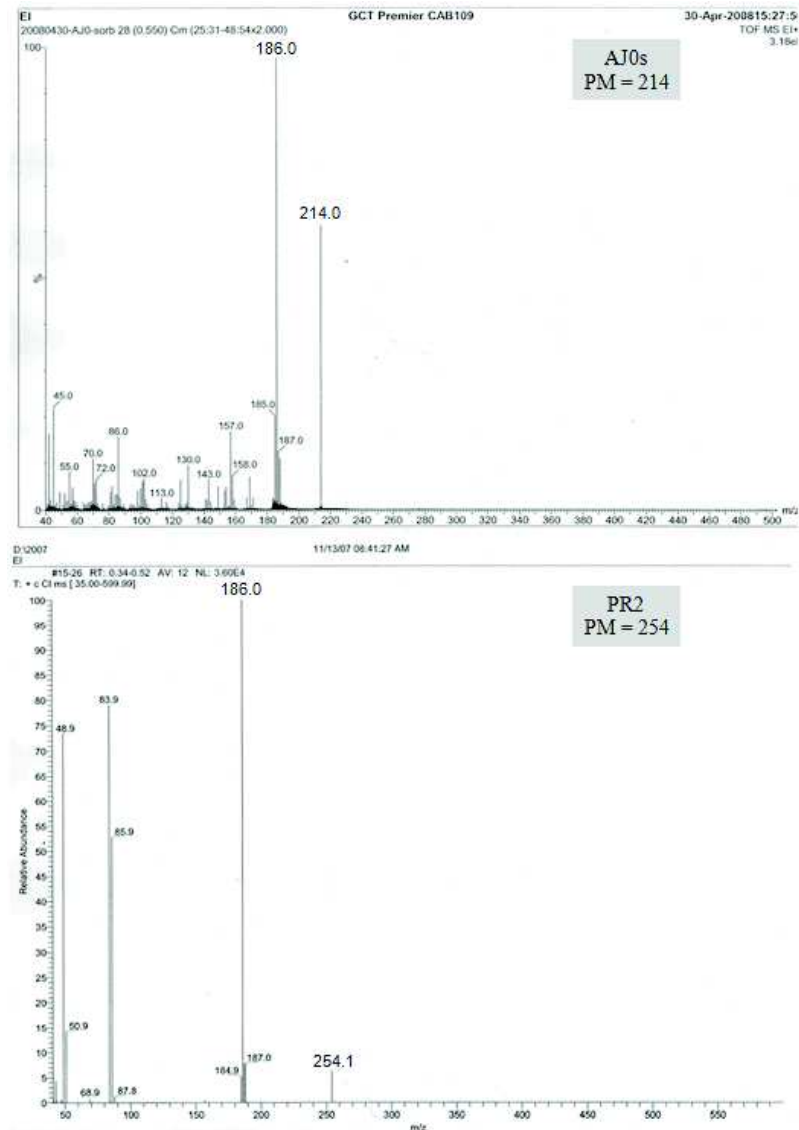
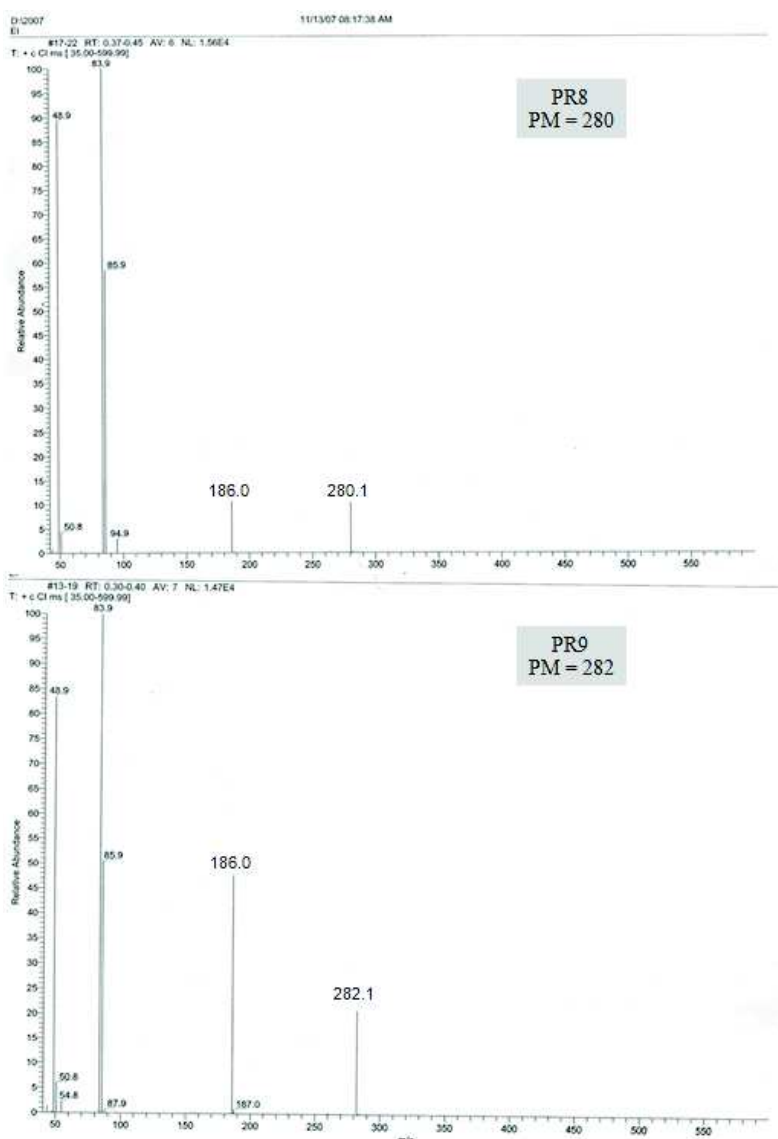
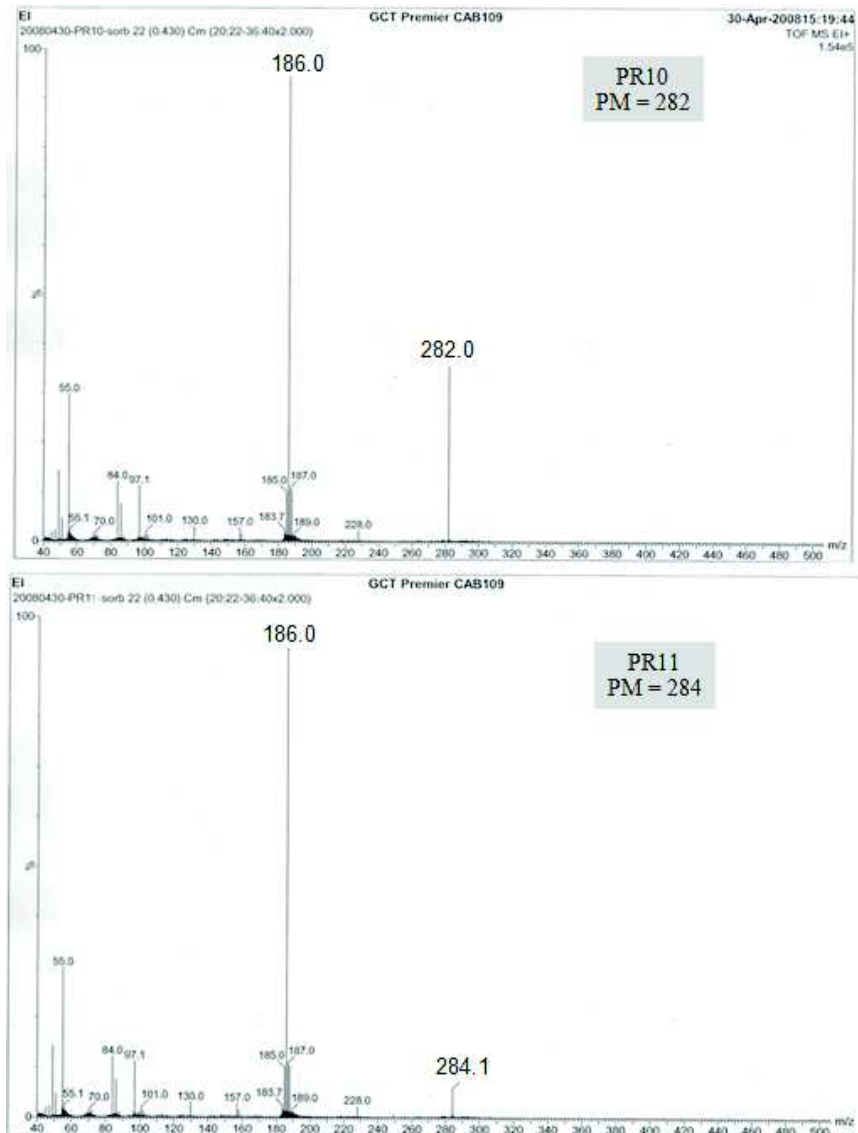


Figure 48. Spectres de masse des nouvelles dithiopyrrolones AJ0s et PR2 induites par l'addition de l'acide sorbique.

Production de nouveaux antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis* après addition de précurseurs dans le milieu de culture



(Suite de la figure 48). Spectres de masse des nouvelles dithiopyrrolones PR8 et PR9 induites par l'addition de l'acide sorbique.



(Suite de la figure 48). Spectres de masse des nouvelles dithiopyrrolones PR10 et PR11 induites par l'addition de l'acide sorbique.

Production de nouveaux antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis* après addition de précurseurs dans le milieu de culture

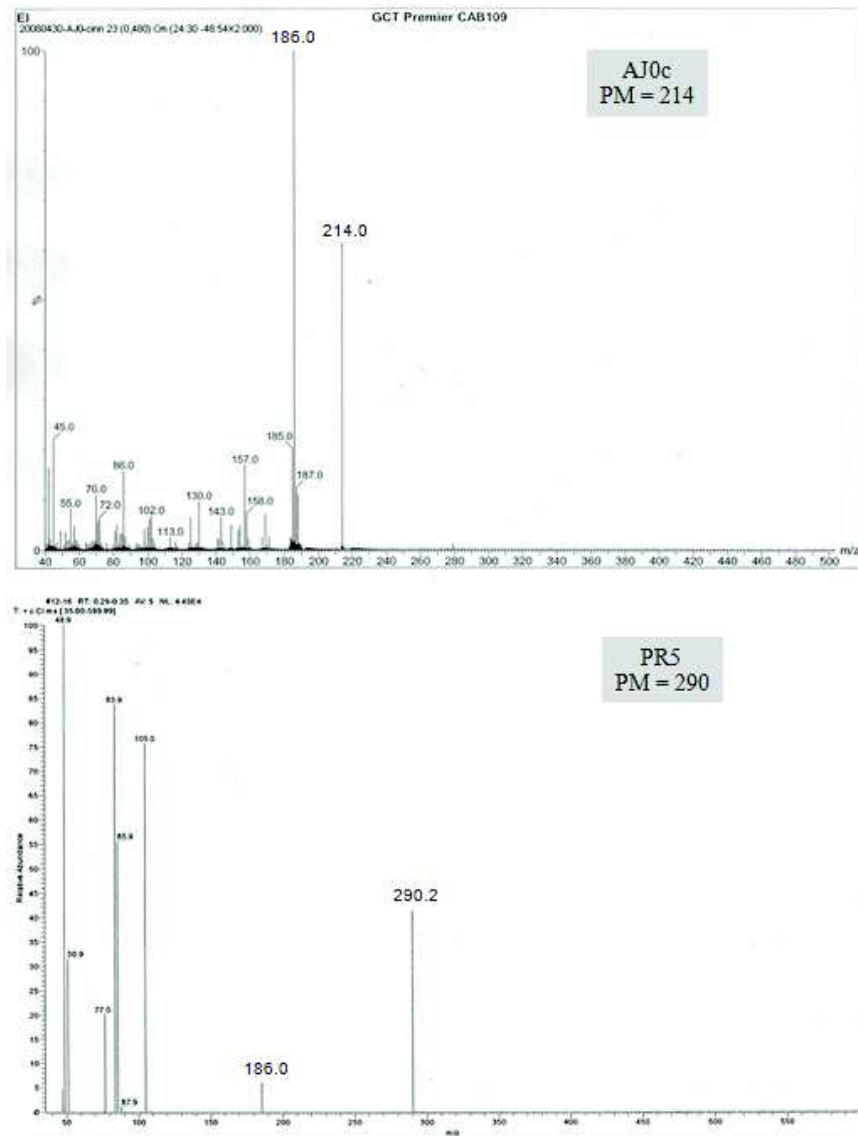


Figure 49. Spectres de masse des nouvelles dithiopyrrolones AJ0c et PR5 induites par l'addition de l'acide cinnamique.

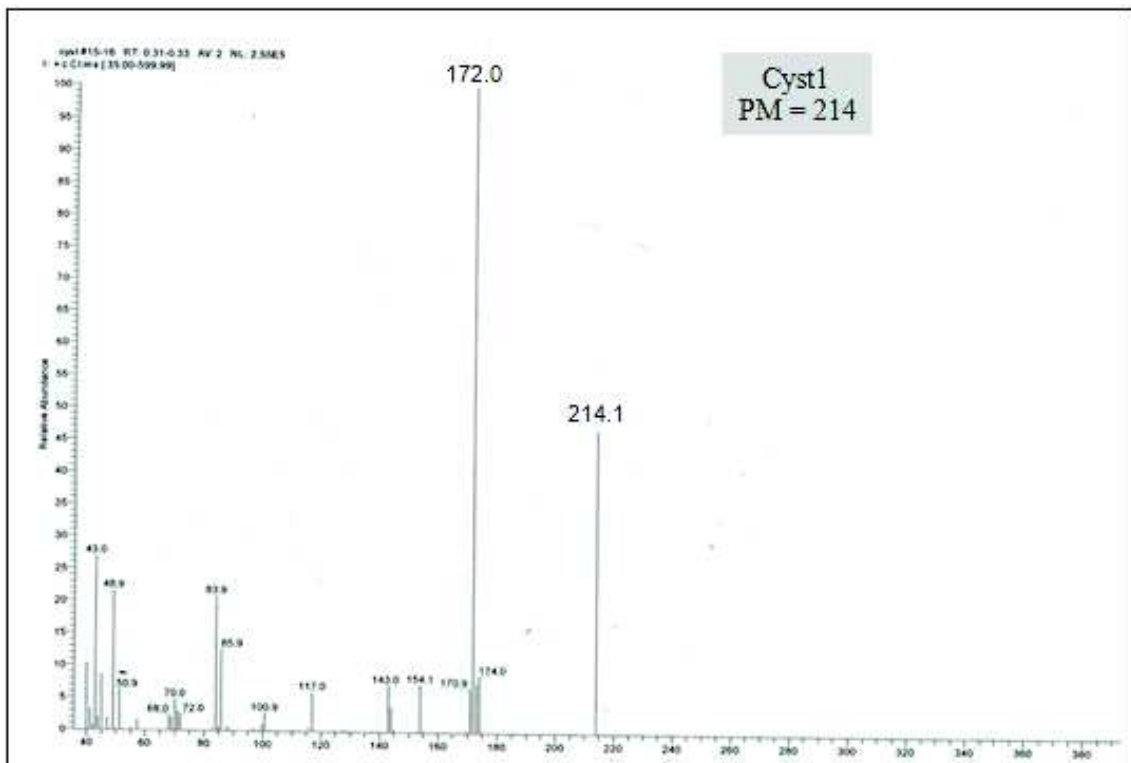


Figure 50. Spectre de masse de la nouvelle dithiopyrrolone Cyst1 induite par l'addition de la cystine.

Production de nouveaux antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis* après addition de précurseurs dans le milieu de culture

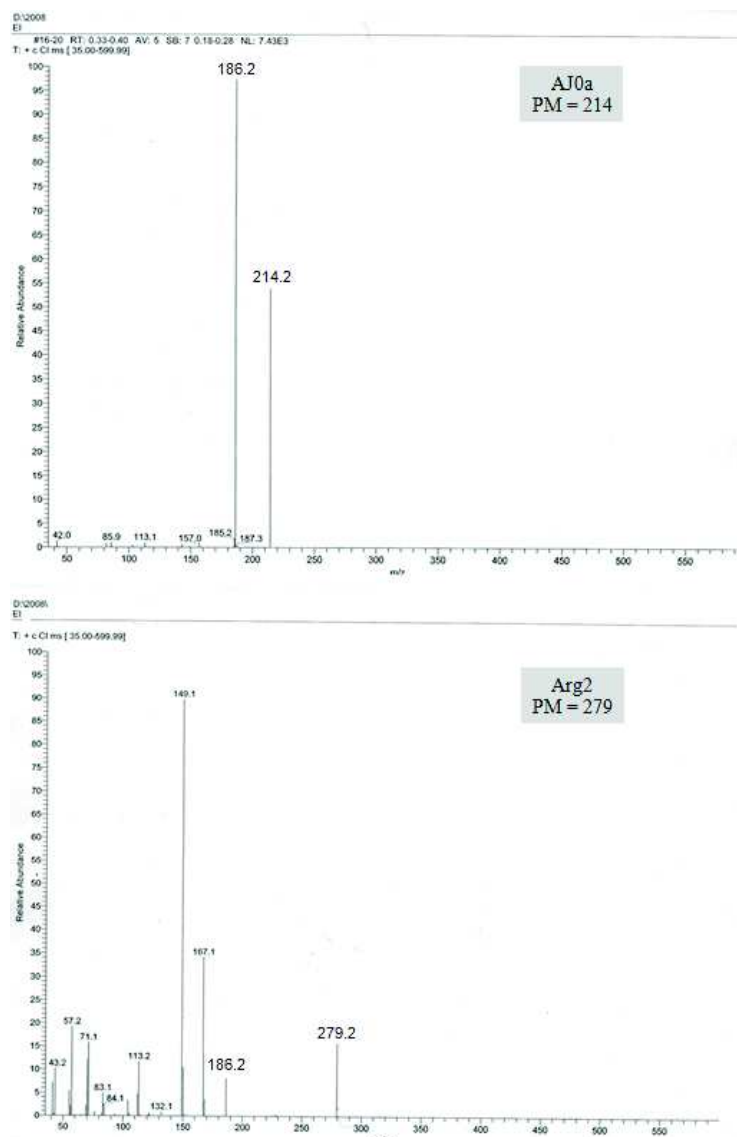
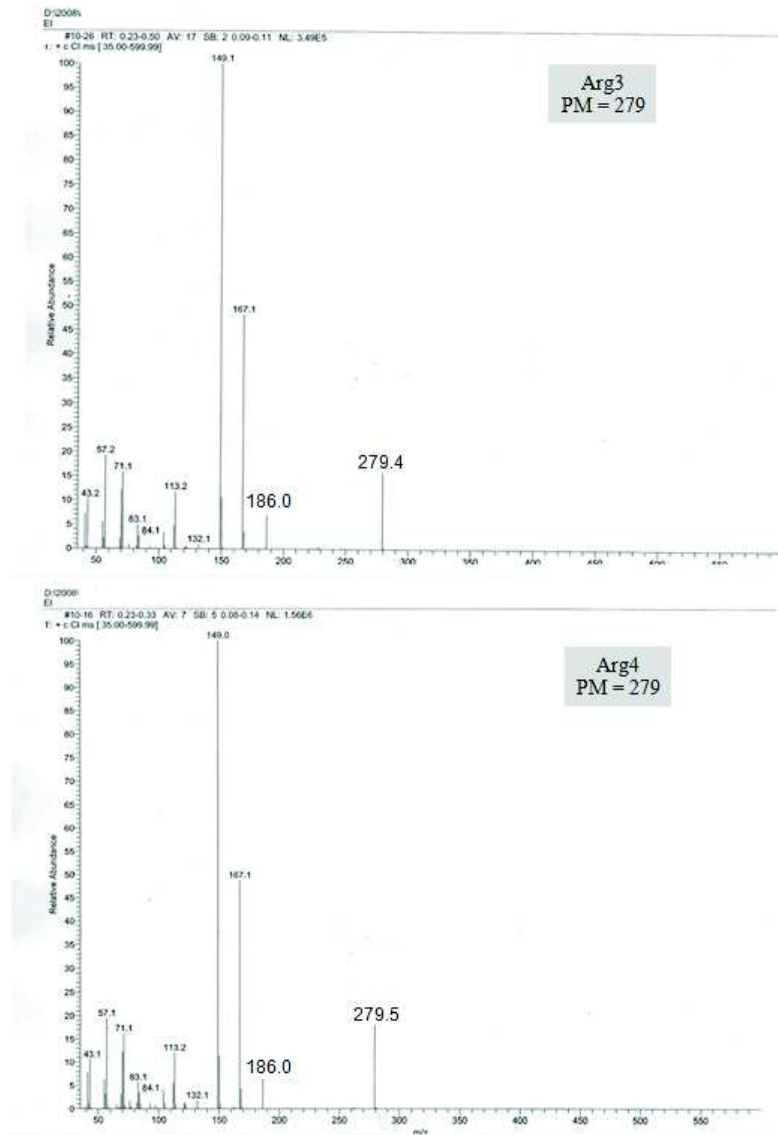


Figure 51. Spectres de masse des nouvelles dithiopyrrolones AJ0a et Arg2 induites par l'addition de l'arginine.



(Suite de la figure 51). Spectres de masse des nouvelles dithiopyrrolones Arg3 et Arg4 induites par l'addition de l'arginine.

Production de nouveaux antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis* après addition de précurseurs dans le milieu de culture

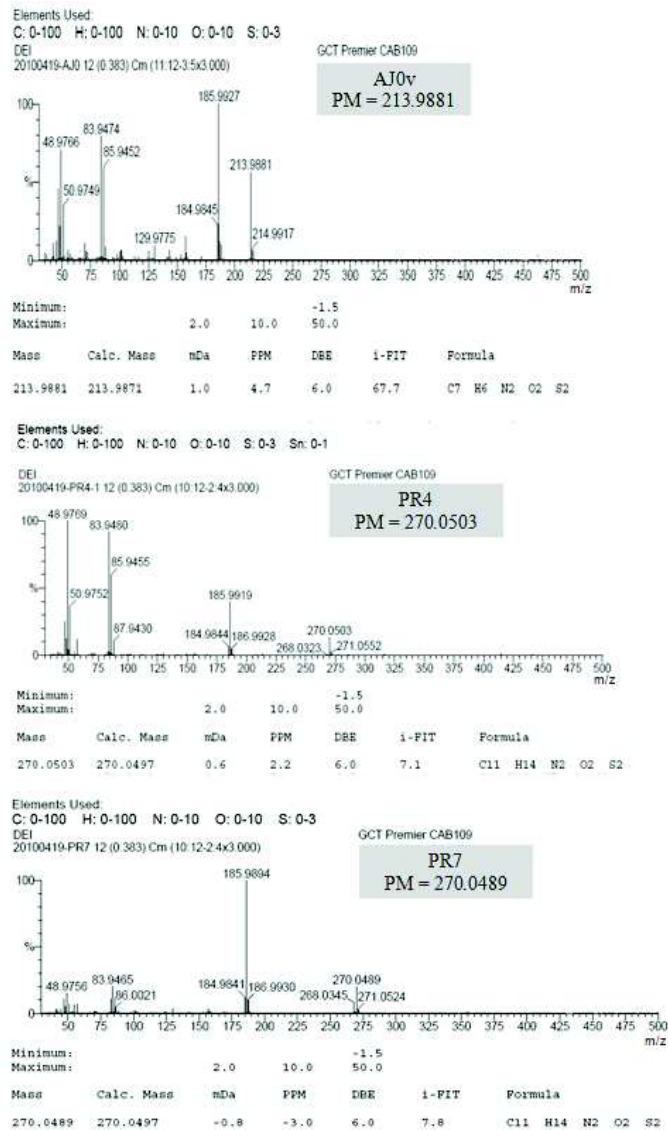


Figure 52. Spectres de masse à haute résolution des nouvelles dithiopyrrolones AJ0v, PR4 et PR7 induites par l'addition d'acide valérique.

Milieu SS	Molécule	UV-visible	PM	Fragments de Masse
Milieu SS témoin	AJ	207 - 313 - 389	228	186, 185, 154, 86, 70, 43.
	AJ0t	204 - 313 - 390	214	186, 185, 157, 86, 70, 45.
	BUP	203 - 311 - 389	256	186, 184, 85, 83, 50, 48.
	ISP	203 - 313 - 390	256	186, 185, 85, 83, 50, 48.
	TIP	210 - 300 - 396	268	186, 184, 85, 83, 82, 55, 48.
	SEP	214 - 304 - 399	268	186, 184, 157, 85, 82, 55, 41.
Milieu SS + acide valérique	AJ0v	206 - 312 - 390	214	186, 157, 86, 83, 48, 42.
	PR3	202 - 310 - 389	242	186, 184, 156, 130, 86, 56, 41.
	PR4	205 - 306 - 389	270	186, 185, 85, 83, 57, 48.
	PR7	208 - 307 - 392	270	186, 185, 86, 82, 56, 54, 40.
Milieu SS + acide sorbique	AJ0s	204 - 312 - 390	214	186, 185, 17, 130, 86, 70, 55.
	PR2	203 - 304 - 396	254	186, 184, 85, 83, 50, 48.
	PR8	202 - 304 - 413	280	186, 94, 85, 83, 50, 48.
	PR9	204 - 304 - 403	282	186, 85, 83, 54, 50, 48.
	PR10	202 - 304 - 398	282	186, 185, 157, 97, 84, 55.
	PR11	202 - 300 - 400	284	186, 185, 157, 130, 84, 55.
Milieu SS + acide cinnamique	AJ0c	206 - 313 - 390	214	186, 157, 86, 83, 48, 42.
	PR5	202 - 308 - 398	290	186, 105, 85, 83, 77, 50, 48.
Milieu SS + cystine	Cyst1	204 - 300 - 384	214	172, 117, 85, 83, 50, 48, 43.
Milieu SS + arginine	AJ0a	204 - 312 - 390	214	186, 157, 113, 85, 42.
	Arg2	206 - 311 - 389	279	186, 167, 149, 113, 71, 57, 43.
	Arg3	204 - 311 - 390	279	186, 167, 149, 113, 71, 57, 43.
	Arg4	204 - 311 - 389	279	186, 167, 149, 113, 71, 57, 43.

Tableau 10. Longueurs d'ondes maximales d'absorption en UV-visible et masses des dithiopyrrolones produites dans le milieu SS témoin et après induction par l'addition d'acides organiques et d'acides aminés chez *Sa. algeriensis*.

PM = poids moléculaire.

1.3. Spectres RMN

Les résultats des spectres RMN du proton et du carbone 13 des 11 nouvelles dithiopyrrolones sont donnés dans les tableaux 11 et 12 et les figures 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 et 61. Les tests de corrélation RMN H/RMN C13 sont donnés en annexe.

Les spectres RMN du ^1H et du ^{13}C de tous les antibiotiques purifiées montrent des caractéristiques communes:

- un groupement NH (\square H 8,19~07,49).
- Un méthyle lié au carbone n° 4 (\square H 3,56~3,32 et \square C 29,73~27,10), à l'exception de l'antibiotique cyst1 qui possède un proton à la place du CH₃ (\square H 8.19).
- un groupement oléfinique (\square H 6,75~6,66).

	Solvant de solubilisation	H-3	N (4)-CH ₃	N(4)-H	C (6)-NH
AJ0 (t, v, s et c)	(CD ₂ Cl ₂)	δ_H 6.74	δ_H 3.36	-	δ_H 8.19
PR2	(CD ₂ Cl ₂)	δ_H 6.71~6.69	δ_H 3.35	-	δ_H 7.6
PR3	(CD ₂ Cl ₂)	δ_H 6.66	δ_H 3.35	-	δ_H 8.02
PR4	(CD ₂ Cl ₂)	δ_H 6.68	δ_H 3.34	-	δ_H 7.55
PR5	(CD ₂ Cl ₂)	δ_H 6.75	δ_H 3.40~3.35	-	δ_H 7.92~7.53
PR7	(CD ₂ Cl ₂)	δ_H 6.71~6.70	δ_H 3.35	-	δ_H 8.09
PR8	(CD ₂ Cl ₂)	δ_H 6.72	δ_H 3.35~3.34	-	δ_H 7.62
PR9	(CD ₂ Cl ₂)	δ_H 7.0~6.97	δ_H 3.35	-	δ_H 7.74~7.49
PR10	(CD ₂ Cl ₂)	δ_H 6.70	δ_H 3.35	-	δ_H 7.50
PR11	(CD ₂ Cl ₂)	δ_H 6.70	δ_H 3.35	-	δ_H 7.50
CystI	(CD ₂ Cl ₂)	δ_H 6.83	-	δ_H 8.19	δ_H 8.03

Note: CD₂Cl₂ = dichlorométhane.

Position	PR3	PR4	PR5	PR7
3	δ_C 108.44	δ_C 108.49	δ_C 108.76	δ_C 108.76~108.56
3a			δ_C 132.38	δ_C 132.15
N (4)-CH ₃	δ_C 29.73~27.56	δ_C 27.56~27.22		δ_C 27.56~27.22
5				δ_C 167.04
6			δ_C 113.69	δ_C 116.86~114.72
6a		δ_H 136.88		δ_C 137.02~136.84
Noyau amide	δ_C 171.90 δ_C 18.78 δ_C 13.46	δ_C 174.77 δ_C 17.05 δ_C 11.61		δ_C 171.62~164.44 δ_C 22.29 δ_C 19.86 δ_C 13.52

Tableau 12. Données de la RMN du ¹³C des composés PR3, PR4, PR5 et PR7.

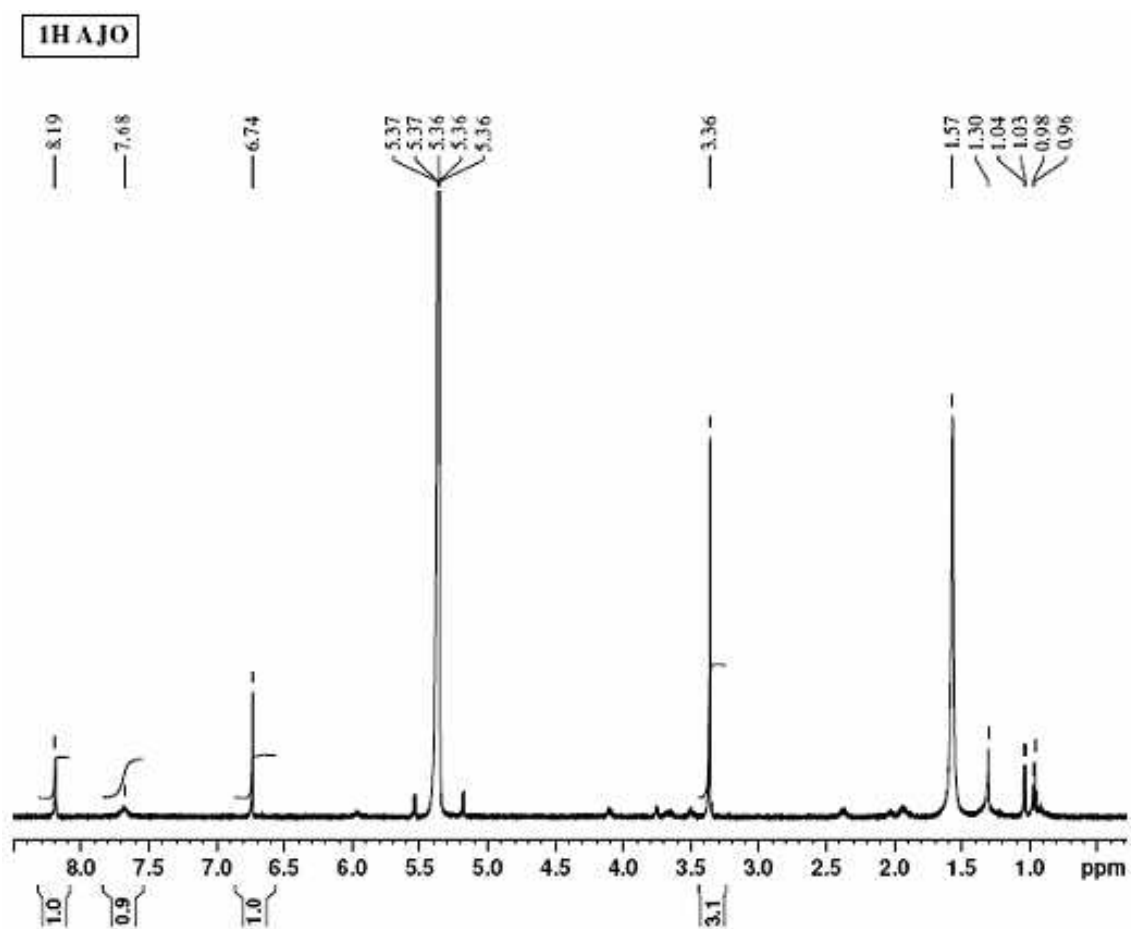


Figure 53. Spectre de RMN du proton de la dithiopyrrolone AJ0v.

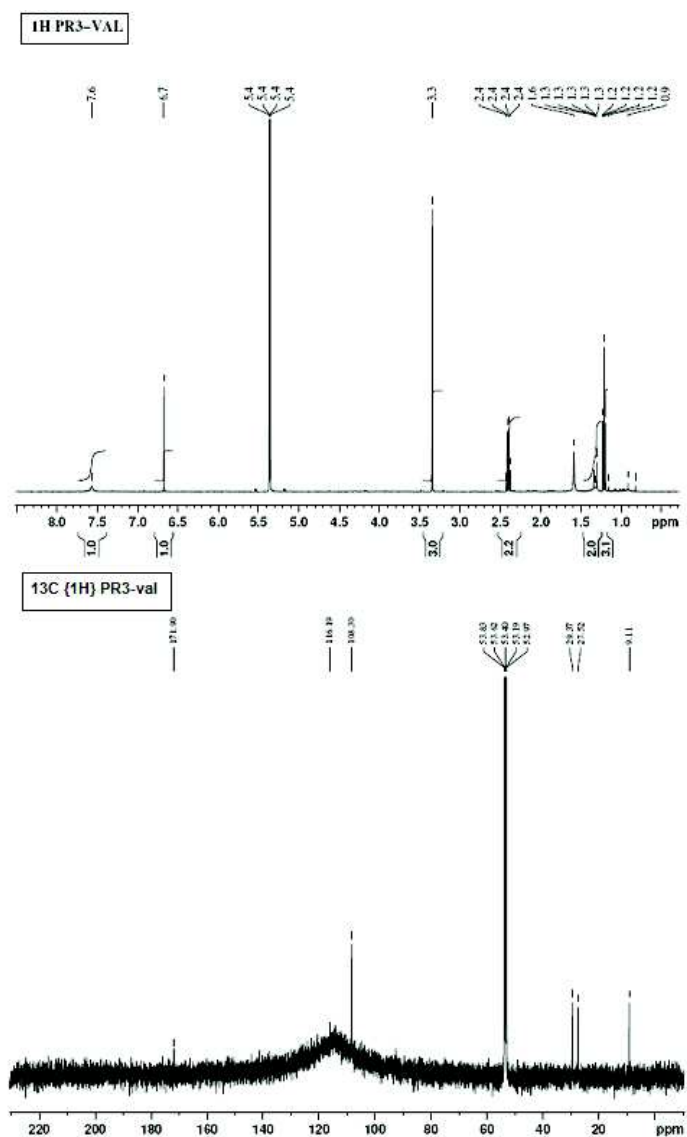


Figure 54. Spectres de RMN du proton et du carbone 13 de la dithiopyrrolone PR3.

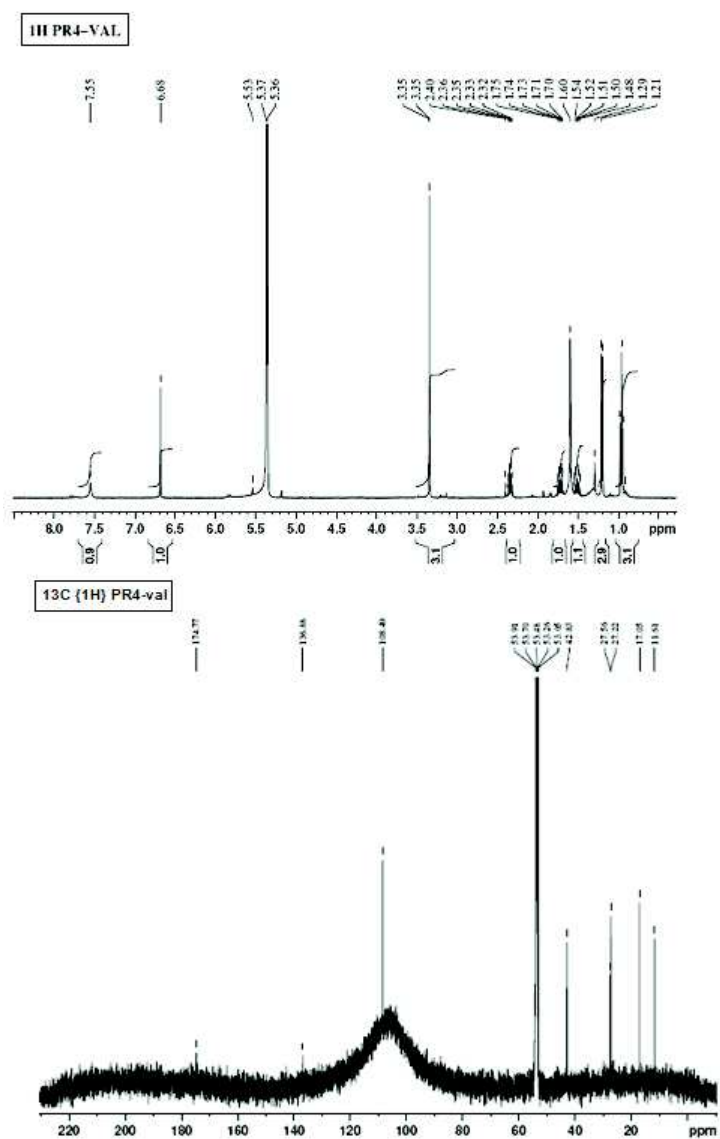


Figure 55. Spectres de RMN du proton et du carbone 13 de la dithiopyrrolone PR4.

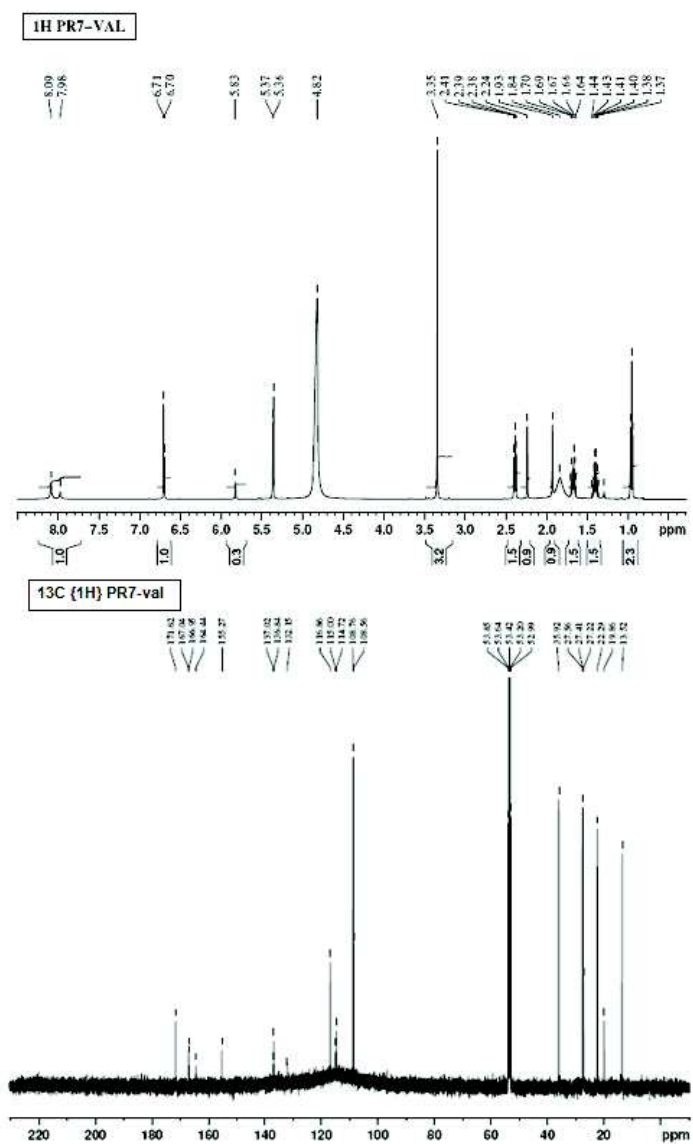


Figure 56. Spectres de RMN du proton et du carbone 13 de la dithiopyrrolone PR7.

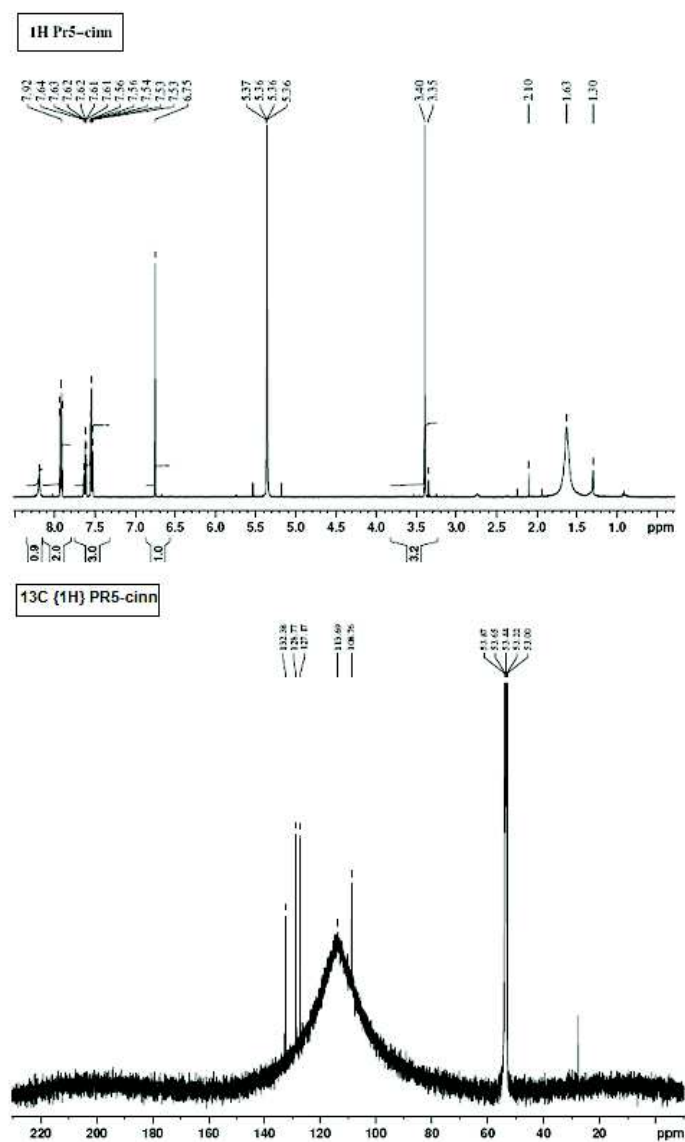


Figure 57. Spectres de RMN du proton et du carbone 13 de la dithiopyrrolone PR5.

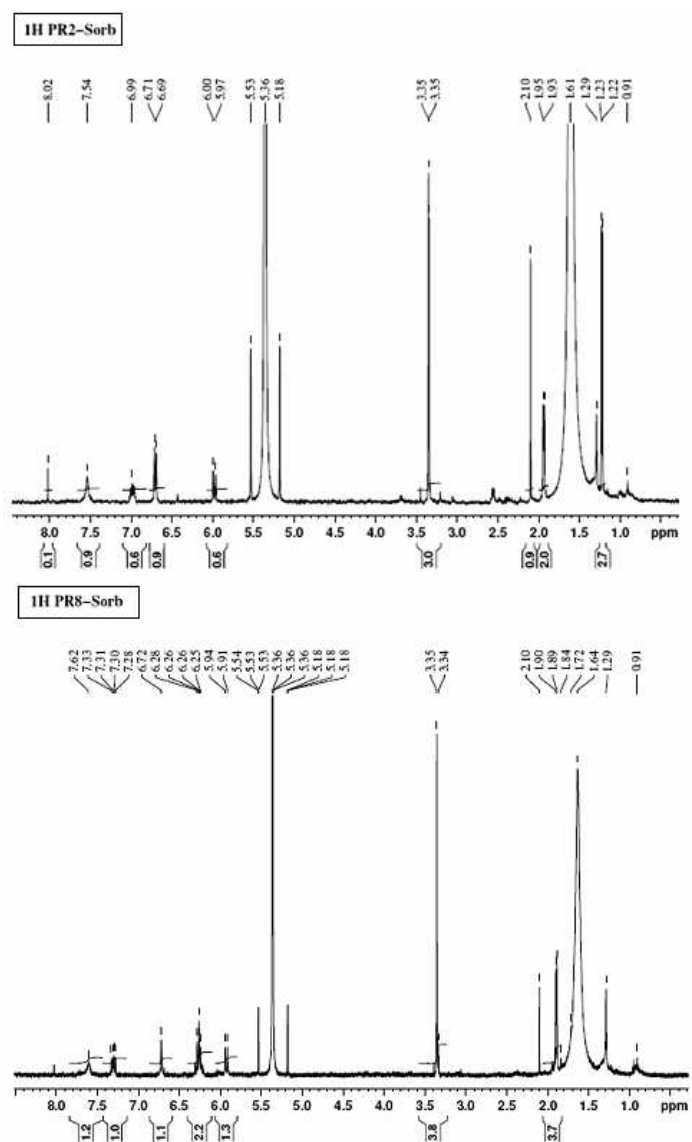


Figure 58. Spectres de RMN du proton des dithiopyrrolones PR2 et PR8.

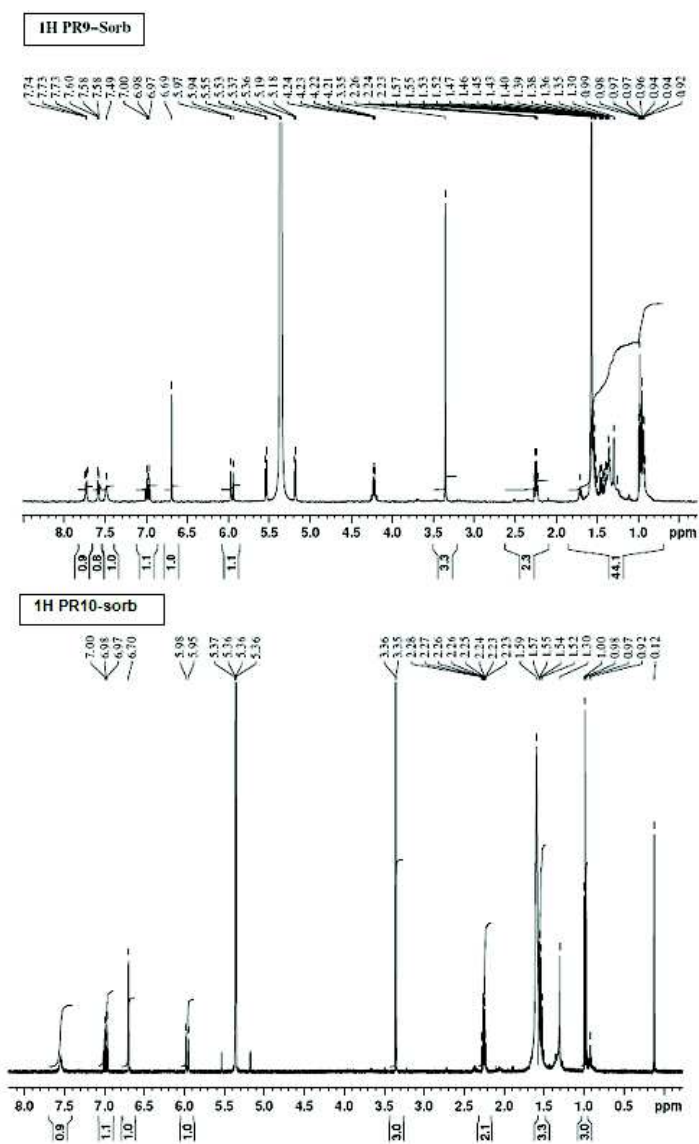


Figure 59. Spectres de RMN du proton des dithiopyrrolones PR9 et PR10.

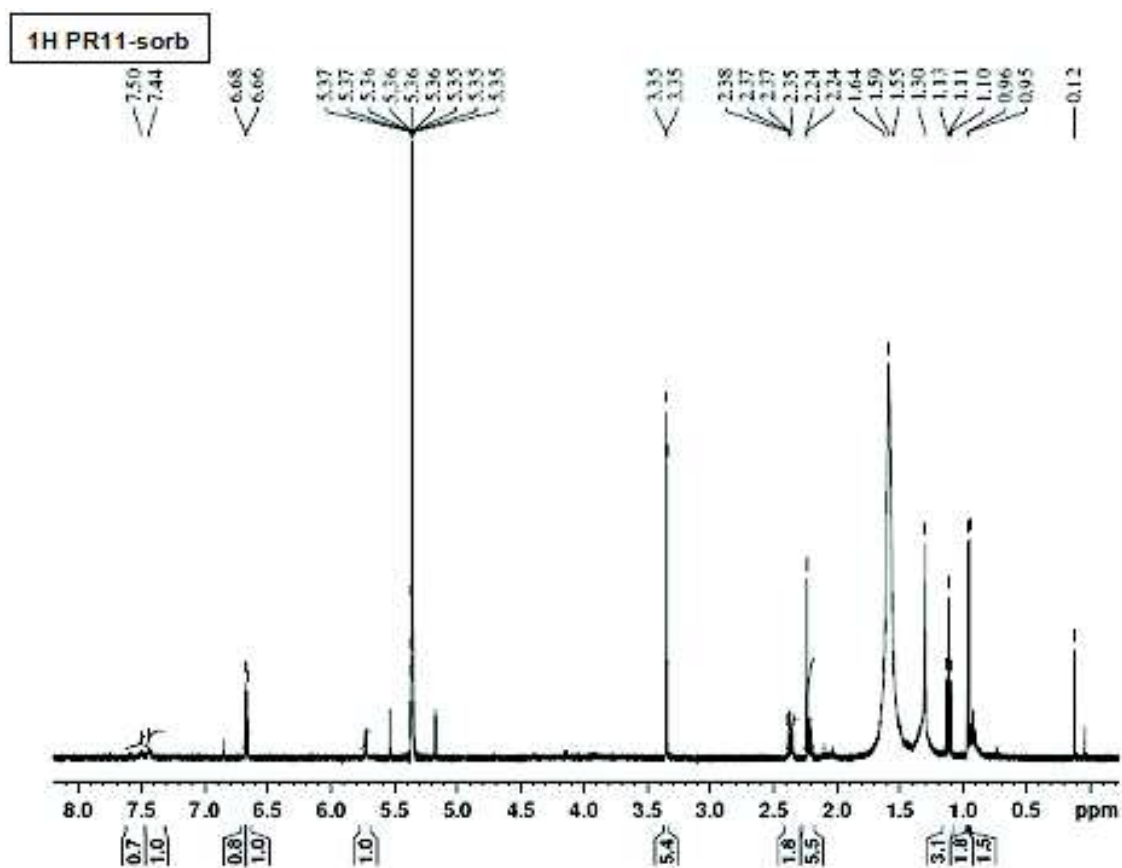


Figure 60. Spectre de RMN du proton de la dithiopyrrolone PR11.

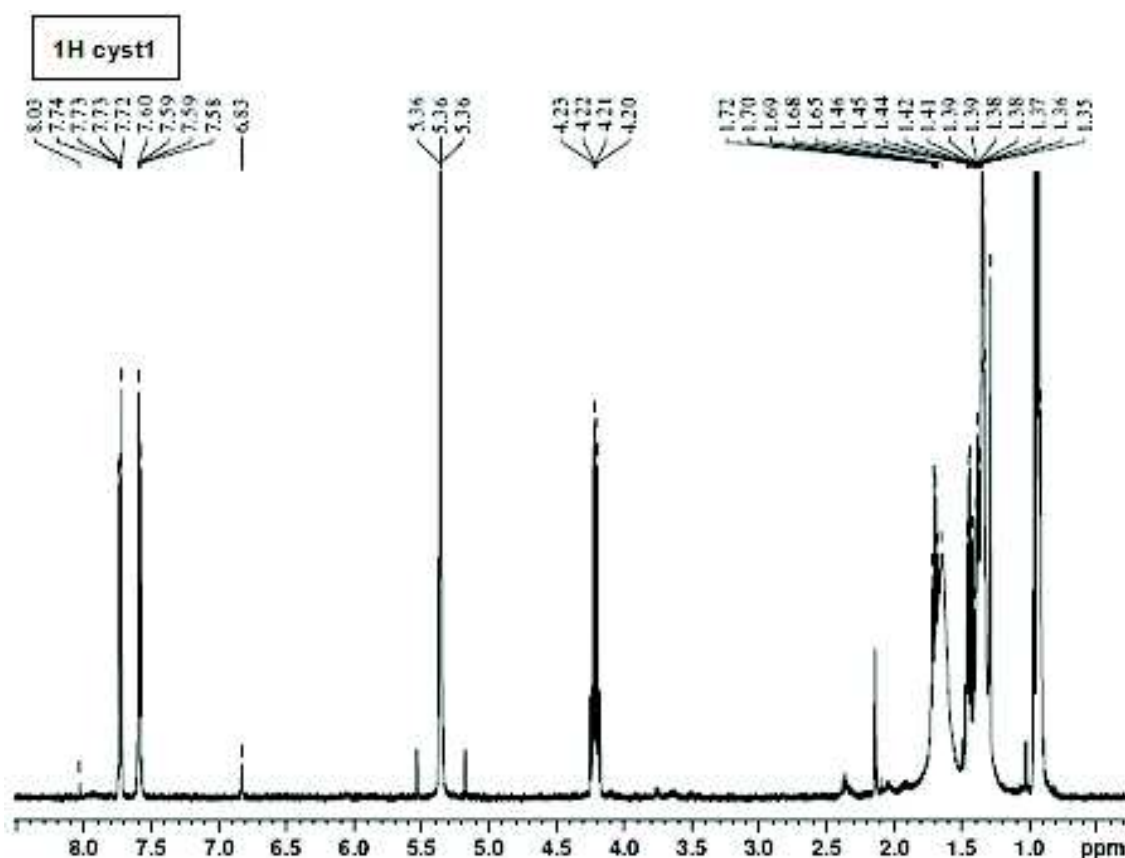


Figure 61. Spectre de RMN du proton de la dithiopyrrolone cyst1.

2.- Discussion et identification des structures chimiques des antibiotiques

2.1.- Détermination du squelette de base des antibiotiques

La comparaison des différents résultats spectroscopiques (UV-visible, masse, RMN du ^1H et du ^{13}C) avec ceux présentés dans la littérature montre que les antibiotiques isolés de la souche d'actinomycète *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 sont des amides de la 6-amino-4,5-dihydro-4-méthyl-5-oxo-1,2-dithiolo[4,3-*b*]pyrrole. Ces antibiotiques diffèrent les uns des autres par la nature de l'acide réalisant l'amidification du squelette de base.

Les spectres UV-visible des produits présentent tous trois maxima d'absorption à 202 ~ 214 nm, 300 ~ 313 nm et 389 ~ 413 nm.

Les spectres de RMN du proton et du carbone 13 des différents composés présentent des caractéristiques communes: des signaux d'un méthyle porté par un N, un proton oléfinique, un NH amide ainsi que des signaux d'un CH_3 porté par un azote (à l'exception de l'antibiotique cyst1), d'un CH oléfinique et d'un $\text{C}=\text{O}$.

Enfin, les spectres de masse en impact électronique direct de tous les antibiotiques montrent un ion de fragmentation très intense à $m/z = 186$, à l'exception de l'antibiotique cyst1 qui montre un ion de fragmentation à $m/z = 172$. Le fragment $m/z = 186$ obtenu

après la perte du $\text{CH}_3\text{-C=O}$ est retrouvé dans toutes les dithiopyrrolones produites par *Saccharothrix algeriensis* dans le milieu témoin (sans précurseurs); ces antibiotiques appartient à la sous-famille des pyrrothines. Par ailleurs, selon Mc Inerney *et al.* (1991), les dithiopyrrolones présentant un fragment à $m/z = 172$ à la place de 186, sont des molécules ayant dans leur structure un H à la place du CH_3 lié à l'azote n° 4 du cycle; ces molécules appartiennent à la sous-famille des holothines.

Le squelette de base, de formule brute $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$, est illustré par la figure 62.

Tous les antibiotiques étudiés possèdent un CH_3 au niveau du radical R2 et ne diffèrent entre eux que par la chaîne latérale R1 à l'exception de l'antibiotique cyst1 qui possède un H au niveau du R2 et un CH_3 au niveau du R1.

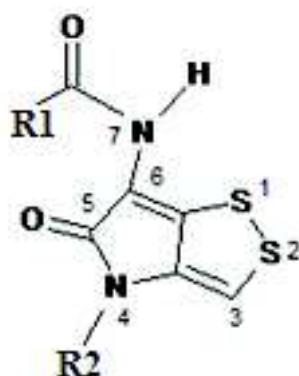


Figure 62. Squelette de base des dithiopyrrolones.

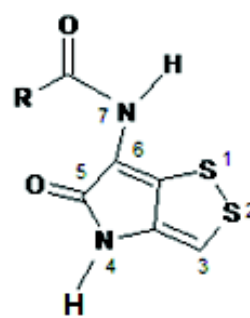
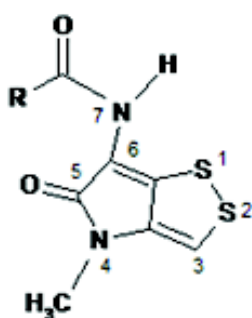
2.2.- Détermination de la structure des nouvelles dithiopyrrolones produites après l'ajout de précurseurs

Les structures chimiques des 11 antibiotiques isolés ont été déterminées: AJ0 (t, v, s, c et a) PR2, PR3, PR4, PR5, PR7, PR8, PR9, PR10, PR11 et Cyst1 (Figure 63).

La détermination de leur structure a été faite sur la base des données de RMN et de la spectrométrie de masse.

Les trois molécules Arg2, Arg3 et Arg4 induites par l'addition de l'arginine n'ont pas fait l'objet d'analyse en RMN et leur structure chimique n'a pas été déterminée.

La structure chimique de la molécule Cyst2 induite par l'addition de cystine n'a pas été déterminée en raison, de son instabilité (constatée lors de la purification par HPLC).



R = H	Formyl-pyrrothine (AJ0)	R = CH ₃	Holomycine (cyst1)
R = CH=CH(CH ₃)	Crotonyl-pyrrothine (PR2)		
R = CH ₂ CH ₃	Auréothricine (PR3)		
R = CH(CH ₃)(CH ₂ CH ₃)	Isovaléryl-pyrrothine (PR4)		
R = C ₆ H ₅	Benzoyl-pyrrothine (PR5)		
R = CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	Valéryl-pyrrothine (PR7)		
R = CH=CH-CH=CH(CH ₃)	Sorbyl-pyrrothine (PR8)		
R = CH=CH-CH ₂ CH ₂ CH ₃	2-hexonyl-pyrrothine (PR9)		
R = CH=C(CH ₃)(CH ₂ CH ₃)	2-méthyl-3- pentényl-pyrrothine (PR10)		
R = CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	Isopentyl formyl pyrrothine (PR11)		

Figure 63. Antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones synthésisés par *Saccharothrix algeriensis* après l'ajout de précurseurs.

2.2.1.- Antibiotiques sécrétés après l'ajout d'acide valérique

2.2.1.1.- Antibiotique AJ0

Le spectre de masse de l'antibiotique AJ0 présente un ion moléculaire $m/z = 214$. En se basant sur les résultats de la masse et de la RMN, la formule brute du produit est $C_7H_6N_2O_2S_2$.

Le bombardement d'électron permet l'obtention d'un fragment principal $m/z = 186$ caractéristique aux pyrrothines qui possèdent un CH₃ lié à l'azote n° 4.

Le spectre de RMN du ¹³C présente, en plus des signaux du système 4-méthyl-1,2-dithiolo [4,3-b] pyrrol-5[4H] one, un groupe carbonyle supplémentaire (δ_c 166.8) et un signal ¹H à δ_H 8.19 caractérisant une chaîne latérale formamide.

L'acide amidifiant le groupement amine en position 6 est donc l'acide formique. Ceci conduit à identifier l'antibiotique AJ0 à la formyl-pyrrothine (Figure 63). Cet antibiotique est un nouveau produit naturel décrit ici pour la première fois.

2.2.1.2.- Antibiotique PR3

La formule brute de l'antibiotique PR3, $C_{11}H_{12}N_2O_2S_2$, a été déduite de l'analyse des spectres RMN et l'analyse en impact électronique direct de l'ion moléculaire $m/z = 242$ en spectrométrie de masse. Ce spectre présente par ailleurs comme ion de base, l'ion de fragmentation à $m/z = 186$, caractéristique des pyrrothines.

Le spectre de RMN du ^{13}C présente un groupe carbonyle supplémentaire (δ_c 116.19) et un signal 1H à δ_H 7.6. Les expériences 2D 1H - 1H and 1H - ^{13}C permettent de déduire que l'acide amidifiant le squelette de base est l'acide propionique. PR3 est donc la propionyl-pyrrothine appelé aussi auréothricine (Figure 63). Cet antibiotique est signalé pour la 1ère fois chez *Sa. algeriensis*, mais il a été précédemment isolé du filtrat de culture de plusieurs espèces appartenant au genre *Streptomyces*, tel, par exemple, *S. kasugaensis* (Celmer et al. 1955 et Sturdikova et al. 1990).

2.2.1.3.- Antibiotique PR7

Le spectre de masse de l'antibiotique PR7 présente un ion moléculaire $m/z = 270$ et un ion de fragmentation $m/z = 186$. En se basant sur les résultats de la masse et de la RMN, la formule brute du produit est $C_{11}H_{14}N_2O_2S_2$.

La molécule PR7 présente un groupe carbonyle supplémentaire (δ_c 167.0) et quatre autres sp^3 -carbones hybridés (δ_c 35.9, 27.4, 22.3 et 13.5). Les expériences 2D 1H - 1H and 1H - ^{13}C confirme la présence d'une chaîne latérale pentanamide.

L'ensemble de ces données confirme une amidification du noyau de base par l'acide valérique (incorporation directe de l'acide valérique qui a été ajouté au milieu de culture). L'antibiotique PR7 serait donc la valéryl-pyrrothine (Figure 63), laquelle n'a jamais été signalée dans la littérature auparavant.

2.2.1.4.- Antibiotique PR4

L'antibiotique PR4 présente un spectre UV-visible et un spectre de masse pratiquement identiques à ceux de l'antibiotique PR7, avec la même formule brute $C_{11}H_{14}N_2O_2S_2$, ce qui indique que ce sont des isomères de position.

Cet PR4 présente aussi un groupe carbonyle supplémentaire (δ_c 167.0) et quatre autres sp^3 -carbones hybridés (δ_c 42.8, 27.2, 17.0 et 11.6) compatibles à une chaîne latérale de 2-méthyl-butanamide. Donc l'acide amidifiant le squelette de base est ici l'acide iso-valérique.

Le composé PR4 présente donc une structure d'isovaléryl-pyrrothine (Figure 63). Ce composé est décrit ici pour la première fois.

2.2.2.- Antibiotiques sécrétés après l'ajout d'acide sorbique

2.2.2.1.- Antibiotique PR2

La formule brute de l'antibiotique PR2, $C_{10}H_{10}N_2O_2S_2$, a été déduite de l'analyse des spectres RMN et l'analyse en impact électronique direct de l'ion moléculaire $m/z = 254$ en spectrométrie de masse. Ce spectre présente par ailleurs comme ion de base, l'ion de fragmentation à $m/z = 186$, caractéristique des pyrrothines.

Les spectres de RMN du ^1H et du ^{13}C de l'antibiotique PR2 montrent, en plus des signaux du système 4-méthyl-1,2-dithiolo [4,3-b] pyrrol-5[4H] one, deux sp² méthines supplémentaires (δ_{H} 6.99 et 5.98 et δ_{C} 142.8 et 123.2) et un groupement méthyle supplémentaire (δ_{H} 1.93 et δ_{C} 17.4). Les expériences 2D ^1H - ^1H et ^1H - ^{13}C permettent de confirmer la présence d'une chaîne latérale de 2-buténamide.

Ces données permettent de déduire que l'acide amidifiant le squelette de base est l'acide crotonique. Ceci conduit à identifier l'antibiotique PR2 à la crotonyl-pyrrothine (Figure 63). Cet antibiotique est un nouveau produit naturel décrit ici pour la première fois.

2.2.2.2.- Antibiotique PR8

Le spectre de masse de l'antibiotique PR8 présente un ion moléculaire $m/z = 280$ et un ion de fragmentation à $m/z = 186$. En se basant sur les résultats de la masse et de la RMN, la formule brute du produit est $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$.

D'après les résultats RMN, l'antibiotique PR8 montre quatre sp² méthines supplémentaires (δ_{H} 7.30, 6.27, 6.26 et 5.92 et δ_{C} 143.2, 140.0, 129.3 et 119.3) et un groupement méthyle supplémentaire (δ_{H} 1.90 et δ_{C} 18.4). Les expériences 2D ^1H - ^1H et ^1H - ^{13}C révèle clairement que PR8 contient une chaîne latérale de 2,4-hexadiénamide.

L'acide amidifiant le squelette de base est dans ce cas l'acide sorbique qui a été incorporé directement au niveau de la chaîne latérale après son addition au milieu de culture. Le composé PR8 présente donc une structure de sorbyl-pyrrothine (Figure 63). Ce composé est décrit ici pour la première fois.

2.2.2.3.- Antibiotique PR9

Le spectre de masse de l'antibiotique PR9 présente un ion moléculaire $m/z = 282$ et un ion de fragmentation intense à $m/z = 186$. En se basant sur les résultats de la masse et de la RMN, la formule brute du produit est $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2\text{N}_2\text{S}_2$.

L'antibiotique PR9 montre deux sp² méthines (δ_{H} 6.98 et 5.95 et δ_{C} 147.5 et 121.9), deux sp³ méthylènes supplémentaires (δ_{H} 2.25, 1.54, δ_{C} 34.1 et 13.4) et un groupement méthyle supplémentaire (δ_{H} 0.98 and δ_{C} 13.4). Les expériences 2D ^1H - ^1H et ^1H - ^{13}C confirment la présence d'une chaîne latérale de 2-Hexénamide.

L'ensemble de ces données confirme une amidification du noyau de base par l'acide 2-hexanoïque. L'antibiotique PR9 serait donc la 2-hexonyl-pyrrothine (Figure 63), qui n'a jamais été signalée dans la littérature auparavant.

2.2.2.4.- Antibiotique PR10

L'antibiotique PR10 présente un spectre UV-visible et un spectre de masse pratiquement identiques à ceux de l'antibiotique PR9, avec la même formule brute $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2\text{N}_2\text{S}_2$; ce sont donc des isomères de position.

L'antibiotique PR10 montre un sp² méthine supplémentaire (δ_{H} 5.72 and δ_{C} 115.7), un sp³ méthylène (δ_{H} 2.21 et δ_{C} 34.2) et deux groupement méthyles supplémentaires

(δ ^1H 2.24 et 1.12 et δ ^{13}C 19.1 et 12.1). Les expériences 2D ^1H - ^1H et ^1H - ^{13}C confirment la présence d'une chaîne latérale de 2-penténamide, 3-méthyle.

Ces données permettent de déduire que l'acide amidifiant le squelette de base est l'acide 2-méthyl-3-pentanoïque. La structure de l'antibiotique PR10 est donc la 2-méthyl-3-pentenyl-pyrrothine (Figure 63). Ce composé est décrit ici pour la première fois.

2.2.2.5.- Antibiotique PR11

Le spectre de masse de l'antibiotique PR11 présente un ion moléculaire $m/z = 284$ et un ion de fragmentation à $m/z = 186$. En se basant sur les résultats de la masse et de la RMN, la formule brute du produit est $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_2\text{N}_2\text{S}_2$.

Les spectres de RMN du ^1H et du ^{13}C de l'antibiotique PR2 montrent, en plus des signaux du système 4-méthyl-1,2-dithiolo [4,3-b] pyrrol-5[4H], l'apparition d'autres signaux qui confirment que l'acide amidifiant le squelette de base est l'acide isopentyl-formate. La structure de l'antibiotique PR11 est donc l'isopentyl-formyl-pyrrothine (Figure 63). Ce composé est décrit ici pour la première fois.

2.2.3.- Antibiotique sécrété après l'ajout d'acide cinnamique

Le spectre de masse de l'antibiotique PR5 présente, outre l'ion moléculaire $m/z = 290$ et l'ion de fragmentation à $m/z = 186$, deux très importants ions de fragmentation à $m/z = 105$ (ion de base) et $m/z = 77$, suggérant la présence d'un noyau benzénique dans ce composé. En se basant sur les résultats de la masse et de la RMN, la formule brute du produit est $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$.

En bon accord avec cette hypothèse, le spectre de RMN du ^1H et du ^{13}C présente les signaux caractéristiques d'une amide benzoïque: doublet de 2H à 7,92 ppm, triplet de 1H à (7,56 ~ 7,53 ppm) et triplet de 2H à 6,75 ppm.

Ces données permettent d'attribuer à l'antibiotique PR5 la structure de la benzoyl-pyrrothine (Figure 63). Ce composé est produit dans le milieu complexe ISP2 à l'état de traces (Lamari, 2006). Il avait toutefois été auparavant synthétisé chimiquement par condensation de la pyrrothine avec l'anhydride benzoïque (Bhate *et al.*, 1960). La benzoyl-pyrrothine n'a jamais été signalé chez un autre microorganisme.

2.2.4.- Antibiotique sécrété après l'ajout de cystine

L'antibiotique Cyst 1 possède la même masse que l'antibiotique AJ0 avec la même formule brute ($\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$), mais avec l'ion de fragmentation à $m/z = 172$ (au lieu de $m/z = 186$), caractéristique des holothines qui possèdent un H lié à l'azote n° 4 (au lieu d'un CH_3 comme le cas des pyrrothines).

Pour le spectre RMN du proton, il manque le signal à δ ^1H 3.4 correspondant au CH_3 sur l'azote n° 4 (comme le cas des autres dithiopyrrolones) et il y a l'apparition d'un nouveau signal intégrant pour un H à δ ^1H 8.19. Donc le N- CH_3 a été remplacé par un N-H.

L'acide amidifiant le noyau de base est l'acide acétique (comme le cas de la thiolutine appelé aussi acétyl-pyrrothine). La structure de l'antibiotique Cyst1 est donc l'acétyl-holothine, appelé encore l'holomycine (Figure 63). Cet antibiotique est identifié pour la 1ère fois chez *Sa. algeriensis*, mais précédemment isolé du filtrat de culture de plusieurs espèces

appartenant au genre *Streptomyces*, telles que *S. kasugaensis*, *S. griseus* et *S. pimprina* (Ettlinger *et al.*, 1959; Okamura *et al.*, 1977; De la Fuente *et al.*, 2002).

3.- Conclusion

La souche *Saccharothrix algeriensis* produit dans le milieu SS témoin six antibiotiques appartenant au groupe des dithiopyrrolones, dont cinq (thiolutine, SEP, TIP, BUP et ISP) ont été caractérisés précédemment par Lamari *et al.* (2002). Ce groupe d'antibiotiques a été signalé pour la première fois chez ce genre. La souche *Saccharothrix algeriensis* est le seul taxon de *Saccharothrix* à produire des antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones.

L'ajout de précurseurs (acides organiques et aminés) au milieu de culture a induit la production de nouvelles dithiopyrrolones.

La structure des différents composés a été établie grâce à l'étude de leurs différents spectres. L'analyse du spectre de masse en impact électronique direct a montré la présence d'un ion de base à $m/z = 186$ qui est un ion de réarrangement commun à toutes les molécules étudiés, à l'exception de la molécule Cyst1 où l'ion de base est à $m/z = 172$. L'étude des différents fragments de masse en impact électronique direct a permis de déduire les formules brutes en notant à chaque fois la présence de $N_2O_2S_2$ qui est d'ailleurs constante chez toutes les molécules étudiées.

La structure finale des antibiotiques a été établie grâce à l'ensemble de ces données et surtout grâce à l'analyse des spectres de RMN du proton et du carbone 13.

Onze antibiotiques identifiés sont nouveaux chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 et deux d'entre eux (holomycine et auréothricine) sont connus pour être produits par plusieurs espèces de *Streptomyces*.

4.- Hypothèse sur les voies de biosynthèse des nouvelles dithiopyrrolones

Nous avons proposé des voies de biosynthèse des nouvelles dithiopyrrolones induites par l'addition d'acides organiques et aminés chez *Sa. algeriensis*. Les réactions sont effectuées au niveau du noyau pyrrothine représentée ci-dessous:

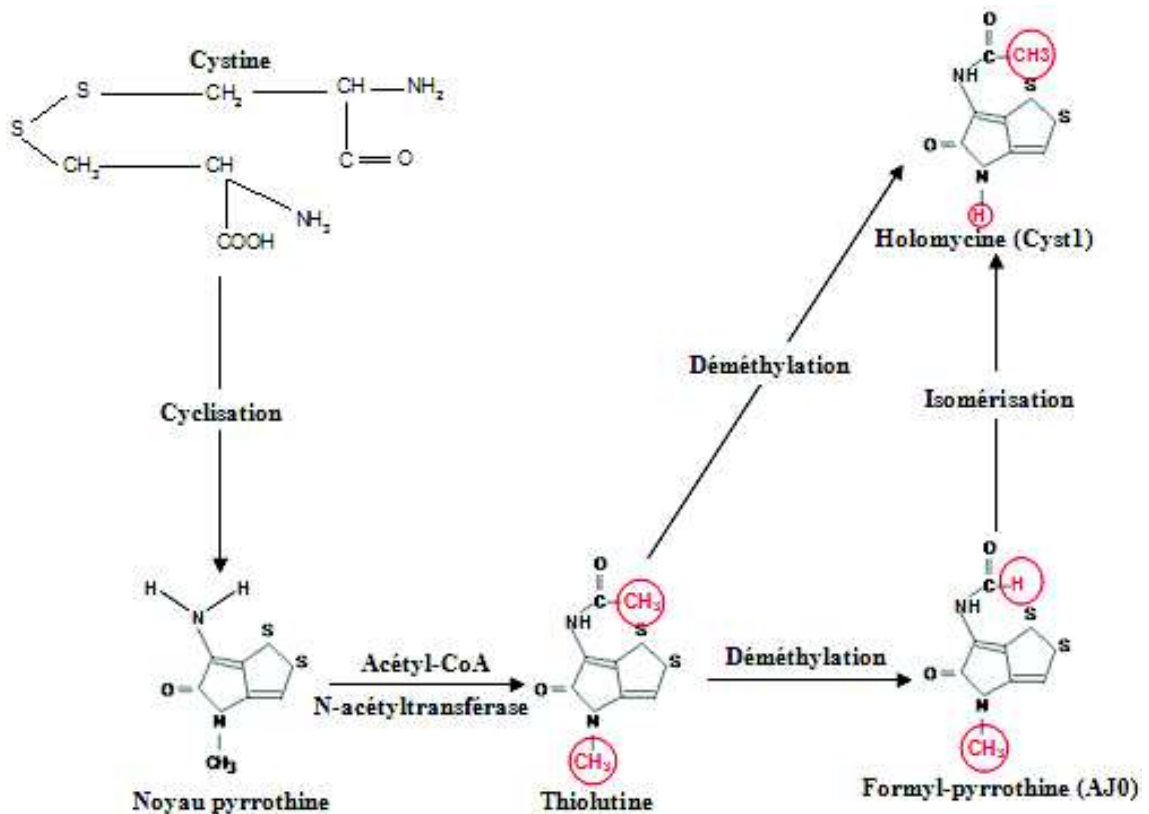


4.1.- Biosynthèse de l'holomycine Cyst1 induite par l'ajout de cystine

L'ajout de la cystine a induit la formation d'une nouvelle molécule chez *Sa. algeriensis* appelée l'holomycine (Cyst1). Cette pyrrothine est connue pour être sécrétée par plusieurs espèces de *Streptomyces* (Ettlinger *et al.*, 1959; Okamura *et al.*, 1977; De la Fuente *et al.*, 2002). La voie de biosynthèse de l'holomycine a été proposée comme suit:

Comme il a été déjà cité dans la bibliographie, le noyau de base des pyrrothines proviendrait de la cyclisation de la cystine. Ce noyau de base se transforme en thiolutine avec une réaction d'acylation de la pyrrothine avec le groupement acétyl. Chorin (2009) a mis en évidence l'activité enzymatique pyrrothine N-acétyltransférase qui entraîne la formation de thiolutine après une acylation de la pyrrothine avec le groupement acétyl chez *Sa. algeriensis*.

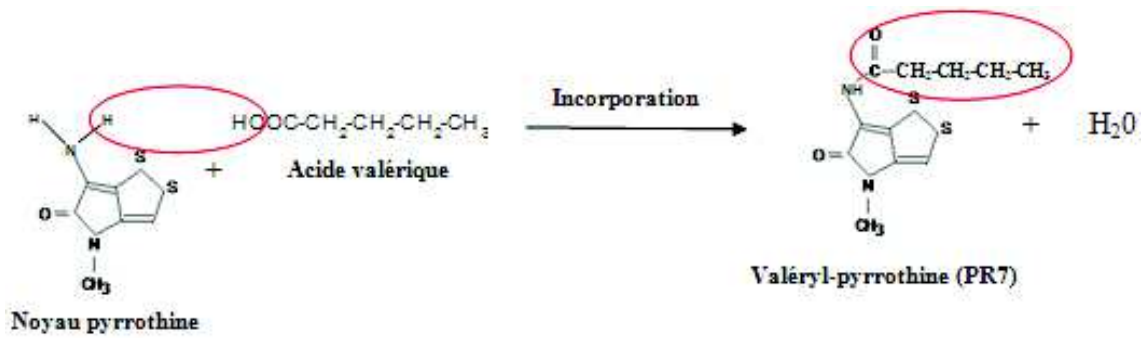
- Une déméthylation de la thiolutine aboutirait à la formation de l'holomycine (Cyst1).
- Une déméthylation de la thiolutine pourrait aussi donner la formyl-pyrrothine AJ0, qui, après isomérisation, se transformerait en holomycine.



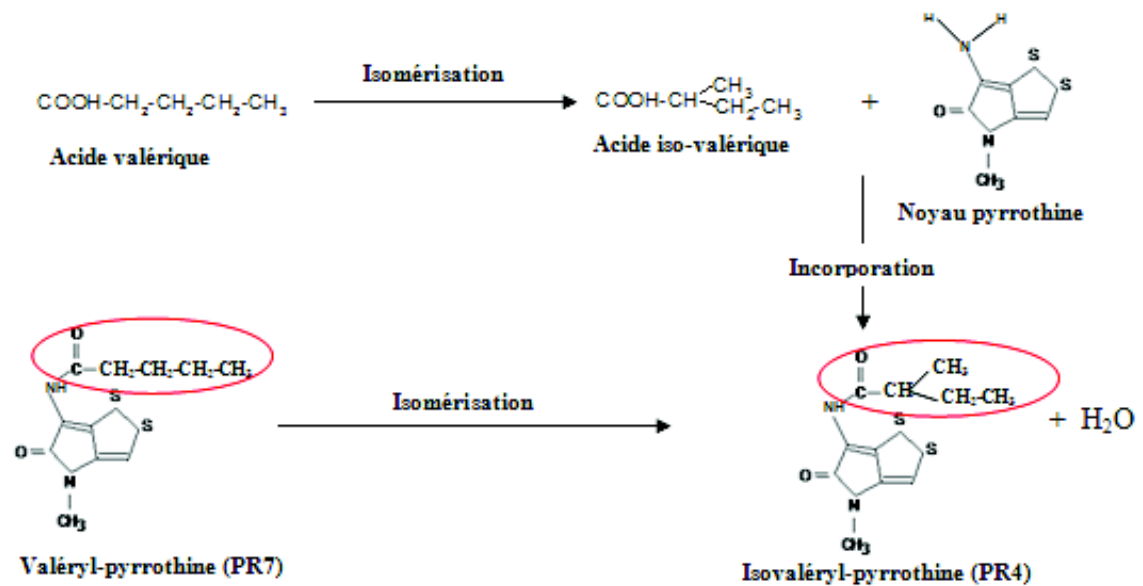
4.2.- Biosynthèse des nouvelles dithiopyrrolones induites par l'ajout d'acide valérique

L'ajout de l'acide valérique a induit la formation de trois nouvelles dithiopyrrolones: la valéryl-pyrrothine (PR7), l'isovaléryl-pyrrothine (PR4) et la propionyl-pyrrothine ou auréothricine (PR3). Les voies de biosynthèse proposées de ces nouvelles molécules sont résumées par les réactions suivantes:

- Une incorporation directe de l'acide valérique sur l'azote n° 7 du noyau pyrrothine aboutit à la formation de la valéryl-pyrrothine (PR7).

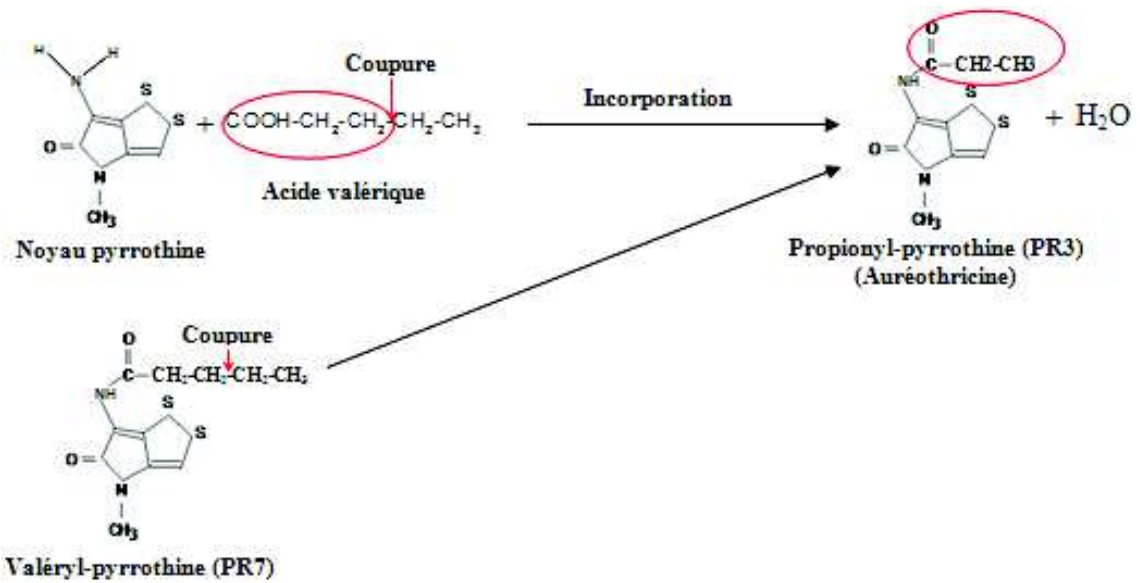


- Une isomérisation de cet acide puis une incorporation au niveau du noyau pyrrothine, permettrait à *Sa. algeriensis* de biosynthétiser l'isovaléryl-pyrrothine (PR4). Celle-ci pourrait être aussi synthétisée après une isomérisation de la valéryl-pyrrothine au niveau de la chaîne latérale.



- Une coupure au niveau de l'acide valérique puis une incorporation sur l'azote n° 7 du noyau pyrrothine permet la formation de la propionyl-pyrrothine. La valéryl-pyrrothine pourrait également se transformer en propionyl-pyrrothine (PR3).

Production de nouveaux antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis* après addition de précurseurs dans le milieu de culture

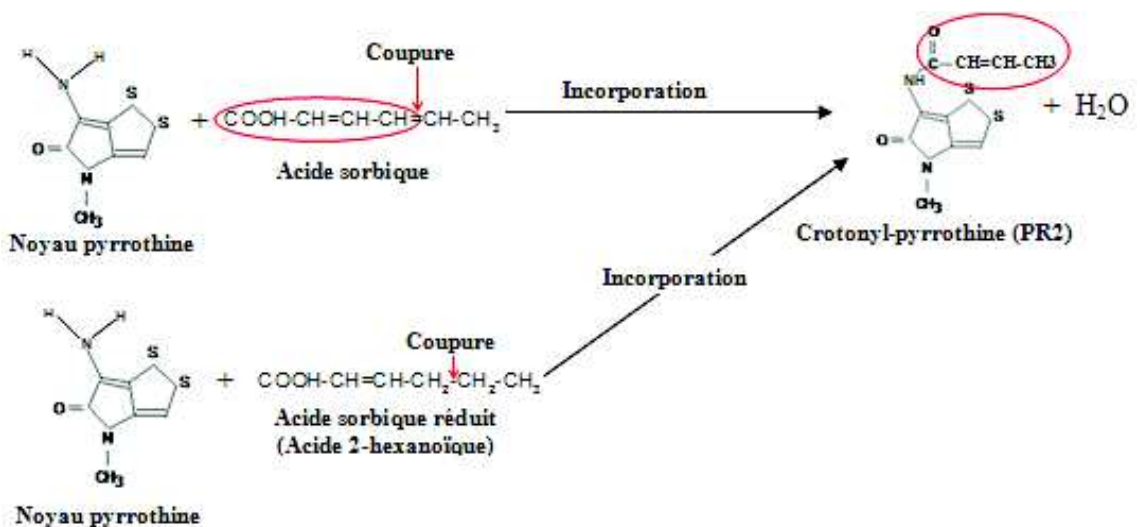


Cette molécule, appelée aussi auréothricine, est connue pour être sécrétée par plusieurs espèces de *Streptomyces* (Umezawa *et al.*, 1949; Celmer *et al.*, 1952; Celmer et Solomons, 1955; Yamagishi *et al.*, 1971; Juhl et Clark, 1990; Naik *et al.*, 2001.).

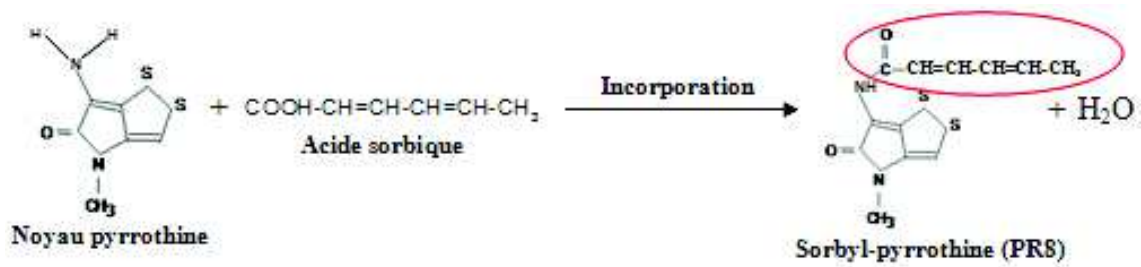
4.3.- Biosynthèse des nouvelles dithiopyrrolones induites par l'ajout d'acide sorbique

L'ajout d'acide sorbique a induit la formation de cinq nouvelles dithiopyrrolones: la crotonyl-pyrrothine (PR2), la sorbyl-pyrrothine (PR8), la 2-hexonyl-pyrrothine (PR9), la 2-méthyl-3-pentenyl-pyrrothine (PR10) et l'isopentyl-formyl-pyrrothine (PR11). La biosynthèse de ces nouvelles dithiopyrrolones a été proposée par les réactions suivantes:

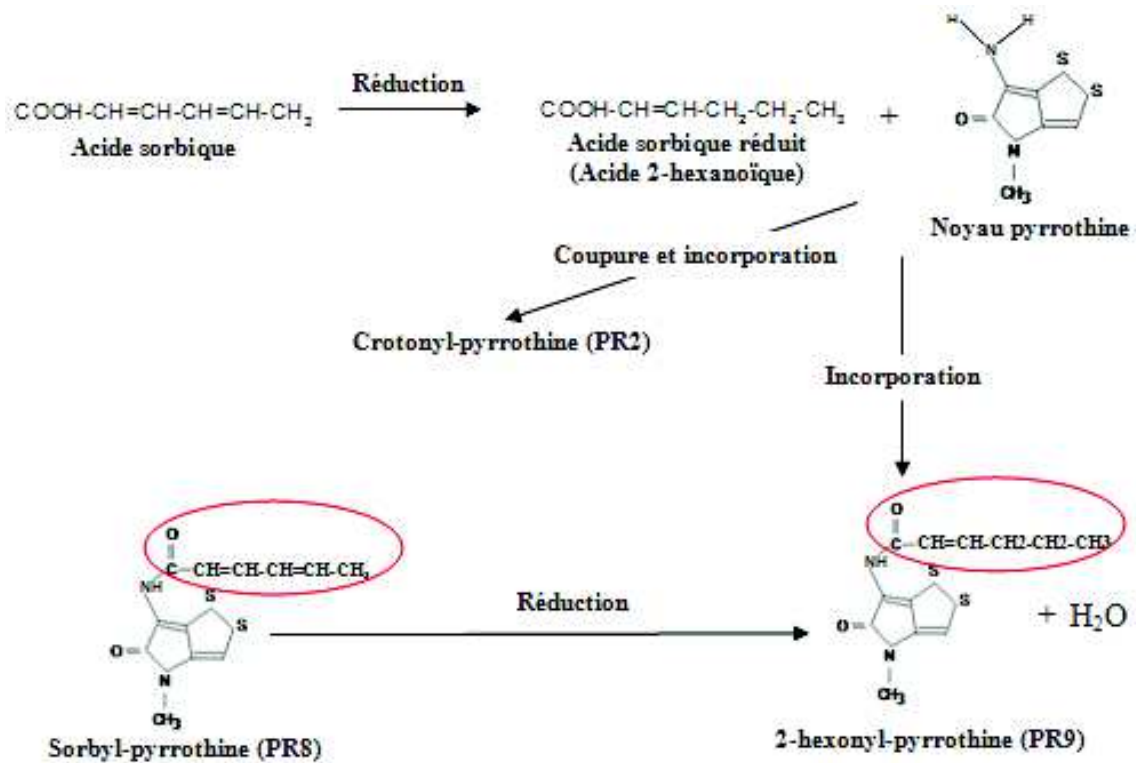
Une coupure au niveau de l'acide sorbique puis une incorporation sur la chaîne latérale du noyau pyrrothine aboutit à la formation de la crotonyl-pyrrothine (PR2). La coupure au niveau d'une double liaison étant difficile, il est fort probable que l'acide sorbique soit d'abord réduit avant de subir une coupure puis une incorporation.



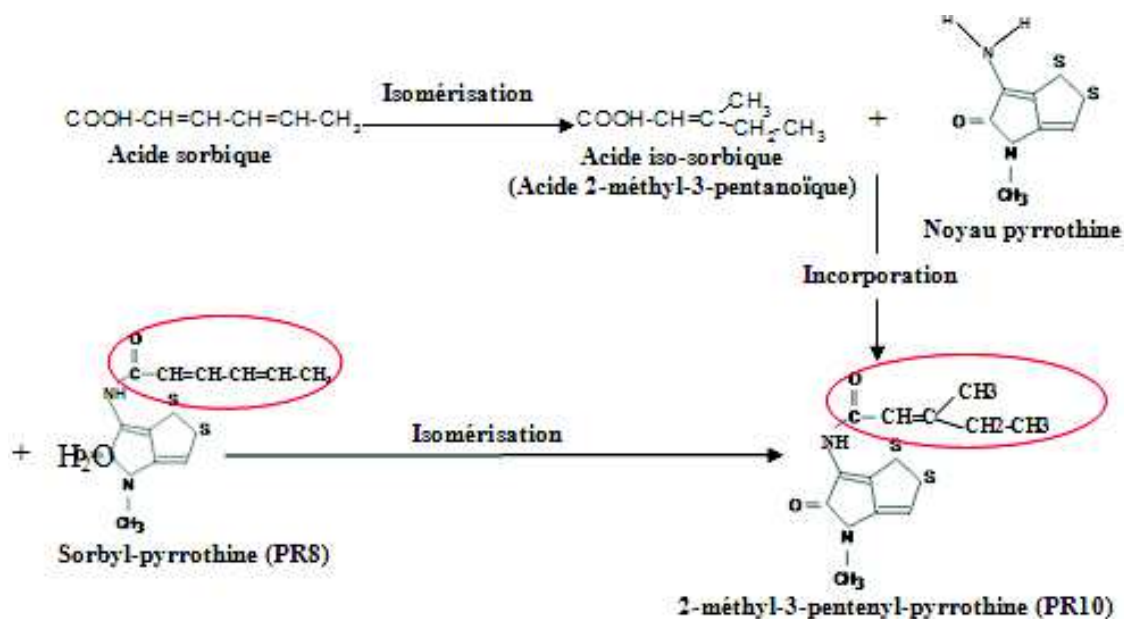
- Une incorporation directe de cet acide sur l'azote n° 7 du noyau pyrrothine permet la formation de la sorbyl-pyrrothine (PR8).



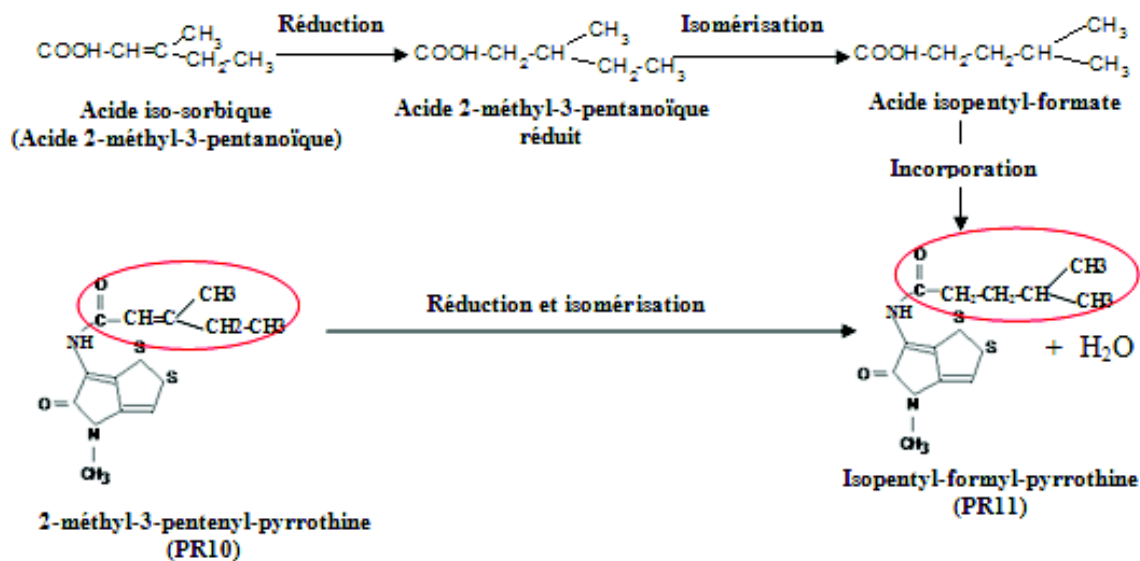
- Une réduction de l'acide sorbique puis une incorporation sur la chaîne latérale du noyau pyrrothine permet à *Sa. algeriensis* de biosynthétiser la 2-hexonyl-pyrrothine (PR9), qui peut être aussi produite par une réduction de la sorbyl-pyrrothine.



- Une isomérisation de l'acide sorbique puis une incorporation au niveau du noyau pyrrothine induit la formation de la 2-méthyl-3-pentenyl-pyrrothine (PR10). Celle-ci pourrait aussi provenir de l'isomérisation de la sorbyl-pyrrothine.



- Une réduction puis une isomérisation de la 2-méthyl-3-pentenyl-pyrrothine conduirait à la formation de la nouvelle dithiopyrrolone isopentyl-formyl-pyrrothine (PR11). Celle-ci pourrait également provenir de l'incorporation de l'acide iso-sorbique ayant subi auparavant une réduction et une isomérisation.

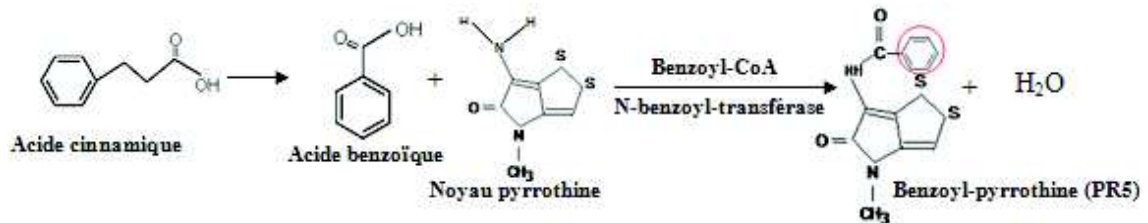


4.4.- Biosynthèse de la dithiopyrrolone induite par l'ajout d'acide cinnamique

L'addition de l'acide cinnamique induit la formation de la benzoyl-pyrrothine (PR5) par les réactions suivantes:

- L'acide cinnamique se transformerait en acide benzoïque qui peut être incorporé directement au niveau de la chaîne latérale du noyau pyrrothine pour donner la benzoyl-pyrrothine. Cette réaction d'acylation de la pyrrothine avec le groupement

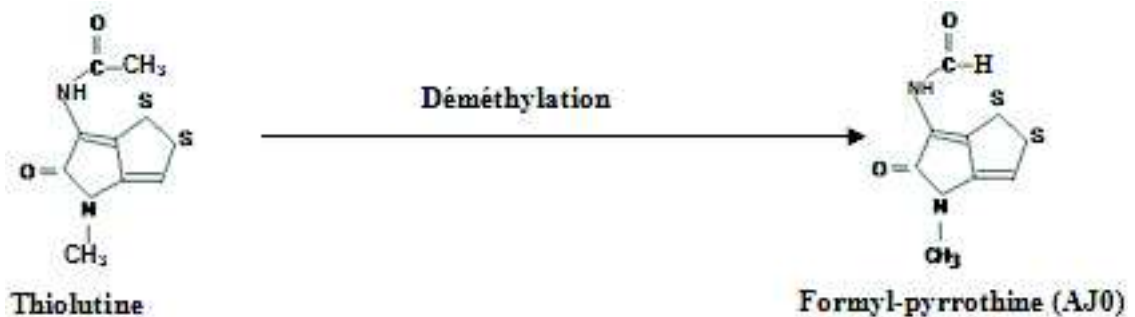
benzoyl est réalisée avec une enzyme N-benzoyltransférase qui a été mise en évidence par Chorin (2009). La benzoyl-pyrrothine n'est pas produite dans le milieu SS témoin, mais elle est produite par *Sa. algeriensis* dans le milieu complexe ISP2 à l'état de traces (Lamari, 2006). Cet auteur a déterminé la structure de la benzoyl-pyrrothine sur la base de la spectrométrie de masse. Les RMN du proton et du carbone 13 que nous avons entreprises ont permis de confirmer ce résultat.



4.5.- Biosynthèse de la dithiopyrrolone formyl-pyrrothine (AJ0)

La formyl-pyrrothine (AJ0) a été produite dans le milieu SS témoin à une faible concentration. L'ajout des différents précurseurs a augmenté la production de cette dithiopyrrolone, à l'exception de la cystine (absence de production). Cette dithiopyrrolone est décrite ici pour la première fois.

Cette molécule peut être biosynthétisée par une déméthylation de la thiolutine. Après l'ajout des précurseurs, la production de la thiolutine a diminué, par contre la concentration de AJ0 a augmenté. Ceci peut suggérer une transformation partielle de la thiolutine en formyl-pyrrothine. Il semble que l'ajout de précurseurs ait donc favorisé la formation de la formyl-pyrrothine au détriment de la formation de la thiolutine.



La figure 64 résume les différentes dithiopyrrolones produites dans le milieu SS témoin et celles induites par l'ajout de précurseurs.

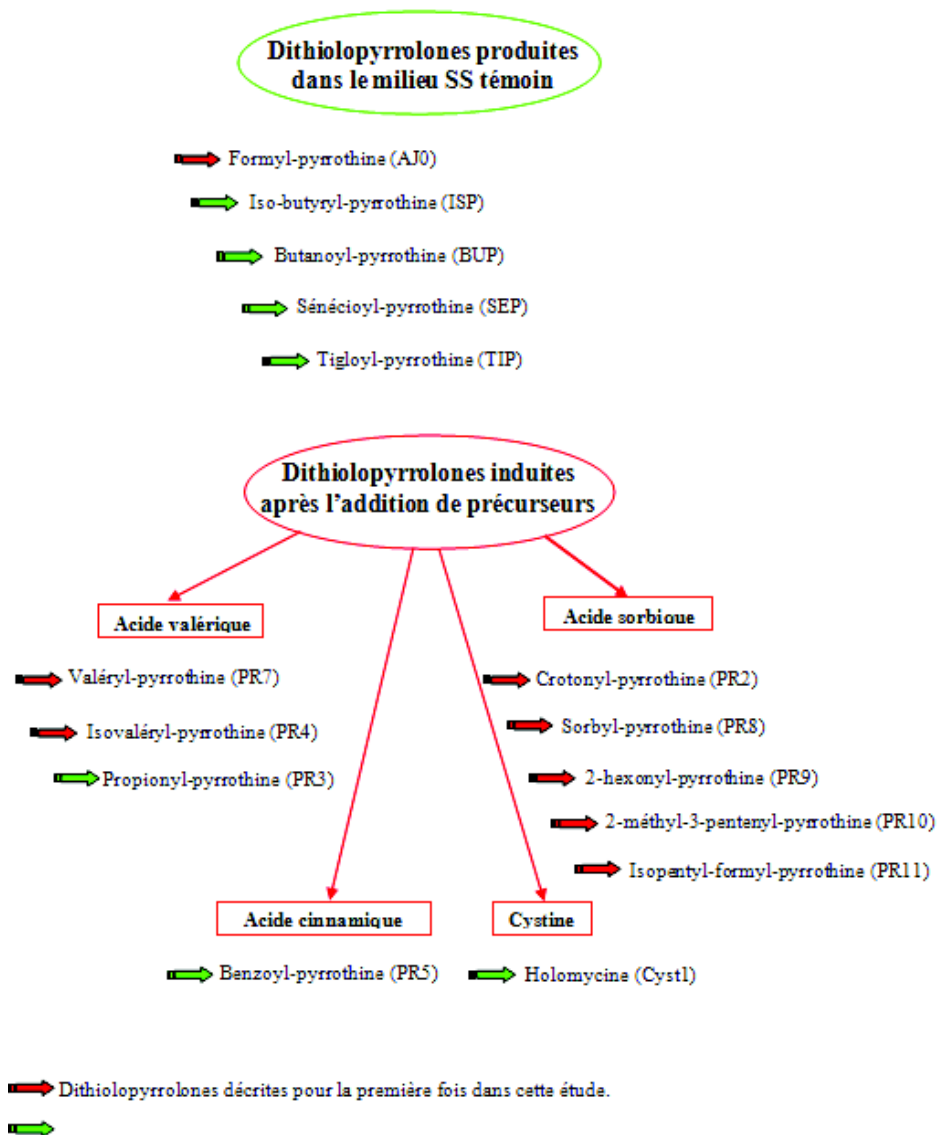


Figure 64. Dithiopyrrolones produites dans le milieu SS témoin et celles induites par l'ajout de précurseurs chez *Sa. algeriensis*.

V.- DETERMINATION DES CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES DES DITHIOPYRROLONES

La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) a été effectuée pour dix dithiopyrrolones purifiées et identifiées: AJ0, PR2, PR3, PR4, PR5, PR7, PR8, PR9, PR10 et Cys1. Elle a été réalisée sur 21 microorganismes: des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, des levures et des champignons, pathogènes pour l'homme ou les plantes, ou encore non pathogènes. La figure 65 montre les microorganismes-cibles inhibés ou non à des concentrations de 0,1 µg/mL, 30 µg/mL et 100 µg/mL de l'antibiotique Cyst1.

A travers les valeurs des CMI obtenues dans le tableau 13, nous constatons que les bactéries à Gram+ sont majoritairement sensibles, contrairement aux bactéries à Gram-. Les champignons et les levures présentent une certaine sensibilité selon l'antibiotique utilisé. Les mêmes résultats ont été obtenus par Lamari (2002b) qui a montré que les dithiopyrrolones AJ (thiolutine), ISP (iso-butyryl-pyrrothine), SEP (sénécioyl-pyrrothine), BUP (butanoyl-pyrrothine) et TIP (tigloyl-pyrrothine), sécrétés par la souche *Sa. algeriensis* dans le milieu SS témoin (sans précurseurs), ont une activité forte contre les bactéries à Gram positif, forte à moyenne contre les champignons et les levures et faible ou nulle contre les bactéries à Gram négatif.

Nous remarquons également que l'antibiotique AJ0 (formyl-pyrrothine) est, en général, plus actif que son isomère de position Cyst1 (l'holomycine). De même pour l'antibiotique PR7 (valéryl-pyrrothine) qui est nettement plus actif que son isomère PR4 (isovaléryl-pyrrothine). Par contre, la pyrrothine PR8 (sorbyl-pyrrothine) est plus active que sa forme réduite PR9 (2-hexonyl-pyrrothine), mais moins active en général que son isomère PR10 (2-méthyl-3-pentenyl-pyrrothine).

L'antibiotique AJ0 est le plus actif contre les bactéries à Gram + (CMI = 2 à 3 µg/mL) sauf pour *Listeria monocytogenes* (20 µg/mL). L'antibiotique PR10 est le plus actif contre certains champignons et levures comme *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* et *Candida albicans* (CMI = 2 µg/mL), *Mucor ramannianus* et *Fusarium moniliforme* (CMI = 5 µg/mL) et *Saccharomyces cerevisiae* (10 µg/mL).

Le PR2 est un antibiotique plus antibactérien (moyen à faible) qu'antifongique. Il est actif contre toutes les bactéries à Gram+, alors qu'il ne présente une activité que contre 4 champignons: *Mucor ramannianus*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium equiseti* (50 µg/mL) et *Penicillium expansum* (75 µg/mL).

Le PR9 est l'antibiotique le moins actif parmi tous les antibiotiques testés. Il a montré une activité (faible à moyenne) contre deux bactéries à Gram+ (*Listeria monocytogenes*: 20 µg/mL et *Micrococcus luteus*: 75 µg/mL), trois champignons (*Mucor ramannianus*: 40 µg/mL, *Fusarium culmorum*: 50 µg/mL et *Fusarium equiseti*: 75 µg/mL) et les deux levures (*Saccharomyces cerevisiae*: 30 µg/mL et *Candida albicans*: 50 µg/mL).

Escherichia coli n'est sensible (moyennement à faiblement) qu'à AJ0 (40 µg/mL), Cyst1 et PR3 (75 µg/mL). Les autres bactéries à Gram négatif sont toutes résistantes. *Aspergillus ochraceus* est le champignon le plus résistant; il n'est sensible qu'à PR10 (2 µg/mL).

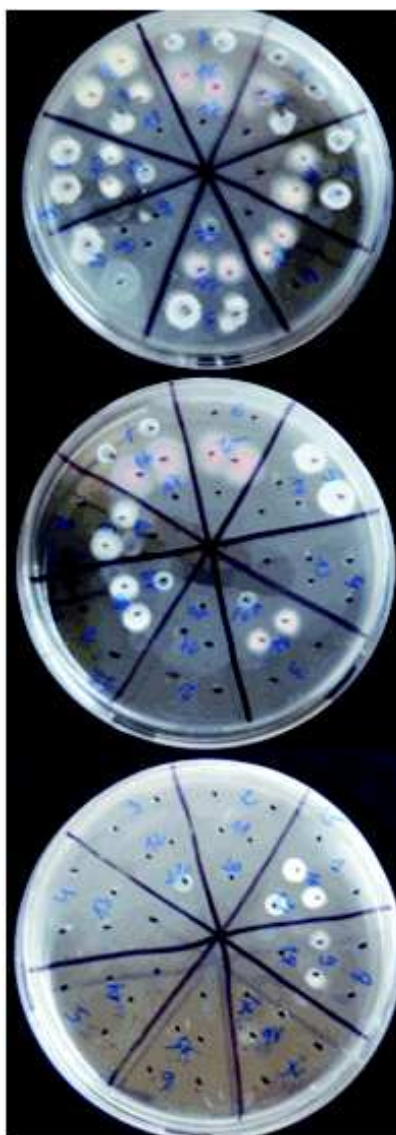


Figure 65. Expérimentation pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices vis-à-vis des microorganismes: cas de l'antibiotique Cyst1 à 0,1 µg/ml, 30 µg/ml et 100 µg/mL.

Microorganismes-tests	CMI (µg/mL)									
	AJ0	Cyst1	PR2	PR3	PR4	PR5	PR7	PR8	PR9	PR10
<i>Bacillus subtilis</i>	2	30	75	20	40	40	20	20	> 100	20
<i>Bacillus coagulans</i>	2	30	75	20	40	20	20	30	> 100	20
<i>Micrococcus luteus</i>	3	20	30	20	100	30	40	10	75	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	20	30	100	100	> 100	75	10	> 100	> 100
<i>Listeria monocytogenes</i>	20	2	40	> 100	> 100	4	> 100	10	20	10

Tableau 13. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des dix dithiopyrrolones pures sécrétées par *Sa. algeriensis* dans le milieu SS après l'addition de précurseurs, vis-à-vis de divers microorganismes-cibles.

= test non effect

conclusion générale

Les antibiotiques représentent le plus grand succès thérapeutique pour guérir les infections microbiennes, mais les microorganismes sont extrêmement adaptables et capables de réagir au changement, ce qui leur permet de se transformer rapidement pour surmonter les menaces du milieu externe à leur survie. Pour cela, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre afin de mettre sur le marché de nouveaux antibiotiques (Goldman *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 2002). À l'heure actuelle, des milliers d'antibiotiques sont découverts, dont seulement 2% sont utilisés dans les domaines médical, vétérinaire, agro-alimentaire et agricole (Thiele-Bruhn, 2003).

Les antibiotiques naturels sont des métabolites secondaires qui dérivent biochimiquement d'un nombre restreint de précurseurs fournis par le métabolisme primaire, tels que les acides aminés, les acides gras et les bases puriques et pyrimidiques. Cette variété structurale résulte non pas du nombre de voies de biosynthèse de départ (assez réduit), mais plutôt des chaînes de réactions enzymatiques terminales assez variées: polymérisation, méthylation, condensation, oxydation et réduction (Martin et Liras, 1989; O'hagan, 1991).

Les dithiopyrrolones sont des antibiotiques hétérocycliques contenant de l'azote et du soufre provenant de la condensation de deux cystéines ou de la cyclisation de la cystine (Furumai *et al.*, 1982), ainsi que d'une chaîne latérale qui résulte d'un accollement d'un acide organique au noyau cyclique par une liaison amide.

Nous nous sommes intéressés dans ce travail à la recherche de nouvelles dithiopyrrolones sécrétées par une espèce d'actinomycète d'origine saharienne, *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Nous fournissons ainsi au microorganisme des précurseurs représentés par des acides organiques (qui interviennent dans la formation de la chaîne latérale des dithiopyrrolones) et des acides aminés (qui peuvent être des précurseurs directs ou indirects dans la formation du noyau de base), pour lui permettre de biosynthétiser de nouveaux dérivés de dithiopyrrolones.

Pour cela, l'acide valérique, l'acide sorbique, l'acide cinnamique, la cystine et l'arginine ont été ajoutés séparément au milieu de culture semi-synthétique (SS) à une concentration de 5 mM. Cette concentration a été choisie sur la base des études préliminaires réalisées par Bouras (2005).

Dans une première partie, nous avons réalisé une cinétique de croissance et de production des dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis* sur un milieu SS témoin (sans précurseurs) et après l'ajout d'acides organiques et des acides aminés. Les résultats ont montré que les maxima de production des dithiopyrrolones sont obtenus au cours de la phase stationnaire de croissance et le début de la phase de déclin. Le pH du milieu SS de *Sa. algeriensis* devient alcalin au cours des fermentations, sans et avec précurseurs (acides organiques et aminés). Les activités antimicrobiennes (antibactériennes et antifongiques) sont plus importantes en présence des acides organiques et des acides aminés que dans le milieu SS témoin. Cela est dû à la production d'autres dérivés d'antibiotiques (en quantités plus au moins grande) comme l'a montré le dosage des dithiopyrrolones par HPLC analytique lors des cinétiques.

L'analyse par HPLC analytique sur colonne C18 en phase inverse a montré que dans le milieu SS témoin, *Sa. algeriensis* produit six antibiotiques; AJ0, thiolutine (AJ), iso-butyryl-pyrrothine (ISP), butanoyl-pyrrothine (BUP), sénéciol-pyrrothine (SEP) et tigloyl-pyrrothine (TIP). Lamari (2006) a signalé que la même souche d'actinomycète produit sur milieu complexe ISP2 (à base d'extrait de malt, d'extrait de levure et de glucose) sept antibiotiques: thiolutine, ISP, BUP, SEP, TIP, benzoyl-pyrrothine et pentanoyl-pyrrothine (ces deux dernière à l'état de trace).

L'ajout des acides organiques et aminés a permis l'apparition de nouvelles dithiopyrrolones non détectés dans le milieu SS témoin:

- L'addition de l'acide valérique a induit la production de trois nouvelles molécules (PR3, PR4 et PR7).
- L'addition de l'acide sorbique a permis l'apparition de cinq nouveaux produits (PR2, PR8, PR9, P10 et PR11).
- L'addition de l'acide cinnamique a permis l'apparition d'une nouvelle molécule (PR5).
- L'addition de la cystine a induit l'apparition de deux nouveaux produits (cyst1 et cyst2).
- L'addition de l'arginine a permis l'apparition de trois nouveaux produits (Arg2, Arg3 et Arg4).

L'antibiotique AJ0 est sécrété dans le milieu SS témoin à une faible concentration. La production de cette molécule est favorisée après l'ajout des précurseurs. De même pour la molécule PR5 qui a été produite à l'état de trace sur milieu complexe ISP2 et nommée PSD par Lamari (2006); sa production a été multipliée après l'ajout de l'acide cinnamique au milieu SS.

Dans la deuxième partie, dans le but de purifier les nouvelles molécules apparues, des fermentations en grandes quantités ont été entreprises. L'extraction de l'activité antibiotique a été effectuée à partir des filtrats de cultures en utilisant le dichlorométhane. Les extraits au dichlorométhane des filtrats de culture (en présence et en absence des précurseurs) ont donné par CCM deux produits jaunes AJ et PS.

La semi-purification des extraits a été réalisée en utilisant des plaques épaisses de gel de silice. Le développement des extraits bruts (spotés en traits continus) est réalisé par le système de solvants "acétate d'éthyl-méthanol" (100-15 v/v).

La purification finale des nouvelles dithiopyrrolones apparues a été réalisée par HPLC semi-préparative sur colonne C18. Les dithiopyrrolones pures ont été analysées par spectroscopies: UV-visible, masse et RMN du proton et du carbone 13. Ces analyses ont permis ainsi d'aboutir à la structure chimique de ces molécules.

- L'acide valérique a induit la production de 3 nouvelles dithiopyrrolones: la valéryl-pyrrothine (PR7), l'isovaléryl-pyrrothine (PR4) et la propionyl-pyrrothine (ou auréothricine) (PR3). L'auréothricine est connue pour être sécrétée par certaines espèces de *Streptomyces*, telles que, *S. kasugaensis*, *S. pimprina*, *S. farcinicus*, *S. thioluteus*, etc., et peut être aussi synthétisé chimiquement (Celmer et Solomons, 1955; Yamagishi *et al.*, 1971; Juhl et Clark, 1990; Naik *et al.*, 2001). Cet antibiotique a montré une activité antitumorale (Minamiguchi *et al.* 2001).
- L'acide sorbique a provoqué l'apparition de cinq nouvelles dithiopyrrolones: la crotonyl-pyrrothine (PR2), la sorbyl-pyrrothine (PR8), la 2-hexonyl-pyrrothine (PR9), la 2-méthyl-3-pentényl-pyrrothine (PR10) et l'isopentyl-formyl-pyrrothine (PR11).

- L'acide cinnamique a permis à *Sa. algeriensis* de produire la dithiopyrrolone PR5 identifiée à la benzoyl-pyrrothine. Cette molécule est aussi produite à l'état de trace par la même souche dans le milieu complexe ISP2 (Lamari 2006).
- La cystine a induit la production de l'holomycine (Cyst1). Cet antibiotique est aussi sécrété par quelques espèces de *Streptomyces* comme, *S. griseus*, *S. clavuligerus*, *S. pimprina*, etc. (Ettliger *et al.*, 1959; Okamura *et al.*, 1977; De la Fuente *et al.*, 2002). L'holomycine diffère de toutes les autres dithiopyrrolones produites par *Sa. algeriensis* par le radical lié à l'azote n° 4 qui représente un H au lieu d'un CH₃ comme le cas des autres molécules.
- La molécule AJ0, favorisée par l'ajout d'acide valérique, d'acide sorbique, d'acide cinnamique et d'arginine, a été identifiée à la formyl-pyrrothine. Cette molécule est un isomère de position de l'holomycine.
- L'arginine a induit la production de trois nouvelles molécules, à spectres UV-visibles très proches, et à poids moléculaire identique (PM = 279). Ces molécules n'ayant pas fait l'objet d'études en RMN, leur structure chimique n'a pas été déterminée.

Pour essayer de comprendre les mécanismes utilisés par *Sa. algeriensis* et sa grande capacité de biosynthétiser un grand nombre de dithiopyrrolones après addition de précurseurs, nous avons proposé des voies de biosynthèse de ces dérivés.

Nous avons remarqué que certains acides organiques s'incorporent directement au niveau de la chaîne latérale produisant ainsi l'antibiotique correspondant. D'une manière générale, Il existe une corrélation directe entre l'acide organique ajouté dans le milieu de culture et le type de dithiopyrrolone favorisée. Des travaux réalisés par Chorin (2009) ont permis de mettre en évidence la présence de six activités pyrrothine N-acyltransférases dans l'extrait intracellulaire brut de *Sa. algeriensis* obtenu sur milieu SS: les activités acétyltransférase, benzoyltransférase, butyryltransférase, acétoacétyltransférase, crotonoyltransférase et hexanoyltransférase.

En outre, d'autres dithiopyrrolones ont été biosynthétisées par *Sa. algeriensis* après des réactions de réduction ou d'isomérisation au niveau de l'acide organique lié à l'azote n° 7. Cet actinomycète possède donc un bagage enzymatique très diversifié qui permet de biosynthétiser un grand nombre de dérivés de dithiopyrrolones.

L'induction de nouvelles dithiopyrrolones a été aussi réalisée par l'addition de cystine et d'arginine. Ainsi, l'addition de cystine induit la production de l'holomycine. De la Fuente *et al.* (2002), étudiant la biosynthèse de l'holomycine dans des extraits cellulaires de mutants de *S. clavuligerus*, mettent en évidence l'existence d'une activité enzymatique catalysant l'acylation de l'holothine avec de l'acétyl-CoA, aboutissant à la synthèse de l'holomycine.

A l'issue de cette étude, nous pouvant dire que son originalité réside dans la mise en évidence des précurseurs qui ont permis d'induire la production (à la carte) de nouvelles dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis*. Cette induction est le résultat du changement d'un seul paramètre qui est l'addition d'acides organiques ou d'acides aminés dans le milieu de culture. Ce mode de culture nous a permis d'obtenir 11 nouvelles molécules chez *Sa. algeriensis* (AJ0, PR3, PR4, PR7, PR2, PR8, PR9, PR10, PR11, PR5 et Cyst1). Parmi ces molécules, huit dithiopyrrolones sont décrites ici pour la première fois, les trois autres ont été citées auparavant dans la littérature. Ceci est particulièrement important dans le cas d'un procédé de production de nouveaux antibiotiques.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de 10 dithiopyrrolones identifiées (AJ0, PR2, PR3, PR4, PR5, PR7, PR8, PR9, PR10 et Cyst1) ont été déterminées contre plusieurs microorganismes dont plusieurs sont phytopathogènes ou pathogènes pour

l'homme. L'activité de ces nouvelles molécules est forte contre les bactéries à Gram positif, forte à moyenne contre les champignons et les levures et faible ou nulle contre les bactéries à Gram négatif. Les mêmes résultats ont été obtenus par Lamari (2002b), pour les dithiopyrrolones sécrétées par *Sa. algeriensis* dans le milieu complexe ISP2.

Il serait intéressant de poursuivre les études sur les dithiopyrrolones de *Sa. algeriensis*, en effectuant notamment les RMN H et du C13 des molécules Arg2, Arg3 et Arg4 (induites par l'ajout de l'arginine) afin de déterminer leur structure, puis par la suite, leur activité.

Bouras (2005) a constaté que l'addition de certains acides organiques et aminés (autres que ceux que nous avons étudiés) ont permis l'apparition de nouveaux pics (détectés par HPLC) dont les spectres UV-visibles sont similaires (ou un peu proche) de ceux des dithiopyrrolones. Ces composés pourraient être de nouvelles dithiopyrrolones ou des composés intermédiaires intervenant dans la biosynthèse de ces molécules. Leur étude aiderait à la compréhension de leur mécanisme de biosynthèse.

Il serait tout aussi intéressant de mettre en évidence les enzymes impliquées dans la formation des nouvelles dithiopyrrolones telles que la valéryl-pyrrothine, la sorbyl-pyrrothine, etc. Tout comme il serait important de connaître les gènes qui sont impliqués dans la biosynthèse des dithiopyrrolones chez *Sa. algeriensis*. A ce titre, des travaux sont actuellement en cours de réalisation sur cette souche. De même, il est prévu de faire le séquençage de la stabilité du génome de cet actinomycète.

Enfin, pour mieux définir les activités biologiques des dithiopyrrolones biosynthétisés par *Sa. algeriensis*, d'autres études doivent être menées. Sachant que certains dithiopyrrolones, décrites dans littérature, ont montré des activités antitumorale assez importantes, il serait intéressant de déterminer la cytotoxicité des dithiopyrrolones sécrétés par *Sa. algeriensis* envers des lignées cellulaires cancéreuses. Par ailleurs, les données toxicologiques sur les dithiopyrrolones sont très peu présentes dans la littérature bien qu'il semble que ce soit une limitation pour leur usage thérapeutique. Il serait donc important de déterminer pour chaque activité biologique des dithiopyrrolones, l'index thérapeutique des composés, c'est-à-dire le ratio entre la dose efficace et la dose toxique et de mener des études pharmacocinétique.

Références Bibliographiques

-A-

- Adams C.C. and Gross D.S. (1991).** - The yeast heat shock response is induced by conversion of cells to spheroplasts and by potent transcriptional inhibitors. *J. Bacteriol.*, **173** (23), 7429-7435.
- Adelberg E.A. and Rabinovitz M. (1956).** - Metabolism of amino acids and proteins. *Ann. Rev. Biochem.*, **25**, 349-396.
- Aharonowitz Y. and Demain A.L. (1979).** - Nitrogen nutrition and regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Can. J. Microbiol.*, **25**, 61-67.
- Akhurst R. J. (1982).** - Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families *Heterorhabditidae* and *Steinernematidae*. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 3061-3065.
- Aoki H., Sakai, H., Kohsaka M., Konomi T., Hosoda J., Kubouchi Y. and Imanaa H. (1976).** - Nocardicin A, a new monocyclic beta-lactam antibiotic. I. Discovery, isolation and characterization. *J. Antibiot.*, **29**, 492-500.
- Arnold J.T., Wikinson B.P., Sharma S. and Steele V.E. (1995).** - Evaluation of chemopreventive agents in different mechanistic classes using a rat tracheal epithelial cell culture transformation assay. *Cancer Res.*, **55**, 537-543.
- Asselineau J. et Zalta P. (1973).** - Les antibiotiques. Structure et exemples de mode d'action. Hermann (Ed.). Paris.
- Athalye M., Goodfellow M., Lacey J. and White R.P. (1985).** - Numerical classification of *Actinomadura* and *Nocardiosis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **35**, 86-98.

-B-

- Barrett D., Tanaka A., Harada K., Ohki H., Watabe E., Maki K. and Ikeda F. (2001).** - Synthesis and biological activity of novel macrocyclic antifungals: Acylated conjugates of the ornithine moiety of the lipopeptidolactone FR 901469. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 479-482.
- Becking J.H. (1974).** - Family III. *Frankiaceae*. In: *Bergey Manual of Determinative Bacteriology*. 8th Eds. Buchanan R.E. and Gibbons N.E. (Eds.). Williams and Wilkins Co. Baltimore. pp. 701-706.
- Behal V., Neuzi J. and Hostalek Z. (1983).** - Effect of tetracycline derivatived and some cations on the activity of anhydrotetracycline oxygenase. *Biotechnol. Lett.* **5**, 537-542.
- Berdy J., Aszalos A. and Mc Nitt K.L. (1987).** - CRC Handbook of Antibiotic Compounds. Vol XIII. Microbial metabolites. Parts 1, 2, 3. Florida, USA. CRC Press. Boca Raton.

- Berdy J. (2005).** -Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.*, **58**, 1-26.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1989).** - Vol. 4. Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore, p. 2648.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994).** - 9th Ed. Holt J.H., Kreig N.R, Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T. (Eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2004).** - Vol. 4. Garrity G.M., Bell J.A. and Liburn T. G. (Eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore, p. 401.
- Bergman R. (1989).** - Thiolutin inhibits utilization of glucose and other carbon sources in cells of *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **55**, 143-152.
- Betina V. (1983).** - The chemistry and biology of antibiotics. Nanta W.T. and Rekker R.F. (Eds.). Elsevier, Amsterdam. pp. 493-526.
- Bhate D. S., Hulyalkar R. K. and Menon S. K. (1960).** - Isolation of isobutyropyrrrothine along with thiolutin and aureothricin from a *Streptomyces* sp., *Experientia*, **11**, 504-505.
- Bhosale S.H., Rao M.B. and Deshpande V.V. (1996).** - Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol. Rev.*, **60**, 280-300.
- Bibb M.J. (2005).** - Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr. Opin. Microbiol.*, **8**, 208–215.
- Bill G.F., Martín J., Collado J., Platas G., Overy D., Tormo J. R., Vicente F. and Verkleij G, Crous P. (2009).** - Measuring the distribution and diversity of antibiotics and secondary metabolites in the filamentous fungi. *SIM. News*, **59**, 133–147
- Boudjella H. (1994).** - Influence des milieux de culture, des antibiotiques et du pré-traitement des échantillons à la chaleur sur la sélection des genres et des espèces d'actinomycètes rares de quelques sols sahariens. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba. 177 p.
- Bouras N. (2005).** - Régulation de la production d'antibiotiques dithiopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Thèse de Doctorat, INP-ENSAT, 238 p.
- Bouras N., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2006a).** - Effect of amino acids containing sulfur on dithiopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *J. Appl. Microbiol.*, **100**, 390-397.
- Bouras N., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2006b).** - Nutritional requirements for the production of dithiopyrrolones antibiotics by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Enz. & Microb. Tech.*, **39**, 1423-429.
- Bouras N., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2007).** - Influence on dithiopyrrolone antibiotic production by organic acids in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochem.*, **42**, 925-933.
- Bouras N., Merrouche R., Lamari L., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2008).** - Precursor-directed biosynthesis of new dithiopyrrolone analogs by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochem.*, **43**, 1244–1252.
- Braña A.F., Wolf S. and Demain A.L. (1985).** - Ammonium repression of cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. *Can. J. Microbiol.*, **31**, 736-743.

- Braznikova M. G., Konstantinova N.V., Potapova N. P. and Tolstykh I. V. (1977).** - Physicochemical characteristics of the new antineoplastic antibiotic, nocamycin. *Antibiotiki*, **22**, 486-489.
- Breton A., Theilleux J., Sanglier J. J. and Vobi G. (1989).** - Organismes producteurs: biologie, taxonomie et écologie. *In: Biotechnologie des antibiotiques*. Larpent J. P. et Sanglier J. J. (Eds.). Paris, Masson. pp. 33-70.
- Brooks P.C., Strömblad S., Klemke R.L., Visscher D., Sarkar F.H. and Cheresch D.A. (1995).** - Antiintegrin $\alpha 3$ blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J. Clin. Invest.*, **96**, 1815-1822.
- Brown D.E. and Zainudeen M.A. (1978).** - Effect of inoculum size on the aeration pattern of batch cultures of a fungal microorganism. *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1045-1061.
- Bruns A., Phillipp H., Cypionka H. and Brinkhoff T. (2003).** - *Aeromicrobium marinum* sp. nov., an abundant pelagic bacterium isolated from German wadden Sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **3**, 1917-1923.
- Bryskier A. (1999).** - Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. Ellipses (EDS.). Paris.
- Büchi G. and Lukas G. (1964).** - A total synthesis of holomycin. *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 5654-5658.
- Budavari S., O'Neil M. J., Smith A. and Heckelman P.E. (1989).** - The merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Eleventh edition, Merck & Co., Inc.
- Bu'lock J. D. (1965).** - The biosynthesis of natural products. An introduction to secondary metabolism. Mc Graw-Hill, New-York.
- Bush J. A., Long B. H., Catino J. J., Bradner W. T. and Tomita K. (1987).** - Production and biological activity of rebeccamycin, a novel antitumor agent. *J. Antibiot.*, **40**, 668-678.
- Bush B. D., Fitchett G. V. Gates D. A. and Langley D. (1993).** - Carbocyclic nucleosides from species of *Saccharothrix*. *Phytochemistry*, **32**, 737-739.
- Bycroft B. W. (1988).** - Dictionary of antibiotics and related substances. London: Chapman and Hall, p. 944.
- C-
- Celmer W. D. and Solomons I. A. (1963).** -1,5-Dimethyl-2-oxo-3-pyrrolidineglyoxylic acid. Medical Research Laboratories, Chas. Pfizer and Company, Inc., Groton, Connecticut, 3221-3222.
- Celmer W. D., Tanner F. W., Harfenist M., Lees T. M. and Solomons I. A. (1952).** -Characterization of antibiotic thiolutin and its relationship with aureothricin. *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 6304-6305.
- Celmer W.D. and Solomons I.A., (1955).** - The structures of thiolutin and aureothricin, antibiotics containing a unique pyrrolinodithiole nucleus. *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 2861-2865.

- Chang Z. and Vining L.C. (2002).** - Biosynthesis of sulfur containing amino acids in *Streptomyces venezuelae* ISP5230: roles for cystathionine b-synthase and transsulfuration. *Microbiology*, **148**, 2135-2147.
- Chen G., Dunphy G. B. and Webster J. M. (1994).**- Antifungal activity of two *Xenorhabdus* species and *Photorhabdus luminescens*, bacteria associated with the nematodes *Steinernema* species and *Heterorhabditis megidis*. *Biological Control*, **4**, 157-162.
- Chorin A.C. (2009).** - Synthèse enzymatique de nouveaux dérivés dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat, INP-ENSAT, 238 p.
- Chorin A.C., Bijeire L., Monje M.C., Baziard G., Lebrihi A. and Mathieu F. (2009).**- Expression of pyrrothine *N*-acyltransferase activities in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137: new insights into dithiopyrrolone antibiotic biosynthetic pathway. *J. Appl. Microbiol.*, **107**, 1751–1762
- Cole M. and Rolinson G.B. (1972).** - Microbial metabolites with insecticidal properties. *Nematologia*, **42**, 124-127.
- Colombié V. (2005)** - Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. Thèse de Doctorat, INP-ENSAT, 163 p.
- Corcoran J.W. (1974).** - Genetic considerations and erythromycin production by *Streptomyces erythreus*. pp. 339-351. In Vanek Z., Hostalek Z. and Cudlin J. (eds.), Genetics of industrial microorganisms, Vol. 2. Academia, Prague.
- Cropp A., Chen S., Liu H., Zhang W. and Reynolds K.A. (2001).** - Genetic approaches for controlling ratios of related polyketide products in fermentation processes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 368-377.
- Cruz R., Arias M.E. and Soliveri, J. (1999).** – Nutritional requirements for the production of pyrazoloisoquinolinone antibiotics by *Streptomyces griseocarneus* NCIMB 40447, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 115-119.
- Cundliffe E. (2006).** - Antibiotic production by actinomycetes: the Janus faces of regulation. *J. Ind. Microbiol Biotechnol.*, **33**, 500–506.
- D-
- Dancer J. E., Hughes R. G. and Lindell S. D. (1997).** - Adenosine-5'-phosphate deaminase, a novel herbicide target. *Plant Physiol.*, **114**, 119-129.
- Da Silva M.C., Bertolini M.C. and Ernandes J.R. (2001).** - Biomass production and secretion of hydrolytic enzymes are influenced by the structural complexity of the nitrogen source in *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus nidulans*. *J. Basic Microbiol.*, **41**, 269-280.
- David L., Loutheiller H., Bauchart O., Auboiron S. and Asselineau (1992).** – Effects of exogenous methyl oleate on the biosynthesis of nigericin, a polyether carboxylic antibiotic, by *Streptomyces hygroscopicus* NRRL B-1865. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 330-339.

- Deacon J. W. (1984).** - "Introduction to modern mycology". Vol.7, 2nd. Ed., 239 p.
- De la Fuente A., Lorenzana L.M., Martín J.F. and Liras P. (2002).** – Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin: possible cross-regulation of two unrelated secondary metabolic pathways. *J. Bacteriol.*, **23**, 6559-6565.
- Dell I., Godfrey C.R. A. and Wadsworth D.J. (1992).** - Total synthesis of naturally occurring 1,2-dithiolo (4,3-b) pyrrolones and compounds. *Chem. Inform.*, **24**, 384-394.
- Demain A. L. (1989).** - Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in actinomycetes. In: Shapiro, S., editor. Regulation of secondary metabolism in actinomycetes. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 127-34.
- Demain A.L. (1991).** - Production of beta-lactam antibiotics and its regulation. *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China B*, **15**, 251-65.
- Demain A.L. (1998).** – Induction of microbial secondary metabolism. *Internatl. Microbiol.*, **1**, 259-264.
- Dinya Z. M. and Sztaricskai F. J. (1986).** - Ultraviolet and light absorption spectrometry. In: #Modern analysis of antibiotics# Aszolas A. (Eds), Marcel dekker, Inc. New York, pp. 19-96.
- Dommergues Y. et Mangenot F. (1970).** - Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie(Eds.), Paris.
- Donadio S., Monciardini P., Alduina R., Mazza P., Chiocchini C., Cavaletti L., Sosio M. and Puglia A. M. (2002).** - Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *J. Biotechnol.*, **99**, 187-198.
- Drew S.X. and Demain A.L. (1977).** -Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.*, **31**, 343-356.
- E-
- Eisenman W., Minieri P.P., Abbey A., Charlebois J., Moncrieff-Yeates M. and Rigler N.E. (1953).** - A new sulfur-containing antibiotic, produced by a *Streptomyces*, active against bacteria and fungi. *Antibiot. chemother.*, **3**, 385-392.
- Elgazwy A-S.S.H. (2003).** - The chemistry of isothiazoles. *Tetrahedron*, **59**, 7445-7463.
- Ellis J. E., Fried J. H., Harrisson I. T., Rappe E. and Ross C. H. (1977).** - Synthesis of holomycin and derivatives. *J. Org. Chem.*, **42**, 2891-2893.
- El-Sayed E. S. (2000).** - Production of thaxtomin A by two species of *Streptomyces* causing potato scab. *Folia Microbiol. (Praha)*, **45**, 415-22.
- Elstner E. F. and Suhadolnik R. J. (1975).** - Guanosine triphosphate8-formylhydrolase. *Methods enzymol.*, **43**, 515-520.
- Ettlinger L., Gäumann E., Hütter R., Keller-Schierlein W., Kradolfer F., Neipp L., Prelog V. and Zähler H. (1959).** - Stoffwechselprodukte von actinomyceten (Metabolic products of actinomycetes). Holomycin. *Helv. Chim. Acta.*, **42**, 563-569.
- F-

- Feng B., Friedlin E. and Marzluf G.A. (1994).** - A reporter gene analysis of penicillin biosynthesis gene expression in *Penicillium chrysogenum* and its regulation by nitrogen and glucose catabolite repression. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 4432-4439.
- Forst S. and Neilson K. (1996).** - Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. *Microbiol. Rev.*, **60**, 21-43.
- Furumai T., Takeda K. and Okanishi M. (1982).** - Function of plasmids in the production of aureothricin. I. Elimination of plasmids and alteration of phenotypes caused by protoplast regeneration in the *Streptomyces kasugaensis*. *J. Antibiot.*, **35**, 1367-1373.

-G-

- Gathogo E.W., Waugh A.C., Peric-Concha N., Redpath M.B. and Long P.F. (2004).** - Rapid detection of rare actinomycetes in environmental samples. *Biotechnol. Lett.*, **26** (11), 897-900.
- Gauze G.F., Maksimova T. S. and Olkhovatova (1974).** - Production of madumycin, an antibacterial antibiotic by *Actinomadura flavasp. nov.* *Antibiotiki*, **19**, 771 - 775.
- Gerber N.N. (1969).** - New microbial phenazine. *J. Heterocycle Chem.*, **6**, 297-300.
- Getha K., vikineswary S., Wong W.H., Seki T., Ward A. and Goodfellow M. (2005).** - Evaluation of *Streptomyces* sp. strain g10 for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonisation in pot-grown banana plantlets. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 24-32.
- Goldman D. A., Weinstein R. A., Wenzel R. P., Tablan O. C., Duma R. J., Gaynes R. P., Schlosser J. and Martone W. J. (1996).**-Strategies to prevent and control the emergence and spread of antimicrobial-resistant microorganisms in hospital: a challenge to hospital leadership. *J. A. M. A.*, **275**, 234-240.
- Gomez R.C., Semedo L.T.A.S., Soares R.M.A., Alviano C.S., Linhares L.F. and Coelho R.R. (2000).** - Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. *Let. Appl. Microbiol.*, **30**, 146-150.
- Gonzalez R., Islas L., Obregon A. M., Escalante L. and Sanchez S. (1995).** - Gentamicin formation in *Micromonospora purpurea*: stimulatory effect of ammonium. *J. Antibiot.*, **48**, 715-9.
- Goodfellow M. and Williams S.T. (1983).** - Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.*, **37**, 189-216.
- Gopalkrishnan K. S. and Jump J. A. (1952).** - The antibiotic activity of thiolutin in the chemotherapy of the *Fusarium* wilts of tomato. *Phytopathology*, **42**, 338-340.
- Gray P.P. and Bhuwapathanapun S. (1980).** - Production of the macrolide antibiotic tylosin in batch and chemostat culture. *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1785-1804.
- Gray P.P. and Vu-Trong K. (1987).** - Production of the macrolide tylosin in cyclic fed-batch culture. *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 33-40.
- Grigorevski de Lima A.L., Pires do Nascimento R., Da Silva Bon, E.P. and Coelho R.R.R. (2005).** - *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial

by-products and its potential use in the detergent and textile industries. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **37**, 272-277.

Grosso J.J. (1954). - Control of tobacco blue mould by antibiotics. *Plant Dis. Repr.*, **38**, 333-334.

Grund E. and Kroppenstedt R.M. (1990). - Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus *Nocardioopsis* Meyer 1976. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**, 5-11.

Guo Y., Chen G. and Bin L. (2008). - Novel dithiopyrrolones and their therapeutical applications. Patent WO2008038175. April 3rd.

Guoping W. and Quanhai L. (2009). - Dithiopyrrolone compounds, the preparation and the use thereof. Patent WO2009033396. 19th March.

Gupte M., Kulkarni P. and Ganguli B. N. (2002). - Antifungal antibiotics. Mini-Review. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **58**, 46–57.

-H-

Haavik H.I. (1974). - Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis*: role of catabolite repression and organic acids. *J. Gen. Microbiol.*, **84**, 321-326.

Hagio K. and Yoneda N. (1974). - Total synthesis of holomycin, thiolutin and aureothricin. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **47**, 1484-1489.

Hermans L., Gossele F. et Biot A. (1989). - Fermentations industrielles. In: « Biotechnologie des antibiotiques » Larpent J.P and Sanglier J.J (Eds), Masson, Paris, pp. 342-380.

Herrick D., Parker R. and Jacobson A. (1990). - Identification and comparaison of stable and unstable mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 2269-2284.

Hjelmgaard T., Givskov M. and Nielsen J. (2007). - Expedient total synthesis of pyrrothine natural products and analogs. *Org Biomol Chem.*, **5**, 344-348.

Holzappel W., Brost I., Faerber P., Geisen R., Bresch H., Jany K-D., Mengu M., Jakobsen M., Steyn P. S., Teniola D. and Addo P. (2002). - Bacterial degradation of aflatoxin B1, ochratoxin A and/or zearalenone . *PCT Int. Appl.*, p. 19.

Horan A.C., Shearer M.C., hedge V., Beyazova M.L., Brodsky B.C., King A., Berrie R., Kardaci K. and Nimeck M. (1977). - A family of novel macrocyclic lactones, the saccharocarcins produced by *Saccharothrix aerocolonigenes* subsp. *antibiotica*. I. Taxonomie, fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiotics*, **50**, 119-125.

Horvath G., Brazhnikova M.G., Konstantinova N.V., Tolstykh I.V. and Potapova N.P. (1979). - The structure of nocamycin, a new antitumor antibiotic. *J. Antibiot.*, **32** (6), 555-558.

Hu Y.T., Zhou P.J., Zhou Y-G., Liu Z-H. and Liu S-J. (2004). - *Saccharothrix xinjiangensis* sp. nov., a pyrene-degrading actinomycete isolated from Tianchi lake, Xinjiang, China. *Int. J. Syst. & Evolt. Microbiol.*, **54**, 2091-2094.

Huang S., Zhao Y., Qin Z., Wang X., Onega M., Chen L., He J., Yu Y. and Deng H. 2010. - Identification and heterologous expression of the biosynthetic gene cluster for holomycin produced by *Streptomyces clavuligerus*. *Process Biochem.*, **46**, 811-816.

-I-

- Igarashi M., Kinoshita N., Ikeda T., Nakagawa E., Hamada M. and Takeuchi T. (1997).** - Formamycin, a novel antifungal antibiotic produced by a strain of *Saccharothrix* sp. I. Taxonomy, production, isolation and biological properties. *J. Antibiot.*, **50**, 926-931.
- Ikeda Y., Naganawa H., Kondo S. and Takeuchi T. (1992).** - Biosynthesis of bellenamycin by *Streptomyces nashvillensis* using stable isotope labeled compounds. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **45** (12), 1919-24.
- Isaacson P.J. and Webster J.M. (2002).** - Antimicrobial activity of *Xenorhabdus* sp. RIO (*Enterobacteriaceae*), symbiont of the entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* (*Rhabditida: Steinernematidae*). *J. Invertebr. Pathol.*, **79**, 146-153.
- Ishihara H., Endo Y., Abe S. and Shimura K. (1975).** - The presence of 4'-phosphopantéthine in the bacitracin synthetas. *FEBS Lett.*, **50**, 43-46.
- Ishizawa S. and Araragi M. (1976).** - Composition of actinomycetes population in soil. *In: Actinomycetes, the boundary microorganisms.* Arai T. (Eds.) Toppan Co. Ltd, Tokyo, 97-107.
- Isono K. (1988).** - Nucleoside antibiotics: structure, biological activity, and biosynthesis. *J. Antibiot.*, **41**(12), 1711-39.
- Isshiki K., Sawa T., Naganawa H., Matsuda N., Hattori S., Hamada M., Takeuchi T., Oosono M., Ishizuka M., Yang Z., Zhu B. and Xu W. (1989).** - 3-O-isobutyrylkinamycin C and 4-deacetyl-4-O-isobutyrylkinamycin C, new antibiotics produced by a *Saccharothrix* species. *J. Antibiot.*, **42**, 467-469.
- Ito S., Matsuya T., Omura S., Otani M. and Nakagawa A. (1970).** - A new antibiotic, kinamycin. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **23** (6), 315-7.

-J-

- Jain T.C., Newman D.J. and Shearer M.C. (1982).** - Polynitroxin antibiotics produced by *Nocardiosis mutabilis* Shearer sp. nov. ATCC 31520. U.S. **4**, 317-812. A, Mar. 2. (brevet).
- Jiang B., Bussey H. and Roemer T. (2002).** - Novel antiviral agent: a medicinal plant perspective. *J. Appl. Microbiol.*, **95**, 412-427.
- Jimenez A., Tipper D.J. and Davies J. (1973).** - Mode of action of thiolutin, an inhibitor of macromolecular synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. agents chemother.*, **3**, 729-738.
- Joshi A., Verma M. and Chakravorty M. (1982).** - Thiolutin resistant mutants of *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob. Agents chemother.*, **22**, 541-547.
- Juhl M.J. and Clark D.P. (1990).** - Thiophene-degrading *Escherichia coli* mutants possess sulfone oxidase activity and show altered resistance to sulfur-containing antibiotics. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3179-3185.

-K-

- Katz E. (1967).** - Actinomycin, p. 276-341. In D. Gottlieb and P. D. Shaw (ed.), Antibiotics, vol. 2. Springer-Verlag, New York.
- Khachatourians G.G. and Tipper D.J. (1974a).** - *In vivo* Effect of thiolutine on cell growth and macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob. agents chemother.*, **6**, 304-310.
- Khachatourians G.G. and Tipper D.J. (1974b).** - Inhibition of messenger ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli* by thiolutin. *J. Bacteriol.*, **119**, 795-804.
- Khan N., Xiao H., Zhang B., Cheng X. and Mootoo D.R. (1999).** – Oxocarbenium ion cyclisations under non-acidic conditions: synthesis of tetrahydropyran analogues of the pseudomonic acids. *Tetrahedron*, **55**, 8303-8312.
- Khaoua S. (1990).** - Régulation des étapes initiales de la biosynthèse de la spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Thèse de Doctorat de l'INPL-Nancy. 180 P.
- Khaoua, S., Lebrihi, A., Germain, P. and Lefebvre, G. (1991).** – Cephamycin C biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 253-257.
- Khaoua S., Lebrihi A., Laakel M., Schneider F., Germain P. and Lefebvre G. (1992).** - Influence of short-chain fatty acids on the production of spiramycin by *Streptomyces ambofaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 763-767.
- Khokhlov A. S. and Tovarova I. I. (1972).** - Studies of streptomycin biosynthesis. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, **26**, 469-491.
- Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F. and Hopwood D.A. (2000).** - Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes foundation Ed. Norwich.
- Kim B. Y., Brown R., Labeda D.P. and Goodefellow M. (2011).** - Reclassification of *Saccharothrix variisporea* corrig. (ex Tomita *et al.* 1977) sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**, 130-314.
- Kim Y. S. and Kawai A. (1998).** - Studies on the antiviral mechanisms of protein kinase inhibitors K-252a and KT5926 against the replication of vesicular stomatitis virus. *Biolo. Pharm. Bull.*, **21** (5), 498-505.
- Kinoshita N., Igarashi M., Ikeno S., Hori M. and Hamada M. (1999).** - *Saccharothrix tangerinus* sp. nov., the producer of the new antibiotic formamicin: taxonomic studies. *Actinomycetologica*, **13**, 20-31.
- Kirby J.P., Maise W.M., Testa R.T. and Labeda D.P. (1987).** - New antibacterial LL – C 19004 cpd-prepd. by fermentation of *Saccharothrix espanaensis*. U.S., **4**, 699-790.
- Kobayashi M., Nagasawa T. and Yamada H. (1992).** - Enzymatic synthesis of acrylamide: a success not yet over. *Trends Biotechnol.*, **10**, 402-408.
- Koguchi Y., Khono J., Suzuki S., Takahashi K., Ohnuki T. and Komatsubara S. (1999).** - TMC-86A, B and TMC-96, new proteasome inhibitors from *Streptomyces* sp. TC 1084 and 98 *Saccharothrix* sp. TC 1094. I. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **52**(12), 1069-76.

- Kurahashi K., Yamada M., Mori K., Fujikawa K., Kambe M., Imae E., Takahashi H. and Sakamoto Y. (1969). - Biosynthesis of cyclic oligopeptide. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **34**, 815-826.
- Küster E. and Neumeier W. (1981). – Halotolerance in some streptomycetes producing tetracyclines. Zbl. Bakt. Suppl., **11**, 315-319.
- L-
- Labeda D.P., Testa R.T., Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1984). - *Saccharothrix*: a new genus of the Actinomycetales related to *Nocardiosis*. Int. J. Syst. Bacteriol., **34**, 426-431.
- Labeda D.P. (1989). - Genus *Saccharothrix* Labeda et al. 1984. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4, Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds). Williams and Wilkins Co., Baltimore. pp. 2599-2601.
- Labeda D.P. and Lechevalier M.P. (1989). - Amendment of the genus *Saccharothrix* Labeda et al. 1984 and descriptions of *Saccharothrix espanaensis* sp. nov., *Saccharothrix cryophilis* sp. nov., and *Saccharothrix mutabilis* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., **39**, 420-423.
- Labeda D.P. and Lyons A.J. (1989). - *Saccharothrix texasensis* sp. nov. and *Saccharothrix waywayandensis* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., **39**, 355 - 358.
- Labeda D.P. and Kroppenstedt R.M. (2000). - Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa: proposal for *Actinosynnemataceae* fam. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **50**, 331-336.
- Labeda D.P., Hatano K., Kroppenstedt R.M. and Tamura T. (2001). - Revival of the genus *Lentzea* and proposal for *Lechevalieria* gen. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **51**, 1045-1050.
- Lacey J. (1973). - Actinomycetes in soils, composts and fodders. Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser., **2**, 231-51.
- Lacey J. (1997). - Actinomycetes in composts. Ann. Agric. Environ. Med., **4**, 113-121.
- Lam K.S., Schroeder D.R., Veitch J.M., Colson K.L., Matson J.A., Rose W.C., Doyle T.W. and Forenza S. (2001). - Production, isolation and structure determination of novel fluorindolocarbazoles from *Saccharothrix aerocolonigenes* ATCC 39243. J. Antibiot., **54**, 1-9.
- Lamari L., Zitouni A., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Lebrihi A., Lefebvre G., Seguin E. and Tillequin F. (2002a). - New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233 – I. Taxonomy, production, isolation and biological properties. J. Antibiot., **55**, 696-701.
- Lamari L., Zitouni A., Dob T., Sabaou N., Lebihi A., Germain P., Seguin E. and Tillequin F. (2002b). - New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. II. Physicochemical properties and structure elucidation. J. Antibiot., **55**, 702-707.
- Lamari L. (2006). - Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat, E.N.S. de kouba, 176 p.

- Lamsaïf D. (1992).** - Effects des sources d'azote sur la biosynthèse de la spiramycine chez *Streptomyces ambofaciens*. Etude des enzymes impliquées dans l'assimilation des ions ammonium. Thèse de Doctorat de l'INPL de Nancy.
- Larpent J.P. et Sanglier J.J. (1989).** - Biotechnologie des antibiotiques. Masson, Paris, p. 481.
- Laskin A.I. and Lechevalier, H. (1984).** - Handbook of Microbiology. Vol. 3, CRC Press.
- Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G. and Marinelli F. (2000).** - Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*, **78**, 399-405.
- Leben C. and Keitt G.W. (1954).** - Antibiotics and plant disease, effect of antibiotics in control of plant diseases. *J. Agric. Food Chem.*, **2**, 234-239.
- Lebrihi A., Germain P. and Lefebvre G. (1987).** - Phosphate repression of cephamycin and clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 130-135.
- Lebrihi A., Lefebvre G. and Germain P. (1988).** - Carbon catabolite regulation of cephalosporin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 44-51.
- Lebrihi A., Lamsaïf D., Lefebvre G. and Germain P. (1992).** - Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 382-387.
- Lechevalier M.P. (1981).** - Ecological associations involving actinomycetes. In: *Actinomycetes*. Shaal and Pulverer (Eds.). *Zbl. Bakt. suppl.*, **11**, 159-166.
- Lee I.H., Fredrickson A.G. and Tsuchiya H.M. (2003).** - Diauxic growth of *Propionibacterium shermanii*. *Appl. Microbiol.*, **28**, 831-835.
- Lee M., Henry M. and Silver P. A. (1996).** - A protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm is an important mediator of RNA export. *Genes Dev.*, **10**, 1233-1246.
- Lee S.H. (1997).** - Ammonium ion affecting tylosin production by *Streptomyces fradiae* NRRL 2702 in continuous culture. *Lett. Appl. Microbiol.*, **25**, 349-352.
- Lewis J.C. and Michener H.D. (1954).** - Antibiotics in food processing, additives accelerating death spores by heat. *J. Agric. Food Chem.*, **2**, 298-302.
- Li B., Lyle M. P. A., Chen G., Li J., Hu K., Tang L., Alaoui-Jamali M. A. and Webster J. (2007).** - Substituted 6-amino-4H-[1,2]dithiolo[4,3-b]pyrrol-5-ones: Synthesis, structure-activity relationships, and cytotoxic activity on selected human cancer cell lines. *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 4601-4608.
- Li B. and Walsh C. T. (2010).** - Identification of the gene cluster for the dithiopyrrolone antibiotic holomycin in *Streptomyces clavuligerus*. [Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA](#) (PNAS), **107**, 19731-19735.
- Li J., Chen G. and Webster M. (1995).** - Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont. *J. Nat. Prod.*, **55**, 1081-1086.

- Li J., Chen G. and Webster M. (1996).** - N-(indol-3-ylethyl)-2'-hydroxy-3'-methylpentanamide, a novel indole derivative from *Xenorhabdus nematophilus*. *J. Nat. Prod.*, **59**, 1157-1158.
- Li H., Lu W., Zhang Y., Jin W., Tao P., Liu X., He Y. and Zeng Y. (1992).** - Isolation and characterization of mutactimycin-producing mutant. *Weishengwu Xuebao*, **32**, 353-358.
- Lilley G. Clark A.E. and Lawrence G.C. (1981).** - Control of the production of cephamycin C and thienamycin by *Streptomyces cattleya* NRRL 8057. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **31**, 127-134.
- Liras P., Asturias J.A. and Martín J.F. (1990).** - Phosphate control sequences involved in transcriptional regulation of antibiotic biosynthesis. *Tibtech.*, **8**, 184-189.
- Litzka O., Then B. K., Van den B. J., Steidl S. and Brakhage A.A. (1999).** -Transcriptional control of expression of fungal beta-lactam biosynthesis genes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **75**, 95-105.
- Lombardi P. and Crisanti A. (1997).** - Antimalarial activity of synthetic analogues of distamycin. *Pharmacol. Ther.*, **76**, 125-133.
- Lounes A., Lebrihi A., Benslimane C., Lefebvre G. and Germain P. (1995).** - Regulation of spiramycin synthesis in *Streptomyces ambofaciens*: Effect of glucose and inorganic phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 204-211.
- M-
- Magasanik K. B. (1992).** - Regulation of nitrogen-utilization. *In*: Jones, E. W., Pringle, J. R., Broach, J. R. (eds.) *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, **2**, 283-317.
- Marion O., Gao X., Marcus S. and Hall D. G. (2009).** - Synthesis and preliminary antibacterial evaluation of simplified thiomarinol analogs. *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 1006-1017.
- Marshall V.P., Mc Wethy S.J., Visser J., Cialdella J.I. and Laborde A.L. (1987).** - Fermentation technology for the production of antibiotics from actinomycetes, the example of paulomycin. *J. Ind. Microbiol.*, **28**, 105-113.
- Martín J. F. and Demain A.L. (1980).** - Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.*, **44**, 230-251.
- Martin J. F. and Liras P. (1989).** - Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Ann. Rev. Microbiol.*, **43**, 173-206.
- Matsuo N., Negishi A. and Negishi Y. (2003).** - Jpn. Kokai Tokkyo Koho, p. 6.
- Matteo C. C., Glade M., Tanaka A., Piret J. and Demain A. L. (1975).** - Microbiological studies on the formation of gramidicin S synthetase. *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 129-142.
- Mc Inerney B. V., Gregson R. P., Lacey M. J., Akhurst R. J., Lyons G. R., Rhods S. H., Smith D. R. J., Engelhardt L. M. and White A. H. (1991).** - Biologically

- active metabolites from *Xenorhabdus* spp. Part 1. Dithiopyrrolone derivatives with antibiotics activity. *J. Nat. Prod.*, **54**, 774-784.
- Mc Kenna F., EL-Tarabily K.A., Petrie S., Chen C. and Dell B. (2002).**- Application of actinomycetes to soil to ameliorate water repellency. *Lett. Appl. Microbiol.* **35**, 107-112.
- Meklat A. (2004).** - Effet des antibiotiques de deux souches d'actinomycètes sur la maladie tache chocolat et l'antracnose de la fève et sur la fusariose vasculaire du lin. Magister de microbiologie, E.N.S. de Kouba, 97 p.
- Melchior D.L. and Steim J.M. (1977).** – Control of fatty acid composition of *Acholeplasma laidlawii* membranes. *Biochem. Biophys. Acta.*, **466**, 148-159.
- Merrouche R. (2000).** - Influence d'une souche de *Saccharothrix* (*Actinomycetales*) et de son antibiotique, la thiolutine, sur l'expression de la fusariose vasculaire de quelques plantes cultivées. Magister de microbiologie, E.N.S. de Kouba, 101p.
- Minamiguchi K., Kumagai H., Maduda T., Kawada M., Ishizuka M. and Takeuchi T. (2001).** - Thiolutin, an inhibitor of huvec adhesion to vitronectin, reduces paxillin in huvecs and suppresses tumor cell-induced angiogenesis. *Int. J. Cancer*, **93**, 307-316.
- Misato T. (1982).** - Present status and futur prospects of agricultural antibiotics. *J. pesticides Sci.*, **7**, 301-305.
- Miyairi N., Miyoshi T., Aoki H., Kohsaka M., Ikuushima H., Kunugita K., Sakai H. and Imanaka H. (1970).** - Studies on thiopeptin antibiotics. I. Characteristics of thiopeptin B. *J. Antibiot.*, **23**, 113-119.
- Mo S ., Sydor P.K ., Corre C ., Alhamadsheh M.M ., Stanley A.E ., Haynes S.W ., Song L ., Reynolds K.A . and Challis G.L . (2008).** - Elucidation of the *Streptomyces coelicolor* pathway to 2-undecylpyrrole, a key intermediate in undecylprodiginine and streptorubin B biosynthesis. *Chem. & Biology.*, **2** ,137- 48.
- Moncheva P., Tishkov S., Dimitrova N., Chipeva V., Antonova-Nikolova S. and Bogatzevska N. (2002).** - Characteristics of soil actinomycetes from Antarctica. *J. Cult. Collect.*, **3**, 3-14.
- Moreira K.A., Albuquerque B.F., Teixeira M.F.S., Porto A.L.F. and Lima J. L. (2002).**- Application of protease from *Nocardioopsis* sp. as a laundry detergent additive. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 307-312.
- Mousslim J., David L., Pétel G. and Gendraud M. (1993).** - Effect of exogenous methyl oleate on time course of some parameters of *Streptomyces hygroscopicus* NRRL B-1865 culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **39**, 585-588.
- Murakami R., Tomikawa T., Shin-Ya K., Shinozaki J., Kajiura T., Seto H. and Hayakawa Y. (2001).** -Ammocidin, a new apoptosis inducer in ras-dependant cells from *Saccharothrix* sp. I. Production, isolation and biological activity. *J. Antibiot.*, **54**, 710-713.
- Murneek A. E. (1952).** - Thiolutin as a possible inhibitor of fire blight. *Phytopathology*, **42**, 57-58.

-N-

- Naik S.R., Harindran J. and Varde A.B. (2001).** - Pimpirine, an extracellular alkaloid produced by *Streptomyces* CDRIL-312: fermentation, isolation and pharmacological activity. *J. Biotechnol.*, **88**, 1-10.
- Nakamura K., Kimura T. and Takahashi E. (1999).** - Synthesis and biological activities of phosphonothrixin. Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements. *Naturstoffen. Angew. Chem.*, **69**, 50-58.
- Newman D.J., Cragg G.M. and Snader K.M. (2003).** - Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.*, **66**, 1022-1037.
- Nickell L.G. and Finlay A.C. (1954).** - Growth modifiers, antibiotics and their effects on plant growth. *J. Agric. Food Chem.*, **2**, 178-182.
- Niemi J. (1995).** - Hybrid anthracycline antibiotics: analysis and application of rhodomycine biosynthetic genes from *Streptomyces purpuracens*. PH.D. Thesis, Univ. Turku (Finland).
- Niladevi K.N. and Prema P. (2005).** - Mangrove actinomycetes as the source of ligninolytic enzymes. *Nippon Hosenkin Gakkaishi*, **19**, 40-47.
- Ninet L. and Verrier J. (1960).** - Production of spiramycin. United States Patent (N°2,943,023).
- Ninomiya Y.T., Yamada Y., Shirai H., Onitsuka M., Suhara Y. and Maruyama H.B. (1980).** - Biochemically active substances from microorganisms. V. Pyrrothines, potent platelet aggregation inhibitors of microbial origin. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **28**, 3157-3162.
- Novikova L.M. and Makarevich V.G. (1984).** - Inter-relationship of dehydrogenase activity of mycelium of *Streptomyces aureofaciens* and its capacity for tetracycline biosynthesis. *Antibiotiki*, **29**, 735-740.
- O-
- O'hagan D. (1991).** - The polyketide metabolites. Ellis Horwor (Eds.) New York, P. 176.
- Okamura K., Soga K., Shimauchi Y., Ishikura T. and Lein J. (1977).** - Holomycin and N-propionylholothin, antibiotics produced by a cephamycin C producer. *J. Antibiot.*, **30**, 334-336.
- Okazaki H., Ono H., Yamada K., Beppu T. and Arima K. (1973).** - Relationship among cellular fatty acid composition, amino acid uptake and neomycin formation in a mutant strain of *Streptomyces fradiae*. *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2319-23.
- Oki T., Tenmyo O., Hirano M., Tamatsu K. and Kamei H. 1990.**- Pramidicins A, B and C: new antifungal antibiotics. II. *In vitro* and *in vivo* biological activities. *J. Antibiotics*, **43**, 763-770.
- Oliva B, O'Neill A, Wilson. J.M, O'Hanlon. P.J. and Chopra I. (2001).** - Antimicrobial Properties and Mode of Action of the Pyrrothine Holomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 532-539.
- Omura S., Tanaka Y., Takahashi Y. and Iwai Y. (1980).** - Stimulation of production of macrolide antibiotics by magnesium phosphate and related insoluble materials. *J. Antibiot.*, **33**, 1568-1569.

- Omura S., Taki A., Matsuda K. and Tanaka Y. (1984a).** - Ammonium ions suppress the amino acid metabolism involved in the biosynthesis of protylonolide in mutant of *Streptomyces fradiae*. *J. Antibiot.*, **37**, 1362-1369.
- Omura S., Tanaka Y., Hamada H. and Masuma R. (1984b).** - Effect of ammonium ion, inorganic phosphate and amino acids of the biosynthesis of protylonolide, a precursor of tylosin aglycone. *J. Antibiot.*, **37**, 494-502.
- O'Neill A., Oliva B., Storey C., Hoyle A., Fishwick C. and Chopra I. (2000).** - RNA polymerase inhibitors with activity against rifampicin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 3163-3166.
- Otoguro M., Tamura T. Suzuki K-I. and Hayakawa M. (2009).** - *Saccharothrix violaceirubra* sp. nov., isolated from soil and plant litter. *Intern. J. Syst. & Evol. Microb.*, **59**, 1054-1057.
- P-
- Paik S., Park Y.H., Suh S.II. Kim H.S., Lee I.S. Park M.K. Lee C.S. and Park S.H. (2001).** - Unusual cytotoxic phenethylamides from *Xenorhabdus nematophilus*, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **22**, 372-374.
- Pass L. and Raczynska-bojanowsks K. (1969).** - Arginine in viomycin biosynthesis. *Acta. Biochim. Pol.*, **16**, 355-367.
- Patke D. and Dey S. (1998).** - Proteolytic activity from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain SDP4. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**, 171-174.
- Patent U.K. Pat., 1990, 2 232 668, CA, 115, 112815u. (1993).** - In: Bush, B. D., Fitchett, G. V. Gates, D. A. and Langley, D.
- Peltola J.S.P., Anderson M.A., Kampf P., Auling G., Kropensstedt R.M., Busse H.J., Salkinoja-Salonen M.S. and Rainey F.A. (2001).** - Isolation of toxigenic *Nocardiosis* strains from indoor environments and description of two new *Nocariopsis* species, *N. exhalans* sp. nov. and *N. umidischholae* sp. nov. *Appl. Env. Microbiol.*, **67**, 4293-4304.
- Pensikovo G. A. and Levitov M. M. (1970).** - A study on transaminidase activity with respect to streptomycin biosynthesis. *Biologiya*, **39**, 337-342.
- Peroz-Collignon A. (1993).** - Biosynthèse de la spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*: études cinétiques en discontinu et en semi-continu de l'influence de précurseurs du platénolide en présence de glycérol. Thèse de Doctorat de l'INPL-Nancy.
- Pfefferle C., Theobald U., Gürtler H. and Fiedler H-P. (2000).** - Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *J. Biotechnol.*, **80**, 135-142.
- Piepersberg W. and Distler J. (1997).** - Aminoglycosides and sugar components in other secondary metabolites. In: Rehn H-J, Reed G, editors. Products of secondary metabolism, Vol. 7. Weinheim: VCH, pp.397-488.
- Piret J.M. and Demain A.L. (1988).** - Actinomycetes in biotechnology: an overview in: Goodfellow, M., Mordarski, M and Williams S.T. (Edn.) Actinomycetes in biotechnology. Academic Press, London, pp. 461-482.

- Pospíšil S., Cimburkova E., Krumphanzl V. and Vanek Z. (1985).** - Effect of precursors on biosynthesis of monensins A and B. *Folia Microbiol. (Praha)*, **30**(1), 30-3.
- Pregolato M., Terreni M., Ubiali D., Pagani G., Borgna P., Pastoni F. and Zampollo F. (2000).** - 3H-[1,2]dithiolo[3,4-b]pyridine-3-thione and its derivatives synthesis and antimicrobial activity. *Il Farmaco*, **55**, 669-679.
- Prescott LM., Harley J.P., Klein D.A., Bacq-Calberg C.M. et Dusart J., (2002).** - Microbiologie. De Boeck Université. 1147 p.
- R-
- Raczynska-Bojanowska K., Ruczaj Z., Sawnor-Korszynska D. and Rafalski A. (1973).** – Limiting reactions in activation of acyl units in biosynthesis of macrolide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **3**, 162-167.
- Rapilly F., 1969.**- Technique de mycologie en pathologie végétale. *Ann. Epiphyties*. 102p.
- Raty K., Kantola J., Hautala A., Hakala J., Ylihonko K. and Mantsala P. (2002).** - Cloning and characterization of *Streptomyces galilaeus* aclacinomycins polyketide synthase (PKS) cluster. *Gene.*, **293**, 115-122.
- Reeves A.R., Cernota W.H., Brikun I.A., Wesley R.K. and Weber J.M. (2004).**- Engineering precursor flow for increased erythromycin production in *Aeromicrobium erythreum*. *Metab. Eng.*, **6**, 300-312.
- Reeves A.R., Brikun I.A., Cernota W.H., Leach B.I., González M.C. and Weber J.M. (2006).** -Effects of methylmalonyl-CoA mutase gene knockouts on erythromycin production in carbohydrate-based and oil-based fermentations of *Saccharopolyspora erythraea*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 600-609.
- Rokem J.S., Eliasson Lantz A. and Nielsen J. (2007).** - Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Nat. Prod. Rep.* **24**, 1262-1287.
- Roubos J.A., Krabben P., Luiten R.G.M., Babuska R. and Heijnen J.J. (2001).**- A semi-stoichiometric model for *Streptomyces* fed-batch cultivation with multiple feeds. 8th International conference on computer applications in biotechnology, modeling and control of biotechnological processes,. Quebec, Canada.
- S-
- Sabaou N., Amir H. et Bounaga D. (1980).** - Le palmier dattier et la fusariose. X. - Dénombrement des actinomycètes de la rhizosphère; leurs antagonisme vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Killian et Maire) Gordan. *Ann. Phytopathol.*, **12**, 253-257.
- Sabaou N. (1988).** - Contribution à l'étude des actinomycètes des sols des palmeraies algériennes: systématique et écologie. Thèse de Doctorat Es Sciences Naturelles, option Microbiologie, USTHB, Alger.192 p.
- Sabaou N., Hacène H., Bennadji A., Bennadji H. et Bounaga N. (1992).** – Distribution quantitative et qualitative des actinomycètes dans les horizons de sol de surface et profonds d'une palmeraie algérienne. *Can. J. Microbiol.*, **38**, 1066-1073.

- Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A, Lamari L., Bennadji H., Lefebvre G. et Germain P. (1998).** - Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*, **9**, 147-153.
- Sallam L., El-Abyad M.S. El-Refai A. H., El-Menofi H.A. and Adham N.Z. (1995).** - Bioconversion of 19-nortestosterone by *Rhodococcus* sp. DSM 92-344. I: optimization of transformation parameters. *Process Biochem.* **30**, 25-34.
- Sanglier J.J. (1990).** - Mycotoxines, mycoses et mycoallergies. *In: Moisissures utiles et nuisibles: Importance industrielle.* Botton B. (Eds). 2nd édition, Paris, Mason, pp. 437-453.
- Schachtner J.E., Nienaber J. Stachel H.D. and Waisser K. (1999).** - Fused 1,2-dithioles, V: Carbenoid anions as intermediates in reactions of pyrrothines and their heteroanalogues, *Pharmazie*, **54**, 335-340.
- Schaffner C.P. (1954).** - Studies on orchid media inhibitory to fungi. *American Orchid Society Bulletin*, 798-802.
- Schumacher R.W., Harrigan B.L. and Davidson B.S. (2002).** - Kahakamides A and B, new neosidomycin metabolites from a marine-derived actinomycete. *Tetrahedron Letters*, **42** (31), 5133-5135.
- Seto H. and Shimazu A. (1992).** - Novel anticancer cyclic compound CF-24 and its manufacture with *Saccharothrix* species. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho.*, p. 7.
- Seepersaud M., Kettunen M., Abu-Surrah A.S., Voelter W. and Al-Abed Y. (2002).** - Hydroformylation of glycals using a rhodium(I)(acac)(CO)₂ catalyst. *Tetrahedron Letters*, **43**, 8607-8609.
- Seneca H., Kane J. H. and Rockenbach J. (1952).** - Bacterial, protozoïdal and fungicidal properties of thiolutin. *Antibiot. Chemother.*, **2**, 375-360.
- Shapiro S. (1989).** - Nitrogen assimilation in actinomycetes and the influence of nitrogen nutrition on actinomycete secondary metabolism. *In: regulation of secondary metabolism in Actinomycetes*, pp. 135-211. Edited by S. Shapiro. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Shiozawa H., Kagasaki T., Kinoshita T., Haruyama H., Domon H., Utsui Y., Kodama K. and Takahashi S. (1993).** - Thiomarinol, a new hybrid antimicrobial antibiotic produced by a marine bacterium. Fermentation, isolation, structure, and antimicrobial activity. *J. Antibiot.*, **46**, 1834-1842.
- Shiozawa H. and Takahashi S. (1994).** - Configurational studies on thiomarinol. *J. Antibiot.*, **47**, 851-853.
- Shiozawa H., Kagasaki T., Torikata N., Hata T., Furukawa Y. and Takahashi S. (1995).** - Thiomarinols B and C, new antimicrobial antibiotics produced by a marine bacterium. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **48**(8), 907-909.
- Shiozawa H., Shimada A. and Takahashi S. (1997).** - Thiomarinols D, E, F and G, new hybrid antimicrobial antibiotics produced by a marine bacterium; isolation, structure, and antimicrobial activity. *J. Antibiot.*, **50**, 449-452.

- Shirling E. B. and Gottlieb D. (1966).**- Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44**, 313-340.
- Sikyta B., Slezak J. and Herold M. (1961).** - Growth of *Streptomyces aureofaciens* in continuous culture. *Appl. Microbiol.*, **9**, 233-238.
- Singh M. P., Petersen P.J., Weiss W.J. Kong F. and Greenstein M. (2000).** - Saccharomicins, novel heptadecaglycoside antibiotics produced by *Saccharothrix espanaensis*: antibacterial and mechanistic activities. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 2154-2159.
- Singh S. B., Genilloud O. and Pelaez F. (2010).** - NP structural diversity II. Secondary metabolite sources, evolution and selected molecular structures: terrestrial microorganisms—bacteria. In: Mander L, Liu H-W (eds) *Comprehensive natural products II. Chemistry and biology*. Elsevier, UK, pp 109–140.
- Sivasubramanian N. and Jayaraman R. (1976).** - Thiolutin resistant mutants of *Escherichia coli* are they chain initiation mutants. *Mol. Gen. Genet.*, **145**, 89-96.
- Slininger P.J. and Jackson M.A. (1992).** – Nutritional factors regulating growth and accumulation of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 388-392.
- Smith G.M. and Calam C.T. (1980).** - Variations in inocula and their influence on the productivity of antibiotic fermentations. *Biotechnol. Lett.*, **2**, 261–266.
- Solé M., Rius N. and Lorén J. G. (2000).** - Rapid extracellular acidification induced by glucose metabolism in non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Int. Microbiol.*, **3**, 39-43.
- Spížek J. and Tichý P. (1995).** - Some aspects of overproduction of secondary metabolites. *Folia Microbiol.*, **40**, 43-50.
- Stachel H-D., Eckla E., Immerz-Winkler E., Kreinera C., Wolfgang Weigand W., Christian Roblb C., Wünsch R., Dickc S. and Drescher N. (2002).** - Synthesis and Reactions of New Dithiopyrroles. *Helv. Chim. Acta*, **85**, 4453-447.
- Stachel H-D., Eckl E., Immerz-Winkler E., Kreiner C., Weigand W., Robl C., Wünsch R., Dick S. and Drescher N. (2003a).** - Synthesis and reactions of new dithiopyrrolones. *Helv. Chim. Acta*, **85**, 4453-4467.
- Stachel H-D., Immerz-Winkler E., Poschenrieder H., Windt A., Weigand W., Drescher N. and Wünsch R. (2003b).** - Metal complexes of functionalized sulfur-containing ligands, Part XIX, Synthesis and reactions of new pyrroloisothiazoles. *Helv. Chim. Acta*, **86**, 2471-2480.
- Stahl P., Seidel H., Von der Eltz H., Wilhelms O.H. and Roesch A. (1988).** - Pyrrothine derivatives and pharmaceutical use thereof, U. S. Patent 4,760,077.
- Stanley A. E., Walton L. J., Zerikly M. K., Corre C. and Challis G. L. (2006).** - Elucidation of the *Streptomyces coelicolor* pathway to 4-methoxy-2,2'-bipyrrrole-5-carboxaldehyde, an intermediate in prodiginine biosynthesis. *Chem. Commun.*, 3981–3983.
- Stead P. (1997).** - Natural Products drug discovery. New technologies and approaches. *Drug Discov. Today*, **2**, 256-259.

- Strohl WR, Woodruff HB, Monaghan RL, Hendlin D, Mochales S and Demain A. L. (2001).** - The history of natural products research at Merck & Co., Inc. *SIM News*, **51**, 5-19.
- Strub C. (2008).** - Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat, Université de Toulouse, INP-ENSAT (France), 174 p.
- Sturdikova M., Proska B., Uhrín D. and Fuska J. (1990).** - Regulation of biosynthesis of thiolutin and aureothricin in *Streptomyces kasugaensis*. *Folia Microbiol. (Praha)*, **35**, 278-283.
- Sugawara T., Tanba T., Kaneda Y., Yamamoto H. and Adachi T. (1999).** - Antifungal thiazolopyridine compound from *Saccharothrix* species and pharmaceutical compositions containing it. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho.*, p.10.
- Suzuki K., Sato T., Morioka M., Nagai K., Abe K., Yamaguchi H., Saito T., Ohmi Y. and Susaki K., (1991).** - Tetrazomine, a new antibiotic produced by an actinomycete strain. Taxonomy, fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot.*, **44**, 479-485.
- Svensson M.-L., Prodyut R. and Gatenbeck S. (1983).** -Glycerol catabolite regulation of D-cycloserine production in *Streptomyces garyphalus*. *Arch. Microbiol.*, **135**, 191-193.
- T-
- Takahashi A., Hotta K., Saito N., Morioka M., Okami Y. and Umuzawa H. (1986).** -Production of novel antibiotic, dopsisamine, by a new subspecies of *Nocardioopsis mutabilis* with multiple antibiotic resistance. *J. Antibiot.*, **39**, 175-183.
- Takahashi E., Kimura T., Nakamura K., Arahira M. and Iida M. (1995).** - Phosphonothrixin, a novel herbicidal antibiotic produced by *Saccharothrix* sp. ST-888. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot.*, **48**, 1124-1129.
- Takeuchi M., Takahashi S., Enokita R., Sakaida Y., Haruyama H., Nakamura T., Katayama T. and Inukai M., (1992).** - Galacardins A and B, new glycopeptide antibiotics. *J. Antibiot.*, **45**, 297-305.
- Tanaka Y., Taki A., Masuma R. and Omura S. (1985).** – Mechanism of nitrogen regulation of protylonolide biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *J. Antibiot.*, **39**, 813-821.
- Tang L., Zhang Y.X. and Hutchinson C.R. (1994).** - Amino acid catabolism and antibiotic synthesis: valine is source for precursors for macrolide biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens* and *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.*, **176**, 6107-6119.
- Tanner F. W., Means J. A. and Davisson J. W. (1950).** - Thiolutin, an antibiotic produced by certain strains of *Streptomyces albus*. 118th Meeting, American Chemical Society. 7-8.
- Ter Schure E.G., Van Riel N.A.W. and Verrips C.T. (2000).** - The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**, 67-83.

Thayer D.W., Heintz C.E., Marx J.N., Cox D.E. and Huff R. (1985). - Antibiotic production by *Streptomyces cinnamonensis* ATCC 12308. *Dev. Ind. Microbiol.*, **26**, 445.

Thiele-Bruhn S. (2003). - Pharmaceutical antibiotic compounds in soils. A review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **166**, 145-167.

Tomita K., Oda N., Hoshino Y., Ohkusa N. and Chikazawa H. (1991). - Fluvirucins A1, A2, B1, B2, B3, B4 and B5, new antibiotics active against influenza A virus. IV. Taxonomy on the producing organisms. *J. Antibiot.*, **44**, 940-8.

Trejo-Estrada S.R., Paszczyński A. and Crawford D.L. (1988). - Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. *J. Industr. Microbiol. Biotech.*, **21**, 81-90.

Trilli A., Crosseley M.V. and Kontakou M. (1987). - Relation between growth and erythromycin production in *Streptomyces erythreus*. *Biotechnol. Lett.*, **9**, 765-770.

Tsurumi Y., Ueda H., Hayashi K., Takase S., Nishikawa M., Kiyoto S. and Okuhara M. (1995). - WS75624 A and B, new endothelin converting enzyme inhibitors isolated from *Saccharothrix* sp. No. 75624. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J. Antibiot.*, **48**, 1066-1072.

-U-

Umezawa H., Maeda K. and Kosada H. (1949). - Isolation of a new antibiotic substance, aureothricin, from a strain of *Streptomyces*. *J. Antibiot. Ser. A.*, **02**, 107.

Untrau S., Lebrihi A., Germain P. and Lefebvre G. (1995). - Influence of growth rate and precursor availability on spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens*. *Can. J. Microbiol.*, **41**, 157-162.

-V-

Vandamme E.J. (1985). – Biotechnology of industrial antibiotics. Drugs and pharmaceutical sciences. Vol. 22. Marcel Dekker. New York, p. 808.

Vértesy L., Barbone F. P., Cashmen E., Decker H., Ehrlich K., Jordan B., Knauf M., Schummer D., Segeth M. P., Wink J. and Seibert G. (2001). - Pulraflavins, potent antitumor antibiotics from *Saccharothrix* sp. DSM 12931. *J. Antibiot.*, **54**, 718-729.

Vinig L. C. (1985). - Antibiotic biosynthesis. *Biotechnol. Adv.*, **3**, 171-194.

Von Daehne W., Godfredsen W. O. and Tybring L. (1969). - New antibiotics containing the 1,2-dithiolo[4,3-b]pyrrole ring system. *J. Antibiot.*, **22**, 233-236.

Von Daehne W., Jahnsen S., Kiril I., Larsen R. and Iorch H. (1984). - Fusidic acid: properties, biosynthesis and fermentation. *In: Biotechnology and industrial antibiotics.* Vandamme E.j. (Eds.). Marcel Dekker. New-york, Based. pp. 427-450.

Vonothini G., Murigan M., Sivakumar K. and Sudha S. (2008). - Optimization of protease production by an actinomycete strain, PS-18A isolated from an estuarine shrimp pond. *Afr. J. Biotechnol.*, **7**, 3225-3230.

Vu-Trang K. and Gray P.P. (1987). - Influence of ammonium on the biosynthesis of the macrolide antibiotic tylosin. *Enz. Microbiol. Technol.*, **9**, 590-593.

-W-

- Walker J.B. (1974).** - Biosynthesis of the monoguanidinated inositol moiety of bluensomycin. A possible evolutionary precursor of streptomycin. *J. Biol. Chem.*, **249**, 2397-2404.
- Wang J., Kodali S., Lee SH., Galgoci A., Painter R., DorsoK Racine F., Motyl M., Hernandez L., Tinney E., Colletti S.L., Herath K., Cummings R., Salazar O., Gonzalez I., Basilio A., Vicente F., Genilloud O., Pelaez F., Jayasuriya H., Young K., Cully DF. and Singh S. B. (2007).** - Discovery of platencin, a dual FabF and FabH inhibitor with in vivo antibiotic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **104**, 7612–7616.
- Wang L., Zhang Y., Lu Z., Shi Y., Liu Z., Maldonado L. and Goodfellow M. (2001).** - *Nocardia beijingensis* sp. nov., a novel isolate from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 1783-1788.
- Wang W., Wang F-O. and Wie D.Z. (2009).** - Characterization of P450 FcpC, the Enzyme Responsible for Bioconversion of Diosgenone to Isonuatigenone in *Streptomyces virginiae* IBL-14. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 4202–4205.
- Watve M.G., Tickoo R., Jog M.M. and Bhole B.D. (2001).** - How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.*, **176**, 386-390.
- Webster J.M., Li J. and Chen G. (2000).** - Anticancer property of dithiopyrrolones, U.S. Patent 6,020,360.
- Webster J.M., Chen G., Hu K. and Li J. (2002).** - Bacterial metabolites, *In: Entomopathogenic Nematology*, R. Gaugler (ed.). CAB International. p 99-114.
- Wei X., Yunxiang L. and Yinghua Z. (2006).** - Enhancement and selective production of oligomycin through inactivation of avermectin's starter unit in *Streptomyces avermitilis*. *Biotechnol. Lett.*, **28**, 911-916.
- Williams D.H. and Fleming I. (1989).**- Spectroscopic Methods in Organic Chemistry (fourth ed.), McGraw Hill, New York.
- Williamson N. R., Henrik T. Simonsen, H. T., Ahmed R. A., Goldet G., Slater H., Woodley L., Leeper F. J. and Salmond G. P. C. (2005).** - Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*: identification of a novel 2-methyl-3-n-amylypyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*. *Mol. Microbiol.*, **56**, 971-989.
- Winter H.F., Young H.C. (1955).** - Antibiotics in plant disease, comparative studies on control of fireblight in apple and pear. *J. Agric. Food Chem.*, **3**, 623-624.

-Y-

- Yajima T., Mason K.T. and Katz E. (1975).** - Branched-Chain amino acid substitutions in the biosynthesis of the antibiotic actinomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **7**, 773-780.

- Yala D., Merad A.S., Mohamedi D. et Ouar Korich M.N. (2001).** - Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, **91**, 5-12.
- Yamagishi S., Koyama Y., Fukakusa Y., Kyomura N., Ohishi J. I. Hamamichi N. and Arai T. (1971).** - On the metabolites of *Streptomyces luteoreticuliti* Katoh et Arai. Isolation of the metabolites. *Yakugaku Zasshi*, **91**, 351-357.
- Yamatodami S., T. Asahi T. Matsukura S. Ohmono and Abc M. (1970).** - Structure of rugulovasine A, B and their derivatives. *Agri. Biol. Chem.*, **34**, 485-487.
- Yang X-F., Zhang Z-M., Yang H-W. and Jiang H. (2001).** - Inhibition of metabolites from *Xenorhabdus nematophilus* against *Phytophthora infestans*, *J. Agri. Univ.*, 1-5.
- Yang X-F., Yang H-W. and Jiang H. (1998).** - The antibiotics of *Xenorhabdus* spp. against *Phytophthora boehmeriae*, *Chi. J. Bio. Control.*, **14**, 21-24.
- Yoshimura S., Tsurumi Y., Takase S. and Okuhara M. (1995).** - WS75624 A and B, new endothelin converting enzyme inhibitors isolated from *Saccharothrix* sp. No. 75624. II. Structure elucidation of WS75624 A and B. *J. Antibiot.*, **48**, 1073-1075.
- Z-
- Zhang C.W., Occi J., Masurekar P., Barrett J.F., Zink D.L., Smith S., Onishi R., Ha S.H., Salazar O., Genilloud O., Basilio A., Vicente F., Gill C., Hickey E.J., Dorso K., Motyl M. and Singh S.B. (2008). - Isolation, structure, and antibacterial activity of philipimycin, a thiazolyl peptide discovered from *Actinoplanes philippinensis* MA7347. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 12102–12110.
- Zhao J.J., Hua Y.J., Sun D.G., Meng X.X., Xiao H.S. and Ma X. (2006). - Genome-wide microRNA profiling in human fetal nervous tissues by oligonucleotide microarray. *Childs Nerv. Syst.* **22**, 1419-1425.
- Zentmyer G. A. (1955). - A laboratory method for testing soil fungicides, with *Phytophthora cinnamomi* as test organism. *Phytopathology*, **45**, 398-404.
- Zimmermann W., Winter B. and Broda P. (1988). - Xylanolytic enzyme activities produced by mesophilic and thermophilic actinomycetes grown on graminaceous xylan and lignocelluloses. *FEMS Microbiol. Lett.*, **55**, 181-185.
- Zitouni A. (1995). - Les genres *Nocardiopsis* et *Saccharothrix* (*Actinomycetales*) dans les sols sahariens: taxonomie numérique, extraction, purification et caractérisation de quelques antibiotiques synthétisés. Magister de microbiologie, E.N.S. de Kouba, 177 p.
- Zitouni A. (2004). – Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Nocardiopsis* et des *Saccharothrix* des sols sahariens et production de nouveaux antibiotiques par *Saccharothrix* sp. 103. Thèse de Doctorat, INP-ENSAT, 230 p.
- Zitouni A., Boudjella H., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2004a). - Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities. *J. Antibiot.*, **57**, 367-372.
- Zitouni A., Mathieu F., Coppel Y., Pont F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2004b). - Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103. II. Physico-chemical Properties and Structure Elucidation. *J. Antibiot.*, **57**, 373-378.

Zitouni A., Lamari L., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Gaouar A., Mathieu F., Lebrihi A. and Labeda D.P. (2004c). - *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., isolated from a saharan soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 1377-1381.

Zitouni A., Boudjella H., Lamari L., Badji B., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. (2005).- *Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Res. Microbiol.*, 156 (10), 984-993.

Annexes

Annexe1

Tests de corrélation COSY, HMBC et HSQC des nouvelles dithiopyrrolones secrétées par *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137

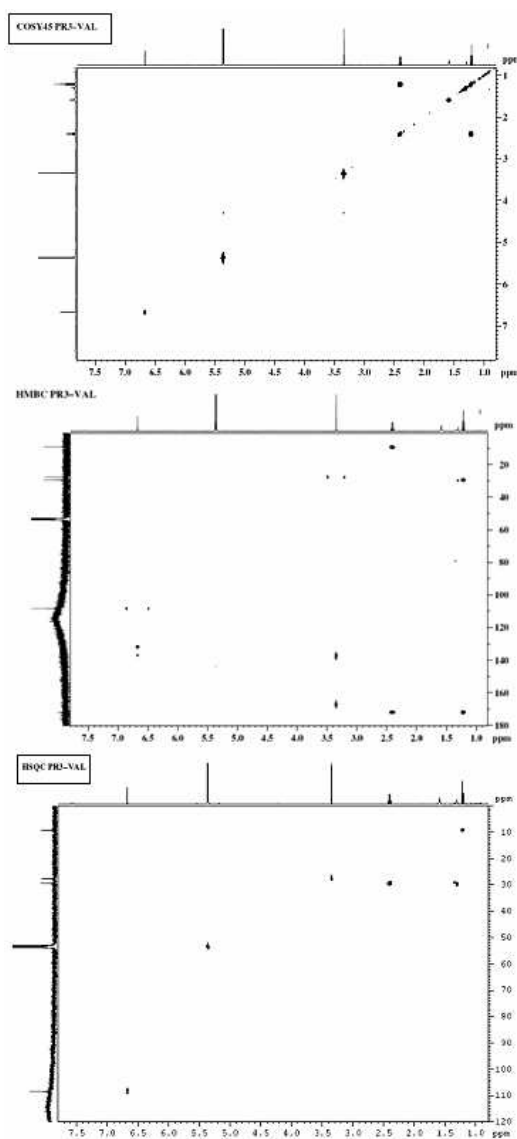


Figure 66. Tests de corrélation (COSY, HMBC et HSQC) de la dithiopyrrolone PR3.

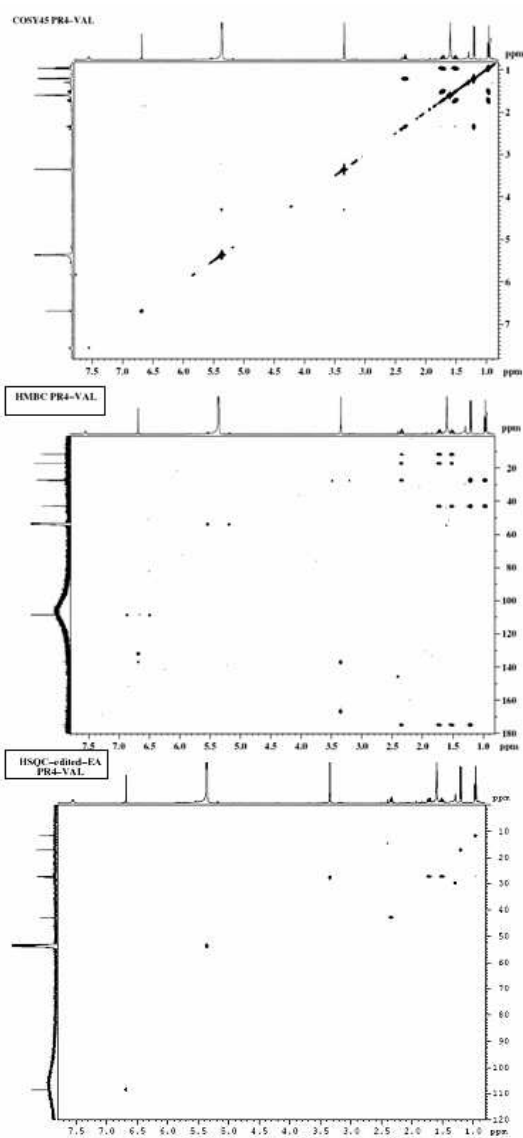


Figure 67. Tests de corrélation (COSY, HMBC et HSQC) de la dithiopyrrolone PR4.

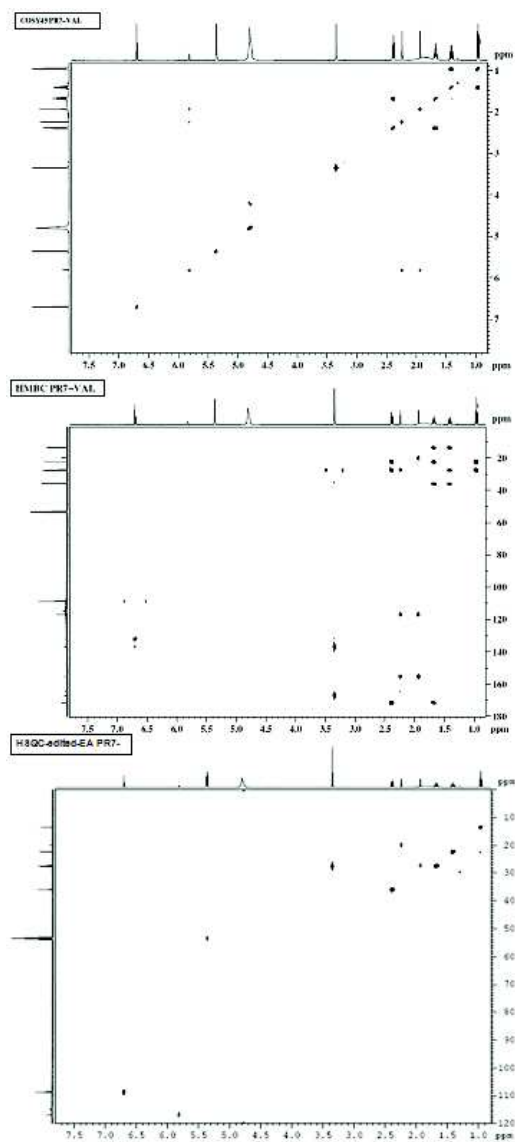


Figure 68. Tests de corrélation (COSY, HMBC et HSQC) de la dithiopyrrolone PR7.

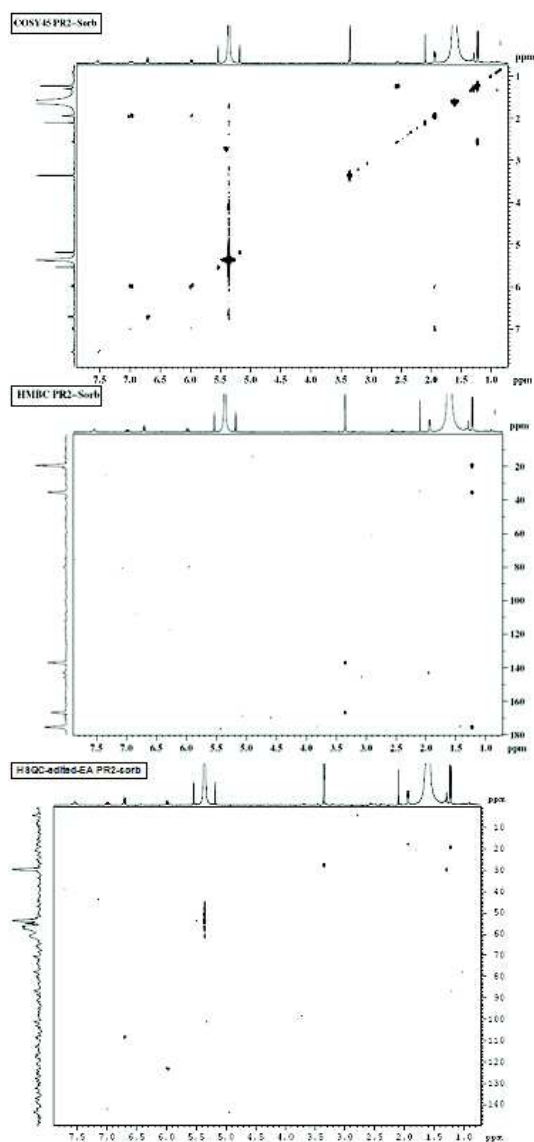


Figure 69. Tests de corrélation (COSY, HMBC et HSQC) de la dithiopyrrolone PR2.

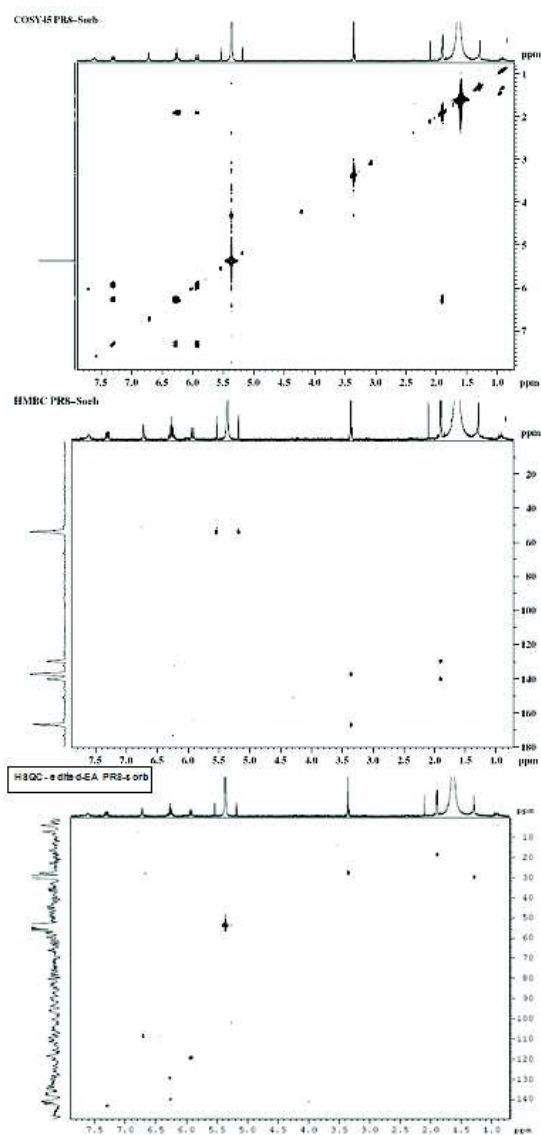


Figure 70. Tests de corrélation (COSY, HMBC et HSQC) de la dithiopyrrolone PR8.

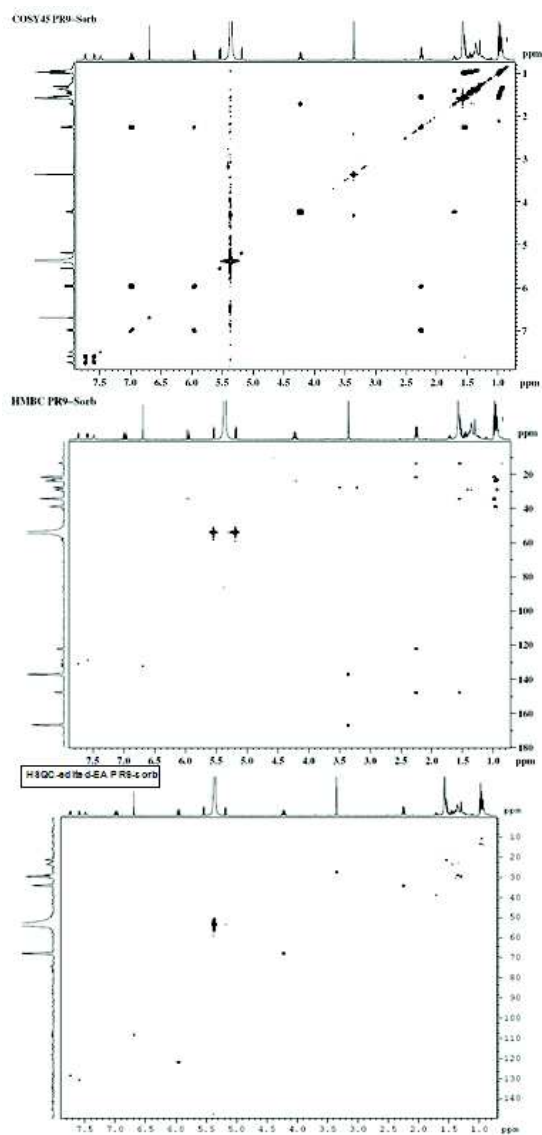


Figure 71. Tests de corrélation (COSY, HMBC et HSQC) de la dithiopyrrolone PR9.

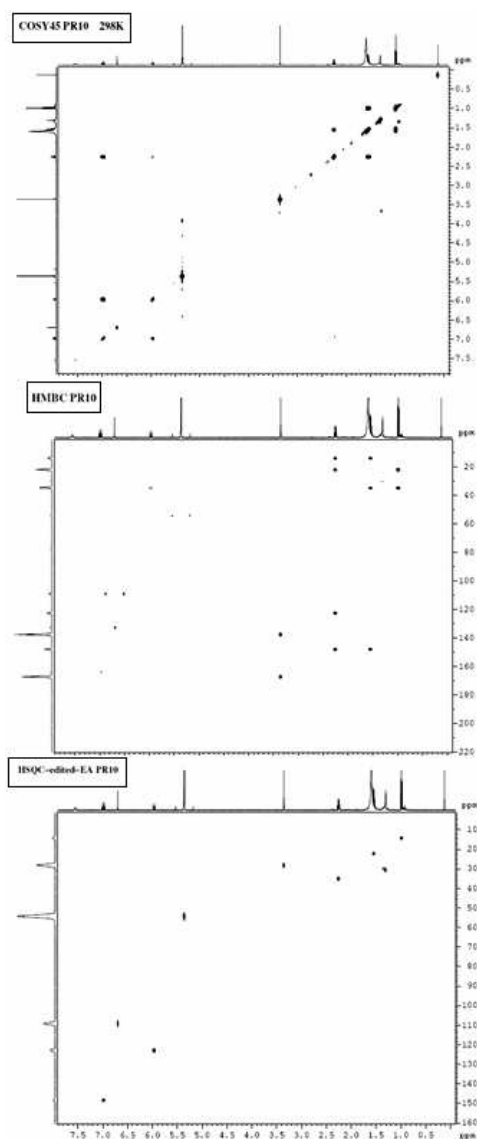


Figure 72. Tests de corrélation (COSY, HMBC et HSQC) de la dithiopyrrolone PR10.

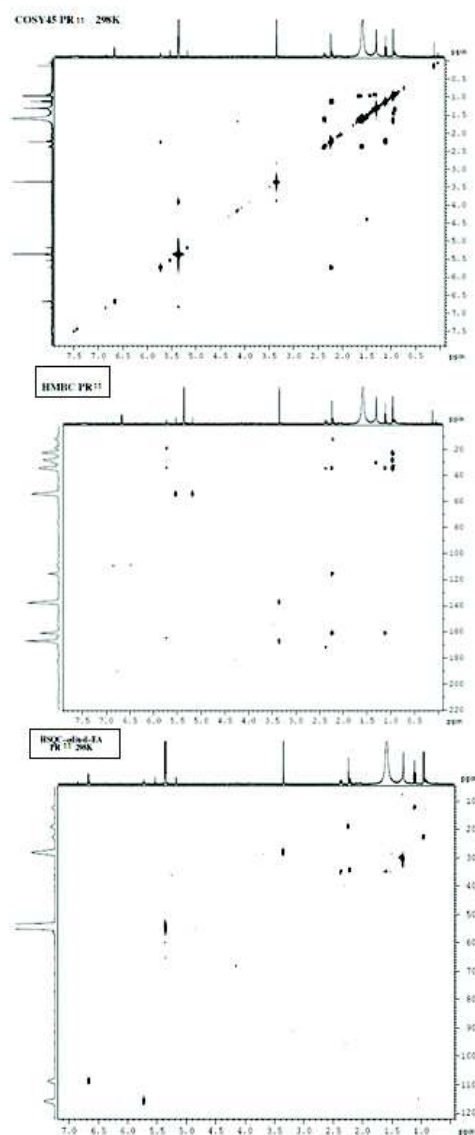


Figure 73. Tests de corrélation (COSY, HMBC et HSQC) de la dithiopyrrolone PR11.

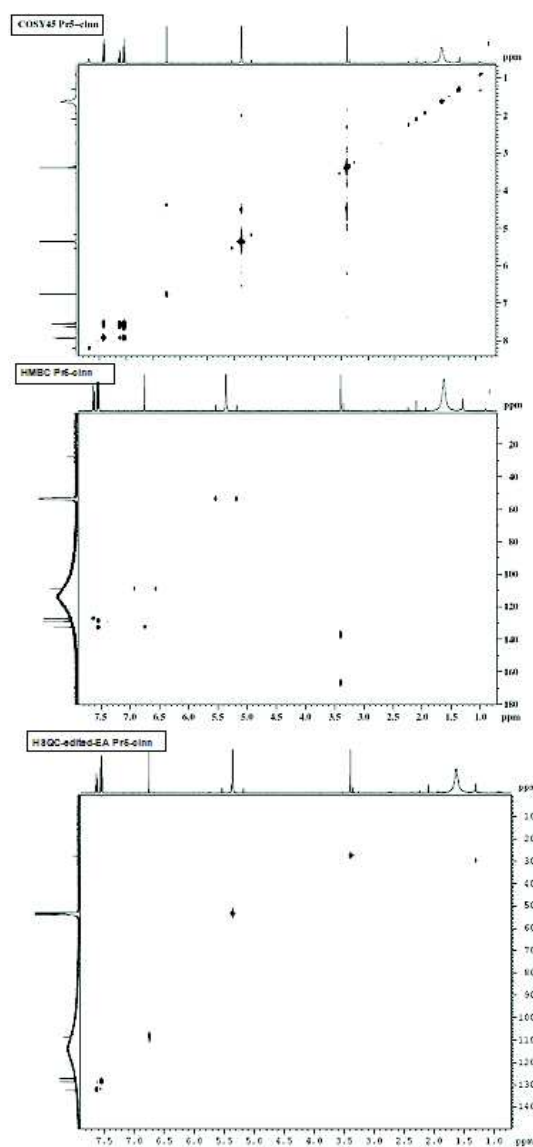


Figure74. Tests de corrélation (COSY, HMBC et HSQC) de la dithiopyrrolone PR5.

Annexe2

Publications parues:

- **Merrouche R., Bouras N., Coppel Y., Mathieu F., Monje M-C., Sabaou N. and Lebrihi A. (2010).** –Dithiopyrrolone Antibiotic Formation Induced by Adding Valeric Acid to the Culture Broth of *Saccharothrix algeriensis*. *J. Nat. Prod.*,73, 1164–166.
- **Merrouche R., Bouras N., Coppel Y., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2011).** – New dithiopyrrolone antibiotics induced by adding sorbic acid to the culture medium of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *FEMS Microbiol. Lett.*, 318, 41–46.

Dithiopyrrolone Antibiotic Formation Induced by Adding Valeric Acid to the Culture Broth of *Saccharothrix algeriensis*

Rabiâa Merrouche,¹ Noureddine Bouras,¹ Yannick Coppel,² Florence Mathieu,³ Marie-Carmen Monje,⁵ Nasserdine Sabbou,¹ and Ahmed Lebrhi^{1*3}

Laboratoire de Recherche sur les Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse (LPBVB), Ecole Normale Supérieure de Kouba, B.P. 92, 16050 Kouba, Alger, Algeria, CNRS, LCC (Laboratoire de Chimie de Coordination), Université de Toulouse, UPS, INPT, LCC, 205 Route de Narbonne, F-31077 Toulouse, France, and Laboratoire de Génie Chimique UMR 5503 (CNRS/INPT/UPS), ENSAT/INP de Toulouse, Université de Toulouse, 1 Avenue de l'Agrobiopôle, Castanet-Tolosan Cedex, France

Received December 14, 2009

Three new antibiotics were isolated from the fermentation broth of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 and characterized as the dithiopyrrolone derivatives valerypyrrothine (1), isovalerypyrrothine (2), and formylpyrrothine (3) as well as the known antibiotic aureothricin. The production of the dithiopyrrolone derivatives was induced by adding valeric acid to the culture medium. The compounds exhibited moderate antimicrobial activity in vitro.

Dithiopyrrolones are members of the pyrrothine class of naturally occurring antibiotics that contain *N*-acyl derivatives of 6-amino-4,5-dihydro-4-methyl-5-oxo-1,2-dithiol[4,3-*b*]pyrrole. Dithiopyrrolone derivatives were previously identified from the culture broth of certain species of bacteria such as *Streptomyces*,^{1,2} *Xenorhabdus*,³ and *Atheromonas*.⁴ *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 (Actinomycetales) isolated as a new species from Algerian Saharan soil in our laboratory^{5,6} produces five dithiopyrrolone derivatives: thiolant, semioxyrpyrrothine (SEP), tyglypyrrothine (TIP), isobutyrylpyrrothine (ISP), and butanoylpyrrothine (BUP).⁷

Dithiopyrrolone antibiotics have strong activities against a variety of Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeasts, filamentous fungi, and protozoa.^{8–10} Furthermore, this class of antibiotics exhibits protozoicidal, larvicidal, and insecticidal activities.^{11–13} Dithiopyrrolones also have strong activity against several human cancer cell lines and are especially useful in the treatment of malignant mammary cells.^{12–15} However, it is clear that the prospects for development of dithiopyrrolone derivatives into potential pharmaceuticals will depend upon elucidating their mode of action and determining whether they exert adverse effects on human health.

The search for new bioactive compounds is one of the central subjects of industrial and academic natural products discovery.¹⁶ Several studies have reported the generation of novel bioactive molecules by melanosynthesis, semisynthesis, bio-organic synthesis, and also precursor-directed biosynthesis, which is considered a promising approach.^{17,18} Several microorganisms can be fed by uncommon and unusual precursors, generating derivatives of expected new natural products that are not easily obtainable by chemical synthesis.¹⁹ The antimicrobial and antitumoral activities of dithiopyrrolones are related to their variable acyl groups. Consequently, the obtained uncommon dithiopyrrolone derivatives could lead to improvement and discovery of new biological activities. In the present work, the formation of new dithiopyrrolone antibiotics from *S. algeriensis* has been induced and the new antibiotics have subsequently been purified and characterized.

The actinomycete strain *S. algeriensis* NRRL B-24137 afforded a yellow culture broth with antimicrobial activity. The strain was cultivated in a semisynthetic medium (SSM) in 12 L Erlenmeyer flasks. The culture broth was separated from the mycelium by

filtration and extracted with DCM on the fifth day of fermentation. Valeric acid was added to the medium at a concentration of 5 mM prior to inoculation. The crude extract was concentrated under vacuum (3.8 g from 12 L) and partially purified on preparative silica gel 60 plates followed by semipreparative reversed-phase HPLC. The latter afforded compounds 1–3, and their concentration reached levels of 1.31, 0.55, and 0.08 mg/L, respectively, at day 5. These compounds showed antimicrobial activity. Furthermore, the known antibiotic aureothricin (propionylpyrrothine) was also isolated from the fermentation broth of *S. algeriensis*. The latter compound was previously identified from the culture broth of several actinomycetes belonging to the genus *Streptomyces* such as *S. kasugaensis*.^{8,10}

HPLC analysis of the partially purified extract revealed new peaks in fermentations that were supplemented with valeric acid. The retention times of these peaks (1–3) were recorded at 9.51, 25.02, and 28.37 min, respectively. The UV spectra of compound 1–3 showed three absorption maxima. Compound 1 absorbs at 207, 307, and 392 nm, compound 2 at 204, 305, and 388 nm, and compound 3 at 203, 311, and 389 nm. The molecular weights of these compounds were obtained by EIMS. Compounds 1 and 2 have the same molecular weight, 270, suggesting isomeric compounds. Compound 3 (molecular weight 214) has the same molecular weight of a known antibiotic, holomycin, produced by some species of *Streptomyces* such as *S. clavuligerus*, *S. pimprina* and *S. griseus*.^{1,2}

The three compounds (1–3) showed a prominent fragment ion at *m/z* 186, indicating an extra methyl group in the heterocyclic ring as reported for other dithiopyrrolones.^{3,7}

On the basis of NMR and MS data the molecular formula of compound 1 was determined as C₁₁H₁₄N₂O₂S₂, suggesting incorporation of the intact valeric acid into the pyrrothine ring (Figure 1). Compound 2 showed the same molecular weight as compound 1 (*m/z* 270). Compound 3 was found to have a molecular formula of C₈H₈N₂O₂S₂ (*m/z* 214). This compound is an isomer of the holomycin antibiotic. The latter showed a fragment ion of *m/z* 177 (corresponding to the empirical formula C₅H₄N₂OS₂) in place of *m/z* 186 for compound 3, corresponding to a hydrogen instead of a methyl group in the pyrrothine moiety.³

Compounds 1, 2, and 3 show common ¹H and ¹³C NMR features: one carbonyl group (δ_c 167.0–166.5), three sp²-hybridized quaternary carbons (δ_c from 136.9 to 114.5), one olefinic group (δ_b 6.74–6.70 and δ_c 108.8–108.5), one N-CH₃ group (δ_b 3.37–3.3; and δ_c 27.6–27.5), and one NH group (δ_b 8.02–7.55). These ¹H and ¹³C NMR signals are typical of dithiopyrrolone derivatives.

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +33-562-193-900. Fax: +33-562-193-901. E-mail: lebrhi@ensat.fr.
¹Laboratoire de LPBVB.
²CNRS, LCC.
³ENSA/INP de Toulouse.

Notes

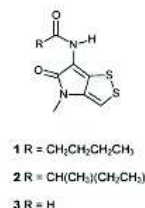


Figure 1. Structure of induced dithiopyrrolones (1–3).

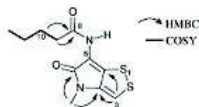


Figure 2. HMBC and COSY correlations of 1.

Furthermore, compound 1 shows one additional carbonyl group (δ_c 167.0) and four additional sp^3 -hybridized carbons (δ_c 35.9, 27.4, 22.3, and 13.5). The 2D ^1H – ^1H and ^1H – ^{13}C COSY experiments confirmed the presence of the pentanoyl side chain (Figure 2). Compound 2 shows one additional carbonyl group (δ_c 166.8) and four additional sp^3 -hybridized carbons (δ_c 42.8, 27.2, 17.0, and 11.6), accounting for a 2-methylbutanoyl side chain. Compound 3 shows one additional carbonyl group (δ_c 166.8) and one proton at δ_H 8.19, characterizing a formyl side chain. From an analysis of MS and ^1H and ^{13}C NMR data, as well as by comparison with those reported, the structures of the three dithiopyrrolones (1–3) were characterized as *N*-acyl derivatives of 6-amino-4,5-dihydro-4-methyl-5-oxo-1,2-dithiol[4,3-*b*]pyrrole. The new dithiopyrrolones 1–3 were named, respectively, valerypyrrothine, isovalerypyrrothine, and formylpyrrothine.

Dithiopyrrolones are known to be produced by several species of *Streptomyces* and *Xenorhabdus* and also by *Alteromonas cava*. The actinomycete *S. algeriensis* produces in basic medium (without precursors) five dithiopyrrolones (thiolotin, ISP, TIP, BUP, and SEP). The addition of valeric acid at a concentration of 5 mM to the medium as a precursor induced the production of new dithiopyrrolones derivatives (1–3).

The antimicrobial activity of compounds 1–3 and aureothricin produced by *S. algeriensis* is shown in Table 1. Compound 3 showed higher activity than compounds 1 and 2 against Gram-positive bacteria and the majority of filamentous fungi. Compound 2 was less active than its isomer 1 and aureothricin. Except for compound 2, which is not active against the phytopathogenic fungi *Fusarium moniliforme* and *F. graminearum*, all other compounds showed a moderate to strong activity against all filamentous fungi and yeasts tested. All compounds showed no (or weak) activity against Gram-negative bacteria. Similar results were observed with other known dithiopyrrolones produced by our strain.⁵

Experimental Section

General Experimental Procedures. The optical rotation was measured on a Perkin-Elmer (model 241) polarimeter. UV spectra were measured on a Shimadzu UV 1605 spectrophotometer. The NMR sample was prepared by dissolving compounds 1, 2, and 3 in 600 μL of CD_2Cl_2 . 1D and 2D ^1H and ^{13}C NMR experiments were recorded on a Bruker Avance 500 spectrometer equipped with a 5 mm triple resonance inverse Z -gradient probe (TBI ^1H , ^{31}P , BB). The proton and carbon chemical shifts are relative to TMS using ^1H (residual) or ^{13}C chemical shifts of the solvent as a secondary standard. The temperature

Table 1. Antimicrobial MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) Values of Dithiopyrrolones 1–3 and Aureothricin

test organism ^a	compound			aureothricin
	1	2	3	
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	20	40	2	20
<i>Bacillus coagulans</i> (CIP 6625)	20	40	2	20
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 9314)	40	100	3	20
<i>Staphylococcus aureus</i> (CIP 7625)	75	100	2	100
<i>Listeria monocytogenes</i> (CIP 82110)	>100	>100	20	>100
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	>100	>100	40	75
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (CIP 8291)	>100	>100	>100	>100
<i>Salmonella enterica</i> (CIP 813)	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CIP A22)	>100	>100	>100	>100
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (no. 2410 LB)	>100	>100	>100	>100
<i>Macor ranonimansis</i> (NRRL 1829)	10	30	10	20
<i>Penicillium expansum</i>	20	40	3	20
<i>Aspergillus carbonarius</i> (M333)	20	75	50	40
<i>Fusarium oxysporum</i> fsp. lini (Fols 3–5)	50	75	30	40
<i>Fusarium moniliforme</i>	75	>100	75	75
<i>Fusarium equiseti</i>	20	50	10	20
<i>Fusarium culmorum</i>	20	40	10	20
<i>Fusarium graminearum</i>	75	100	40	75
<i>Candida albicans</i> (IPA 200)	20	75	75	75
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 4226)	10	20	75	40

^a The target microorganisms without accession number resulted from our laboratory collection.

was set at 298 K. The ^1H and ^{13}C NMR signals were assigned on the basis of chemical shifts, coupling constants, splitting patterns, and signal intensities and by using ^1H – ^1H COSY-45, ^1H – ^{13}C HMQC, and ^1H – ^{13}C HMBC experiments. EIMS were recorded at 70 eV with a Numa R-10-10C spectrometer. The accurate mass spectrometry (HREIMS) was carried out on a GCT Premier System. Semipreparative HPLC was run on a Waters system using a C18 column (UPSPDB, 250 \times 7.8 mm). The samples were analyzed by linear gradient elution using MeOH as solvent A and ultrapure H_2O as solvent B. The separation gradient started with 40% solvent A and 60% solvent B and reached 100% solvent B and 0% solvent A in 30 min, using a flow of 1.5 mL min^{-1} . The detection of compounds was carried out at 220 and 300 nm.

Producing Strain. *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 (=DSM 44581) was isolated from a Saharan soil sample collected in 1992 at a palm grove in Adrar (southwest of Algeria).⁶ This strain was grown and maintained at 4 $^\circ\text{C}$ on slants of ISP 2 (International *Streptomyces* Project 2) solid medium containing (in grams per liter of distilled water): D(+)-glucose 4.0, malt extract 10.0, yeast extract 4.0, and agar 18.0. The pH of the medium was adjusted to 7.0 with a 2 M NaOH solution before autoclaving at 120 $^\circ\text{C}$ for 20 min.

Fermentation and Isolation. A mature slant culture of the strain *S. algeriensis* NRRL B-24137 was inoculated into 500 mL Erlenmeyer flasks each containing 100 mL of a basal semisynthetic medium (SSM) consisting of (in g/L of distilled H_2O): D(+)-glucose (10.0), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2.0), NaCl (2.0), KH_2PO_4 (0.5), K_2HPO_4 (1.0), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2), CaCO_3 (5.0), and yeast extract (2.0). The pH of the medium was adjusted to 7.0 using a 2 M NaOH solution prior to autoclaving. The valeric acid was added at a concentration of 5 mM to the medium prior to inoculation. The culture was incubated on a rotary shaker (240 rpm) at 30 $^\circ\text{C}$ for 5 days. The fermentation procedure was repeated to obtain a total of 12 L of culture broth. These cultures were centrifuged and filtered to remove mycelium. The culture filtrate was extracted with

an equal volume of DCM, and the organic layer was dried with Na_2SO_4 and concentrated under vacuum to generate a crude extract. The latter was partially purified on preparative silica gel 60 [MeOH-EtOAc (15:100)]. Two active bands were obtained as yellow (AJ) and yellow-orange (PS) bands at R_f values of 0.52 and 0.59, respectively. After elution with MeOH, crude AJ and crude PS were obtained and purified by HPLC using a continuous grade from 20% to 100% MeOH in H_2O . AJ was composed of two components, thiolutin and 3. PS contained the five compounds 1, 2, zureothricin, TIP, and SEP. However, ISP and BUP were not obtained under these conditions. The three yellow compounds 1–3 showing the main antimicrobial activity were further purified by HPLC and characterized as new dithiopyrrolone derivatives.

Bioassay. MIC values of the antibiotics 1–3 were determined by a conventional agar dilution method using ISP2 medium. For each test, the experiments were repeated four times. The antimicrobial activity was observed after 24–48 h incubation at 37 °C for bacteria and 48–72 h incubation at 28 °C for filamentous fungi and yeasts.

Vakerylpyrrothine (1): orange-yellow powder; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 207 (4.1), 307 (3.7), 392 (3.9) nm; $^1\text{H NMR}$ (CD_2Cl_2 , 500 MHz) δ 8.02 (1H, br s, N7-H), 6.70 (1H, s, H-3), 3.34 (3H, s, NCH_3), 2.38 (1H, t, $J = 7.6$, H-9), 1.67 (1H, m, H-10), 1.41 (1H, m, H-11), 0.96 (3H, t, $J = 7.3$, H-12); $^{13}\text{C NMR}$ (CD_2Cl_2 , 125 MHz) δ 171.6 (C, C-8), 167.0 (C, C-5), 136.8 (C, C-6a), 132.1 (C, C-3a), 114.7 (C, C-6), 108.8 (CH, C-3), 35.9 (CH, C-9), 27.6 (CH_2 , NCH_2), 27.4 (CH_2 , C-10), 22.3 (CH_3 , C-11), 13.5 (CH_3 , C-12); EIMS m/z 270 (M^+ ; 28), 186 (100), 83 (7), 57 (8); HREIMS m/z 270.0489 (calcd. $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$, 270.0497).

Isovakerylpyrrothine (2): yellow-orange powder; $[\alpha]_D^{25} = -0.7$ (c 0.3, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 204 (4.1), 305 (3.7), 388 (3.9) nm; $^1\text{H NMR}$ (CD_2Cl_2 , 500 MHz) δ 7.55 (1H, br s, N7-H), 6.70 (1H, s, H-3), 3.34 (3H, s, NCH_3), 2.34 (1H, dq, $J = 6.8$, 7.1, H-9), 1.72 (1H, m, H-10), 1.51 (1H, m, H-11), 1.20 (3H, d, $J = 6.8$, H-12), 0.96 (3H, t, $J = 7.4$, H-11); $^{13}\text{C NMR}$ (CD_2Cl_2 , 125 MHz) δ 174.8 (C, C-8), 166.8 (C, C-5), 136.9 (C, C-6a), 132.0 (C, C-3a), 114.5 (C, C-6), 108.5 (CH, C-3), 42.8 (CH, C-9), 27.6 (CH_2 , NCH_2), 27.2 (CH_2 , C-10), 17.0 (CH_3 , C-12), 11.6 (CH_3 , C-11); EIMS m/z 270 (M^+ ; 49), 186 (100), 83 (7), 57 (11); HREIMS m/z 270.0503 (calcd. $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$, 270.0497).

Formylpyrrothine (3): yellow powder; UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 203 (4.2), 311 (3.5), 389 (3.9) nm; $^1\text{H NMR}$ (CD_2Cl_2 , 500 MHz) δ 8.19 (1H, s, H), 7.68 (1H, br s, N7-H), 6.74 (1H, s, H-3), 3.37 (3H, s, NCH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (CD_2Cl_2 , 125 MHz) δ 166.5 (C, C-5), 159.3 (C, C-8), 136.9 (C, C-6a), 108.8 (CH, C-3); 1D $^{13}\text{C NMR}$ data were not recorded for 3 due to sample limitation; C-3a and C-6 were not detected in the HMBC experiment; EIMS m/z 214 (M^+ ; 72), 186 (100), 86 (11), 84 (8); HREIMS m/z 213.9881 (calcd. $\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$, 213.9871).

Acknowledgment. A part of this work was supported by the "Comité d'Évaluation et de Prospective de Coopération Interuniversitaire Franco-Algérienne" (Programme Tassili).

References and Notes

- (1) Okamura, K.; Soga, K.; Shimauchi, Y.; Ishikura, T.; Lein, J. *J. Antibiot.* 1977, 30, 334–336.
- (2) De la Fuente, A.; Lorenzana, L. M.; Martín, J. F.; Liras, P. *J. Bacteriol.* 2002, 184, 6559–6565.
- (3) McInerney, B. V.; Gregson, R. P.; Lacey, M. J.; Akhurst, R. J.; Lyons, G. R.; Rhodes, S. H.; Smith, D. R. J.; Engelhardt, L. M.; White, A. H. *J. Nat. Prod.* 1991, 54, 774–784.
- (4) Shiozawa, H.; Shimada, A.; Takahashi, S. *J. Antibiot.* 1997, 50, 449–452.
- (5) Lamari, L.; Zitouni, A.; Boudjella, H.; Badji, B.; Sabaou, N.; Lebrihi, A.; Lefebvre, G.; Seguin, E.; Tiltequin, F. *J. Antibiot.* 2002, 55, 696–701.
- (6) Zitouni, A.; Lamari, L.; Boudjella, H.; Badji, B.; Sabaou, N.; Gaour, A.; Mathieu, F.; Lebrihi, A. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004, 54, 1377–1381.
- (7) Lamari, L.; Zitouni, A.; Dob, T.; Sabaou, N.; Lebrihi, A.; Germain, P.; Seguin, E.; Tiltequin, F. *J. Antibiot.* 2002, 55, 702–706.
- (8) Celmer, W. D.; Sokolons, I. A. *J. Am. Chem. Soc.* 1955, 77, 2861–2865.
- (9) Webster, J. M.; Chen, G.; Hu, K.; Li, J. In *Entomopathogenic Nematology*; Gaugler, R., Ed.; CAB International: NJ, 2002; pp 99–114.
- (10) Sturdíková, M.; Proška, B.; Ubrin, D.; Faska, J. *Folia Microbiol.* 1990, 35, 278–283.
- (11) Deb, P. R.; Dutta, B. K. *Curr. Sci.* 1984, 53, 659–660.
- (12) Arnold, J. T.; Wikinson, B. P.; Sharma, S.; Swele, V. E. *Cancer Res.* 1995, 55, 537–543.
- (13) Webster, J. M.; Li, J.; Chen, G. U.S. Patent 6,020,360, 2000.
- (14) Minamiguchi, K.; Kumagai, H.; Masuda, T.; Kawada, M.; Ishizuka, M.; Takeuchi, T. *Int. J. Cancer* 2001, 93, 307–316.
- (15) Stahl, P.; Seidel, H.; Von der Eltz, H.; Wilhelm, O. H.; Roesch, A. U.S. Patent 4,760,077, 1988.
- (16) Zahner, H.; Fiedler, H. P. In *Fifty Years of Antimicrobials: Past Perspectives and Future Trends, 53rd Symposium of the Society for General Microbiology*; Hunter, P. A.; Darby, G. K.; Russell, N. J., Eds.; University Press: Cambridge, 1995; pp 67–85.
- (17) Henriksen, C. M.; Holm, S. S.; Schipper, D.; Jørgensen, H. S.; Nielsen, J.; Villadsen, J. *Proc. Biochem.* 1997, 32, 85–91.
- (18) Sattler, I.; Grabley, S.; Thiericke, R. In *Drug Discovery from Nature*; Grabley, S.; Thiericke, R., Eds.; Springer: Berlin, 1999; pp 191–214.
- (19) Leaf, T.; Cadapan, L.; Carreras, C.; Regentia, R.; Ou, S.; Woo, E.; Ashley, G.; Licari, P. *Biotechnol. Prog.* 2009, 16, 553–556.

NP900808U

RESEARCH LETTER

New dithiopyrrolone antibiotics induced by adding sorbic acid to the culture medium of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137Rabiâa Merrouche¹, Noureddine Bouras¹, Yannick Coppel^{2,3}, Florence Mathieu⁴, Nasserine Sabaou¹ & Ahmed Lebrîhi⁴¹Laboratoire de Recherche sur les Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse (LPBVB), Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger, Algeria;²CNRS, Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC), Toulouse, France; ³Université de Toulouse, UPS, INPT, LCC, Toulouse, France, and ⁴Laboratoire de Génie Chimique UMR 5503 (CNRS/INPT/UPS), Université de Toulouse, ENSAT/INP de Toulouse, Castanet-Tolosan, France

Correspondence: Ahmed Lebrîhi, Laboratoire de Génie Chimique UMR 5503 (CNRS/INPT/UPS), Université de Toulouse, ENSAT/INP de Toulouse, 1 avenue de l'Agrobiopôle, Castanet-Tolosan Cedex, France. Tel.: +33 562 193 900; fax: +33 562 193 901; e-mail: lebrhi@ensat.fr

Received 5 October 2010; revised 29 January 2011; accepted 31 January 2011.
Final version published online 11 March 2011.

DOI:10.1111/j.1574-6968.2011.02246.x

Editor: Paolina Garbeva

Keywords: new dithiopyrrolone antibiotics, *Saccharothrix algeriensis* precursors, sorbic acid, fermentation, antimicrobial activity

Abstract

Dithiopyrrolone antibiotics, produced by several microorganisms, are known for their strong antimicrobial activities. This class of antibiotics generated new interest after the discovery of their anticancer and antitumor properties. In this study, four new antibiotics were purified from the fermentation broth of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 and characterized as dithiopyrrolone derivatives. These new dithiopyrrolone antibiotics were induced by adding sorbic acid, as precursor, at a concentration of 5 mM to the semi-synthetic medium. The analysis of the induced antibiotics was carried out by HPLC. The maximal production of the antibiotics PR2, PR8, PR9 and PR10 was 0.08 ± 0.04 , 0.21 ± 0.04 , 0.13 ± 0.03 and $0.09 \pm 0.00 \text{ mg L}^{-1}$, respectively, obtained after 8 days of fermentation. The chemical structures of these antibiotics were determined by ¹H- and ¹³C-nuclear magnetic resonance, mass and UV-visible data. The four new dithiopyrrolone antibiotics – PR2, PR8, PR9 and PR10 – were characterized, respectively, as crotonyl-pyrrothine, sorbyl-pyrrothine, 2-hexonyl-pyrrothine and 2-methyl-3-pentenyl-pyrrothine. The minimum inhibitory concentrations of the new induced antibiotics were determined.

Introduction

Actinomycetes are filamentous bacteria that naturally inhabit soils. They are of great importance in biotechnological process because of their ability to produce a large number of antibiotics and other bioactive secondary metabolites. *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 (= DSM 44581) is an actinomycete that produces bioactive compounds belonging to the dithiopyrrolone class of antibiotics (Lamari *et al.*, 2002a, b; Zitouni *et al.*, 2004). Dithiopyrrolones are members of the pyrrothine class of naturally occurring antibiotics that contain *N*-acyl derivatives of 6-amino-4,5-dihydro-4-methyl-5-oxo-1,2-dithiolo[4,3-*b*]pyrrole. Dithiopyrrolone derivatives were previously identified from the culture broth of certain *Streptomyces* spp. (Okamura *et al.*, 1977; De la Fuente *et al.*, 2002) and from other microorganisms such as the symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. (McInerney *et al.*, 1991) and the marine bacterium *Alteromonas rava* (Shiozawa *et al.*, 1997).

Dithiopyrrolone antibiotics have strong activities against a variety of Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeasts, filamentous fungi and amoeboid parasites (Celmer & Solomons, 1955; Webster *et al.*, 2002; Lamari *et al.*, 2002a). Furthermore, this class of antibiotics exhibits protozoicidal, larvicidal and insecticidal activities (Šturdíková *et al.*, 1990; Webster *et al.*, 2002), and possess outstanding antiallergic action (Stahl *et al.*, 1988). Dithiopyrrolones also have strong activity against several human cancer cell lines and are especially useful in the treatment of malignant mammary cells (Webster *et al.*, 2000; Minamiguchi *et al.*, 2001).

The previous studies showed that *S. algeriensis* produces five dithiopyrrolone derivatives characterized by their different *N*-acyl groups (R): acetyl-pyrrothine (thiolutin), iso-butryl-pyrrothine, butanoyl-pyrrothine, seneciyl-pyrrothine and tigloyl-pyrrothine (Lamari *et al.*, 2002a, b; Bouras *et al.*, 2006a) (Fig. 1). Furthermore, the addition of precursors to the culture medium led to the modification in production levels of known dithiopyrrolones (Bouras *et al.*, 2006a, b)

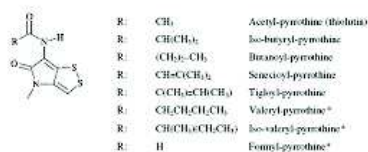


Fig. 1. Structure of dithiolo-pyrrolone antibiotics produced by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Dithiolo-pyrrolones induced by adding valeric acid alone.

and also to precursor-directed biosynthesis of new dithiolo-pyrrolone analogues (Bouras et al., 2007, 2008). Consequently, *S. algeriensis* has the ability to produce a wide range of dithiolo-pyrrolones based on different acyl-CoA depending on the precursors added (Bouras et al., 2007, 2008). Recently, Merrouche et al. (2010) showed that the addition of valeric acid at a concentration of 5 mM induced the production of three new dithiolo-pyrrolone derivatives: formyl-pyrrothine, valeryl-pyrrothine and iso-valeryl-pyrrothine (Fig. 1).

In the present work, new dithiolo-pyrrolone antibiotics from *S. algeriensis* have been induced by adding sorbic acid and subsequently purified and characterized. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of the new induced antibiotics against several microorganisms were determined.

Materials and methods

Producing strain

Saccharothrix algeriensis NRRL B-24137 (Zitouni et al., 2004) was grown and maintained at 4 °C on slants of International Streptomyces Project 2 (ISP 2) medium (Shirling & Gottlieb, 1966).

Fermentation studies of *S. algeriensis* with and without sorbic acid

Culture conditions

A mature slant culture of the strain *S. algeriensis* was inoculated into 500 mL Erlenmeyer flasks, each containing 100 mL of a basal semi-synthetic medium (SSM) consisting of 10 g glucose D⁺ (Fisher Labosi), 2 g (NH₄)₂SO₄ (Prolabo), 2 g NaCl (Fisher Labosi), 0.5 g KH₂PO₄ (Acros), 1 g K₂HPO₄ (Acros), 0.2 g MgSO₄·7H₂O (Acros), 5 g CaCO₃ (Prolabo) and 2 g yeast extract (Difco), in 1 L distilled water. The pH of the medium was adjusted to 7 using a 2 M NaOH solution before autoclaving. The sorbic acid (Fluka), at a concentration of 5 mM, was supplied to the basal SSM prior inoculation. The inoculated cultures were put on a rotary shaker at 240 r.p.m. at 30 °C for 10 days.

Kinetics of antimicrobial products, growth and pH

All kinetics was assessed on SSM supplemented with sorbic acid (at 5 mM) and control (without sorbic acid). The activity against *Bacillus subtilis* and *Mucor ramannianus*, used as test microorganisms, was regularly recorded each day by the agar diffusion method (well technique; each well of 10 mm in diameter made in the ISP 2 agar plate was filled with 200 µL of supernatant).

Dry cell weights were determined as described by Bouras et al. (2006a) and expressed as gram per litre. The pH value was measured with a pH meter (Consort C 832, Consort, NY). All tests were repeated two times from two separate cultures.

Kinetics of antibiotic production and HPLC analysis

The culture filtrate was extracted with an equal volume of dichloromethane and the organic layer was dried with anhydrous sodium sulphate and concentrated under vacuum to generate a crude extract. The extract was concentrated to dryness under vacuum on a Rotavapor, and dissolved in 1 mL of methanol as crude extract. The analysis of antibiotics induced by addition of sorbic acid in the SSM was carried out by a HPLC system equipped with a C₁₈ reverse phase column (Uptisphere UP50DB, 150 × 4.6 mm; BioTek). The samples were analysed and quantified as described by Lamari et al. (2002b) and Bouras et al. (2006a).

Purification of induced antibiotics

The bacteria were cultivated in 500 mL Erlenmeyer flasks, each containing 100 mL of SSM supplemented with sorbic acid (5 mM). For the purification, cultures were combined to obtain 15 L. The mycelium was separated, and the culture broth was extracted with dichloromethane on the eighth day of fermentation. The concentrated extracts were partially purified on preparative silica gel 60 plates (Merck Art 5735, Kieselgel 60F 254) and separated by a mixture of ethyl acetate and methanol (100:15 v/v). Two active bands were obtained as yellow (AJ) and yellow-orange (PS) bands at retention factor (R_f) values of 0.52 and 0.59, respectively. After elution with methanol, crude AJ and crude PS were obtained and purified by HPLC. Semi-preparative HPLC was performed on a Waters system using a C₁₈ column (UP50DB, 250 × 7.8 mm). The samples were analysed by linear gradient elution using methanol as solvent A and ultra pure water as solvent B. The separation gradient started with 40% solvent A and 60% solvent B, and reached 100% solvent B and 0% solvent A in 30 min, using a flow of 1.5 mL min⁻¹. The detection of compounds was carried out at 390 and 220 nm.

Chemical characterization of induced antibiotics

UV-visible absorption spectra of induced antibiotics were determined with a Shimadzu UV 1605 spectrophotometer. The molecular weights of the compounds were obtained by electron impact MS (EIMS) recorded at 70 eV with a Nermag R-10-10C spectrometer. The nuclear magnetic resonance (NMR) sample was prepared by dissolving the pure molecules (PR2, PR8, PR9 and PR10) in 600 μ L of CD_2Cl_2 . One- and two-dimensional (2D) 1H and ^{13}C experiments were recorded on a Bruker Avance 500 spectrometer equipped with a 5 mM triple resonance inverse Z-gradient probe (TBI 1H , ^{31}P , BB). All chemical shifts for 1H and ^{13}C are relative to tetramethylsilane (TMS) using 1H (residual) or ^{13}C chemical shifts of the solvent as a secondary standard. The temperature was set at 298 K. All the 1H and ^{13}C signals were assigned on the basis of chemical shifts, spin-spin coupling constants, splitting patterns and signal intensities in 1H - 1H COSY45, 1H - ^{13}C HMQC and 1H - ^{13}C HMBC experiments.

Antimicrobial MIC of purified antibiotics

The MIC of antibiotics were determined by a conventional agar dilution method using ISP 2 medium. The antimicrobial activity was observed after 24–48-h incubation at 37 °C for bacteria and 48–72-h incubation at 28 °C for fungi and yeasts.

Results

Kinetics of antimicrobial products of *S. algeriensis*

The results of evolution of antimicrobial products of *S. algeriensis* are shown in Fig. 2. The antimicrobial activity started earlier in the presence of sorbic acid (third day of fermentation against *M. ramannianus* and fourth day against *B. subtilis*) as compared with control (seventh day of fermentation against *M. ramannianus* and sixth day against *B. subtilis*). *Saccharothrix algeriensis* exhibited better antimicrobial activity after addition of sorbic acid compared with the control. The maximal antifungal activity (25 mM diameter inhibition after 9 days of fermentation) was greater than the maximal antibacterial activity (15 mM diameter of inhibition after 7 days of fermentation).

Effect of addition of sorbic acid on pH of the medium, growth and antibiotic production in *S. algeriensis*

The actinomycete *S. algeriensis* produces five known dithiopyrrolones (thiolutin, iso-butyl- γ -pyrrothine, butanoyl-pyrrothine, senecioid-pyrrothine and tigloyl-pyrrothine) in the SSM (without precursors) as reported by Lamari *et al.*

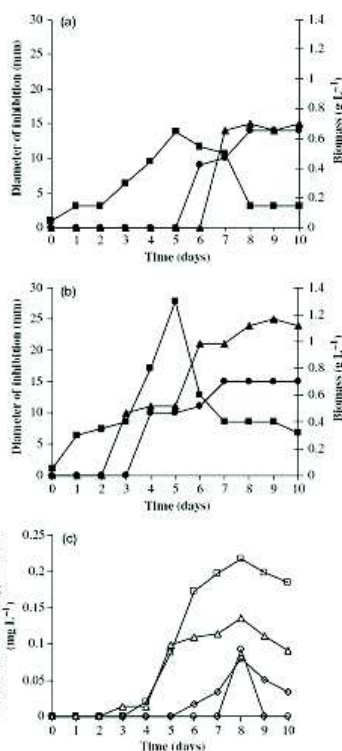


Fig. 2. Effect of addition of sorbic acid to the SSM on evolution of biomass, antimicrobial activity and production of new dithiopyrrolones by *Saccharothrix algeriensis*: (a) SSM without adding sorbic acid (control); (b) SSM with sorbic acid (at 5 mM). ■, Evolution of biomass; ●, activity against *Bacillus subtilis*; ▲, activity against *Mucor ramannianus*; values do not include the diameter of wells (10 mm). (c) Production of new obtained dithiopyrrolones. ○, PR2; □, PR8; ▲, PR9; and ◊, PR10.

(2002b). Importantly, the addition of sorbic acid to the SSM induced the production of four new dithiopyrrolones (PR2, PR8, PR9 and PR10). The retention times of these new induced compounds (PR2, PR8, PR9 and PR10) were recorded at 28.24, 36.86, 37.16 and 37.82 min, respectively. The growth of *S. algeriensis* was influenced by the addition

of sorbic acid. In SSM broth (control), the dry cell weight reached a maximum after 5 days of fermentation ($0.65 \pm 0.05 \text{ g L}^{-1}$) and then decreased to reach a value of $0.15 \pm 0.03 \text{ g L}^{-1}$ at the end of fermentation (after 10 days). However, by addition of sorbic acid, the dry cell weights reached a maximum of $1.30 \pm 0.08 \text{ g L}^{-1}$ (also obtained after 5 days of fermentation) and then decreased $0.32 \pm 0.06 \text{ g L}^{-1}$ at the end of fermentation.

Moreover, the sorbic acid allowed a high specific growth rate (μ_{max}) of $0.074 \pm 0.004 \text{ h}^{-1}$, in comparison with $0.045 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$ with control. In addition, the optimal production of new dithiopyrrolones PR2, PR8, PR9 and PR10 was observed during the idiophase and was generally dissociated from growth. The maximal production of the antibiotics PR2, PR8, PR9 and PR10 was 0.08 ± 0.04 , 0.21 ± 0.04 , 0.13 ± 0.03 and $0.09 \pm 0.00 \text{ mg L}^{-1}$, respectively, recorded on the eighth day of fermentation. The production of thiolutin was reduced three times more after addition of sorbic acid ($0.29 \pm 0.08 \text{ mg L}^{-1}$) than with the control ($0.89 \pm 0.09 \text{ mg L}^{-1}$). Moreover, the final pH at the end of fermentation (after 10 days) was 7.92 ± 0.06 in the presence of sorbic acid as compared with 8.16 ± 0.04 with the control.

Purification and characterization of induced antibiotics

The culture broth with antimicrobial activity was partially purified, and the thin-layer chromatography plates showed two bands (A) and (B). The analysis by semi-preparative reversed-phase HPLC showed that the (A) band was composed of one compound (thiolutin); however, the (B) band contained eight compounds: iso-butylpyrrothine, butanoyl-pyrrothine, senecioid-pyrrothine, tigloyl-pyrrothine (Lamari et al., 2002a) and four induced unknown compounds. These last four compounds were purified by HPLC, and all appear yellow and exhibit antimicrobial activity. The UV-visible spectra of each of the induced compounds showed three absorption maxima. Compound PR2 absorbed at 203, 304 and 395 nm, PR8 at 202, 270 and 413 nm, PR9 at 204, 303 and 402 nm and PR10 at 202, 304 and 398 nm. The molecular weights of PR2 and PR8 are m/z 254 and 280, respectively. PR9 and PR10 have the same molecular weight (m/z 282).

Compounds PR2, PR8, PR9 and PR10 show common ^1H - and ^{13}C -NMR spectral features: two carbonyl groups (δ_{C} 167.0~166.6 and δ_{C} 164.8~163.8), two sp^2 -hybridized quaternary carbons (δ_{C} 137.4~136.9 and δ_{C} 132.1~131.6), one olefinic group (δ_{H} 6.71~6.66 and δ_{C} 108.7~108.3), one N-CH_3 group (δ_{H} 3.36~3.35 and δ_{C} 28.0~27.4), and one NH group (δ_{H} 7.60~7.43). These ^1H and ^{13}C signals are typical of dithiopyrrolone derivatives. Compound PR2 showed two additional sp^2 methines (δ_{H} 6.99 and 5.98 and δ_{C} 142.8 and 123.2) and one additional methyl group (δ_{H} 1.93 and δ_{C} 17.4).



Fig. 3. Structure of new dithiopyrrolones PR2, PR8, PR9 and PR10 induced by adding sorbic acid.

The 2D ^1H - ^1H and ^1H - ^{13}C experiments made it possible to confirm the presence of a 2-butenamide side chain (Fig. 3). The E-geometry of the double bond was obtained on the basis of the coupling constant of H9-H10 (15.2 Hz). Compound PR8 showed four additional sp^2 methines (δ_{H} 7.30, 6.27, 6.26 and 5.92 and δ_{C} 143.2, 140.0, 129.3 and 119.3) and one additional methyl group (δ_{H} 1.90 and δ_{C} 18.4). The 2D ^1H - ^1H and ^1H - ^{13}C experiments clearly revealed that PR8 contained a 2,4-hexadienamide side chain (Fig. 3). The E,E-geometry of the double bond was deduced from the coupling constant of H9-H10 (15.0 Hz) and of H11-H12 (15.1 Hz, obtained from simulation). Compound PR9 showed two additional sp^2 methines (δ_{H} 6.98 and 5.95 and δ_{C} 147.5 and 121.9), two additional sp^2 methylenes (δ_{H} 2.25 and 1.54 and δ_{C} 34.1 and 13.4) and one additional methyl group (δ_{H} 0.98 and δ_{C} 13.4). The 2D ^1H - ^1H and ^1H - ^{13}C experiments established the presence of a 2-hexenamide side chain (Fig. 3). The E-geometry of the double bond was obtained on the basis of the coupling constant of H9-H10 (15.2 Hz). Compound PR10 showed one additional sp^2 methine (δ_{H} 5.72 and δ_{C} 115.7), one sp^3 methylene (δ_{H} 2.21 and δ_{C} 34.2) and two additional methyl groups (δ_{H} 2.24 and 1.12 and δ_{C} 19.1 and 12.1). The 2D ^1H - ^1H and ^1H - ^{13}C experiments made it possible to confirm the presence of 2-pentenamide, 3-methyl side chain (Fig. 3). The geometry of the double bond was assigned as E by the long-range $^3J_{\text{HC}}$ coupling constants between H9 and C11 ($< 2 \text{ Hz}$) and between H9 and C13 ($\sim 7 \text{ Hz}$).

Antimicrobial activity of purified dithiopyrrolone antibiotics

The antimicrobial activity of the new dithiopyrrolone antibiotics (PR2, PR8, PR9 and PR10) is shown in Table 1. The antibiotic PR8 showed higher activity than other compounds against Gram-positive bacteria. The antibiotics PR2 and PR9 were not active against *Aspergillus carbonarius* and the phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum* f. sp. *liri*, *Fusarium graminearum* and *Fusarium moniliforme*. However, the antibiotics PR8 and PR10 showed a moderate activity against all fungi and yeasts tested. None of the new induced antibiotics showed activity against Gram-negative bacteria.

Discussion

Dithiopyrrolones are known to be produced by several species of *Streptomyces*, *Xenorhabdus* and *Alteromonas*. The

Table 1. Antimicrobial MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$) of new dithiopyrrolone antibiotics produced by *Saccharothrix algeriensis*

Test organism*	New dithiopyrrolones			
	PR2	PR8	PR9	PR10
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	75	20	> 100	20
<i>Bacillus coagulans</i> (CIP 6625)	75	30	> 100	20
<i>Listeria monocytogenes</i> (CIP 82110)	40	10	20	10
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 9314)	30	10	75	75
<i>Staphylococcus aureus</i> (CIP 7625)	30	10	> 100	100
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (no. 241018)	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (CIP 82 91)	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>Salmonella enterica</i> (CIP 81 3)	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CIP A22)	> 100	> 100	> 100	> 100
<i>Aspergillus carbonarius</i> (M333)	> 100	30	> 100	2
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lini</i> (Foln 3)	> 100	75	> 100	50
<i>Fusarium moniliforme</i>	> 100	75	> 100	5
<i>Fusarium equiseti</i>	50	20	75	30
<i>Fusarium culmorum</i>	50	50	50	30
<i>Fusarium graminearum</i>	> 100	50	> 100	30
<i>Mucor ramannianus</i> (NRRL 1829)	50	20	40	5
<i>Penicillium expansum</i>	75	20	> 100	40
<i>Candida albicans</i> (IPA 200)	> 100	50	50	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 4226)	30	50	30	10

*The test microorganisms without an accession number were from our laboratory collection.

actinomycete *S. algeriensis* produces five dithiopyrrolones in the basic medium (without precursors): thiolutin, isobutyryl-pyrrothine, butanoyl-pyrrothine, seneciyl-pyrrothine and tigloyl-pyrrothine (Lamari *et al.*, 2002b). This actinomycete has a great ability to produce a wide range of dithiopyrrolone derivatives that, depending on the composition of the culture medium, nature and concentration of precursors added and an enzymatic system, are involved in attaching a variety of radicals (R) into pyrrothine ring (Bouras *et al.*, 2006a,b, 2007, 2008; Chorin *et al.*, 2009). The data presented above show that the addition of sorbic acid at a concentration of 5 mM to the SSM as a precursor has induced the production of four new peaks, as revealed by HPLC analysis. These induced compounds did not correspond to known dithiopyrrolones with respect to retention time, but they were identified as dithiopyrrolone derivatives by their spectral characteristics (UV spectra, EIMS and NMR).

From MS and ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopic analyses, as well as by comparison with all dithiopyrrolone derivatives reported in the literature, the structures of the four new dithiopyrrolones (PR2, PR8, PR9 and PR10) were characterized as N-acyl derivatives of 6-amino-4,5-dihydro-4-methyl-5-oxo-1,2-dithiolo[4,3-b]pyrrole. The four compounds showed a prominent fragment ion of m/z 186 and indicated by the EIMS spectrum an extra methyl group in

the heterocyclic ring (corresponding to the empirical formula $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$) as reported for other dithiopyrrolones (McInerney *et al.*, 1991; Lamari *et al.*, 2002b).

On the basis of NMR and MS data, the molecular formula of PR2 was determined as $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$ (Fig. 3). The antibiotic PR8 was determined as $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$, suggesting an intact direct incorporation of the sorbic acid into pyrrothine ring. The results of Bouras *et al.* (2008) showed that addition of precursors into the culture medium, such as organic acids, led to precursor-directed biosynthesis of new dithiopyrrolone analogues. In the same context, Chorin *et al.* (2009) suggest that the enzymatic reaction of pyrrothine acylation takes part in the dithiopyrrolone biosynthetic pathway in *S. algeriensis*, which is able to use acyl-CoA with different structures (acetyl-CoA and benzoyl-CoA) as substrates to produce corresponding dithiopyrrolones (acetyl-pyrrothine and benzoyl-pyrrothine). Furthermore, the antibiotic PR9 showed the same molecular weight as PR10 (m/z 282) with the same molecular formula $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2$, suggesting isomeric compounds.

The new dithiopyrrolones (PR2, PR8, PR9 and PR10) were named, respectively, crotonyl-pyrrothine, sorbyl-pyrrothine, 2-hexonyl-pyrrothine and 2-methyl-3-pentenyl-pyrrothine.

Our results showed that the antibacterial and antifungal activities of the newly obtained dithiopyrrolones are related to their variable acyl groups. The antibiotic PR8 (sorbyl-pyrrothine) showed higher activity than other compounds against Gram-positive bacteria. The new dithiopyrrolone antibiotics showed a moderate activity against all fungi and yeasts tested (except for PR2 and PR9, which are not active against *A. carbonarius*, *F. oxysporum* f. sp. *lini*, *F. graminearum* or *F. moniliforme*). Interestingly, the antibiotic 2-methyl-3-pentenyl-pyrrothine (PR10) showed higher activity against *A. carbonarius* and *Candida albicans*, than showed by any of the other dithiopyrrolones produced by *S. algeriensis*. In fact, the biological activity of dithiopyrrolones is strongly influenced by the nature of variable acyl groups, as reported previously (Oliva *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008). Furthermore, none of the newly obtained antibiotics showed any activity against Gram-negative bacteria; similar results have been obtained with other dithiopyrrolones produced by *S. algeriensis* (Lamari *et al.*, 2002a; Merrouche *et al.*, 2010).

References

- Bouras N, Mathieu F, Sabaou N & Lebrihi A (2006a) Effect of amino acids containing sulfur on dithiopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *J Appl Microbiol* **100**: 390–397.
- Bouras N, Mathieu F, Sabaou N & Lebrihi A (2006b) Nutritional requirements for the production of dithiopyrrolones by

Production de nouveaux antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis* après addition de précurseurs dans le milieu de culture

46

R. Merroudie et al.

- Saccharothrix algeriensis* NRRLB-24137. *Enzyme Microb Tech* 39: 1423–1429.
- Bouras N, Mathieu F, Sabaou N & Lebréhi A (2007) Influence on dithiopyrrolone antibiotic production by organic acids in *Saccharothrix algeriensis* NRRLB-24137. *Process Biochem* 42: 925–933.
- Bouras N, Merroudie R, Lamari L, Mathieu F, Sabaou N & Lebréhi A (2008) Precursor-directed biosynthesis of new dithiopyrrolone analogs by *Saccharothrix algeriensis* NRRLB-24137. *Process Biochem* 43: 1244–1252.
- Celmer WD & Solomons IA (1955) The structures of thiolutin and aureothricin, antibiotics containing a unique pyrrolinonodithiole nucleus. *J Am Chem Soc* 77: 2861–2865.
- Chorin AC, Bijeire L, Monje MC, Baziard G, Lebréhi L & Mathieu F (2009) Expression of pyrrothine *N*-acyltransferase activities in *Saccharothrix algeriensis* NRRLB-24137: new insights into dithiopyrrolone antibiotic biosynthetic pathway. *J Appl Microbiol* 107: 1751–1762.
- De la Fuente A, Lorenzana LM, Martín IF & Liras P (2002) Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin: possible cross-regulation of two unrelated secondary metabolic pathway. *J Bacteriol* 184: 6559–6565.
- Guo Y, Chen G & Bin L (2008) Novel dithiopyrrolones and their therapeutical applications. Patent WO2008038175, 3 April 2008.
- Lamari L, Zitouni A, Boudjella H, Badji B, Sabaou N, Lebréhi A, Lefebvre G, Seguin E & Tilleguin F (2002a) New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J Antibiot* 55: 696–701.
- Lamari L, Zitouni A, Dob T, Sabaou N, Lebréhi A, Germain P, Seguin E & Tilleguin F (2002b) New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. II. Physicochemical properties and structure elucidation. *J Antibiot* 55: 702–707.
- Li B, Lyle MPA, Chen G, Li J, Hu K, Tang L, Alaoui-Jamali MA & Webster J (2007) Substituted 6-amino-4H-[1,2]dithiolo[4,3-*b*]pyrrol-5-ones: synthesis, structure-activity relationships, and cytotoxic activity on selected human cancer cell lines. *Bioorgan Med Chem* 15: 4601–4608.
- McInerney BV, Gregson RP, Lacey MJ, Akhurst RJ, Lyons GR, Rhodes SH, Smith DR, Engelhardt LM & White AH (1991) Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part I. Dithiopyrrolone derivatives with antibiotic activity. *J Nat Prod* 54: 774–784.
- Merroudie R, Bouras N, Coppel Y, Mathieu F, Monge M-C, Sabaou N & Lebréhi A (2010) Dithiopyrrolone antibiotic formation induced by adding valeric acid to the culture broth of *Saccharothrix algeriensis*. *J Nat Prod* 73: 1164–1166.
- Minamiguchi K, Kumagai H, Masuda T, Kawada M, Ishizuka M & Takeuchi T (2001) Thiolutin, an inhibitor of HUVEC adhesion to vitronectin, reduces paxillin in HUVECs and suppresses tumor cell-induced angiogenesis. *Int J Cancer* 93: 307–316.
- Okamura K, Soga K, Shimachi Y, Ishikura T & Ito J (1977) Holomycin and *n*-propionyl-holothin, antibiotics produced by a cephamycin C producer. *J Antibiot* 30: 334–336.
- Oliva B, O'Neill A, Wilson JM, O'Hanlon PJ & Chopra I (2001) Antimicrobial properties and mode of action of the pyrrothine holomycin. *Antimicrob Agents Ch* 45: 532–539.
- Shiozawa H, Shimada A & Takahashi S (1997) Thiomarinols D, E, F and G, new hybrid antimicrobial antibiotics produced by a marine bacterium; isolation, structure, and antimicrobial activity. *J Antibiot* 50: 449–452.
- Shirling EB & Gottlieb D (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 16: 313–340.
- Stahl P, Seidel H, Von der Eltz H, Wilhelms O-H & Roesch A (1988) Pyrrothine derivatives and pharmaceutical use thereof. Patent US4760077, 26 July 1988.
- Šturdíková M, Proška B, Uhrin D & Fůska J (1990) Regulation of biosynthesis of thiolutin and aureothricin in *Streptomyces kasugaensis*. *Folia Microbiol* 35: 278–283.
- Webster JM, Li J & Chen G (2000) Anticancer properties of dithiopyrrolones. Patent US6020360, 1 February 2000.
- Webster JM, Chen G, Hu K & Li J (2002) Bacterial metabolites. *Entomopathogenic Nematology* (Gaugler R, ed), pp. 99–114. CAB International, New Jersey.
- Zitouni A, Lamari L, Boudjella H, Badji B, Sabaou N, Gaouar A, Mathieu F, Lebréhi A & Labeda DP (2004) *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., isolated from a Saharan soil. *Int J Syst Evol Micr* 54: 1377–1381.