



THESE

En vue de l'obtention du :

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'*Institut National Polytechnique de Toulouse*

Discipline ou spécialité : *Génie des Procédés et de l'Environnement*

Présentée et soutenue par

Caroline STRUB

Ingénieur INSA de Toulouse

Le 05 décembre 2008

Modélisation et Optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*

JURY

M. Jean-Louis GOERGEN	Rapporteur
M. Nasserline SABAOU	Rapporteur
M. Ahmed LEBRIHI	Directeur de Thèse
Mme. Xuân-Mi MEYER	Directrice de Thèse
M. Cédric BRANDAM	Examineur
M. Christian LARROCHE	Examineur

Ecole doctorale : Mécanique, Energétique, Génie Civil, Procédés (MEGEP)

Unité de recherche : Laboratoire de Génie Chimique (UMR n°5503), Toulouse

Directeurs de thèse : Ahmed Lebrihi et Xuân-Mi Meyer

Remerciements

Ce travail a été réalisé au **Laboratoire de Génie Chimique (UMR 5503, CNRS/INPT/UPS)** au sein des départements de « **Bioprocédés et Systèmes Microbiens** » et de « **Procédés Systèmes Industriels** » sur les sites de Basso Cambo et de l'**Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Toulouse**.

Je remercie Jean-Louis GOERGEN, professeur à l'**Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires de Nancy** et Nasserline SABAOU, professeur à l'**Ecole Normale Supérieure de Kouba-Alger** d'avoir accepté la tâche de rapporteur de ce mémoire. J'exprime également mes remerciements à Christian LARROCHE, professeur à Polytech'Clermont-Ferrand d'avoir présidé mon jury de soutenance.

Pour la confiance qu'il m'a accordée et pour m'avoir permis de travailler sur un sujet aussi passionnant ainsi que pour ses précieux conseils, je remercie Ahmed LEBRIHI, professeur à l'ENSAT qui a dirigé cette thèse.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Xuân-Mi MEYER, maître de conférences à l'**Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques Et Technologiques** pour avoir codirigé ce doctorat. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude et toute ma sympathie.

Je tiens à remercier Cédric BRANDAM, maître de conférences à l'ENSIACET, pour la façon dont il a suivi ce travail au quotidien tout au long de ces trois années, pour l'attention et le soutien qu'il a portés à mon travail.

Florence MATHIEU, ma tutrice de monitorat, Professeur à l'ENSAT, a pleinement assumé son rôle. J'ai apprécié le rapport de confiance qu'elle a su instaurer entre nous. Elle a fait en sorte que l'enseignement soit avant tout un plaisir.

J'exprime ma gratitude envers le ministère français de l'enseignement supérieur et de la recherche d'avoir financé cette thèse.

Je remercie Valérie LAROUTE et Clémentine DRESSAIRE du LISBP de l'INSA de Toulouse de m'avoir permis de déterminer la composition en acides aminés libres de mes surnageants de cultures.

Je remercie les doctorants et post doctorants du laboratoire, en particulier ceux du cru 2008-2009 : Abdelkrim, Abdoulaye, Adrien, Alain, Alicia, Amit, Benjamin, Carole, Cathy, Céline, Dominique, Fahima, Ilyes, Isariebel, Liz, Luis, Maha, Mathieu, Matthieu, Nancy, Nathalie DM-R, Nathalie G-M, Norbert, Romain, Suhuttaya ...

Mes remerciements vont également à l'ensemble des personnels permanents ou non du laboratoire que j'ai pu côtoyer tout au long de cette thèse de près ou de loin.

Parce que j'ai parcouru bon nombre de thèses en m'attardant souvent sur cette partie notoire, je vais, consacrer quelques mots à la page suivante.

J'aurais espéré que cette thèse soit, en elle-même, un remerciement suffisant au soutien et à la confiance sans cesse renouvelée de mes proches, mais je préfère leur dédier ces quelques mots (au cas où) ...

Ce travail clôture neuf années passées dans l'enseignement supérieur - Je tiens à préciser, à ce propos, que je n'ai point repiqué mais que j'ai été admise sur titre à l'INSA -, 24 ans dans le système éducatif français, je remercie tous ceux que j'y ai croisé, qui m'ont marqué pour diverses raisons et ont façonné la personne diplômée que je suis : Adrien, Carine, Coui, Delphine, Jean-Philippe, Marie, Muriel, From, Kenza, Léo, Lucille, Nico(lo), Romain, Valenti, Vincent ... Philippe FAUCOU de la société 3A, Didier FOURNIER de l'IPBS, Claude MARANGES de l'INSA et Jean-Louis URIBELARREA de l'INSA...

Phong, Huberson (Hub pour les intimes), je vous adresse mes plus plates excuses pour mes petits sauts d'humeur autour des fermenteurs ou à Naples ...

Alain, le labo ne serait pas le même sans toi, en tout cas certainement pas aussi propre !

Que les qualités morales du Dr SALAMEH soient saluées.

Bernard, merci pour tes bisous quotidien du matin

Je remercie le Centre d'Initiation à l'Enseignement Supérieur pour son insistance à me former à des tas de choses.

Une pensée pour les barbiz® : Amandine, Benjamin, Benoit, Jitti et Luis, les doctorants des doctoriales.

Je salue mes camarades du bureau Alambic 2005 : Cathy, Fahima, Florian, Maha, Matthieu, et Nathalie. Vive l'alambic !

J'aimerais également honorer mes camarades de jogging : Claudine, Jackie, Claire... .

Je remercie mes amis extrascolaires, tous ceux que je n'ai pas croisés sur un banc d'école, je pense plus particulièrement aux gourettois ...

Je bénis le quizz du mulligan's du mardi soir.

Je remercie les microorganismes d'exister. Je remercie aussi cette forme de précipitation, constituée de glace cristallisée et agglomérée en flocons pouvant être ramifiés d'une infinité de façons, bref je remercie ce truc qu'on appelle la neige de tomber si souvent dans notre belle vallée d'Ossau.

Mes pensées vont également aux moments obscurs qui m'ont toujours donné l'envie d'avancer.

Je ne remercie pas le dictionnaire des synonymes de word pour le peu de propositions fournies du synonyme du verbe remercier.

Je remercie tous les « ... » que j'ai oubliés de citer.

Je remercie mes parents, Françoise et Michel, ma sœur Emmanuelle et mon frère Charles.

LES BACTÉRIES: LES BONNES, LES BRUTES ET LES TRUANDES

Sommaire

Introduction	1
I Etude Bibliographique	5
I - 1 Besoin en nouvelles molécules	5
I - 1 - 1 Une menace pour l'humanité : Augmentation des risques liés aux épidémies	5
I - 1 - 2 La résistance aux antibiotiques	8
I - 1 - 2 - 1 Qu'est ce que la résistance aux antibiotiques ?	8
I - 1 - 2 - 2 Origine de la résistance aux antibiotiques	9
I - 1 - 3 Solutions envisagées	10
I - 1 - 3 - 1 Trouver et/ou développer de nouveaux antibiotiques	10
I - 1 - 3 - 1 - 1 Exploiter la biodiversité	10
I - 1 - 3 - 1 - 2 Explorer les génomes bactériens	11
I - 1 - 3 - 1 - 3 Développement de nouvelles molécules	12
I - 1 - 3 - 2 Alternatives aux antibiotiques	12
I - 2 <i>Saccharothrix algeriensis</i>, bactérie filamenteuse productrice de dithiopyrrolones	13
I - 2 - 1 Intérêt, inconvénients et caractéristiques des bactéries filamenteuses	13
I - 2 - 1 - 1 Principales caractéristiques des actinomycètes	13
I - 2 - 1 - 2 Le métabolisme secondaire des actinomycètes	15
I - 2 - 1 - 2 - 1 Généralités	15
I - 2 - 1 - 2 - 2 Régulation de la biosynthèse des métabolites secondaires	16
I - 2 - 1 - 2 - 3 Vers les procédés industriels de bioconversions	22
I - 2 - 2 <i>Saccharothrix algeriensis</i>	23
I - 2 - 2 - 1 Isolement et caractéristiques de la souche	23
I - 2 - 2 - 2 Le genre <i>Saccharothrix</i>	24
I - 2 - 3 Dithiopyrrolones	28
I - 2 - 3 - 1 Propriétés structurales	28
I - 2 - 3 - 2 Spectre et mode d'action	29
I - 2 - 3 - 3 Microorganismes producteurs	29
I - 2 - 3 - 4 Synthèse chimique et biosynthèse des dithiopyrrolones	31
I - 2 - 3 - 5 Production de dithiopyrrolones par <i>Sa. algeriensis</i>	31
I - 2 - 3 - 5 - 1 Influence de la composition du milieu sur la production des dithiopyrrolones	32
I - 2 - 3 - 5 - 2 Influence de la composition du milieu sur la production de nouveaux dérivés	32
I - 2 - 3 - 5 - 3 Faibles consommations du glucose	33
I - 2 - 3 - 6 Les cyclodipeptides synthases	33
I - 3 Modélisation du comportement microbien	34
I - 3 - 1 Généralités	34
I - 3 - 2 Modélisation du comportement microbien	36
I - 3 - 2 - 1 Modèles phénoménologiques	36
I - 3 - 2 - 2 Modèles structurés	38

I - 3 - 2 - 3 Modèles hybrides	39
II Matériel et Méthodes	41
II - 1 Microorganisme	41
II - 2 Culture microbienne	41
II - 2 - 1 Milieu de sporulation du microorganisme : ISP2	41
II - 2 - 2 Milieux de culture	42
II - 2 - 2 - 1 Milieux « Minimum »	42
II - 2 - 2 - 1 - 1 Milieu minimum « carbonate de calcium »	42
II - 2 - 2 - 1 - 2 Milieu minimum « MOPS »	42
II - 2 - 2 - 2 Milieu semi-synthétique	43
II - 2 - 2 - 3 Milieux synthétiques	44
II - 2 - 2 - 4 Milieu semi-synthétique standard	47
II - 2 - 3 Conditions de culture	47
II - 2 - 3 - 1 Conservation de la souche : préparation de cryotubes	47
II - 2 - 3 - 2 Préculture	48
II - 2 - 3 - 3 Culture en erlenmeyers	48
II - 2 - 3 - 4 Culture en fermenteurs	48
II - 3 Méthodes analytiques	51
II - 3 - 1 Quantification de la biomasse : Mesure du poids sec	51
II - 3 - 2 Dosage du glucose	52
II - 3 - 3 Dosage des dithiopyrrolones	52
II - 3 - 3 - 1 Préparation de l'échantillon	53
II - 3 - 3 - 2 Conditions analytiques	53
II - 3 - 4 Dosage des acides aminés	54
II - 3 - 5 Dosage des sulfates et des phosphates	55
II - 3 - 5 - 1 Préparation de l'échantillon	55
II - 3 - 5 - 2 Conditions analytiques	55
II - 3 - 6 Dosage de l'azote ammoniacal (NH_4^+) : méthode enzymatique	56
II - 3 - 7 Dosage de l'azote α -aminé : méthode enzymatique	56
II - 3 - 8 Dosage des éléments chimiques : spectrométrie d'émission atomique	56
II - 3 - 8 - 1 Préparation de l'échantillon	57
II - 3 - 8 - 2 Conditions analytiques	57
II - 3 - 9 Analyse élémentaire CHONS	57
II - 3 - 10 Mesure du diamètre des pelotes : microscope	58
II - 4 Culture des microorganismes filamenteux : Aspects Pratiques	59
II - 4 - 1 Suivi de l'évolution de la biomasse	59
II - 4 - 2 Culture des actinomycètes, bactéries filamenteuses	61
II - 4 - 3 Reproductibilité	61
II - 5 Détermination des paramètres cinétiques microbiens	62
II - 5 - 1 Etablissement des cinétiques de production de CO_2 et de consommation de l'O_2	62
II - 5 - 2 Calcul des vitesses instantanées de production et de consommation	64
II - 5 - 3 Calcul des vitesses spécifiques instantanées	64
II - 6 Traitement des données	64
II - 6 - 1 Lissage des données expérimentales	64
II - 6 - 2 Réconciliations des données expérimentales	65

II - 6 - 3 Méthode d'analyse factorielle appliquée à la recherche de stœchiométries de réaction	66
III Recherche d'un milieu synthétique pour la production de biomasse	69
III - 1 Milieu semi-synthétique	70
III - 1 - 1 Substitution de carbonate de calcium	70
III - 1 - 2 Croissance sur milieu semi-synthétique tamponné avec du MOPS	71
III - 2 Croissance sur milieu minimum	73
III - 3 Recherche d'un milieu synthétique	73
III - 3 - 1 Influence des carbohydrates sur la croissance	73
III - 3 - 2 Croissance sur milieu synthétique	76
III - 3 - 2 - 1 Effet des acides aminés sur la croissance	76
III - 3 - 2 - 2 Effet des bases azotées sur la croissance	79
III - 3 - 2 - 3 Effet des oligoéléments sur la croissance	80
III - 3 - 3 Récapitulatif	82
III - 4 Essai en réacteur	83
IV - Analyse qualitative du comportement <i>Saccharothrix algeriensis</i>	87
IV - 1 Description de la croissance de <i>Saccharothrix algeriensis</i> et de la production de thiolutine sur milieu semi-synthétique standard	87
IV - 2 Interprétations	92
IV - 3 Etude de sensibilité	96
IV - 3 - 1 Sensibilité des concentrations en glucose et en extrait de levure	96
IV - 3 - 2 Incidence d'une limitation en glucose	99
IV - 3 - 3 Impact d'un pulse de cystine	101
IV - 4 Validation	102
IV - 5 Conclusion	104

V - Analyse quantitative du comportement	
<i>Saccharothrix algeriensis</i>	105
V - 1 Bilans matière	106
V - 2 Définition d'un pseudo constituant	109
V - 3 Résultats de la réconciliation des données expérimentales	110
V - 4 Proposition d'un schéma réactionnel	112
V - 4 - 1 Analyses des données expérimentales	112
V - 4 - 2 Détermination des coefficients stœchiométriques	114
V - 5 Initialisation et procédure d'identification	115
V - 6 Présentation des résultats de la minimisation sous contraintes	116
V - 6 - 1 Coefficients stœchiométriques	116
V - 6 - 2 Avancements de réactions	118
V - 6 - 3 Données réconciliées versus données simulées	124
V - 7 Validation sur 3 expérimentations	126
V - 8 Conclusion	128
Conclusions Générales	129
Références Bibliographiques	133
Table des illustrations	151
Annexes	155
Résumé	173
Abstract	174
Communications Scientifiques	175

Introduction

Introduction

Près d'un quart des décès dans le monde résulte de maladies infectieuses et un nombre grandissant d'infections est provoqué par des bactéries de plus en plus résistantes aux antibiotiques (Mukhopadhyay *et al.*, 2008). La surconsommation de ces molécules aussi bien en santé humaine que sur le plan de l'élevage agricole en est la principale cause. Bien que ce phénomène illustre l'extraordinaire capacité d'adaptation du vivant, il est devenu une préoccupation essentielle de l'humanité. Ainsi, la production de nouvelles molécules « bio-actives » sur les souches pathogènes résistantes aux antibiotiques actuellement disponibles fait l'objet de plus en plus de projets de recherche interdisciplinaires. C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude.

Au sein de notre laboratoire (LGC), une nouvelle espèce bactérienne *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 (Zitouni *et al.*, 2004) a été isolée en 1992 de la palmeraie d'Adrar (Algérie). Cette bactérie filamenteuse appartient au groupe des actinomycètes. Celle-ci s'est avérée productrice de molécules de la classe des dithiopyrrolones et présente des activités antibactériennes, antifongiques et anticancéreuses intéressantes (Webster *et al.*, 2000 ; Oliva *et al.*, 2001 ; Minamiguchi *et al.*, 2001). Le noyau dithiopyrrolone possède une structure composée de deux hétérocycles de 5 atomes : un cycle dithiol et un cycle pyrrol. Chaque association « radical-noyau » confère à la dithiopyrrolone des propriétés différentes, ce qui rend ce modèle d'étude intéressant. Lamari *et al.* (2002a) ont trouvé que *Sa. algeriensis* produit principalement six molécules de cette classe.

Le genre *Saccharothrix* fait partie des Actinomycètes rares très peu étudiés. Aucune donnée intéressante sur ce groupe n'est disponible dans la littérature. Des travaux antérieurs (Bouras, 2005), ont permis de mettre en évidence l'influence de la composition du milieu de culture sur les productions spécifiques des six molécules produites. De plus, également lors de ces travaux, de nouveaux dérivés dithiopyrrolones ont pu être produits en modifiant le milieu de culture. Ces potentialités synthétiques sont donc prometteuses.

Le travail présenté ici vise un double intérêt. En effet, la compréhension du métabolisme des actinomycètes, producteurs d'une grande diversité de métabolites secondaires, est fondamentale. Par ailleurs, les exigences en matière de maîtrise du procédé sont primordiales en termes de compétitivité et de concurrence industrielle.

Ce travail a donc pour ultime objectif la définition de conditions d'un procédé de production d'une molécule d'intérêt. Ainsi, cette étude se concentre plus sur les aspects macroscopiques de l'examen du comportement du microorganisme que sur une analyse microscopique de sa physiologie.

Cet objectif se décompose en plusieurs étapes :

- Concevoir un milieu de culture chimiquement maîtrisé permettant une croissance appréciable de *Sa. algeriensis* en culture liquide.
- Présenter et comprendre la croissance du microorganisme et la production de thiolutine associée sur milieu semi-synthétique standard afin d'acquérir une certaine connaissance des caractéristiques physiologiques du microorganisme ainsi que des voies de biosynthèse de l'antibiotique produit et des régulations qui s'y opèrent.
- Etablir, à partir des données cinétiques collectées aux cours de différentes expérimentations, un modèle stœchiométrique rendant compte du comportement de la bactérie d'un point de vue macroscopique.

Le **chapitre I** est une **synthèse bibliographique**. Dans un premier temps, elle précise les raisons de l'accroissement des besoins de l'humanité en antibiotiques ainsi que les différentes approches mises en œuvre afin de développer de nouvelles molécules bio-actives. Les connaissances sur *Sa. algeriensis* ainsi que sur les dithiopyrrolones sont ensuite exposées. Enfin, une part de cette synthèse est consacrée à la modélisation du comportement microbien.

La partie **matériel et méthodes** décrite dans le **chapitre II** regroupe l'ensemble des techniques et méthodologies utilisées pour la réalisation de ce travail.

La présentation et la discussion des résultats sont décomposées en trois chapitres. Le **chapitre III** concerne les investigations menées sur la recherche d'un milieu chimiquement

défini. L'analyse qualitative du comportement de la bactérie sur un milieu multi-substrats est présentée dans le **chapitre IV**. L'approche stœchiométrique appliquée aux données expérimentales est présentée et critiquée dans le **chapitre V** au travers d'une analyse quantitative des résultats du chapitre IV.

Les **conclusions** des travaux menés ainsi que les **perspectives** qui en découlent clôturent ce manuscrit.

Chapitre I

Etude Bibliographique

I Etude Bibliographique

L'apparition de bactéries multi résistantes fait, de la recherche et du développement de nouvelles molécules bioactives, un des défis les plus importants pour l'humanité au 21^{ème} siècle. Alors que la recherche commence à buter sur des limites physiques, les perspectives entrouvertes sur le monde du vivant sont immenses. Cette synthèse bibliographique présente un panorama de la recherche de nouvelles molécules bioactives. Elle a pour but de permettre au lecteur de s'immerger dans le sujet ainsi que dans la perception qu'en a son auteur et donc de comprendre la structuration de ce manuscrit.

Ce chapitre présente dans un premier temps les raisons d'une telle demande et les solutions possibles ou envisagées. Les connaissances sur *Saccharothrix algeriensis* ainsi que sur les dithiolyrrolones sont rassemblées dans une deuxième partie. Elles ont servi de bases à mon travail de thèse. La dernière partie traite des différents intérêts et moyens de modéliser le comportement microbien.

I - 1 Besoin en nouvelles molécules

I - 1 - 1 Une menace pour l'humanité : Augmentation des risques liés aux épidémies

La terre a connu des pandémies dévastatrices, ainsi, les historiens estiment que la peste noire (1347-1350) a provoqué la mort de la moitié de la population européenne en cinq ans, soit environ 25 millions de victimes (Halioua, 2004). Les villes sont plus durement touchées que les campagnes du fait de la concentration de la population, mais aussi des disettes et difficultés d'approvisionnement que la peste provoqua.

Les chercheurs estiment que de telles maladies émergentes prendront une importance croissante avec la croissance démographique, la promiscuité urbaine, les modifications

climatiques, l'augmentation des déplacements de biens et personnes, l'augmentation des facteurs mutagènes et le contact avec de nouveaux microorganismes ou nouveaux virus.

Ainsi, la population mondiale était de 6 713 285 484 personnes le lundi 21 juillet 2008 à 11 h 01 min et 52 s (<http://www.populationmondiale.com/> consulté le 21 Juillet 2008).

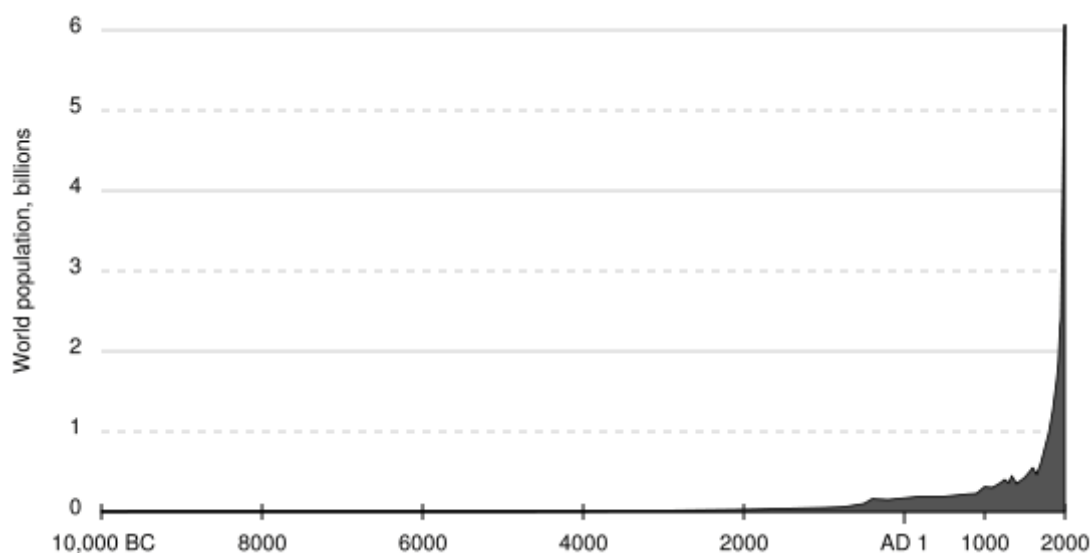


Figure I.1 : Evolution de la population mondiale en milliards d'habitants

(http://fr.wikipedia.org/wiki/Image:Population_curve.svg consulté le 21 Juillet 2008. Consulté le 21 Juillet 2008).

La figure I.1 présente son évolution au cours du temps. En 2008, chaque jour, la terre compte 206000 habitants de plus mais cette augmentation n'est pas homogène sur la surface du globe (figure I.2), certain pays comme l'Inde sont plus touchés par cette explosion démographique.

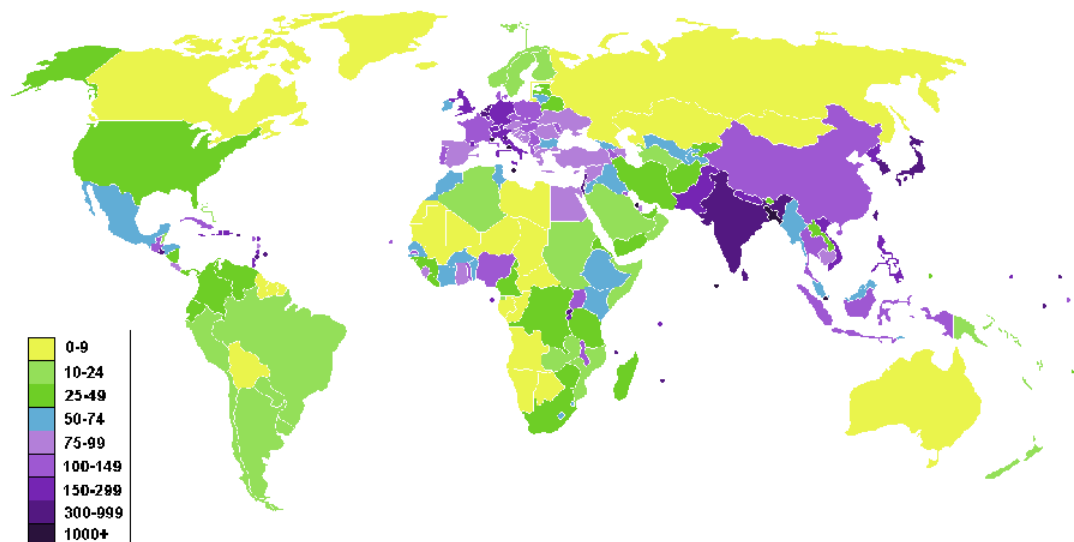


Figure I.2 : Densité de la population mondiale en habitant par km².

(Central Intelligence Agency, « Press Release: CIA World Factbook 2006 ». Consulté le 25 septembre 2006).

L'augmentation de la densité de population humaine accroît sans cesse les risques épidémiologiques. En effet, l'homme est un réservoir classique d'agents pathogènes, dans le sens où on appelle réservoir, l'ensemble des acteurs de la chaîne épidémiologique qui assurent la pérennisation de l'agent pathogène ; un réservoir peut donc être humain.

Les facteurs influençant favorablement l'évolution d'une épidémie ont été étudiés dans le cadre des épidémies de choléra (Jaureguiberry *et al.*, 2001) et sont présentés ci-dessous:

- Le mode de vie : l'augmentation de la population, surtout dans les grandes villes, associée à un appauvrissement et une urbanisation sauvage, est un facteur essentiel dans l'apparition des épidémies de choléra (le nombre d'habitants de la planète vivant dans les villes est passé de 33 % en 1970 à 50 % en 2000).

- Les mouvements de population : déplacements de population à la suite de guerres, de catastrophes naturelles, de famines : les épidémies de choléra peuvent réapparaître en zone d'endémie (la malnutrition, le stress, l'épuisement, la promiscuité favorisent la contamination). Des épidémies de choléra ont été favorisées par des déplacements de personnes au cours de la transhumance (par exemple, le cheminement du choléra au Sahel de 1970 à 1980). Par

ailleurs, les guerres chroniques engendrent des conditions de vie et d'hygiène désastreuses, un appauvrissement du pays, une destruction des ressources sanitaires et parfois un déplacement de la population.

- Faible accès à l'eau potable : Plus d'un milliard de personnes restent exclues d'un approvisionnement en eau (essentiellement en Asie et en Afrique) alors que 2,6 milliards n'ont pas de service d'assainissement. En 2006, 22 000 personnes mourraient chaque jour en raison d'une consommation d'eau insalubre (Dossier de presse de l'association Solidarités, page 2).

- Changements climatiques : L'arrivée de la saison des pluies ou de cyclones peut favoriser l'émergence ou la recrudescence d'une épidémie de choléra en région endémique humide ; un exemple récent : la côte Est de Madagascar (février 2000).

Malheureusement, de nos jours, tous ces facteurs pouvant favoriser les épidémies de choléra (Urbanisation massive et sauvage, conflits, changements climatiques, raréfaction de l'eau potable) se rencontrent fréquemment et peuvent favoriser d'autres épidémies dues à d'autres microorganismes pathogènes.

I - 1 - 2 La résistance aux antibiotiques

I - 1 - 2 - 1 Qu'est ce que la résistance aux antibiotiques ?

Pour être efficace, un antibiotique doit parvenir au contact de la bactérie, puis pénétrer dans la cellule afin de se fixer à une cible et perturber le fonctionnement du microorganisme, sans être détruit ni modifié. Si l'antibiotique ne parvient pas à pénétrer dans la bactérie ou à se fixer sur une cible, il devient inefficace. Ce phénomène appelé résistance est lourd de conséquences. Ainsi, de nombreux microorganismes pathogènes classiques développent des résistances multiples aux antibiotiques.

Les bactéries se défendent contre l'action des antibiotiques :

- en se rendant imperméable à leur pénétration.
- en produisant des enzymes capables de les inactiver.
- en modifiant la structure de leurs cibles.

Ces résistances peuvent être naturelles ou acquises consécutivement à des modifications de l'équipement génétique chromosomique ou plasmidique (mutations spontanées - 20% des résistances - ou échange par conjugaison d'un plasmide ou d'un transposon – 80 % des résistances).

I - 1 - 2 - 2 Origine de la résistance aux antibiotiques

Devant l'augmentation de la densité de la population humaine dans certaines zones géographiques, l'usage des différents traitements est accru.

L'usage d'un seul antibiotique dont la résistance est codée par un gène du plasmide sélectionne les souches résistantes à toutes les molécules dont le gène de résistance se trouve sur le plasmide, ce qui entraîne la sélection rapide de souches polyrésistantes.

Le Dr Harold C. Neu était l'un des premiers chercheurs à dénoncer l'utilisation abusive et inutile des antibiotiques dans de nombreux cas (Neu, 1992). A titre d'exemple, il s'est vendu 14 millions de boîtes d'amoxicilline (12 gélules de 500 mg) en France en 2005. (<http://rteyssou.unblog.fr/2008/04/30/naissance-des-epidemies-ecologie-microbienne/> consulté le 1 Juin 2008). Nous savons maintenant que ses mises en garde étaient fondées (Butler *et al.* 1996; Critchley *et al.* 2007; Linares *et al.* 2007; Lagamayo, 2008).

L'un des antibiotiques victimes de la résistance bactérienne est la pénicilline. Alors que cet antibiotique est mis en évidence par Alexander Fleming en 1928, on observe déjà des bactéries résistantes à ce β -lactame dès 1930. Les bactéries résistent à la pénicilline de trois façons différentes : par diminution de la perméabilité, par modification des PBP (Penicillin Binding Protein) ou le plus souvent par hydrolyse du noyau lactame par les β -lactamases (figure I.3). En 1996, les pénicillines étaient encore un traitement efficace contre le pneumocoque ; en 2001, les chercheurs ont constaté que celui-ci présentait une résistance importante envers ces antibiotiques.

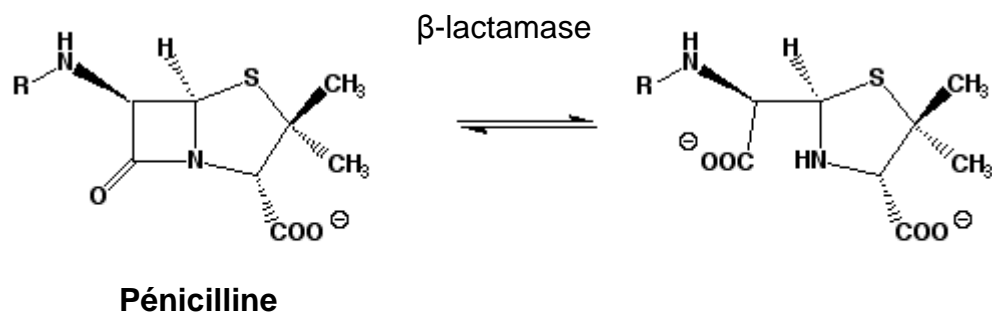


Figure I.3 : Hydrolyse du noyau β -lactame, adapté de Martín-Gil *et al.*, 1984.

D'autres chercheurs avaient déjà entrevu la complexité biologique de l'interaction entre microorganismes. Ernest Duchesne est un scientifique français né en 1874 à Paris, reçu Docteur en médecine à 23 ans, avec pour sujet de thèse : « Contribution à l'étude de la concurrence vitale chez les microorganismes, antagonisme entre les moisissures et les microbes ». L'expérimentation est simple. Il inocule deux cobayes, l'un avec une culture de *Bacterium coli* l'autre avec une culture de bacille typhique. Tous deux meurent rapidement. Dans les jours qui suivent, deux autres cobayes reçoivent les mêmes inoculations avec en plus une culture de *Penicilium glaucum*. Cette fois ils survivent au prix d'une simple hyperthermie. Ses conclusions sont prophétiques : « On peut donc espérer qu'en poursuivant l'étude des faits de concurrence biologique entre moisissures et microbes, étude seulement ébauchée par nous et à laquelle nous n'avons d'autre prétention que d'avoir apporté ici une très modeste contribution, on arrivera, peut-être, à la découverte d'autres faits directement utiles et applicables à l'hygiène prophylactique et à la thérapeutique ».

I - 1 - 3 Solutions envisagées

I - 1 - 3 - 1 Trouver et/ou développer de nouveaux antibiotiques

I - 1 - 3 - 1 - 1 Exploiter la biodiversité

La première idée qui vient à l'esprit lorsque le sujet « découverte d'un nouvel antibiotique » est abordé, est la découverte d'un microorganisme inconnu produisant une molécule inconnue à forte activité antibactérienne.

Les chercheurs estiment que seul 1% des microorganismes vivants sur terre a été découvert, ce qui laisse place à la découverte de multitude de nouvelles espèces. Pourquoi ne sont elles pas encore découvertes ? Soit parce que leur culture est difficile, soit parce que leurs niches écologiques sont des milieux extrêmes (volcan, lac salé, désert ...). Ainsi pour ces deux raisons, les chercheurs pensent que ces souches microbiennes encore inconnues doivent posséder des métabolismes particuliers et différents et donc la capacité de produire de nouvelles molécules. Dans l'espoir d'augmenter la probabilité de découverte de nouveaux antibiotiques, les chercheurs ont commencé à s'intéresser ces dernières années à des genres rares provenant de milieux extrêmes (Sabaou *et al.*, 1998; Lazzarini *et al.*, 2000; Naidenova et Vladimirova, 2002; Barakate *et al.*, 2002; Donadio *et al.*, 2002; Moncheva *et al.*, 2002 ; Bouras *et al.*, 2008). Ainsi, de nombreuses campagnes sont menées à travers le monde pour découvrir de nouveaux microorganismes.

L'exobiologie ne doit pas être mise de côté non plus, mais les projets concernant la découverte de microorganismes extraterrestres ne sont pas présentés ici pour des raisons de concision.

I - 1 - 3 - 1 - 2 Explorer les génomes bactériens

Les actinomycètes sont déjà les fournisseurs de la plupart des antibiotiques utilisés dans la médecine moderne, mais la séquence du génome de quelques espèces (principalement, *S. coelicolor*, *S. avermilis*, *S. scabies*, *S. ambofaciens*) a révélé qu'ils possédaient 5 à 10 fois plus de voies de biosynthèse que ce qui avait été observé d'après leur capacités biosynthétiques, chaque espèce étant connue pour produire 3 ou 4 antibiotiques différents. Cet énorme potentiel, mis en évidence par l'analyse *in silico* des génomes de *Streptomyces* séquencés, pourrait conduire à la production de nouveaux métabolites secondaires avec des structures différentes et donc des activités biologiques différentes (Lautru *et al.*, 2005 ; Tohyama *et al.*, 2004).

Il existe donc un réservoir immense et non exploité de diversité métabolique au sein des milliers d'espèces appartenant à la famille des actinomycètes et plus particulièrement, au genre *Streptomyces* (Smirnov *et al.*, 2008).

I - 1- 3 - 1 - 3 Développement de nouvelles molécules

D'autres moyens de découvrir de nouvelles molécules bioactives sont de développer de nouvelles molécules soit par design moléculaire à partir des cibles moléculaires bactériennes (Singh *et al.*, 2007), soit par modifications chimiques de molécules existantes ou alors par muta synthèse, c'est-à-dire en fournissant à la bactérie des intermédiaires métaboliques différents (Juguet *et al.*, 2008).

Par ailleurs, il est à noter que beaucoup d'études se concentrent sur l'amélioration des rendements de production des molécules déjà existantes. La technique utilisée est l'ingénierie métabolique (Olano *et al.*, 2008) soit en redirigeant les flux de précurseurs métaboliques vers la production de la molécule d'intérêt, soit en dérégulant certaine voie métabolique ou alors en surexprimant les enzymes impliquées dans les étapes goulot d'étranglement des voies métaboliques clés. Il existe d'autres techniques qui utilisent des hôtes hétérologues pour l'expression de métabolites secondaires. Ainsi, l'échinomycine (antitumoral) et son intermédiaire la triostin A ont été produits dans *E. coli* par expression du cluster de gènes entier isolé à partir de *S. lasaliensis* (Watanabe *et al.*, 2006).

I - 1 - 3 - 2 Alternatives aux antibiotiques

Les peptides microbiens, les bactériophages ou les hydrolases de la paroi des bactéries sont d'autres moyens alternatifs aux molécules antibiotiques afin de lutter contre les microorganismes pathogènes (Parisien *et al.*, 2007).

Une autre alternative à la découverte de nouveaux antibiotiques est de préserver l'efficacité des molécules antibiotiques existantes. Naturellement, les bactéries soumises à l'action d'un antibiotique meurent mais il arrive que certaines survivent et ainsi développent une résistance à l'antibiotique qu'elles pourront transmettre (« Effet Darwin »). Mais le développement des bactéries résistantes dépend aussi du mode d'utilisation des antibiotiques.

Afin de préserver l'efficacité des antibiotiques, les utilisations suivantes sont à proscrire :

- Utilisation excessive des antibiotiques qui agissent sur un large nombre d'espèces bactériennes
- Utilisation injustifiée (dans le cas d'une infection virale, par exemple).
- Utilisation d'une classe d'antibiotique inefficace sur une infection bactérienne spécifique.
- Arrêt prématuré du traitement ou sous-dosage

De nombreuses études dans le monde appellent à réduire la consommation d'antibiotique afin d'altérer la résistance aux antibiotiques (Friedman et Whitney, 2008).

Ainsi, en France, pour préserver l'efficacité des antibiotiques, le Ministère de la santé a élaboré un plan en date du 20 novembre 2001 dont l'objectif est de maîtriser et de rationaliser la prescription des antibiotiques. Ce premier plan avait pour but d'informer le public (« Les antibiotiques, c'est pas automatique. ») et les professionnels de la santé. Le deuxième plan (2007-2010) ne se concentre que sur la communication d'informations précises sur les antibiotiques et la résistance aux professionnels de la santé (<http://www.sante.gouv.fr/plan-antibiotiques/index.html> consulté le 20 juillet 2008).

I - 2 *Saccharothrix algeriensis*, bactérie filamenteuse productrice de dithiopyrrolones

I - 2 - 1 Intérêt, inconvénients et caractéristiques des bactéries filamenteuses

I - 2 - 1 - 1 Principales caractéristiques des actinomycètes

Les actinomycètes forment un grand groupe de microorganismes procaryotes appartenant à l'ordre des *Actinomycetales*. Cet ordre regroupe des bactéries à Gram positif ayant un pourcentage en "guanine + cytosine" relativement élevé dans leur ADN (G + C > 55 mol %) et dont la majorité tendent à former un véritable mycélium ramifié (Manuel de Bergey, 1994). Les actinomycètes sont des eubactéries chimio-organotrophes hétérotrophes, aérobies strictes ou microaérophiles, dont plusieurs produisent des spores non mobiles ou parfois mobiles. Ces microorganismes présentent un cycle de développement cellulaire asexué similaire à celui des champignons imparfaits (Locci et Sharples, 1984). Ils sont universellement répandus. On les trouve dans différentes niches écologiques telles que : sols, air, fumier, composts, foin, débris végétaux, résidus fibreux de cannes à sucre, pollen des

plantes, sédiments marins, lacs, rivières, mers et océans, glaciers, déserts, sols pollués, lacs alcalins, milieux salins (Goodfellow et Williams, 1983; Lacey, 1997, Lechevalier, 1981).

Ces microorganismes produisent une pléthore de molécules (Bouras 2005) ayant de nombreuses applications dans divers domaines et de ce fait, présentant un fort intérêt pour les industriels (antibactériens, antifongiques, insecticides, herbicides, antiparasites, acaricides, antivirales, anti tumoraux, antimétaboliques, anti allergénique, protéases alcalines, glucose isomérase, vitamines ...). Par ailleurs, les actinomycètes ont un rôle écologique. Ils possèdent la capacité de dégrader des molécules complexes non dégradées par les champignons ou les autres bactéries, contribuant ainsi à la fertilisation des sols.

Il existe 23000 métabolites secondaires produits par les microorganismes, plus de 10000 sont produits par les actinomycètes, ce qui représente 45% du total des métabolites microbiens, et même 80%, si on ne considère que les composés ayant un usage pratique (Béredy, 2005).

Ces microorganismes sont filamenteux. En culture liquide, ces bactéries peuvent se présenter sous divers aspects : filaments libres, filaments fragmentés, pelotes hérissées, pelotes duveteuses, pelotes allongées, radeaux hydrophobes, flocons, agrégats (Whitaker, 1992). Le principal inconvénient de la culture des microorganismes filamenteux est que leurs conditions de culture ont un impact sur leur morphologie en milieu liquide. Ainsi, l'inoculum, la composition du milieu de culture, plus particulièrement la source de carbone, d'azote et de phosphate, les métaux, la concentration en dioxygène et en dioxyde de carbone dissous, le pH, la température et les forces mécaniques impacte sur la morphologie qu'adopte le microorganisme en culture. Par exemple, un inoculum concentré en spores favorisera l'apparition des pelotes au détriment des filaments (Papagianni, 2004).

Outre les aspects expérimentaux difficiles de leur culture (cf matériel et méthode), leur morphologie en condition de culture liquide influence grandement leur physiologie. Ainsi, d'une manière générale, il semble que les formes filamenteuses libres soient plus propices aux productions industrielles. C'est le cas des productions de turimycine et de streptomycines par *S. hygroscopicus* et *S. griseus*. Cependant, les pelotes formées par *S. nitrificans* produisent plus de glucose isomérase que les filaments libres de cette même espèce. Une étude menée sur *Streptonmyces pristinaespirales* en culture en fiole ont montré que plus la puissance dissipée (par exemple, le ratio air/liquide ou la vitesse d'agitation (350 rpm au lieu de 250 rpm)) était important, meilleure était la production de pristinamycine. Une puissance dissipée de 1,6 kW/m² minimale est requise pour la synthèse de ce métabolite.

Pour résumer ces différentes études, il est difficile de tirer des conclusions sur les liens morphologie / physiologie. L'interdépendance des paramètres cités précédemment rend difficile toute interprétation. De plus, les aspects génétiques de la régulation du processus de différenciation morphologique sont à prendre en compte. (Colson *et al.*, Journées francophones des actinomycètes – 2008).

I - 2 - 1 - 2 Le métabolisme secondaire des actinomycètes

I - 2 - 1 - 2 - 1 Généralités

Le métabolisme des actinomycètes peut être divisé en deux parties : le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire. Ces bactéries filamenteuses sont connues pour la richesse de leur métabolisme secondaire.

Le métabolisme primaire regroupe les réactions cataboliques et anaboliques qui permettent la formation de biomasse. Le pouvoir réducteur et l'énergie produits par ces réactions sont utilisés pour former et assembler les monomères (ex : acides aminés) en macromolécules (ex : protéine).

Le métabolisme secondaire regroupe les voies de synthèse des composés qui n'ont pas de fonction apparente dans le métabolisme cellulaire. Les gènes impliqués dans la biosynthèse et dans la résistance des antibiotiques sont regroupés en clusters dont l'expression est finement régulée. Les gènes impliqués dans la production d'antibiotiques Ca^{2+} dépendant représentent plus de 1,1 % du génome de *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Hodgson, 2000).

Si l'homme trouve un intérêt pratique évident aux métabolites secondaires (antibiotiques, herbicides, anticancéreux ...), ses interrogations quand au rôle biologique de ces molécules pour la cellule bactérienne demeurent (C'est aussi le cas en botanique. Par exemple, le rôle biologique de la quinine, molécule très efficace contre la malaria, produite par l'arbre cinchona est inconnu). Selon la littérature, il existe deux grandes hypothèses sur l'origine du métabolisme secondaire : la sélection par le produit final (final-product selectionist school) et le métabolisme du trop-plein (overflow metabolism).

L'école de la sélection par le produit final explique l'apparition du métabolisme secondaire par un processus de sélection naturelle. En effet, les métabolites secondaires, qui sont principalement des antibiotiques, pourraient servir à empêcher l'utilisation des produits de lyse du mycélium primaire (substrat) lors du processus de différenciation au cours duquel ce mycélium est utilisé par le mycélium aérien et auraient de ce fait, un rôle protecteur. Cette

hypothèse n'explique pas plusieurs constatations. Ainsi, tous les métabolites secondaires ne sont apparemment pas des antibiotiques. Par exemple le rôle sélectif d'un immunomodulateur dans le sol est inconnu à ce jour. Certaines espèces d'actinomycètes produisent beaucoup d'antibiotiques et d'autres très peu, voire pas du tout. Les espèces qui en produisent plus devraient donc être avantagées d'un point de vue évolutif au détriment de celles qui en produisent peu or ce n'est pas le cas. Il n'existe pas d'explication sur les possibilités d'évolution au cours du temps de ces voies complexes de biosynthèse. L'évolution étape par étape par un processus de sélection naturelle des voies du métabolisme secondaire n'est pas possible. Par exemple, bien souvent, le précurseur direct n'a pas d'activité antibiotique. De plus, il existe des antibiotiques, comme la streptomycine constitués d'assemblages de nouveaux sucres, unités n'ayant pas de rôle antimicrobien. Autrement dit, l'évolution ne peut pas regarder dans le futur. Par cette hypothèse, le métabolisme est un énorme paradoxe à lui tout seul.

L'autre grande hypothèse considère les métabolites secondaires comme des métabolites issus du trop-plein du métabolisme central. En effet, le métabolisme primaire fournit les précurseurs qui alimentent le métabolisme secondaire. Or, lorsque la croissance bactérienne est perturbée par une carence en phosphate par exemple, le métabolisme secondaire pourrait être induit pour permettre au métabolisme primaire de se maintenir au ralenti en attendant que la carence en question soit comblée. En fait, c'est plus le métabolisme secondaire dans son processus qui serait utile à la cellule bactérienne que le métabolite secondaire en tant que produit final de ce métabolisme. Donc, dans cette hypothèse, le contrôle du métabolisme primaire aurait pour conséquence l'induction d'un métabolisme d'overflow, le métabolisme secondaire. Dans cette hypothèse de métabolisme d'overflow, le rôle biologique de ces métabolites se serait révélé par la suite, ce qui réconcilierait ces deux hypothèses (Hodgson, 2000).

I - 2 - 1 - 2 - 2 Régulation de la biosynthèse des métabolites secondaires

- **Influence des sources nutritionnelles**

La littérature scientifique abonde d'études sur l'influence des sources nutritionnelles sur le métabolisme secondaire des actinomycètes.

Effet de la source de carbone

Aharonowitz (1978) montre que l'augmentation de la concentration en source carbonée (maltose ou glycérol) de *S. clavuligerus* diminue sensiblement la production de Cephamicine C alors qu'au contraire, des sources de carbone plus pauvres telles que le succinate ou l'alpha-cétoglutarate augmentent cette biosynthèse. De même, chez *S. ambofaciens*, les dextrines permettent une meilleure production spécifique de spiramycine que le glycérol (0,035 mg.g_x.h⁻¹ contre seulement 0,05 mg.g_x.h⁻¹). L'effet négatif du glycérol serait dû à un taux de croissance élevé et à un excès de production d'énergie. Les sources de carbone lentement assimilées permettraient de meilleurs rendements de production d'antibiotiques (Lounès *et al.*, 1995ab).

Chez beaucoup de microorganismes, le glucose provoque une répression de la formation de plusieurs antibiotiques amino-glycosidiques produits par les actinomycètes (streptomycine, kanamycine, istamycine et néomycine) par une répression des enzymes de biosynthèse (Demain, 1989; Piepersberg et Distler, 1997). Chez certains microorganismes, l'effet inhibiteur du glucose sur la production des métabolites est dû à l'acidification par suite de l'accumulation des acides organiques (Solé *et al.*, 2000).

Effet de la source d'azote

La source d'azote utilisée en culture microbienne est généralement l'ammonium ou des composés organiques comme les acides aminés. Le nitrate est aussi employé. Beaucoup d'antibiotiques possèdent un atome d'azote dans leur structure. La forme sous laquelle l'azote est apporté aux cultures productrices d'antibiotiques influe et contrôle fortement les rendements de production (Marwick *et al.*, 1999 ; Lebrihi *et al.*, 1992).

L'ammonium inhibe la formation de deux enzymes de la voie de biosynthèse de la céphamicine C chez *S. clavuligerus*: la cyclase et l'expandase (Braña *et al.*, 1985). Des concentrations importantes en ammonium répriment certaines enzymes de dégradation des acides aminés comme la valine déshydrogénase (VDH) (Omura *et al.*, 1983) ou la thréonine déshydrogénase (Vančura *et al.*, 1988), enzymes impliquées dans la production de précurseurs indispensables à la biosynthèse d'antibiotiques.

D'autres auteurs ont montré que l'addition d'ammonium au milieu de culture augmente la production de certains métabolites secondaires telles que la streptomycine, la néomycine et la gentamicine (aminosides). Cet effet positif est dû à la conversion de l'ammonium en glutamine utilisée dans la formation des précurseurs (Gonzalez *et al.*, 1995).

La production de spiramycine est fortement contrôlée par la source d'azote présente dans le milieu de culture. Lebrihi (1992) montre qu'elle est 3 fois supérieure dans une culture sur isoleucine que sur ammonium. La biosynthèse de céphamycine C par *S. cattleya* est aussi régulée par la source d'azote (Khaoua *et al.*, 1991). Les acides aminés suivant leur mode de catabolisme (désamination ou transamination) influencent différemment la production (Voelker et Altaba., 2001). Par exemple, un pulse d'arginine induit une faible production spécifique à cause du rejet d'ammonium dans le milieu de culture. Inversement, la lysine a un effet positif sur la production car contrairement à l'arginine, qui est fortement désaminée par le microorganisme, le rôle favorable de la lysine est lié au fait que l'azote contenu dans cette acide aminé est assimilé par transamination et non par désamination chez *S. ambofaciens*. L'addition d'une molécule piègeuse d'ammonium (0,25% $Mg_3(PO_4)_2$) contre cet effet et multiplie par quatre la production (Untrau *et al.*, 1994).

De même que pour la source de carbone, la biosynthèse de la plupart des métabolites secondaires peut être réprimée par les sources d'azote rapidement assimilables, en particulier par l'ammonium (Aharonowitz, 1980; Okanishi et Hotta, 1980; Demain, 1982; Piret et Demain, 1998).

Effet de la source de phosphate

La production des métabolites secondaires est soumise à une régulation par le phosphate inorganique chez plusieurs espèces de bactéries (Weinberg, 1973 et 1978; Martín, 1977; Liras *et al.*, 1990; Spížek et Tichý, 1995 ; Lounès et al., 1995b). Beaucoup de métabolites secondaires nécessitent pour leur formation des concentrations faibles en phosphate (inférieures à 10 mM). Toutefois des exceptions sont à noter: la thiopeptine (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).

La production d'antibiotique peut également être initiée par la carence en phosphate (Chmiel, 1986). Cependant, la cascade de régulations qui va de la détection d'une limitation en phosphate à l'induction de la voie de biosynthèse n'est pas encore élucidée. L'interruption du gène *pkk* conduit à une très forte augmentation de la production d'antibiotique chez *S. lividans* (Chouayekh *et al.*, 2002). Ce gène est exprimé uniquement en limitation de Pi et code pour une enzyme qui régénère l'ATP à partir de l'ADP et de poly-phosphates (régénération non métabolique). L'interruption du gène *Mut1* donne les mêmes résultats, il coderait pour une polyphosphatase.

Oligoéléments

La synthèse de métabolites secondaires a une tolérance plus faible à la gamme de concentration en oligoéléments que la croissance. Plusieurs 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). Certains jouent un rôle important, quantitativement et qualitativement, dans la biosynthèse des antibiotiques. Le manganèse, le fer et le zinc sont les ions métalliques les plus importants pour la production des antibiotiques. Thayer *et al.* (1985) ont montré que le $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ et le MnCl_2 stimulent la production de la monensine par *S. cinnamomensis*.

Certains éléments chimiques auraient une influence sur les types d'antibiotiques voire les type de famille d'antibiotiques produits. Ces éléments ont probablement des cibles multiples sur les systèmes de biosynthèses de ces métabolites. Des effets qualitatifs peuvent de plus s'observer: la composition du mélange de gentamicines produites par *Micromonospora purpurea* est dépendante de la concentration en Co^{++} .

- **Induction du métabolisme secondaire**

L'épuisement d'un nutriment, l'apparition d'un inducteur (par ajout ou par biosynthèse) ou la diminution du taux de croissance sont trois événements qui peuvent produire un signal induisant une cascade de régulation sous différents niveaux de contrôle génétique. Ce signal mène à un double processus de différenciation morphologique (mycélium aérien) et chimique (métabolisme secondaire).

Double rôle des précurseurs-inducteurs

Dans beaucoup de voies du métabolisme secondaire, les métabolites primaires augmentent la production de métabolites secondaires soit en participant à l'augmentation de l'offre en précurseurs, soit en induisant la production d'enzymes de la voie métabolique ou alors, les deux à la fois. C'est le cas de la lysine dont le produit de dégradation est l'acide α -aminoadipique précurseur de la céphamycine, qui induit également la production de lysine aminotransférase chez *S. clavuligerus* (Rius N *et al.*, 1996). La valine a ce même double effet chez *S. fradiae*. Son produit de dégradation est l'acide iso butyrique, précurseur de la tylosine et en induisant la synthèse de valine déshydrogénase (Nguyen KT *et al.*, 1995).

Les molécules ayant fonction d'inducteurs ne sont pas obligatoirement des précurseurs du métabolite secondaire, ainsi, la production de jadomycine B est stimulée par l'éthanol chez *S. venezuelae* (Doull *et al.*, 1993).

Rôle des inducteurs

Il existe des inducteurs non spécifiques et des inducteurs spécifiques stimulant les processus de différenciation. Les inducteurs non spécifiques sont de structure chimique commune, comme les acides aminés. Ils sont également des précurseurs.

Les inducteurs spécifiques ne sont pas des précurseurs mais possèdent une structure chimique originale. Les inducteurs se différencient des précurseurs par leur pouvoir d'action à très faibles concentrations, lorsqu'ils sont ajoutés exclusivement pendant la tropophase et par leur capacité à être remplacés par des analogues structuraux non métabolisables. Parmi ces facteurs inducteurs, on peut citer les facteurs A (du type gamma-butyrolactone), B, I (du type butanolide) et C (Kawaguchi *et al.*, 1988; Szabo *et al.*, 1988; Horinouchi et Beppu, 1990; Demain, 1998). Le facteur le mieux décrit dans la littérature, tant sur le plan biochimique que celui du mode d'action ou de l'origine génétique, est le facteur A ou facteur d'autorégulation. Il exerce son effet via un récepteur qui normalement réprime cette double différenciation morphologique-chimique. Lorsque le récepteur est complexé avec le facteur A, il ne peut plus exercer sa fonction répressive. Le processus de différenciation se met en place. Ce facteur A a principalement été étudié chez *S. griseus*. A raison de 10^{-9} M, le facteur A est capable d'induire les gènes de la production de streptomycine dont la streptomycine-6 phosphotransférase et ceux de la sporulation ce qui conforte l'hypothèse d'une étroite relation entre métabolisme secondaire et différenciation.

Les messagers nucléotides phosphorylés

En relation avec le métabolisme cellulaire (métabolismes carboné, azoté et phosphaté) et la synthèse des protéines, les messagers nucléotidiques polyphosphorylés, AMPc (3', 5'-adénosine monophosphate cyclique), ppGpp (guanine 5'-diphosphate, 3'-diphosphate) et pppGpp (guanosine 5'-triphosphate, 3'-diphosphate) ont retenu toute l'attention des spécialistes du métabolisme secondaire ces dernières années.

L'addition de l'AMPc à des cultures de *S. kanamyceticus* et de *S. hygroscopicus* supprime, respectivement, la répression exercée par le glucose sur la production de la kanamycine et l'inhibition par les phosphates de la biosynthèse de la turimycine (Sato *et al.*, 1976; Gersch *et al.*, 1979). Cependant, elle ne lève pas la répression du glucose sur les

actinomycines synthétases chez *S. antibioticus* ni l'inhibition des phosphates sur la production de la streptomycine chez *S. griseus* (Terry et Springham, 1981; Brown *et al.*, 1983).

L'étude de la synthèse de formycine chez *Streptomyces* sp. MA406-A-1 dans différentes conditions nutritionnelles prouve le rôle (direct ou indirect) de la ppGpp dans l'initiation de la production de l'antibiotique. Lorsque la souche est transférée d'un milieu riche à un milieu pauvre en acides aminés, la concentration intracellulaire en ppGpp augmente et la production en formycine est multipliée par huit. L'isolement de mutants incapables d'accumuler les ppGpp en milieu limité en azote confirme ce résultat; ces mutants sont également incapables de synthétiser l'antibiotique (Ochi, 1986). D'autres mutants ont été depuis isolés chez *S. antibioticus* et *S. griseoflavus*, producteurs d'actinomycine et de bicozamycine, respectivement (Ochi, 1987 et 1988).

- **Régulations par le taux de croissance**

Beaucoup d'antibiotiques semblent être produits à faible taux de croissance. C'est le cas de l'acide clavulanique qui est produit à des taux de croissance inférieurs à $0,05 \text{ h}^{-1}$ alors qu'il n'est pas produit à taux de croissance élevé ($0,1 \text{ h}^{-1}$) (Roubos *et al.*, 2001). La production de céphamycine C chez *S. cattleya* est également soumise à ce type de régulation (Lilley *et al.*, 1981). La synthèse d'antibiotiques est induite par la diminution du taux de croissance chez *Saccharopolyspora erythraea*, chez *S. hygroscopicus* (Wilson *et al.*, 1999), chez *S. clavuligerus* (Lebrihi *et al.*, 1988).

Le problème est qu'il est difficile de déterminer le rôle du taux de croissance dans l'initiation du métabolisme secondaire car il n'est pas indépendant du phénomène de limitation nutritionnelle. Autrement dit, une limitation nutritionnelle provoque systématiquement une diminution du taux de croissance alors il n'est pas possible de faire la différence entre l'effet de la limitation nutritionnelle et l'effet du ralentissement du métabolisme primaire.

- **Régulations par les paramètres environnementaux**

L'influence des facteurs physico-chimiques (pH, température, agitation et aération) sur l'initiation de la biosynthèse des métabolites secondaires existe. Par exemple, un choc thermique de 1h induit la production de jadomycine B chez *S. venezualae* (Doull *et al.*, 1993).

Pfefferle (2000) a étudié l'influence de la vitesse et du mode d'agitation et de l'aération sur la production de métabolites secondaires chez le genre *Streptosporangium*. Les meilleurs résultats ont été obtenus 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 secondaires. De plus, les auteurs de cette étude pensent qu'il serait possible de produire d'autres métabolites secondaires à partir de souches existantes uniquement par optimisation des conditions physicochimiques de la culture.

I - 2 - 1 - 2 - 3 Vers les procédés industriels de bioconversions.

L'augmentation des rendements de production et l'assurance d'une qualité constante du produit d'intérêt sont les clés des procédés de bioconversions industrielles. L'optimisation du procédé et les cultures menées à des échelles de plus en plus grandes doivent permettre de maintenir des conditions réactionnelles optimales et homogènes, tout en minimisant le stress des microorganismes.

De nombreuses études répertorient les problèmes rencontrés lors de cultures microbiennes menées à différentes échelles d'expérimentation. (Charles, 1985 ; Hewitt *et al.*, 2007 ; Katzer *et al.*, 2001 ; Masurekar *et al.*, 2008). Les problèmes de reproductibilité ne sont pas systématiques. Zou (2008) obtient, en terme de production d'érythromycine, les mêmes titres de production à l'échelle laboratoire (50 L) et à l'échelle industrielle (132 et 372 m³).

Les paramètres tels que l'aération, l'agitation, la stérilisation du milieu, le transfert de chaleur, le suivi et le contrôle du procédé sont des paramètres qui deviennent critiques lors des changements d'échelle. L'agitation et l'aération demeurent les aspects les plus préoccupants car ils conditionnent le transfert d'oxygène au sein de la culture microbienne. Or celui-ci affecte le métabolisme microbien. Une diminution de la pression en oxygène dissous peut impacter négativement la production de métabolites (Chmiel, 1986 ; McIntyre, 1999).

Les propriétés rhéologiques du milieu de culture perturbent les phénomènes de transfert (chaleur ou matière). Elles sont principalement déterminées par la concentration en

biomasse, le taux de croissance et la morphologie des microorganismes (Olsvik et Kristiansen, 1994). La géométrie (longueur, diamètres, taux de branchements) et la flexibilité des filaments ainsi que les interactions filament-filament conditionnent la morphologie du microorganisme.

I - 2 - 2 *Saccharothrix algeriensis*

I - 2 - 2 - 1 Isolement et caractéristiques de la souche

Cette bactérie a été isolée en 1992 à partir d'un échantillon de sol prélevé de la palmeraie d'Adrar (oasis du Sud-Ouest algérien). Sa micromorphologie est typiquement celle du genre *Saccharothrix* auquel elle est rattachée (Zitouni, 1995). Le mycélium aérien est abondant et de couleur jaune-orange, le mycélium du substrat est jaune vif et des pigments solubles de même couleur sont sécrétés. L'analyse des constituants cellulaires a montré que la souche possède le chimiotype III E et des phospholipides de type P IV. La glycine et les acides mycoliques sont absents. D'un point de vue phylogénétique et physiologique, la souche diffère nettement des espèces connues et a été nommée *Sa. algeriensis*. Celle-ci est déposée dans deux collections mondiales: NRRL et DSM sous le numéro d'accèsion B-24137 et 44581, respectivement (Zitouni *et al.*, 2004c).

Sa. algeriensis NRRL B-24137 présente un spectre d'action très large, qui touche aussi bien les bactéries à Gram positif (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) et à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas fluorescens* et *Serratia marcescens*), que les levures (*Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*) et les champignons filamenteux. L'action est particulièrement importante contre les bactéries à Gram positif et les champignons, moyenne contre les levures et moyenne à faible contre les bactéries à Gram négatif (Zitouni, 1995).

I - 2 - 2 - 2 Le genre *Saccharothrix*

Le genre *Saccharothrix* appartient au groupe des actinomycètes dans lequel il est minoritaire. Actuellement, il compte 11 membres :

<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. tangerinus</i>	ATCC BAA-481	Kinoshita <i>et al.</i> , 1999
<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

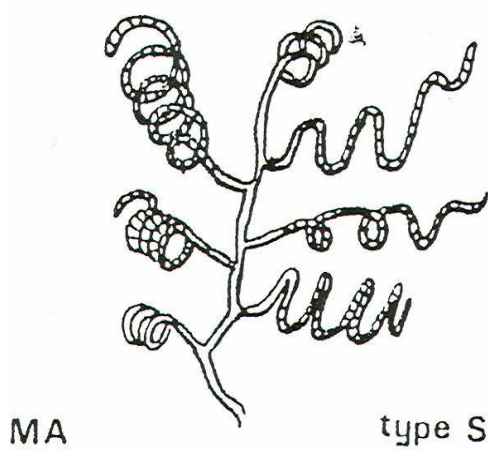
Comme la grande majorité des actinomycètes, *Saccharothrix* est saprophyte, chimioorganotrophe hétérotrophe et aérobic strict. Il est isolé en très petit nombre à partir de divers substrats et écosystèmes: gisements de minéraux, eaux usées, sédiments océaniques, sols des régions désertiques, sols salés et alcalins, etc. (Schippers *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Hozzein *et al.*, 2004; Zitouni *et al.*, 2005). Les colonies portent en général un mycélium aérien, qui peut être abondant ou très peu produit selon les espèces. Les filaments du mycélium aérien se fragmentent de manière anarchique, souvent en "zig-zag", en éléments de plus en plus courts 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.

Le genre *Saccharothrix* ressemble morphologiquement au genre *Nocardioopsis* mais se différencie par son chimiotype (Labeda, 1987; Labeda et Kroppenstedt, 2000; Labeda *et al.*, 2001):

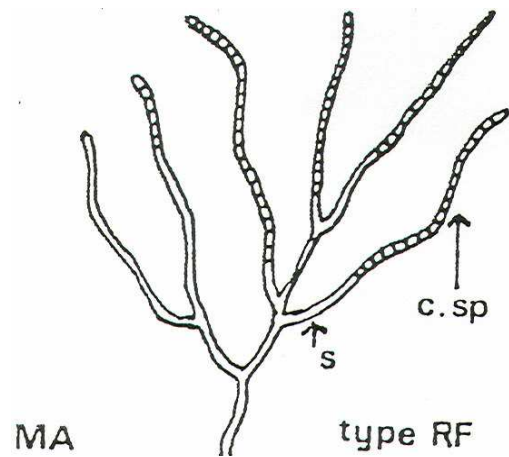
- Paroi cellulaire de type III E (présence d'acide méso-diaminopimélique).

- Présence de deux sucres caractéristiques, le rhamnose et le galactose.
- Phospholipides caractérisés par la présence de phosphatidylethanolamine, d'hydroxyphosphatidylethanolamine et de glucosamine.
- Ménaquinones (lipides membranaires) de type MK-9 (H4) ou MK-10(H4).

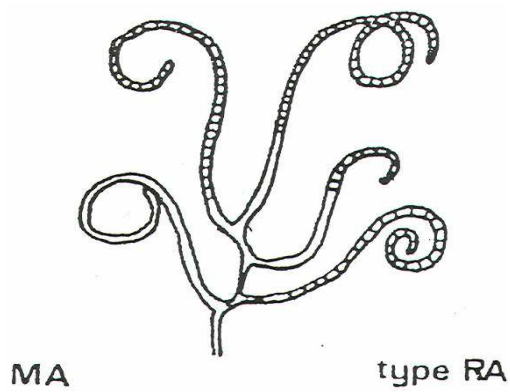
La figure I.4 illustre une comparaison de la micromorphologie du genre *Saccharothrix* avec celle du genre *Streptomyces*.



Genre *Streptomyces*



Genre *Streptomyces*



Genre *Streptomyces*

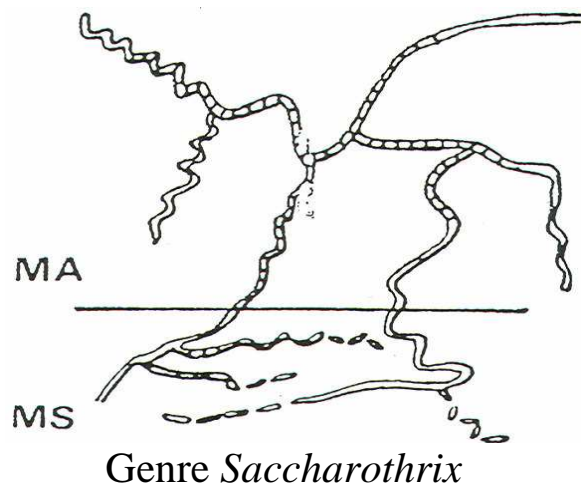


Figure I.4 Comparaison de la micromorphologie du genre *Saccharothrix* avec celle du genre *Streptomyces* (Bergey, 1989).

MA, mycélium aérien; MS, mycélium du substrat; RF : *Rectus Flexibilis* (chaînes de spores droites à flexueuse); RA : *Retinaculum Apertum* (chaînes en crochets ou en boucles fermées); S : *Spira* (chaînes spiralées); s : sporophore; c. sp. : chaînes de spores.

Le genre *Saccharothrix* secrète plusieurs antibiotiques de natures chimiques assez diversifiées. Le tableau I.1 présente la majorité de ces substances.

Tableau I.1 Principales substances ayant une activité biologique et synthétisées par les souches appartenant au genre *Saccharothrix*. (Bouras, 2005).

Substances	Propriétés	Origines	Références
Nocamycine	Antibactérienne, antitumorale	<i>Sa. syringae</i>	Horvath <i>et al.</i> , 1979.
Polymitoxine	Antibiotique	<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	Antibiotique	<i>Sa. espanaensis</i>	Kirby <i>et al.</i> , 1987.
Kinamycines	Antibactérienne, antitumorale	<i>Saccharothrix</i> sp. Isshiki <i>et al.</i> , 1989.	
Ménaquinones	Antiparasitaires	<i>Saccharothrix</i> sp. Perry <i>et al.</i> , 1990.	
Tetrazomine	Antibactérienne, antitumorale	<i>Sa. mutabilis</i>	Suzuki <i>et al.</i> , 1991.
Fluvirucine	Antivirales	<i>Sa. Mutabilis</i>	Tomita <i>et al.</i> , 1991.
Galacardines	Antibactériennes	<i>Saccharothrix</i> sp.	Takeuchi <i>et al.</i> , 1992.
Coformycine	Herbicide	<i>Saccharothrix</i> sp.	Dancer <i>et al.</i> , 1997.
WS75624 A et B	Inhibiteur d'enzyme	<i>Saccharothrix</i> sp.	Tsurumi <i>et al.</i> , 1995.
Substance P	analgésique	<i>Saccharothrix</i> sp.	Tsuboya <i>et al.</i> , 1996.
Formamycine	Antibactérienne, antifongique	<i>Sa. tangerinus</i>	Igarashi <i>et al.</i> , 1997a,b.
Phosphonothrixine	Herbicide	<i>Saccharothrix</i> sp.	Nakamura <i>et al.</i> , 1999.
Thiazolilpyridine	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> , 2001a,b.
Pluraflavines	Antitumorales	<i>Saccharothrix</i> sp.	Vértesy <i>et al.</i> , 2001.
Saccharomicines	Antibactériennes	<i>Sa. espanaensis</i>	Wang <i>et al.</i> , 2001.
Dithiopyrrolones	Antimicrobienne	<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.
(FZO32-W)	Antiparasite, insecticide	<i>Saccharothrix</i> sp.	U.K. Pat., 1990, 2 232 668.
(GBC32-N)	Antiparasite, insecticide	<i>Saccharothrix</i> sp.	U.K. Pat., 1990, 2 232 668.
Kinamycine G	Antibactérienne, antitumorale	<i>Saccharothrix</i> sp.	Ito <i>et al.</i> , 1970.
RUG 13A	Analgésique	<i>Saccharothrix</i> sp.	Yamatodani <i>et al.</i> , 1970.
RUG 13B	Analgésique	<i>Saccharothrix</i> sp.	Yamatodani <i>et al.</i> , 1970.
(GYZ60-K)	Antibiotique	<i>Saccharothrix</i> sp.	Isono, 1988.
(GYZ61-L)	Antibiotique	<i>Saccharothrix</i> sp.	Isono, 1988.
Swalpamycin B	Antibactérienne	<i>Saccharothrix</i> sp.	Zitouni 2004a.
Aldgamycin G	Antibactérienne	<i>Saccharothrix</i> sp.	Zitouni 2004a.
mutactimycin C	Antibactérienne	<i>Saccharothrix</i> sp.	Li <i>et al.</i> , 1992.
mutactimycin PR	Antibactérienne	<i>Saccharothrix</i> sp.	Zitouni <i>et al.</i> , 2004a,b.

I - 2 - 3 Dithiopyrrolones

Zitouni (1995) a montré que l'extrait au dichlorométhane du filtrat de culture de *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 donnait, par chromatographie sur couche mince, deux taches jaune vif, actives contre les bactéries et les champignons. Ces tâches contiennent des antibiotiques qui font partie du groupe des dithiopyrrolones. L'antibiotique principal a été identifié comme étant la thiolutine (synonymes : acétyl-pyrrothine, acéto-pyrrothine, farcinicine).

I - 2 - 3 - 1 Propriétés structurales

La structure chimique de ces antibiotiques est donnée par la figure I.5. Ces molécules sont caractérisées par la présence d'un noyau de type 1,2-dithiolo-[4,3-*b*] pyrrol-5(4H)-one. Leur structure bi-cyclique est composée de deux cycles condensés de cinq membres. Un cycle dithiol (contenant deux atomes de soufre) et un cycle pyrrole qui porte des radicaux reliés à l'azote n°4 et l'azote n°7. Le noyau dithiopyrrolone est aussi appelé pyrrolinodithiole, pyrrolinonodithiole ou encore pyrroloisothiazole. La dithiopyrrolone possédant la structure la plus simple est l'holothine, d'un poids moléculaire de 172, le thiomarinol B étant celle ayant le poids moléculaire le plus important (673).

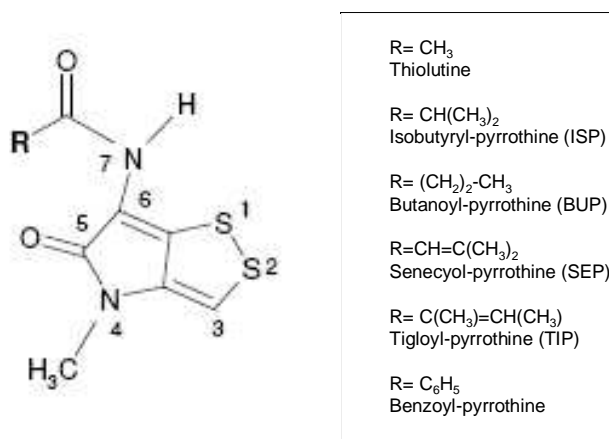


Figure I.5 : Structure des principales dithiopyrrolones produites par *Sa. algeriensis* NRRL B-24137.

Les dithiopyrrolones ont une couleur variant entre le jaune, l'orangé, le vert et le noir (Eisenman *et al.*, 1953; Schachtner *et al.*, 1999). Leur solubilité est en général très bonne

dans le chloroforme et dans le diméthylsulfoxyde, bonne dans le méthanol et le dichlorométhane, moyenne à bonne dans l'acétate d'éthyle, le *n*-butanol, l'éthanol et l'acétone, moyenne dans le benzène et l'eau et très faible dans le *n*-hexane et l'éther diéthylique. La thiolutine est thermostable (une heure à 100°C). Elle résiste à des pH acide ou neutre mais elle est peu stable en solution alcaline. La thiolutine possède un point de fusion à 243-245°C, un point de décomposition à 273-276 °C et une sublimation à 200°C. Les dithiopyrrolones absorbent dans le visible à cause de leur couleur jaune (longueurs d'ondes d'absorption maximale : 205 à 219, 287 à 311 et 386 à 406 nm).

I - 2 - 3 - 2 Spectre et mode d'action

Le spectre d'action de la thiolutine est très large. Il touche aussi bien les bactéries (à Gram positif et à Gram négatif) que les levures ou les champignons microscopiques et même les protozoaires et les insectes (Webster *et al.*, 2002). Cependant, l'utilisation des dithiopyrrolones dans la lutte contre les bactéries infectieuses est limitée par leur forte toxicité (Niemi, 1995). La toxicité des dithiopyrrolones limite leur utilisation en agriculture. Pourtant des propriétés anti-histaminiques, anti-angiogéniques (Minamiguchi *et al.*, 2001) et anti-tumorales (Xu, 1998 ; Webster *et al.*, 2000) ont récemment été attribués à cette classe d'antibiotique.

Les dithiopyrrolones agissent principalement en empêchant la synthèse de l'ARN messager en inhibant les ARN polymérase. Cette action a été démontrée chez les eucaryotes comme *Saccharomyces cerevisiae* (Webster *et al.*, 2002) et chez les procaryotes comme *Escherichia coli* (O'Neill *et al.*, 2000). La thiolutine peut aussi inhiber la synthèse de la paroi de *Saccharomyces cerevisiae* en agissant sur la glucane et la mannane synthétases (Elorza *et al.*, 1976). Elle peut agir aussi sur la membrane plasmique de certaines bactéries avec pour conséquence, l'empêchement de l'entrée de certains composés comme le glucose dans les cellules d'*Escherichia coli* (Bergmann, 1989).

I - 2 - 3 - 3 Microorganismes producteurs

Si *Sa. algeriensis* est la seule espèce du genre *Saccharothrix* à produire des antibiotiques de la famille des dithiopyrrolones, il existe d'autres genres de microorganismes capables de produire les dithiopyrrolones (tableau I.2). Les autres microorganismes appartiennent au genre *Streptomyces* mais aussi à des genres de bactéries

non filamenteuses telles que *Alteromonas* ou *Xenorhabdus* (McInerney *et al.*, 1991 ; Li *et al.*, 1995) .

Tableau I.2 : Microorganismes producteurs de dithiopyrrolones (Bouras, 2005).

Antibiotique	Formule et PM	Espèces productrices
Pyrrothine	$C_6H_6N_2OS_2$ PM: 186	<i>Streptomyces</i> sp.
Thiolutine (<i>syn.</i> : acétyl-pyrrothine, acéto-pyrrothine, farcinicine).	$C_8H_8N_2O_2S_2$ PM: 228	<i>Streptomyces thioluteus</i> , <i>S. celluloflavus</i> , <i>S. albus</i> , <i>S. pimprina</i> , <i>S. kasugaensis</i> , <i>S. luteoreticuli</i> , <i>Saccharothrix algeriensis</i> .
Auréothricine (<i>syn.</i> : propionyl-pyrrothine, propio-pyrrothine).	$C_9H_{10}N_2O_2S_2$ PM: 242	<i>Streptomyces kasugaensis</i> , <i>S. pimprina</i> , <i>S. farcinicus</i> , <i>S. thioluteus</i> , <i>S. luteoreticuli</i> , <i>S. celluloflavus</i> , <i>S. cyanoflavus</i> , (et aussi synthétisé chimiquement).
Iso-butyryl-pyrrothine (<i>syn.</i> : iso-butyro-pyrrothine, 2-méthylpropanoyl-pyrrothine).	$C_{10}H_{12}N_2O_2S_2$ PM: 256	<i>Streptomyces pimprina</i> . <i>Saccharothrix algeriensis</i> , (et aussi synthétisé chimiquement).
Xénorhabdine VII (<i>syn.</i> : butanoyl-pyrrothine, butyro-pyrrothine).	$C_{10}H_{12}N_2O_2S_2$ PM: 256	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. luminescens</i> , <i>X. biovienii</i> , <i>Saccharothrix algeriensis</i> .
Sénéciol-pyrrothine (<i>syn.</i> : 3-méthyl-2-butenoyl-pyrrothine).	$C_{11}H_{12}N_2O_2S_2$ PM: 268	<i>Saccharothrix algeriensis</i> .
Tigloyl-pyrrothine	$C_{11}H_{12}N_2O_2S_2$ PM: 268	<i>Saccharothrix algeriensis</i> .
Benzoyl-pyrrothine	$C_{13}H_{10}N_2O_2S_2$ PM: 290	<i>Saccharothrix algeriensis</i> .
2-méthyl-pentanoyl-pyrrothine	$C_{13}H_{19}N_2O_2S_2$ PM: 299	<i>Saccharothrix algeriensis</i> .
Xénorhabdine VI (<i>syn.</i> : 3-méthylbutanoyl-pyrrothine).	$C_{11}H_{14}N_2O_2S_2$ PM: 270	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. luminescens</i> , <i>X. biovienii</i> .
Xénorhabdine IV	$C_{12}H_{16}N_2O_2S_2$ PM: 284	<i>Xenorhabdus</i> spp.
Pentanoyl-pyrrothine	$C_{12}H_{16}N_2O_2S_2$ PM: 284	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. luminescens</i> , <i>X. biovienii</i> .
Xénorhabdine V (<i>syn.</i> : 5-méthylhexanoyl-pyrrothine).	$C_{13}H_{18}N_2O_2S_2$ PM: 298	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. luminescens</i> , <i>X. biovienii</i> .

I - 2 - 3 - 4 Synthèse chimique et biosynthèse des dithiopyrrolones

La synthèse chimique de la thiolutine s'effectue en une dizaine d'étapes (Hagio *et al.*, 1973). En plus des dithiopyrrolones naturelles, d'autres structures ont été obtenues par synthèse chimique (Pregolato *et al.*, 2000; Seepersaud *et al.*, 2002 ; Elgazwy, 2003; Stachel *et al.*, 2003a,b).

La figure I.6 présente le mécanisme de biosynthèse de la thiolutine proposé par Furumai (1982).

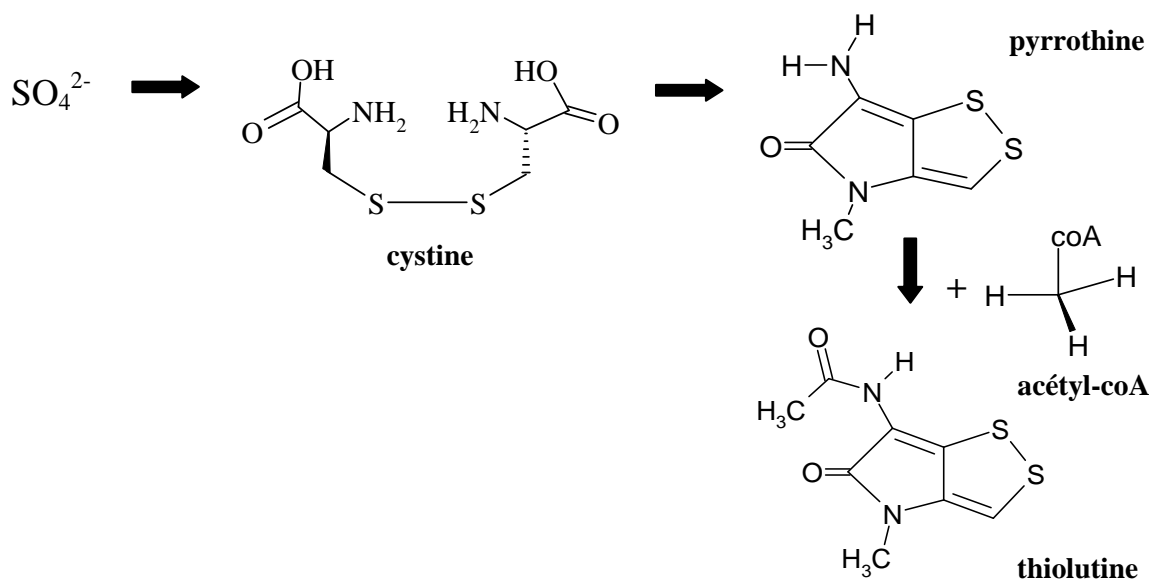


Figure I.6 : Voie de biosynthèse hypothétique de la thiolutine (d'après Furumai *et al.*, 1982).

I - 2 - 3 - 5 Production de dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis*

Le genre *Saccharothrix* est minoritaire parmi les actinomycètes. Il fait partie des actinomycètes rares très peu étudiés. Peu de données intéressantes sur ce groupe sont disponibles au niveau de la littérature. Des travaux antérieurs menés au sein du département Bioprocédés et Systèmes microbiens du laboratoire de Génie Chimique (Bouras, 2005), ont permis de mettre en évidence l'influence de la composition du milieu de culture sur la production de dithiopyrrolones. De plus, de nouveaux dérivés ont pu être produits suivant la composition du milieu de culture. Les cultures ont été menées principalement en erlenmeyers, à 30°C, 250 rpm et pH ajusté à 7 avant la stérilisation du milieu de culture.

I - 2 - 3 - 5 - 1 Influence de la composition du milieu sur la production des dithiopyrrolones

L'influence de l'ajout d'acides aminés et acides organiques au milieu de culture de *Saccharothrix algeriensis* sur la production de dithiopyrrolone a été étudiée par Bouras (2005).

A une concentration comprise entre 5 et 10 mM, la cystine favorise la production spécifique de thiolutine, seneciroyl-pyrrothine et tigloyl-pyrrothine, respectivement x 20, x 8 et x 8 (Bouras *et al.*, 2006a). Par ailleurs, la proline et l'acide humique favorisent aussi la production de ces dithiopyrrolones. A faible concentration, la cystine et la proline pourraient être précurseurs directs des noyaux pyrrothine et pyrrole respectivement. L'acide humique, testé à 1 g.L⁻¹ pourrait agir comme inducteur ou comme précurseur plus ou moins direct du noyau pyrrothine. A forte concentration, ces acides aminés ont un effet inhibiteur. En fait, des concentrations en acides aminés élevées génèrent une accumulation d'ions ammonium qui pourrait exercer une répression catabolique de la biosynthèse. Par contre, quelles que soient leurs concentrations, l'ethionine et la méthionine ont un effet inhibiteur (Bouras *et al.*, 2006b).

A 5 mM, les acides pyruvique, tiglique, butyrique et méthacrylique favorisent la production de dithiopyrrolones. Alors que l'acide pyruvique favorise nettement la production de tous les dérivés pyrrothiniques, l'acide butyrique multiplie par 35 la production de butyryl-pyrrothine, l'acide méthacrylique a le même effet (x 50) sur la production de cette dithiopyrrolone et l'acide tiglique multiplie par dix la production de tigloyl-pyrrothine et par cinq la production d'isobutyryl-pyrrothine. Par ailleurs l'ajout d'acides tels que l'acide pamoïque, benzensulfonique, syringique et oléique entraîne une production de dithiopyrrolones nulle ou très faible.

I - 2 - 3 - 5 - 2 Influence de la composition du milieu sur la production de nouveaux dérivés

Certains acides organiques comme l'acide tiglique ou l'acide butyrique semblent s'incorporer directement au niveau de la chaîne latérale produisant ainsi l'antibiotique correspondant (Bouras *et al.*, 2007). A partir de cette constatation, en plus des acides aminés, l'influence de 83 acides organiques a été testée sur la production de nouvelles dithiopyrrolones. Ces différents ajouts permettent l'induction de la production de 26

nouvelles molécules dont 18 nouvelles dithiopyrrolones (Bouras *et al.*, 2008). Parmi ces molécules, la valéryl-pyrrothine induite par l'ajout d'acide valérique a été caractérisée. L'originalité de cette étude réside dans la mise en évidence de précurseurs qui a permis d'induire la production « à la carte » de nouvelles dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis*.

I - 2 - 3 - 5 - 3 Faible consommation du glucose

L'interprétation des études conduites par Bouras (2005) indique que la consommation du glucose est très réduite dans toutes les cultures effectuées, malgré une production importante de biomasse. Des études supplémentaires devraient être réalisées afin d'éclaircir ce problème.

I - 2 - 3 - 6 Les cyclodipeptides synthases

Les dithiopyrrolones possèdent un noyau constitué de deux cystéines cyclisées. A ce titre, ces molécules peuvent être considérées comme un métabolite de type cyclodipeptidique. Il existe d'autres composés de nature cyclodipeptidiques ayant des activités biologiques (Jia *et al.*, 2005) L'albonoursine est aussi un antibiotique et un antitumoral de nature cyclodipeptidique (cyclo(dehydroPhe-dehydroLeu)), produit par *S. noursei*. De récents travaux ont montré que la formation du cyclodipeptide (Phe-Leu) était catalysée par une nouvelle enzyme AlbC différente des NRPS décrites dans la littérature (non ribosomal peptides synthases). En tant qu'enzyme catalysant la formation d'un cyclopeptide, elle a été qualifiée de cyclodipeptide synthase. D'autres gènes dont les produits sont similaires à AlbC ont été identifiés dans d'autres génomes bactériens. Ils codent pour des cyclodipeptides synthases ayant des spécificités différentes et par conséquent permettent la synthèse d'autres cyclopeptides différents. (Sauget *et al.*, 2007).

I - 3 Modélisation du comportement microbien

I - 3 - 1 Généralités

Un modèle est une forme de représentation de la réalité qui utilise l'outil mathématique et/ou informatique pour appréhender un processus naturel. En sciences de la vie, c'est une forme de représentation imparfaite et limitée par nos degrés actuels de connaissances. En effet, cette représentation est synthétique, codifiée et souvent partielle. Le modèle ne reflète qu'une partie de la réalité mais permet, en réduisant sa complexité, de mieux l'appréhender et de rechercher comment l'optimiser. De ce fait, on modélise toujours par rapport à un objectif et suivant cet objectif, plusieurs modèles peuvent décrire une même réalité. Il est donc important de définir le cadre et le niveau de modélisation souhaité dès le début du projet.

L'analyse de l'intérêt de modéliser un système dans des disciplines aussi différentes les unes des autres que la biologie, l'économie ou la physique, montre que la modélisation sert à trois besoins principaux :

- Compréhension
- Contrôle
- Optimisation

Généralement, l'objectif de la modélisation est de répondre à un ou plusieurs de ces besoins.

Il existe de plus en plus de travaux de modélisation reposant sur des approches pluridisciplinaires. Plus particulièrement, la croissance microbienne qui est un phénomène très complexe par le nombre de réactions mises en jeu au cours de son déroulement et par leur dépendance vis-à-vis des conditions extérieures fait l'objet de nombreux modèles.

La croissance microbienne correspond à une augmentation en nombre ou en taille des cellules microbiennes. Il s'agit d'un phénomène dynamique et non linéaire. Selon Buchanan (1918), il est possible de distinguer plusieurs phases dans la croissance microbienne en culture discontinue (c'est-à-dire en milieu non renouvelé) lorsqu'on analyse l'évolution de la concentration en biomasse en fonction du temps :

Phase 1 : La **phase de latence** se caractérise par un taux de croissance nul mais pour laquelle il y a une activité métabolique visible par une utilisation du substrat, éventuellement respiration et production de métabolites. Elle correspond à une phase d'adaptation (induction d'enzymes nécessaires à l'assimilation du substrat, mise en place des voies anaboliques, mise en place de transporteurs spécifiques...). Cette phase plus ou moins longue suivant le microorganisme va de quelques dizaines de minutes pour les bactéries à quelques heures pour les champignons filamenteux.

Phase 2 : La **phase d'accélération** est caractérisée par une augmentation du taux de croissance jusqu'à une valeur maximale.

Phase 3 : Une valeur constante du taux de croissance caractérise la **phase exponentielle de croissance**. Pendant cette phase, le taux de mortalité est nul et l'activité métabolique est maximale.

Phase 4 : La **phase de décélération** est caractérisée par une valeur décroissante du taux de croissance. Cette phase peut être due à une limitation nutritionnelle, ou à une accumulation de métabolites ou co-produits liés à la croissance ayant un effet inhibiteur ou toxique pour la croissance.

Phase 5 : La **phase d'arrêt** correspond à une phase très courte durant laquelle la croissance stoppe et correspond à l'épuisement en source carbonée.

Phase 6 : La **phase stationnaire** est une période plus ou moins longue pendant laquelle aucune variation de la concentration totale en biomasse n'est observée mais, pendant laquelle on observe une perte importante de viabilité, principalement due à l'absence de source de carbone.

Phase 7 : La **phase de déclin** équivaut à une décroissance de la concentration en biomasse due à la lyse cellulaire.

I - 3 - 2 Modélisation du comportement microbien

En génie microbiologique, deux groupes de modèles peuvent être distingués: les modèles non structurés ou phénoménologiques et les modèles structurés ou mécanistes. Il existe d'autres modèles type logique floue ou réseau de neurones appliqués au contrôle des procédés. Ils ne sont pas abordés dans cette étude.

I - 3 - 2 - 1 Modèles phénoménologiques

Ces modèles sont tous inspirés des trois modèles de bases : le modèle exponentiel, le modèle logistique et le modèle Monod avec en plus, l'introduction de variables d'état susceptibles d'affecter la croissance. Trois phénomènes sont pris en compte, limitation par le substrat, inhibition par le substrat et inhibition par les produits métaboliques. Ils sont largement répertoriés dans la littérature (Béal *et al.*, 1986 ; Ramon-Portugal, 1995 ; Marin, 1999).

Le modèle logistique

La loi logistique repose sur l'hypothèse que l'accroissement relatif d'une variable y modélisée décroît de façon linéaire avec elle.

$$\frac{dy}{dt} = a \cdot y \left(1 - \frac{y}{K} \right) \text{ (Verhulst, 1838)}$$

Ce modèle, proposé par Verhulst (1838), avait pour but de modéliser la croissance d'une population animale se stabilisant au cours du temps. Il a été adapté par Pearl (1927) dans le cas d'une description d'une cinétique de croissance microbienne.

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) \text{ (Pearl, 1927)}$$

Le paramètre μ_{\max} est le taux spécifique de croissance maximal, supposé atteint dès le début de la culture. X_{\max} correspond à la population maximale qui est obtenue lors de la phase stationnaire.

Le modèle de Monod

Ce modèle est la référence de base en terme de modélisation de croissances microbiennes.

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left(\frac{S}{S + K_s} \right) \text{ (Monod, 1941)}$$

Il donne une relation entre μ_{\max} et S, la concentration en substrat limitant. K_s représente la concentration en substrat pour laquelle μ est inférieur de moitié à μ_{\max} .

Cette famille de modèle contient des modèles basés sur l'observation des cinétiques macroscopiques au sein d'un bioréacteur. Ces modèles s'appuient sur une vision globale de la cellule sans en détailler sa structure (Pirt, 1988). La composition cellulaire est considérée comme constante. D'un point de vue pratique, la population microbienne est généralement traitée comme une « boîte noire ». Dans beaucoup de cas, cette simplification est raisonnable parce qu'il est impossible de connaître la composition hétérogène de la biomasse et l'état des systèmes intracellulaire. En sciences du vivant, les modèles phénoménologiques permettent plus une description macroscopique qu'une compréhension microscopique des phénomènes biologiques.

Dans la majorité des modèles de ce type, la variation de la biomasse est exprimée par l'intermédiaire de variables extracellulaires (concentrations en substrats, produits et présence d'inhibiteur de la croissance), ainsi que de variables environnementales comme le pH ou la température. Ainsi, Messens *et al.*, (2003) ont développé un modèle capable de prédire l'influence de la température (20 - 38°C) et du pH (4,8 - 7) sur le comportement de *Lactobacillus curvatus* LTH1174, microorganisme producteur de bactériocine. La croissance microbienne et la production de curvacin A sont affectés par les variations de la température. Par contre elles supportent une large gamme de pH.

Les modèles de type logistique permettent de représenter des valeurs expérimentales par des équations mathématiques mais ils n'autorisent que difficilement l'émission d'hypothèses sur les voies métaboliques actives ou non du microorganisme. Il existe d'autres modèles phénoménologiques dits « stoechiocinétiques » qui permettent une analyse des

données expérimentales pouvant déboucher sur l'établissement d'un schéma réactionnel global du métabolisme de la bactérie. L'avantage de ce type de modèle est que, tout en restant à l'échelle extracellulaire, c'est-à-dire avec des informations expérimentales relativement faciles à obtenir, il permet de déduire des informations sur le métabolisme de la cellule. Les modèles stoechiocinétiques consistent en la décomposition de la croissance bactérienne en quelques réactions simples de stœchiométrie invariantes dans le temps. Le chapitre « matériel et méthode » présente la méthode qui permet d'aboutir à ce type de modèle. Elle repose sur l'analyse factorielle des données de fermentation.

L'analyse factorielle en culture microbienne est fondée sur une exploitation algébrique du bilan matière partiel. L'évolution de chaque constituant est due aux intensités des réactions dans lesquelles il est impliqué, soit comme substrat, soit comme produit. La première adaptation de l'analyse factorielle pour le traitement de données de culture en réacteur discontinu est due à Hamer (1989). En terme d'évolution, cette méthode a subi plusieurs adaptations (Bonvin et Rippin, 1990 ; Harmon *et al.*, 1995 ; Fillon, 1996 ; Moreau, 2000). L'analyse factorielle a été appliquée avec succès à la recherche de stœchiométrie de réaction pour l'établissement d'un schéma réactionnel global ayant un sens physique et physiologique par Moreau (2000). Cet auteur a mené une étude sur les cinétiques de croissance de *Brevibacterium linens*, entre autres, sur mélange d'acides aminés. Un schéma réactionnel rendant compte de la croissance de *Brettanomyces bruxellensis* sur glucose puis sur éthanol a été proposé par Castro-Martinez (2007) à partir de cette même méthodologie.

I - 3 - 2 - 2 Modèles structurés

Les modélisations de biotransformation pour lesquelles la biomasse n'est pas considérée comme homogène, donc pas représentée par une variable unique, sont dites « structurées ». Ces modèles prennent en compte l'état physiologique du microorganisme (Esener *et al.*, 1982). Ils sont généralement complexes et requièrent une certaine connaissance du fonctionnement de la cellule. Ils entraînent, de plus, une multiplication des paramètres du modèle ce qui pose des problèmes d'identification quand des données expérimentales de composés intracellulaires ne sont pas disponibles.

Avec l'augmentation des capacités de calcul des ordinateurs, des modèles d'une plus grande complexité se sont développés, pour lesquels une partie ou l'ensemble des voies métaboliques mises en œuvre dans une biotransformation sont prises en compte (Naeimpoor et Mavituna (2001) ; Avignone Rossa *et al.*, 2002 ; Dae et Ison, 1999). D'un point de vue

pratique, la détermination du flux de la voie de biosynthèse est difficilement réalisable par l'analyse des flux métaboliques. Cependant, ces modèles métaboliques présentent un intérêt croissant en terme de production de métabolite secondaire en raison du développement de l'ingénierie métabolique qui a pour objet d'analyser et de modéliser le métabolisme cellulaire pour en déterminer les points clé afin d'agir directement sur les étapes limitantes par manipulations génétiques (Stephanopoulos et Stafford, 2002).

I - 3 - 2 - 3 Modèles hybrides

Roubos (1999) applique une technique de modélisation hybride de type « métabolique-phénoménologique » à la production d'acide clavulanique par *S. clavuligerus*. Dans un premier temps, un réseau métabolique constitué de 86 réactions a été construit. Il ne permet pas de décrire correctement la production d'antibiotique. Dans un deuxième temps, celle-ci est découplée du réseau métabolique et modélisée de manière phénoménologique en utilisant un modèle d'inhibition par les substrats. Le modèle hybride intègre les dynamiques de lyse cellulaire et de dégradation de l'antibiotique. Les auteurs concluent que ce modèle permet de simuler correctement les données expérimentales.

Colombié (2005) a développé un modèle métabolique regroupant les voies des métabolismes primaire et secondaire afin de décrire la dynamique de croissance et de production de spiramycine par *S. ambofaciens*. Après une simplification de la structure du réseau basée sur le fait que la spiramicine est issue du catabolisme des réserves de carbone endogènes, ce modèle a permis de décrire la croissance microbienne uniquement à partir des mesures accessibles en ligne mais s'est avéré incapable de prédire la production d'antibiotique. Afin de décrire la biosynthèse de spiramicine, il a dû être complété par une modélisation phénoménologique intégrant 3 paramètres : le temps auquel la production débute, la vitesse spécifique de production et le temps auquel la biosynthèse s'arrête.

Cette synthèse bibliographique présente, entre autres, les différentes solutions existantes qui permettent de développer de nouvelles molécules bioactives pour faire face à nos besoins croissants en matière de lutte contre les microorganismes. Parmi ces solutions, l'étude des microorganismes, comme *Sa. algeriensis*, provenant de milieux extrêmes et peu connus est particulièrement novatrice. Ce microorganisme possède des potentialités biosynthétiques remarquables. Cependant, les rares études existantes sur *Sa algeriensis* en milieu liquide font apparaître quelques interrogations quand à son utilisation du glucose.

Chapitre II

Matériel et Méthodes

II Matériel et Méthodes

II - 1 Microorganisme

Saccharothrix algeriensis NRRL B-24137, également déposée dans la collection DSM sous le n°44581, a été isolée à partir d'un échantillon de sol saharien de la palmeraie d'Adrar (oasis du Sud Ouest algérien) par Boudjella (1994). Cette espèce d'actinomycète produit des antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones (Lamari *et al.*, 2002 a,b)

II - 2 Culture microbienne

II - 2 - 1 Milieu de sporulation du microorganisme : ISP2 (International *Streptomyces* Project 2)

Ce milieu gélosé, préconisé par Shirling et Gottlieb (1966) pour la croissance et la sporulation des actinomycètes, est utilisé pour la préparation des cryotubes de spores de *Saccharothrix algeriensis* destinés à l'ensemencement des pré-cultures.

- Extrait de levure	:	4 g.L ⁻¹
- Extrait de malt	:	10 g.L ⁻¹
- D-glucose (anhydre)	:	4 g.L ⁻¹
- Agar	:	18 g.L ⁻¹
- Eau distillée	:	

II - 2 - 2 Milieux de culture

II - 2 - 2 - 1 Milieux « Minimum »

II- 2 - 2 - 1 - 1 Milieu minimum « carbonate de calcium »

- (NH ₄) ₂ SO ₄	:	2 g.L ⁻¹
- NaCl	:	2 g.L ⁻¹
- KH ₂ PO ₄	:	0,5 g.L ⁻¹
- K ₂ HPO ₄	:	1 g.L ⁻¹
- MgSO ₄ .7H ₂ O	:	0,2 g.L ⁻¹
- CaCO ₃	:	5 g.L ⁻¹
- Glucose	:	15 g.L ⁻¹

Le carbonate de calcium (CaCO₃) permet de tamponner le pH du milieu de culture.

II- 2 - 2 - 1 - 2 Milieu minimum « MOPS »

La détermination du poids sec de biomasse nécessite l'ajout d'acide chlorhydrique pour éliminer le CaCO₃ (Bouras, 2005). L'abaissement du pH qui résulte, provoque un déplacement d'équilibre vers la formation de CO₂ gazeux, ce qui génère de la mousse. La mousse entraînant la biomasse, la méthode de détermination du poids sec est rendue plus complexe et source d'erreur à haute concentration en biomasse. Aussi, le CaCO₃ du milieu précédent a été remplacé par 20 g.L⁻¹ de MOPS (acide 3-(N-Morpholino) propansulfonique) et 1 g.L⁻¹ de CaCl₂.

- (NH ₄) ₂ SO ₄	:	2 g.L ⁻¹
- NaCl	:	2 g.L ⁻¹
- KH ₂ PO ₄	:	0,5 g.L ⁻¹
- K ₂ HPO ₄	:	1 g.L ⁻¹
- MgSO ₄ .7H ₂ O	:	0,2 g.L ⁻¹
- MOPS	:	20 g.L ⁻¹
- CaCl ₂	:	1 g.L ⁻¹
- Glucose	:	15 g.L ⁻¹

II - 2 - 2 - 2 Milieu semi-synthétique

Ce milieu est utilisé pour réaliser l'ensemble des pré-cultures de cette étude. Il est équivalent à un milieu minimum type « MOPS » supplémenté avec une quantité minimisée d'extrait de levure (2 g.L^{-1}).

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:	2 g.L^{-1}
- NaCl	:	2 g.L^{-1}
- KH_2PO_4	:	$0,5 \text{ g.L}^{-1}$
- K_2HPO_4	:	1 g.L^{-1}
- $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$:	$0,2 \text{ g.L}^{-1}$
- Extrait de levure	:	2 g.L^{-1}
- MOPS	:	20 g.L^{-1}
- CaCl_2	:	1 g.L^{-1}
- Glucose	:	15 g.L^{-1}

- **Extrait de levure (référence : 288620 Bacto™ Yeast Extract, Technical).**

L'extrait de levure utilisé au cours de cette étude a été partiellement caractérisé dans notre laboratoire. Sa composition élémentaire, la concentration en éléments chimiques et en acides aminés libres sont présentés dans les tableaux II.1 et II.2. Les méthodes analytiques utilisées sont décrites dans les paragraphes (II - 3 - 9 ; II - 3 - 4 et II - 3 - 8).

Tableau II.1 : Composition élémentaire de l'extrait de levure utilisé.

Eléments	moles
C	3,32
H	6,54
O	2,17
N	0,79

Tableau II.2 : Concentrations en acides aminés libres et en éléments atomiques dans l'extrait de levure utilisé.

Acides aminés	[acide aminé] (μmol) par g d'EXL	éléments atomiques	[éléments] (μg) par g d'EXL
ASP	142	P	9751
THR	144	S	36877
SER	200	W	222
GLU	119	Zn	286
GLN	4	Co	5
PRO	42	Pb	4
CYS	30	B	41
GLY	204	Mn	3
ALA	415	Fe	117
VAL	236	Mg	802
MET	51	Al	276
ISO	164	V	66
LEU	311	Be	2
TYR	32	Ca	935
PHE	140	Zr	1
LYS	156	Ba	1
HIS	47	Na	1526
TRP	15	K	73542
ARG	109		
ASN	108		

II - 2 - 2 - 3 Milieux synthétiques

Différents milieux ont été testés afin de formuler un milieu chimiquement défini permettant la croissance de notre microorganisme (cf Introduction). Ces milieux ont été établis sur la base du milieu minimum tamponné avec du MOPS et supplémentés avec des acides aminés testés par groupes (tableau II.5), des bases azotées (tableau II.4) ou des oligoéléments (tableau II.6). Différentes sources de carbone ont également été évaluées sur le milieu minimum « MOPS » (tableau II.3).

Tableau II. 3 : Carbohydrates testés.

carbohydrate	concentration
Glucose	0,83 mM
Maltose	0,83 mM
Fructose	0,83 mM
Galactose	0,83 mM
Lactose	0,83 mM
Saccharose	0,83 mM
Mannitol	0,83 mM
Glycerol	0,83 mM
Amidon	15 g.L ⁻¹
Dextrines	15 g.L ⁻¹

Tableau II. 4 : Bases azotées évaluées.

Bases azotées	Groupe A	Groupe G	Groupe C	Groupe T	Groupe U	Groupe ATCGU
Adénine	X					X
Guanine		X				X
Cytosine			X			X
Thymine				X		X
Uracile					X	X
Concentration par base azotée	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	20 mM	5 mM

Tableau II. 5 : Acides aminés criblés.

Acides aminés	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
Glycine	X			X
Alanine	X			X
Leucine	X			X
Isoleucine	X			X
Valine	X			X
Tryptophane	X			X
Phénylalanine	X			X
Proline	X			X
Tyrosine		X		X
Sérine		X		X
Thréonine		X		X
Cystéine		X		X
Méthionine		X		X
Lysine			X	X
Arginine			X	X
Histidine			X	X
Glutamate			X	X
Aspartate			X	X
Glutamine			X	X
Arginine			X	X
Concentration par acide amine	5 mM	5 mM	5 mM	1,7 mM

Tableau II. 6 : Composition du mélange d'oligoéléments évalués (1X).

CuSO ₄ ,5H ₂ O	0,02968 g.L ⁻¹
NiCl ₂ ,6H ₂ O	0,003353 g.L ⁻¹
H ₃ BO ₃	0,0014g.L ⁻¹
MnSO ₄ ,H ₂ O	0,0525g.L ⁻¹
ZnSO ₄ ,7H ₂ O	0,0308g.L ⁻¹
CoCl ₂ ,6H ₂ O	0,007g.L ⁻¹
NaMoO ₄ ,2H ₂ O	0,0035g.L ⁻¹
KI	0,00231g.L ⁻¹
AlCl ₃ ,6H ₂ O	0,0028g.L ⁻¹
FeSO ₄ ,7H ₂ O	0,09g.L ⁻¹

II - 2 - 2 - 4 Milieu semi-synthétique standard

Ce milieu a été utilisé pour la plupart des cultures ayant servi à établir le schéma réactionnel général rendant compte de la stœchiométrie globale du développement de *Sa. algeriensis*. Il s'agit du milieu semi-synthétique avec ajout de 20 mM d'uracile.

- (NH ₄) ₂ SO ₄	:	2 g.L ⁻¹
- NaCl	:	2 g.L ⁻¹
- KH ₂ PO ₄	:	0,5 g.L ⁻¹
- K ₂ HPO ₄	:	1 g.L ⁻¹
- MgSO ₄ .7H ₂ O	:	0,2 g.L ⁻¹
- Extrait de levure	:	2 g.L ⁻¹
- MOPS	:	20 g.L ⁻¹
- CaCl ₂	:	1 g.L ⁻¹
- Glucose	:	15 g.L ⁻¹
- Uracile	:	20 mmol.L ⁻¹

Le milieu de culture utilisé en réacteur ne contient que 2 g.L⁻¹ de MOPS car le pH est régulé au cours de la culture.

Le glucose et l'uracile, quand ils sont utilisés, sont systématiquement stérilisés séparément (autoclave 120°C, 20 min) puis ajoutés stérilement au milieu contenant les sels et l'extrait de levure. Le pH est ajusté à 7 avec NaOH.

II - 2 - 3 Conditions de culture

II - 2 - 3 - 1 Conservation de la souche : préparation de cryotubes

Le microorganisme est ensemencé à partir d'une boîte de Pétri, d'une culture liquide (200µL) ou d'un cryotube (200µL), en stries serrées de façon à obtenir un tapis bactérien dense sur des boîtes de Pétri (d'un diamètre de 90 mm) contenant de la gélose ISP2 (20 mL). Les boîtes sont incubées pendant 6 à 8 jours à 30°C. Après 8 jours d'incubation, 6 mL de solution de Tween 0,1% (100µL de Tween 80 pur dans 100 mL d'eau distillée, autoclavée pendant 20 min à 120°C) sont déposés sur chaque boîte de Pétri. Un râteau stérile permet de

gratter le tapis bactérien qui s'y est développé et donc, de remettre les spores microbiennes en suspension dans la solution de Tween qui est récupérée à l'aide d'une pipette stérile. La solution de Tween contenant les spores est mélangée à du glycérol de manière à ce que sa concentration finale soit de 25 % (soit 75 mL de solution « Tween + spores » et 25 mL de glycérol 100%) avant d'être répartie dans des tubes cryogéniques 4,8 mL Nalgene (Fischer). Les tubes cryogénique sont conservés à -20°C pendant une durée maximale de 3 ans.

II - 2 - 3 - 2 Préculture

Les précultures sont effectuées dans des erlenmeyers de 500 mL. Le volume de préculture est de 100 mL soit 20 % (volume liquide / volume erlenmeyer). Les précultures sont placées 52 h dans un incubateur thermostaté à 30°C, et à agitation orbitale fixée à 250 rpm (révolution par minute). Une préculture est inoculée avec des spores de manière à ce que la concentration initiale en spore soit de 10^6 spores.mL⁻¹.

II - 2 - 3 - 3 Culture en erlenmeyers

Les cultures en erlenmeyer sont effectuées dans les mêmes conditions que les précultures pendant 6 à 9 jours. Les cultures sont inoculées à 5 % volume préculture / volume culture soit 5 mL de préculture dans 100 mL de culture.

II - 2 - 3 - 4 Culture en fermenteurs

Les cultures sont effectuées dans des fermenteurs de 2 L (figure II.1). Les fermenteurs sont inoculés à 5 % volume préculture / volume culture soit 100 mL de préculture dans 2 L de culture. La température est réglée à 30°C, l'agitation initiale est à 150 rpm, le pH est maintenu à 7 et l'aération initiale est de 0,5 vvm (volume d'air par volume de liquide par minute) soit 1000 mL d'air par minute. Le pourcentage d'oxygène dissous est maintenu à au moins 30 % de la saturation par modification de la vitesse d'agitation. Afin de limiter la formation de mousse, l'acide pluronique est utilisé comme agent anti-mousse.

Les fermenteurs de 2 litres, **modèle New Brunswick Scientific Co., Inc. Edison, N.J., USA, Q 290100** sont équipés de (figure II.2):

- Un module d'agitation type Rushton dont la vitesse de rotation est réglable via un moteur d'agitation de type Magmator.
- Un mode de régulation de la température assuré par un système composé d'une sonde métallique permettant l'acquisition des valeurs de température à l'intérieur du fermenteur, reliée à une couverture chauffante disposée autour du fermenteur et à une électrovanne permettant la circulation d'eau froide via un serpentín métallique plongeant dans le fermenteur.
- Un dispositif d'aération qui comporte un débitmètre massique d'air (Bronkhorst Hi-tec, série F100/200) et une canne de diffusion d'air, percée d'une dizaine de pores d'un diamètre inférieur à 1 mm, plongeant dans le fermenteur, ainsi qu'un filtre à air stérilisable en entrée et un condenseur à eau en sortie pour éviter la perte du milieu par évaporation.
- Une sonde stérilisable de mesure polarographique de la pression partielle en oxygène (sonde O₂ Ingold, Biolafitte, modèle 34-10-3003, Mettler Toledo, Zurich, Suisse). Le résultat est donné en pourcentage de la saturation du milieu en oxygène dissous (à 30°C, 7 mg/L). La quantité d'oxygène dissous étant régie par la surface de transfert gaz/liquide, la régulation en oxygène dissous est automatiquement réalisée par ajustement de la vitesse d'agitation et manuellement par ajustement du débit d'aération.
- Une sonde pH à immersion, stérilisable (Ingold Infit, type 764.50 B/BH), reliée à un ensemble de régulation par acide (HCl 1N) ou par base (NaOH 2N).
- Une canne de prélèvement qui plonge dans le milieu de culture. Cette canne est reliée à l'extérieur à un système (seringue et filtre) permettant de faire des prélèvements de manière stérile par aspiration.

- Une série de septa qui permettent d'inoculer le fermenteur ou de l'alimenter en divers composés (liquide régulateurs de pH, substrats, vitamines...).
- Un analyseur de gaz (4100 SERVOMEX). Il utilise l'infrarouge pour doser le CO₂ et le paramagnétisme pour quantifier l'O₂.

Le logiciel utilisé est : Bio Flo 110 Fermentor/Bioreactor, Bio-Command Plus, NBS Bio Command, version plus (BioProcessing Software). Il permet l'acquisition des données et la commande simultanée et automatique de 4 fermenteurs identiques.

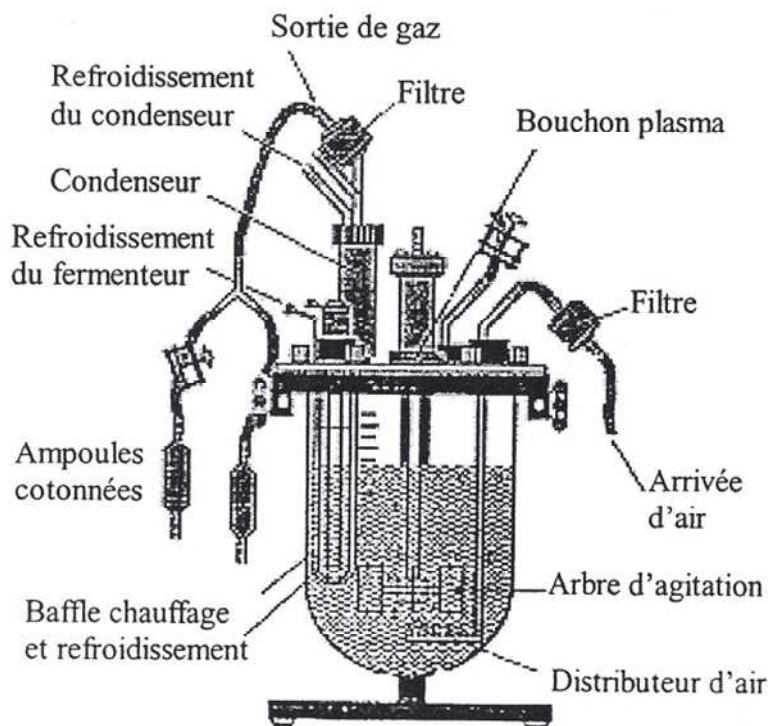


Figure II.1 : Schéma du réacteur type « batch ».

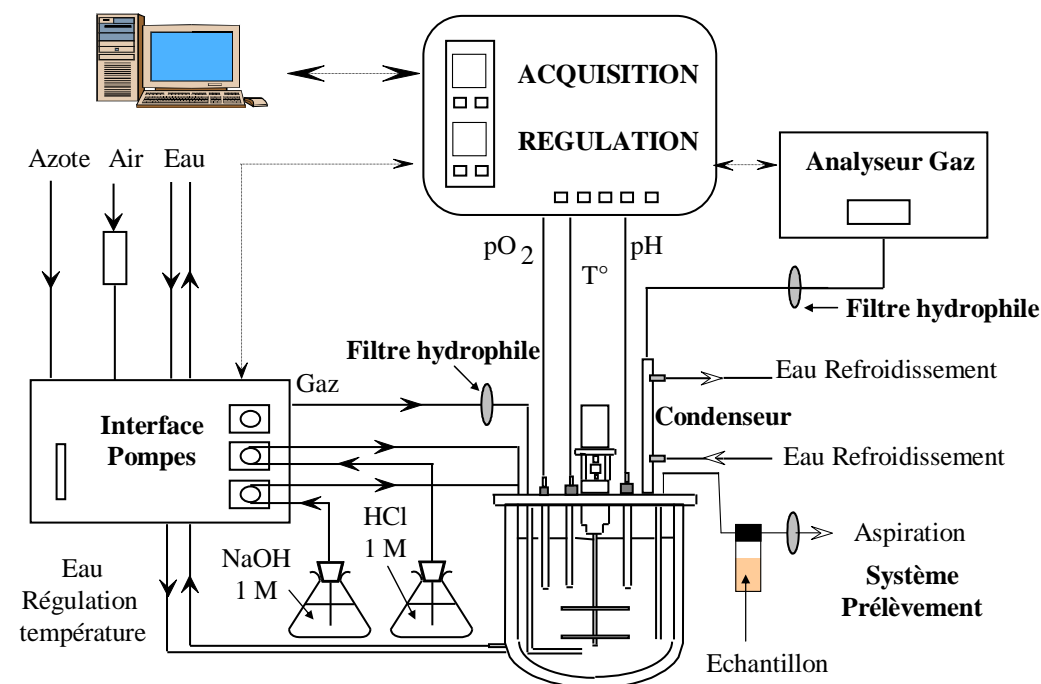


Figure II.2 : Schéma général de l'installation.

II - 3 Méthodes analytiques

II - 3 - 1 Quantification de la biomasse : Mesure du poids sec

La mesure du poids sec 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. Pour chaque échantillon, 4 mL de culture sont prélevés et mis dans 2 tubes Eppendorff (1,5 mL / tube) préalablement desséchés (48 h à 105 °C) et tarés. Les pesées sont effectuées sur une balance analytique Sartorius. Les tubes sont ensuite centrifugés à 16000 g pendant 10 min. Le culot est lavé trois fois par centrifugation en utilisant 1 mL de NaOH (0,25 N) afin d'éliminer les éléments solubles à pH basique, puis avec 1 mL d'HCl (0,35 N) afin d'éliminer les éléments solubles à pH acide, puis avec 1 mL d'eau distillée. Les eppendorffs contenant les culots cellulaires sont ensuite placés dans une étuve pendant 48h, puis pesés après refroidissement dans un dessiccateur. La masse sèche ainsi déterminée est

rapportée au litre de culture. Le résultat est exprimé en gramme de matière sèche par litre de culture avec un écart-type maximal de 5% de la valeur.

II - 3 - 2 Dosage du glucose

Le glucose est quantifié par méthode enzymatique grâce à un appareil automatique, l'YSI modèle 2700 (Yellow Spring Instrument Inc., Yellow Spring, Ohio, USA). L'appareil utilise une enzyme immobilisée, la glucose oxydase, sur une membrane qui est couplée à une sonde électrochimique. L'enzyme permet la production du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à partir de la réaction du glucose avec l'oxygène :



La réaction d'oxydation du peroxyde d'hydrogène via une anode de platine libère alors un flux d'électrons proportionnel à la concentration en glucose de la solution dosée. La réponse de l'appareil est linéaire entre 0,002 et 25 g.L⁻¹ de glucose, avec une erreur maximale de ± 3% par rapport à une solution standard de glucose à 25 g.L⁻¹ (CAS 50997).

II - 3 - 3 Dosage des dithiopyrrolones

Les dithiopyrrolones sont dosées par hplc en phase inverse et détection UV. Le système de chromatographie liquide à haute pression Bio-Tek Instruments a été utilisé. Il est équipé de :

- Un injecteur automatique (auto-sampler 465TM Bio-Tek, Milan, Italie) relié à une boucle d'injection de 80 µL.
- Un système de pompe 525TM.
- Un détecteur UV-Visible (UV-Vis 545V à barrette de diode à longueurs d'onde UV-visible variables).
- Une colonne 582TM thermostatée dans un four.
- Une colonne analytique en phase inverse (C₁₈) ODB, Zorbac SB, Uptisphere, granulométrie 5 µm, dimensions 150 x 4,6 mm. Cette colonne est précédée d'une précolonne de garde de 10 x 4 mm et présentant les mêmes caractéristiques.
- Un PC Pentium II 300 MHz (moniteur LG), YAMAHA.

- Le contrôle du gradient de solvant d'éluion, la collecte 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 PC d'exploitation et d'analyse (Kroma 3000, Bio-Tek).

II - 3 - 3 - 1 Préparation de l'échantillon

Le surnageant de culture, récupéré après centrifugation à 16000 g pendant 10 min, est filtré à 0,45 µm (filtres millipores – diamètre : 0,45 µm).

II - 3 - 3 - 2 Conditions analytiques

Cette chromatographie d'adsorption en phase inverse possède une phase mobile polaire et une phase stationnaire apolaire. La phase mobile pour la séparation est constituée par un éluant dégazé de deux solvants : l'eau bidistillée (solvant A) et l'acétonitrile (solvant B). Les conditions d'éluion sont reportées dans le tableau II.7.

Tableau II.7 : Conditions d'éluions des dithiolyrrolones par hplc (en mode gradient).

	Durée (min)	Débit (mL/min)	Solvant (%)	
			Eau bidistillée	Acétonitrile
Pré-run	-7,00	0,8	100	0
Run	0,00	0,8	100	0
	5,00	0,8	70	30
	30,00	0,8	0	100
Post-run	32,00	0,8	100	0

La détection se fait à 390 nm (Lamari *et al.*, 2002a). Le débit d'éluion est fixé à 0,8 mL/min et la température à 30°C. Avant chaque injection, la colonne (phase mobile) est conditionnée et équilibrée aux conditions initiales (100% de solvant A) pendant 7 min (pré-run). Le volume d'injection est de 60 µL. En fin d'analyse, le retour aux conditions initiales est effectué au cours d'un post-run de 2 min.

Les différentes dithiolyrrolones ne différant qu'au niveau d'un groupement (radicaux CH, CH₂, CH₃...), elles se séparent dans l'ordre de leur degré d'hydrophobicité. Dans les conditions utilisées, le temps de rétention de la thiolutine est de 11,6 min. La

concentration en thiolutine est déterminée à l'aide d'une solution étalon et de ces dilutions (3/4, 1/2 et 1/4) injectées successivement dans la colonne. Les aires correspondant aux concentrations permettent d'établir la droite étalon « concentration = fonction (aire de pic) ». Elle permet de déterminer la concentration en thiolutine de chaque échantillon de surnageant de milieu de culture. L'erreur de mesure de concentration en thiolutine est inférieure à 5%. Les solvants sont filtrés à 0,45 µm. Par hypothèse, les autres dithiopyrrolones absorbent la lumière à la même longueur d'onde que la thiolutine, et leur spectre d'absorption est identique. Ainsi, la gamme étalon de la thiolutine est extrapolable aux autres dithiopyrrolones.

II - 3 - 4 Dosage des acides aminés

Comme les dithiopyrrolones, les acides aminés sont dosés par hplc phase inverse et détection UV. Mais, contrairement aux dithiopyrrolones, les acides aminés ne sont pas quantifiés directement. Leur dosage nécessite une étape supplémentaire. Ils sont rendus détectables par dérivation. La quantification des acides aminés libres dans le surnageant de fermentation a été réalisée au Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés de l'INSA (Toulouse, France).

Le système de chromatographie liquide à haute pression utilisé est **AminoQuant HP 1090** qui est un chromatographe à haute pression avec un compartiment de dérivation et d'injection thermostaté à 35°C, contrôlé par micro-ordinateur. Il est équipé d'une colonne C₁₈ HypersilAA-ODS 200 x 2,1 µm.

Les acides aminés libres du milieu de fermentation sont analysés à partir des surnageants de fermentation, ceux-ci devant subir un pré-traitement afin de précipiter les protéines qui risqueraient d'endommager le système de dosage. Un volume de surnageant et quatre volumes de méthanol sont mis en contact pendant une nuit dans de la glace, puis centrifugés. Le surnageant récupéré peut alors être dosé.

Les acides aminés sont dérivés de façon automatique par l'aldéhyde *ortho*-phtalique (OPA) et le 9-fluorenylméthyl-chloroformiate (FMOC-Cl). Le premier composé réagit avec les substances comportant une fonction amine primaire en présence d'un composé thiolique (acide 3-mercaptopropionique). Le second composé acyle ensuite les acides aminés secondaires. La séparation des substances dérivées se fait par un gradient binaire de tampon acétate - tétrahydrofurane - triéthylamine (pH 7,2) et un solvant eau - acétonitrile. Le détecteur est un spectrophotomètre à barrettes de diode, réglé à 338 nm pour les dérivés OPA,

et 266 nm pour les dérivés FMOC. La limite de détection est de 25 μM . L'erreur relative est inférieure à 10%.

II - 3 - 5 Dosage des sulfates et des phosphates

Les sulfates et les phosphates sont quantifiés par hplc échangeuse d'anions. La détection est assurée par mesure de la conductivité. Le système de chromatographie utilisé est dans ce cas le **Dionex**. Il est équipé de :

- Un système de pompe : GP40 Dionex
- Un passeur d'échantillons automatique AS50 Dionex
- Un four AS50 Dionex
- Une colonne analytique échangeuse d'anions : 250*4 mm AS11 + pré-colonne de garde AG11 10 x 4 mm Dionex
- Un supprimeur ASRS Ultra2 4 mm Dionex
- Un détecteur de conductivité CD20 Dionex
- Un logiciel d'exploitation et d'analyse Chromeleon Dionex

II - 3 - 5 - 1 Préparation de l'échantillon

La concentration en sulfates et phosphates ne doit pas excéder 100 mg.L^{-1} pour chacun. Les échantillons de surnageant de milieu de culture sont dilués 20 fois dans de l'eau ultrapure.

L'échantillon dilué est filtré à 0,45 μm (filtres millipores – diamètre : 0,45 μm).

II - 3 - 5 - 2 Conditions analytiques

La température de la colonne est de 30°C. Le volume d'injection est de 10 μL . La conductivité totale en sortie de colonne ne doit pas excéder 5 μS (mise en place d'un supprimeur de soude (Na^+ et OH^-)).

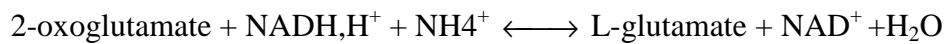
L'élution est isocratique : 90 % solvant A (NaOH 5 mM) et 10 % solvant B (NaOH 100 mM) à 1 mL.min^{-1} .

La durée de l'analyse est de 10 min. Les temps de rétention des sulfates et phosphates sont respectivement : 2,3 et 3,73 min. La reproductibilité des mesures est de 5%.

Remarque : Le sulfate (SO_4^{2-}) peut aussi être dosé par précipitation avec le chlorure de baryum $\text{Ba}(\text{Cl})_2$. Dans ce cas là, le suivi de la précipitation est effectué soit par turbidimétrie, soit par mesure de conductivité. Cette méthode ne convient pas à notre milieu de fermentation. Un élément du milieu de culture fait réagir le BaCl_2 .

II - 3 - 6 Dosage de l'azote ammoniacal (NH_4^+) : méthode enzymatique

En présence de la glutamate deshydrogénase (GIDH) et de nicotidamide-adénine-dinucléotide (NADH, H^+), l'azote ammoniacal est transformé en L-glutamate par le 2-oxoglutarate qui oxyde le NADH, H^+ selon la réaction :



La détermination est basée sur la formation de NAD^+ . La diminution de l'absorbance est mesurée à la longueur d'onde de 340 nm. La quantité de NADH, H^+ oxydée en présence de NAD^+ au cours de la réaction est proportionnelle à la quantité d'azote ammoniacal dans une gamme de concentrations allant de 0 à 50 mg.L^{-1} de NH_4^+ . Le dosage est effectué à l'aide d'un kit commercial (Microdom n° 110 05 037 00). L'erreur relative de mesure est de 5%.

II - 3 - 7 Dosage de l'azote α -aminé : méthode enzymatique

En présence de o-phthaldialdéhyde/N-acétyl-L-cystéine (OPA/NAC), les groupements d'acides aminés primaires réagissent pour former des dérivés d'isoindole stables et quantifiables à la longueur d'onde de 340 nm. La quantité de dérivés d'isoindole est proportionnelle à la quantité d'azote α -aminé dans une gamme de concentrations allant de 0 à 80 mg.L^{-1} de α -N. Le dosage est effectué à l'aide d'un kit commercial (Microdom n° 110 10 110 00). L'erreur relative de mesure est de 5%.

II - 3 - 8 Dosage des éléments chimiques : spectrométrie d'émission atomique

Le système utilisé est le spectromètre d'émission optique **ULTIMA 2[®], JY HORIBA**. L'utilisation d'un plasma à observation strictement radiale permet l'acquisition de toutes les raies spectrales d'un échantillon de 120 à 800 nm en moins de 2 min, à l'aide d'une

combinaison de la détection Haute Dynamique (HDD[®], basée sur la détection par photomultiplicateur), de l'électronique rapide type « Rapid Chip[™] » et du logiciel analytique Win-IMAGE. Des solutions d'éléments mono et multi-standards (inorganic ICP AES standards) sont disponibles à des concentrations de 1000 µg.mL⁻¹ conditionnées en flacons de 100 ou 500 mL. Ce système est utilisé pour doser les différents éléments chimiques totaux présents dans l'extrait de levure (Al, B, Be, Ca, Co, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P, Pb, S, V, W, Zn, Zr).

II - 3 - 8 - 1 Préparation de l'échantillon

L'analyse de la composition en éléments chimiques nécessite un volume de 2 mL d'échantillon liquide filtré à 0,45 µm.

II - 3 - 8 - 2 Conditions analytiques

L'échantillon est injecté dans le spectromètre d'émission atomique et chauffé à 2500°C.

II - 3 - 9 Analyse élémentaire CHONS

Le dosage des éléments chimiques concerne la détermination des teneurs en carbone, azote, hydrogène, soufre et oxygène des échantillons analysés. Il est réalisé par le Service-Inter-Universitaire de microanalyse Élémentaire de l'ENSIACET (Toulouse, France).

Les analyseurs CHNS/O AE1110 et Flash-EA 1112 (ThermoFinnigan) offrent une solution simple pour le dosage en une seule analyse des différents composés. Il s'agit de brûler un échantillon préparé dans une feuille d'étain dans un jet d'oxygène pur à 920°C/1000°C. La combustion « éclair » de l'échantillon à 1800°C libère des gaz qui subissent un cycle de traitements (oxydant, réducteur ...) dans un tube réacteur et/ou pièges spécifiques. Les gaz traités sont alors séparés par une méthode chromatographique. Les analyseurs permettent de travailler avec des quantités d'échantillons variant de 0,1 mg à 1g (en fonction des analyses) pour des échantillons solides ou liquides d'origine organique, organométallique ou inorganique. Les limites de détection des différents éléments sont les suivantes (% massique) : C : 0,5 %, H : 0,6 %, N : 0,5% et S : 0,3 %.

II - 3 - 10 Mesure du diamètre des pelotes : microscope

Un microscope équipé du système d'acquisition (OptiGrid) et du traitement d'image (Image Pro Plus) a été utilisé.

Les bactéries peuvent être observées par transmission ou par réflexion.

Ce système permet l'acquisition d'image en 3D des pelotes bactériennes (demi-sphère) dont il est possible de mesurer le diamètre maximal.

Dans notre cas, l'observation d'une goutte de suspension bactérienne est effectuée par réflexion. La goutte de milieu de culture est déposée sur la lame sans lamelle.

Il faut effectuer la mise au point sur la pelote que l'on souhaite étudier puis faire une séquence de photographies (jusqu'à 100) entre deux plan z. Le logiciel permet la reconstitution de la pelote en 3D ainsi qu'une photo en relief de la pelote (figure II.3).

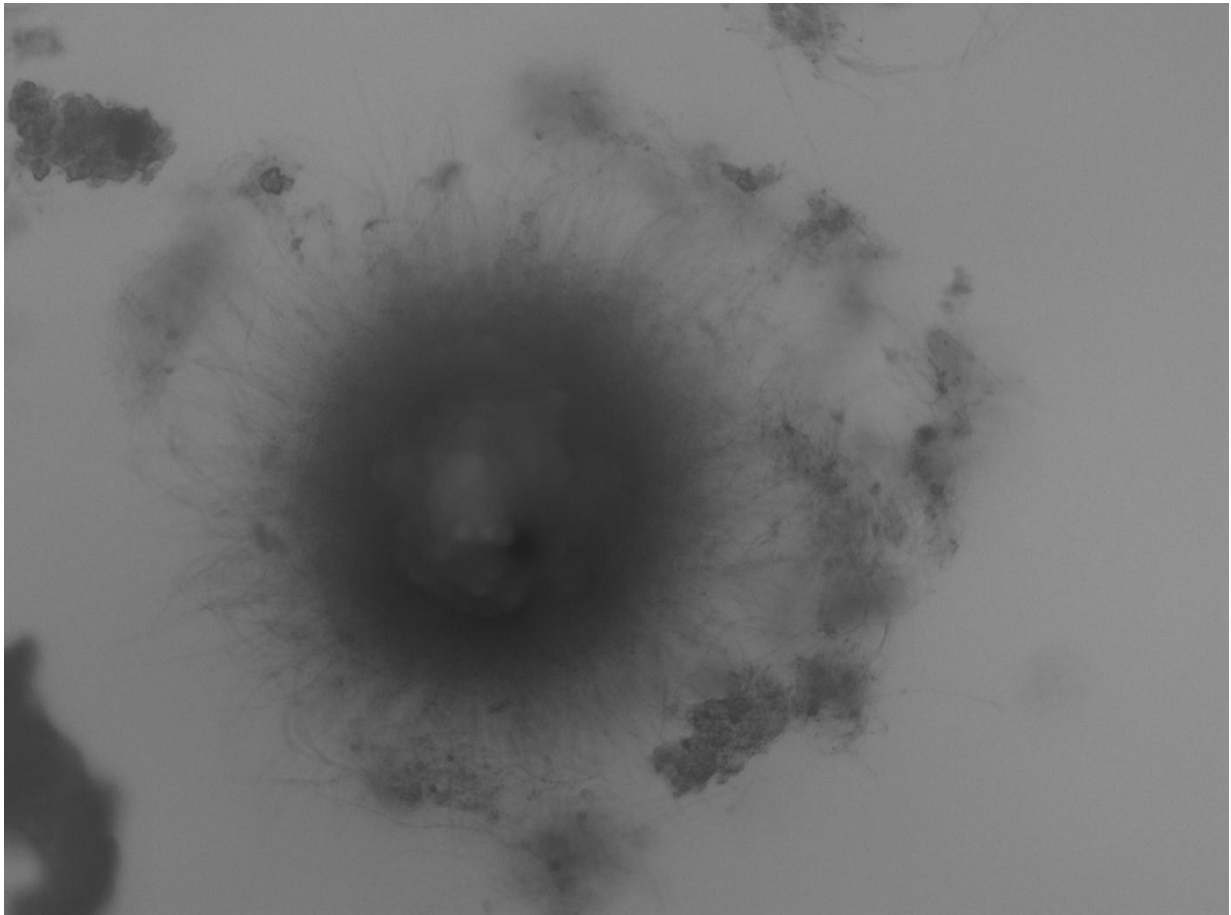


Figure II.3 : Pelote (Image Pro Plus) après 24h de culture sur milieu semi-synthétique. Diamètre = 200 μm . *Sa. algeriensis*, 30°C pH initial 7, 250 rpm.

II - 4 Culture des microorganismes filamenteux : Aspects Pratiques

La culture de microorganismes filamenteux est plus complexe à mettre correctement en œuvre que celle des microorganismes classiques non filamenteux (*Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* ...). Il convient de prendre plusieurs précautions. L'objet de ce paragraphe est de présenter l'ensemble des points critiques à prendre en compte pour la culture de microorganisme filamenteux, en particulier *Saccharothrix algeriensis*.

II - 4 - 1 Suivi de l'évolution de la biomasse

Le suivi de l'évolution de la biomasse présente trois difficultés :

La première difficulté est la détermination de la concentration en biomasse. Le fait que ces microorganismes filamenteux forment rapidement des pelotes rend tout comptage au microscope impossible. La mesure de turbidité est possible mais plus complexe car elle demande une étape supplémentaire de désagrégation des pelotes (sonication) difficile à standardiser à cause de l'évolution non maîtrisée et mal connue de la taille des pelotes. Concernant les microorganismes filamenteux, la mesure de la concentration en biomasse se fait par détermination de la masse sèche de cellule. Cependant, le carbonate de calcium est souvent employé en tant que tampon et source de calcium dans les milieux de culture. Il rend difficile la détermination de la masse sèche car son élimination au cours des lavages est source d'erreur. En effet, l'ajout d'acide au culot de biomasse provoque un déplacement d'équilibre des carbonates vers la formation de gaz carbonique ce qui induit la formation rapide de mousse et de quelques projections entraînant de la biomasse hors de l'épandeur. Il est donc nécessaire de remplacer le CaCO_3 par un mélange de MOPS (rôle tampon) et de CaCl_2 (rôle source de calcium).

La deuxième difficulté vient de l'adhésion des pelotes sur la paroi du fermenteur, sur les cannes d'aération et de prélèvement ainsi que sur les sondes. Ce phénomène est visible hors du milieu liquide mais aussi au sein du milieu de culture (figures II.4 et II.5).



Figure II.4 : Illustration du phénomène d'adhésion des pelotes sur la paroi du réacteur. *Sa. algeriensis*, culture « batch » en réacteur, 30°C pH initial 7, 250 rpm.

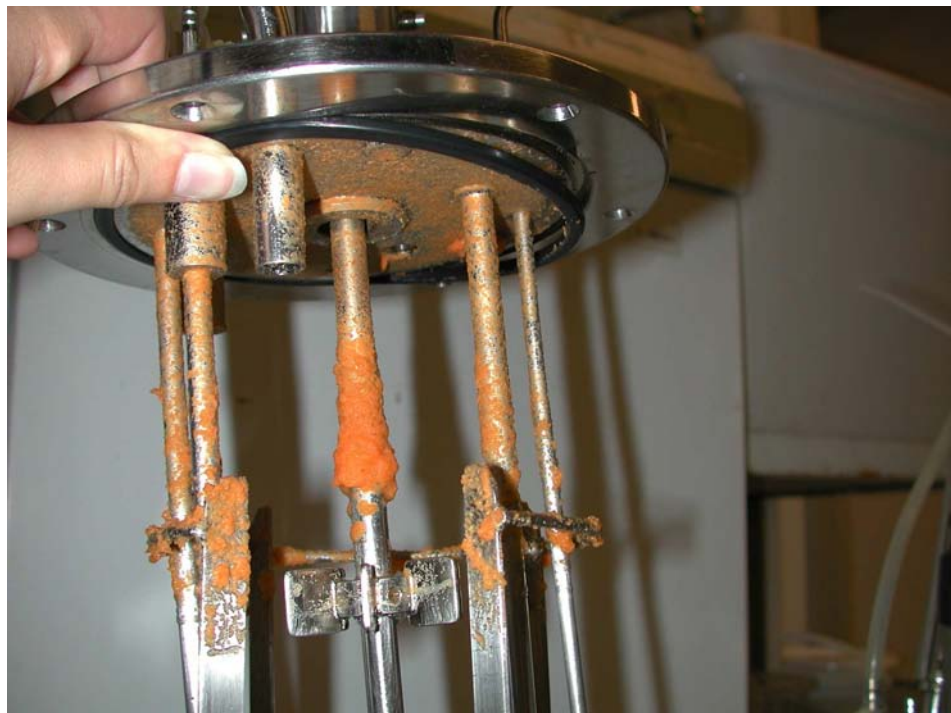


Figure II.5 : Illustration du phénomène d'adhésion des pelotes sur les éléments métalliques du réacteur. *Sa. algeriensis*, culture « batch » en réacteur, 30°C pH initial 7, 250 rpm.

Enfin, les pelotes formées sont entraînées à l'extérieur du milieu liquide par la présence récurrente de mousse due à l'aération, à l'agitation et aux sels, malgré les ajouts d'acide pluronique (antimousse). La canne de prélèvement se situant dans le liquide, les pelotes à l'extérieur du milieu ne sont pas prises en compte.

Pour toutes ces raisons, le protocole de prélèvement doit être rigoureusement standardisé afin de limiter les erreurs de mesure sur la biomasse de ce type de microorganismes.

II - 4 - 2 Culture des actinomycètes, bactéries filamenteuses

La formation des pelotes a un rôle physiologique important. Toute modification de l'agitation peut influencer sur la morphologie de la cellule et donc sur son métabolisme.

La culture de bactéries filamenteuses formant des pelotes d'une taille pouvant atteindre un diamètre de 400 μm subit inévitablement des problèmes de transfert de matière et en particulier d'oxygène.

Le fait que les pelotes s'accrochent aux sondes, outre les problèmes de quantification de la biomasse, induit des perturbations sur le fonctionnement des sondes. Les mesures de pH peuvent être erronées. En cas de régulation automatique du pH, ces erreurs ponctuelles peuvent entraîner un ajout massif et inadéquat de liquide correcteur de pH (NaOH ou HCl). Ainsi, l'utilisation de la régulation automatique du pH est inadaptée à la culture de microorganismes qui peuvent adhérer sur les sondes.

Par ailleurs, les pelotes peuvent également boucher la canne d'aération au fur et à mesure de la culture.

II - 4 - 3 Reproductibilité

Afin d'éviter les problèmes d'interprétations liés à un manque de reproductibilité des expériences, plusieurs types de précautions doivent être pris.

Les actinomycètes sont sensibles aux oligoéléments (nature et concentration). De ce fait, la verrerie utilisée pour la préparation des différents milieux doit être parfaitement

propre. Car si cette verrerie à usage microbiologique est régulièrement stérilisée, stérile ne signifie pas propre d'un point de vue chimique.

De plus, la qualité de l'eau distillée utilisée pour la préparation des milieux de culture doit être elle aussi parfaitement maîtrisée.

Il faut également conserver les mêmes marques de produit et si possible les mêmes lots au cours de l'étude, particulièrement pour l'extrait de levure. Par ailleurs, au cours de la préparation du milieu de culture, toutes les étapes doivent être scrupuleusement réalisées dans le même ordre (par exemple, les composants doivent être rajouté dans le même ordre).

Par ailleurs, l'inoculum doit être parfaitement maîtrisé :

- Le choix de l'inoculum : les spores en cryotubes (dénombrables) seront préférés aux tapis de spores sur boîte de Pétri.

- L'âge de l'inoculum : plus il est âgé, plus la phase de latence est longue et la production de métabolite secondaire affectée.

- Le nombre de génération : les actinomycètes possèdent un haut pourcentage en bases G et C dans leur ADN ce qui les rend plus sujets aux mutations spontanées. De ce fait, le nombre de génération de l'inoculum doit être minimisé pour éviter de perdre partiellement ou même totalement, la capacité de synthèse de l'antibiotique.

II - 5 Détermination des paramètres cinétiques microbiens

II - 5 - 1 Etablissement des cinétiques de production de CO₂ et de consommation de l'O₂.

Un analyseur de gaz SERVOMEX connecté à la sortie des fermenteurs permet d'établir l'évolution de la composition en O₂ et CO₂ des gaz ($x_S^{O_2}$ $x_S^{CO_2}$).

Le débit de gaz de sortie (D_S) du réacteur est déterminé par un bilan matière sur l'azote qui est un gaz inerte. (L'argon est négligé). En effet, ce gaz qui est inerte et donc non utilisé par les microorganismes, se retrouve intégralement dans le courant gazeux sortant du fermenteur.

$$D_S \times x_S^{N_2} = D_E \times x_E^{N_2}$$

$$D_S = \frac{D_E \times x_E^{N_2}}{x_S^{N_2}}$$

$$D_S = \frac{D_E \times x_E^{N_2}}{1 - (x_S^{CO_2} + x_S^{O_2})}$$

Le bilan complet entre l'entrée et la sortie du fermenteur conduit à l'expression générale de la vitesse de consommation en oxygène (r_{O_2}) et de la vitesse de production de dioxyde de carbone (r_{CO_2}).

$$r_{O_2} = \frac{(D_E \times x_E^{O_2}) - (D_S \times x_S^{O_2})}{VM}$$

$$r_{CO_2} = \frac{(D_S \times x_S^{CO_2}) - (D_E \times x_E^{CO_2})}{VM}$$

$x_E^{N_2}$: Fraction molaire du diazote en entrée du réacteur (air)

$x_E^{O_2}$: Fraction molaire du dioxygène en entrée du réacteur (air)

$x_E^{CO_2}$: Fraction molaire du dioxyde de carbone en entrée du réacteur (air)

$x_S^{N_2}$: Fraction molaire du diazote en entrée du réacteur

$x_S^{O_2}$: Fraction molaire du dioxygène en sortie du réacteur

$x_S^{CO_2}$: Fraction molaire du dioxyde de carbone en sortie du réacteur

VM : le volume molaire d'un gaz parfait à 30°C et 1 bar (25,2 L.mol⁻¹).

D_S : Débit de gaz en sortie en entrée du réacteur (L.h⁻¹)

D_E : Débit de gaz (air) en entrée du réacteur (L.h⁻¹)

r_{CO_2} : Vitesse de production de dioxyde de carbone (mol.h⁻¹)

r_{O_2} : Vitesse de consommation de l'oxygène (mol.h⁻¹)

Les quantités cumulées d'oxygène consommé et de dioxyde de carbone produit sont calculées par intégration des vitesses selon la méthode des trapèzes. Le principe est

d'approcher la région sous la courbe représentative de la fonction f par un [trapèze](#) et d'en calculer l'[aire](#). Étant donné que l'acquisition des données d'analyse des gaz de sortie s'effectue toutes les 6 minutes, cette méthode d'intégration simple et rapide est acceptable.

II - 5 - 2 Calcul des vitesses instantanées de production et de consommation

Biomasse $r_X = d[X]/dt$

Glucose $r_G = -d[Glu]/dt$

Dithiopyrrolone $r_D = d[D]/dt$

où $[X]$, $[Glu]$, $[D]$ sont les concentrations ($g.L^{-1}$) en biomasse, glucose et dithiopyrrolones dans le milieu de culture et r_X , r_G et r_D sont les vitesses instantanées correspondantes en $g.L^{-1}.h^{-1}$.

II - 5 - 3 Calcul des vitesses spécifiques instantanées

Biomasse $\mu = q_X = r_X / [X]$

Glucose $q_G = r_G / [X]$

Dithiopyrrolone $q_D = r_D / [X]$

où μ , q_G et q_D sont les vitesses spécifiques instantanées correspondantes en $g.g^{-1}.h^{-1}$.

II - 6 Traitement des données

II - 6 - 1 Lissage des données expérimentales

Afin de déterminer le taux de croissance (μ) du microorganisme, les valeurs expérimentales des différentes variables au cours du temps ont été traitées à l'aide d'une macro Excel de fonctions splines cubiques $g(t)$ vérifiant pour chaque couple de points expérimentaux $(t_i; x_i)$ les deux conditions suivantes:

$$\int_{t_0}^m g''(t)^2 dt \text{ minimum}$$

$$\sum_{i=0}^{i=n} \left(\frac{g(t_i) - x_i}{\sigma(x_i)} \right)^2 < S$$

Avec, x_i : valeur expérimentale de la variable au temps t_i , t_i : le temps de l'échantillonnage compté à partir de l'inoculation de la culture, $\sigma(x_i)$: écart-type lié aux valeurs expérimentales de x , n : nombre total de points expérimentaux et S : la constante de lissage.

La première condition consiste en la minimisation de la dérivée seconde $g''(t)$, qui a pour but de linéariser les jonctions des courbes les unes aux autres, générant ainsi des fonctions lisses.

La deuxième condition est une contrainte sur le lissage. La somme des carrés des écarts entre les points expérimentaux et les points du lissage ne doit pas dépasser la valeur de la constante « S » que détermine le degré de liberté du lissage.

Ce programme permet de choisir cette constante « S » à partir de quelques règles :

- L'allure de la courbe $g'(t)$ doit être significative d'un point de vue physique.
- La courbe $g(t)$ générée par le choix de la constante « S » ne doit pas s'écarter des barres d'erreurs des points expérimentaux.
- La valeur de la constante S doit être la plus petite possible, tout en vérifiant les deux conditions précédentes.

II - 6 - 2 Réconciliations des données expérimentales

Les données sont analysées par une méthode dérivée de méthodes décrites dans la littérature (Moreau, 2000). Cette méthode permet de vérifier la cohérence des données expérimentales et si besoin, de les corriger en prenant en compte trois contraintes mathématiques : bilan carbone, bilan azote et bilan redox. Elle intègre également les erreurs de mesure relative sur chaque constituant.

La détection des grosses erreurs repose sur des méthodes statistiques. Les tests consistent à accepter ou rejeter une hypothèse mathématique donnée, traduisant généralement une loi physique supposée exacte, avec un risque donné (5%).

Trois tests statistiques sont utilisés, les tests GLR, RC et RN. On distingue les tests *a priori*, qui ne nécessitent pas de connaître la solution du problème P, et les tests *a posteriori* qui en sont tributaires.

Le test GLR : Il s'agit du « Generalized Likelihood Ratio » (Narasimhan et Math, 1987). C'est un test, a priori basé sur le rapport de maximum de vraisemblance, qui permet la détection de la mesure erronée et propose une estimation du biais.

Le test RC : Cette méthode, « Residual Criterion », est une méthode a posteriori, qui permet uniquement la localisation d'un échantillon suspect. La fonction de discrimination qui permet d'apprécier l'amplitude des erreurs est de type globale, portant sur la valeur de la fonction objectif après résolution du problème P.

Le test RN : Il utilise l'algorithme « Iterative Measurement Test » travaillant à partir du « vecteur normalisé des termes correctifs ». C'est un test a posteriori, utilisant une méthode locale. Il ne fournit que la localisation d'un échantillon suspect.

Un échantillon est déclaré suspect si un des trois test le détecte. Les corrections des mesures se font à partir des biais proposés par le GLR.

$$E_{ch}^{COR} = E_{ch} - \text{Biais}$$

Si un échantillon corrigé n'est plus détecté par aucun des trois tests, l'échantillon est validé, sinon, il est supprimé.

II - 6 - 3 Méthode d'analyse factorielle appliquée à la recherche de stœchiométries de réaction.

L'analyse factorielle de données en fermentation (réacteur batch) est fondée sur une exploitation de la structure algébrique du bilan matière partiel. Chaque constituant évolue dynamiquement en fonction de l'intensité des réactions dans lesquelles il est impliqué soit comme réactif, soit comme produit. Son évolution globale est donc écrite dans le bilan matière partiel comme la somme des contributions de chaque réaction (Moreau 2000).

Cette méthode a pour but ultime la détermination d'un schéma réactionnel du métabolisme général de *Sa. algeriensis*. Elle a été proposée par Moreau (2000) pour un autre microorganisme.

Elle permet de minimiser les différences entre la matrice $D_{\text{expérimentale}}$ et la matrice $D_{\text{théorique}}$, calculée à partir de la matrice Y des avancements et de la matrice des stoechiométries proposées. Il s'agit d'une résolution d'un problème d'optimisation sous contraintes.

Le critère choisi pour la minimisation des écarts entre D_{calc} et D_{exp} est la somme des erreurs absolues au carré pondérée par la mesure maximale de chaque constituant considéré :

$$\min_{Y,N} \|D_{\text{exp}} - D_{\text{calc}}\|$$

Avec

$$\|D_{\text{exp}} - D_{\text{calc}}\| = \sum_i \sqrt{\frac{\sum_j (D_{i,j\text{exp}} - D_{i,j\text{calc}})^2}{\text{Max}(|D_{i,j\text{exp}}|)}}$$

Les contraintes sont imposées par les lois de conservation de la matière et la réalité physiologique du microorganisme.

Ainsi, $D_{\text{calc}} = YN$ (D est la matrice des variations de rétention molaires, Y est la matrice des avancements de réaction et N est la matrice de stœchiométries de réaction)

N respecte les bilans matière

$y_{i,j} > 0$ et $y_{i+1,j} - y_{i,j} > 0$ pour $i=1, n$ et $j = 1, nr$

La solution trouvée est alors nécessairement une solution physiquement acceptable, en particulier pour les avancements de réactions. La simplicité de la mise en œuvre de cette méthode permet de travailler avec des outils simples tels que le solveur d'Excel (méthode Sequential Quadratic Programming). En revanche pour utiliser cette méthode, il ne faut pas avoir d'incertitudes sur le nombre de réactions occurrentes. Le schéma métabolique doit être connu ou proposé, et seuls les coefficients stœchiométriques et les avancements de réactions sont cherchés.

Chapitre III

Recherche d'un milieu synthétique pour la production de biomasse

III - Recherche d'un milieu synthétique pour la production de biomasse

Les cultures menées par Bouras (2006) sur *Sa. algeriensis* étaient effectuées sur milieu semi-synthétique contenant (2 g.L^{-1}) d'extrait de levure (EXL). Ce milieu est ainsi nommé car la quantité d'EXL qu'il contient est faible par rapport aux milieux « complexes ». (Par exemple, le milieu ISP2 contient 14 g.L^{-1} d'extraits). Dans le cadre d'un milieu complexe, l'EXL est une source de carbone, d'azote et de facteurs de croissance. Par contre, lorsqu'il est utilisé à 2 g.L^{-1} , il a pour simple objectif d'apporter des facteurs de croissance aux microorganismes. Or, à faible concentration, il demeure une source de multiples substrats potentiels pour le microorganisme : carbohydrates, acides aminés, peptides ... (U.S. Food and Drug Administration. 1995. Bacteriological analytical manual, 8th ed. AOAC International. Gaithersburg, USA). Cette abondance de substrats non maîtrisés complique toute compréhension du développement du microorganisme.

Ainsi, l'élimination ou la minimisation de la part d'extrait de levure dans la composition du milieu de culture permettrait de mieux comprendre le développement de *Sa. algeriensis*. Sa modélisation en serait également facilitée. De plus, cette étape supplémentaire pourrait avoir un intérêt pratique non négligeable pour de futurs travaux sur *Sa algeriensis*. En effet, les procédés de production d'extrait de levure étant complexes, variés et confidentiels, son élimination ou sa substitution permettrait d'être indépendant du fournisseur d'extrait de levure. Par ailleurs, un milieu dépourvu d'extrait de levure est préférable à un milieu complexe en vue de l'incorporation de substrats marqués en vue de l'identification de l'origine biosynthétique du métabolite secondaire étudié (Jonsbu *et al.*, 2001 ; Lam *et al.*, 1995 ; Zang *et al.*, 1999).

Les bio-productions microbiennes peuvent être améliorées par deux approches distinctes. La première approche est d'améliorer la production spécifique de la molécule d'intérêt. La seconde est d'augmenter la quantité de biomasse produite. L'amélioration de la production spécifique ayant fait déjà l'objet d'investigations lors d'études précédentes

(Bouras *et al.*, 2006ab et Bouras *et al.*, 2007), c'est la seconde approche qui fait l'objet de cette partie du travail. Ainsi, ce chapitre présente l'ensemble des investigations ayant pour but la mise au point d'un milieu synthétique pour la production de biomasse.

Le milieu recherché doit respecter deux critères. Sa composition doit être simplifiée afin de faciliter la compréhension du développement du microorganisme. La question essentielle de cette simplification est de savoir si la suppression de l'EXL est possible ? Par ailleurs, ce milieu doit permettre une production de biomasse conséquente afin d'accentuer les phénomènes de consommation et de production dans le but d'éviter tout problème d'interprétation des cinétiques de croissance.

L'effet des carbohydrates, des acides aminés et des bases azotées sur le développement de la bactérie a été évalué sur milieu minimum afin de développer un milieu semi-synthétique. De plus, l'influence des oligoéléments a également été évaluée.

III - 1 Milieu semi-synthétique

III - 1 - 1 Substitution de carbonate de calcium

Le milieu utilisé au cours des études menées par Bouras (2006) contenait du carbonate de calcium utilisé afin de lui conférer un pouvoir tampon. Son utilisation compliquant la mesure de poids sec, il a été remplacé par du MOPS dans la composition du milieu de culture. Le calcium est désormais apporté au microorganisme sous forme de chlorure de calcium. L'incidence de cette substitution sur la croissance de la bactérie a été évaluée. La figure III.1 présente l'évolution de la biomasse en fonction du temps dans un milieu semi-synthétique tamponné avec du carbonate de calcium et ou avec du MOPS.

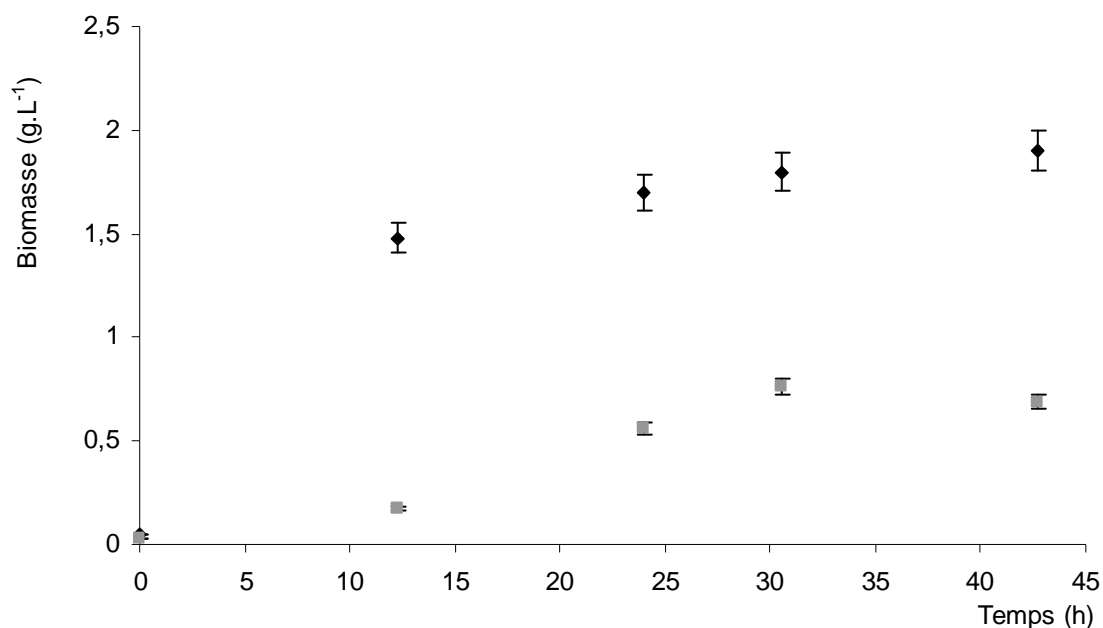


Figure III.1 : Evolution de la production de biomasse en fonction du temps sur deux milieux semi-synthétiques. Un milieu tamponné avec du carbonate de calcium (carrés gris) et un milieu tamponné avec du MOPS (losanges pleins). Culture en fiole de *Sa. algeriensis*, 30°C, 250 rpm, pH initial 7.

Après 12h de culture, le milieu « MOPS » a permis la production de 1,48 g.L⁻¹ de biomasse alors que le milieu « CaCO₃ » ne permet seulement que la production de 0,17 g.L⁻¹. Le MOPS n'a pas d'impact négatif sur la croissance de *Sa. algeriensis* en milieu semi-synthétique. Le MOPS sera utilisé comme agent tampon pour la suite de cette étude.

III- 1 - 2 Croissance sur milieu semi-synthétique tamponné avec du MOPS

La figure III.2 illustre l'évolution de la croissance de *Sa. algeriensis* sur milieu semi-synthétique (MOPS 20 g.L⁻¹ et EXL 2 g.L⁻¹). La production de biomasse ainsi que la consommation de glucose ont été suivies pendant 45h. La production de biomasse, la consommation de glucose et le rendement biomasse / glucose sont représentés sur cette figure.

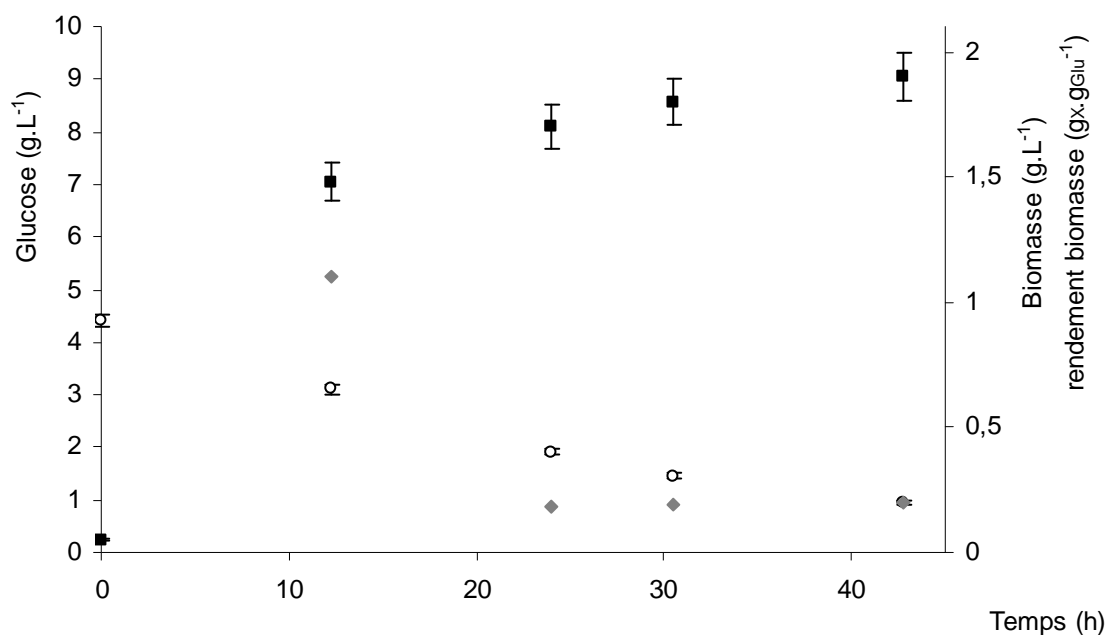


Figure III.2 : Evolution de la production de biomasse (carrés noirs), de la consommation de glucose (cercles blancs) et du rendement biomasse/glucose (losange gris) en fonction du temps sur milieu semi-synthétique tamponné avec du MOPS. Culture en fiole de *Sa. algeriensis*, 30°C, 250 rpm, pH initial 7.

L'observation de cette figure montre que la croissance de *Sa. algeriensis* sur milieu semi synthétique peut être divisée en deux parties. Au cours de la première phase de croissance, il y a production de 1,48 g.L⁻¹ de biomasse avec un rendement de 1,1 g_X.g_{Glu}⁻¹. Or ce rendement est plus de deux fois supérieur au rendement maximal pour les actinomycètes (0,46 g_X.g_{Glu}⁻¹ d'après Borodina et al., 2005), ce qui indique qu'au cours de cette première période, la biomasse est principalement formée à partir d'un substrat autre que le glucose.

Moins de 0,5 g.L⁻¹ de biomasse sont formés au cours de la deuxième période alors que dans le même temps, 2,25 g.L⁻¹ de glucose sont consommés. La biomasse est produite avec un rendement de 0,19 g_X.g_{Glu}⁻¹. Un tel résultat indique qu'au cours de cette phase, le glucose pourrait être la seule source de carbone utilisée pour la croissance microbienne.

Les expérimentations réalisées au cours du chapitre III ont pour unique objectif de rechercher un milieu chimiquement défini par criblage d'un grand nombre de milieux synthétiques. D'un point de vue pratique, le criblage d'un grand nombre de milieux de culture impose une faible fréquence de prélèvement d'échantillons. Le manque de données

expérimentales qui en résulte explique le fait que ces valeurs de rendements sont purement indicatives.

L'extrait de levure est principalement constitué de matière protéique. Hogdson (2000) ayant abondamment répertorié les cas de catabolisation des acides aminés par des actinomycètes, il serait probable que la phase initiale de croissance ait lieu sur un ou plusieurs substrats apportés par l'extrait de levure, par exemple les acides aminés.

III - 2 Croissance sur milieu minimum

Une expérience réalisée avec la suppression totale de l'extrait de levure de la composition du milieu de culture ne permet aucun développement de biomasse appréciable. Il semble que la bactérie manque d'un (ou plusieurs) composé(s) essentiel(s) pour sa croissance. Le glucose, utilisé seul, n'est pas suffisant pour induire le développement de *Sa. algeriensis*. L'extrait de levure pourrait être une source de facteur(s) de croissance pouvant combler une (ou plusieurs) auxotrophie(s). L'élimination de l'extrait de levure du milieu de culture n'étant pas possible, il est nécessaire de remplacer ce constituant par un ou plusieurs composés. Un milieu synthétique doit être recherché.

Par ailleurs, une autre expérience avec un milieu contenant de l'EXL mais dépourvu de glucose a été réalisée. Aucune croissance n'a pu être observée. Le glucose est donc indispensable à la croissance. Ainsi, l'hypothèse du glucose utilisé aussi comme source d'énergie peut être avancée.

III - 3 Recherche d'un milieu synthétique

III - 3 - 1 Influence des carbohydrates sur la croissance

Les observations du développement de *Sa. algeriensis* sur milieux minimum et semi-synthétique font apparaître un constat. Du point de vue macroscopique, sur milieu semi-synthétique, la bactérie n'utilise pas seulement le glucose pour produire de la biomasse. Sur milieu minimum, la bactérie se développe peu. Elle consomme peu le glucose comme substrat carboné. Ainsi, il est légitime de se demander si le glucose est bien le carbohydrate adéquat pour la culture de ce microorganisme.

Avant de développer le milieu synthétique, l'influence de différents carbohydrates sur la croissance de *Sa. algeriensis* doit être évaluée. Ainsi, d'autres carbohydrates ont été testés à

la fois en condition favorable (en présence d'EXL) et en condition défavorable (en absence d'EXL) de croissance à la même concentration molaire (ou équivalent) que le glucose, c'est-à-dire 0,83 mM. Les rendements biomasse / carbohydrate sont présentés figure III.3. Les carbohydrates évalués ne contenant pas tous le même nombre d'atomes de carbone, la biomasse maximale spécifique est la biomasse maximum rapportée à la concentration massique en glucose. Rappelons que le glucose, le galactose, le fructose et le mannitol possèdent 6 atomes de carbone, le lactose, le maltose et le saccharose contiennent 12 atomes de carbone. Le glycérol n'est formé que de 3 atomes de carbone. Les dextrines et l'amidon sont des polymères de glucose.

L'observation générale de la figure confirme le fait que l'extrait de levure joue un rôle primordial et, pour le moment, indispensable pour le développement de *Sa. algeriensis*. En effet, en présence d'extrait de levure, le rendement biomasse / substrat (R_{XS}) est en moyenne 3,6 fois plus grand qu'en son absence quel que soit le sucre. Le R_{XS} maximum sans extrait de levure ($0,042 \text{ g}_X \cdot \text{g}_{\text{dextrines}}^{-1}$) atteint tout juste le R_{XS} le plus faible avec extrait de levure ($0,04 \text{ g}_X \cdot \text{g}_{\text{saccharose}}^{-1}$).

Il est à noter que l'ordre des performances des différents sucres sur R_{XS} est variable. En effet, elles dépendent de la présence ou non de l'extrait de levure dans le milieu de culture. Par exemple, le meilleur R_{XS} ($0,184 \text{ g}_X \cdot \text{g}_S^{-1}$) est obtenu sur galactose en conditions favorables alors qu'en conditions défavorables, il n'arrive qu'en 7^{ème} position ($0,029 \text{ g}_X \cdot \text{g}_S^{-1}$). Les dextrines donnent la meilleure performance sur milieu minimum ($0,042 \text{ g}_X \cdot \text{g}_S^{-1}$), alors que sur milieu semi-synthétique, elles arrivent seulement en 4^{ème} position ($0,014 \text{ g}_X \cdot \text{g}_S^{-1}$). Par contre, quelles que soient les conditions de culture, les R_{XS} les plus faibles sont obtenus sur maltose et saccharose.

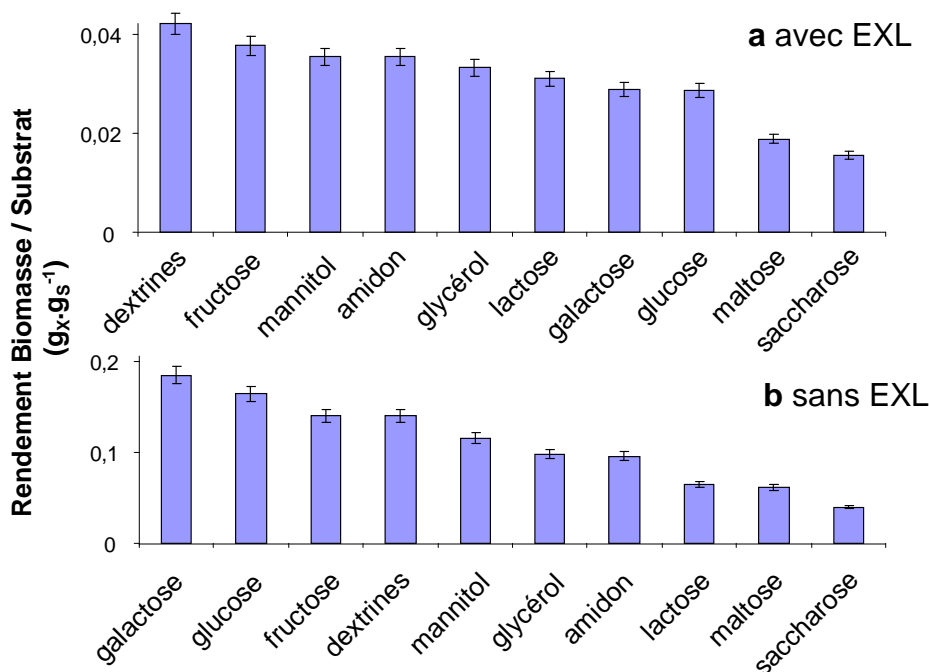


Figure III.3 : Rendement Biomasse / Substrat spécifique en fonction des différents carbohydrates ($\text{g}_X \cdot \text{g}_S^{-1}$) a) sur milieu minimum MOPS et b) sur milieu semi-synthétique MOPS. Glucose, galactose, fructose, lactose, maltose, saccharose et glycérol (83 mM). Dextrines et amidon ($15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Culture en fiole de *Sa. algeriensis*, 30°C , 250 rpm, pH initial 7.

En présence d'extrait de levure, les carbohydrates à 6 carbones semblent favoriser les meilleures productions alors que ceux contenant 12 carbones induisent les productions les plus faibles. En absence d'extrait de levure, les dioses : le lactose, le maltose et le saccharose donnent les résultats les plus faibles. Plus les molécules sont complexes, plus leur assimilation demanderait un coût énergétique important. Ainsi, les carbohydrates ayant une structure simple permettraient une formation de biomasse plus importante que ceux à structures plus complexes comme le maltose par exemple.

En conditions nutritionnelles favorables, le glucose permet le deuxième meilleur R_{XS} ($0,164 \text{ g}_X \cdot \text{g}_S^{-1}$). Le carbohydrate induisant le rendement le plus élevé, le galactose, n'est pas un sucre dit « standard » utilisé et étudié en culture microbienne. C'est donc le glucose qui sera employé comme substrat pour la suite de cette étude.

Etant donné que le glucose apparaît comme l'une des meilleures sources de carbone pour la croissance de *Sa. algeriensis*, il ne peut pas être incriminé dans la mauvaise performance du milieu de culture dépourvu d'extrait de levure sur la croissance de *Sa algeriensis*. Des études supplémentaires ont été menées afin de déterminer quels éléments susceptibles d'être apportés par l'extrait de levure pouvaient favoriser la croissance de cette bactérie.

III - 3 - 2 Croissance sur milieu synthétique

Les molécules étant à la fois susceptibles de combler une éventuelle auxotrophie de la souche et étant potentiellement présente dans l'extrait de levure ont été répertoriées (U.S. Food and Drug Administration. 1995. Bacteriological analytical manual, 8th ed. AOAC International. Gaithersburg, USA). Ainsi les acides aminés, les bases azotées et les oligoéléments semblent être les seuls constituants. Ils ont été criblés sur milieu minimum. Les résultats sont présentés ci-après.

III - 3 - 2 - 1 Effet des acides aminés sur la croissance

Les acides aminés sont évalués par groupe. Les groupes ont été créés en fonction des propriétés physico-chimiques des acides aminés. Le groupe 1 est constitué des acides aminés aliphatiques, aromatiques et hydrophobes de faible poids moléculaire : GLY, ALA, LEU, VAL, TRP, PHE et PRO. Le groupe 2 regroupe TYR, SER, THR, CYS et MET qui sont des molécules polaires et soufrées. Le groupe 3 rassemble les acides aminés chargés : LYS, ARG, HIS, GLU, ASP, GLN et ASN. Dans les groupes 1, 2 et 3, la concentration de chaque acide aminé est de 5 mM. Cette concentration est comprise dans la gamme des concentrations d'acides aminés testées par Bouras (006). Par ailleurs, elle est équivalente à la concentration en acides aminés libres présente dans 2 g.L⁻¹ d'extrait de levure. Ceci permet la comparaison des résultats par groupe avec un témoin positif contenant 2 g.L⁻¹ d'extrait de levure. Le groupe 4 regroupe tous les acides aminés à une concentration de 1,7 mM chacun afin d'être également comparable aux groupes 1, 2 et 3.

La figure III.4 présente la production de biomasse ainsi que la consommation d'azote alpha aminé à différents temps de culture. La concentration en azote alpha aminé est le reflet de la concentration en acides aminés libres. Le groupe 2 contient seulement 25 mM d'acides aminés contre 35 mM pour les groupes 1, 3 et 4. Les résultats du groupe 2 ont été ajustés (x

1,4) afin de pouvoir être comparés à ceux des autres groupes en terme de concentration en acides aminés.

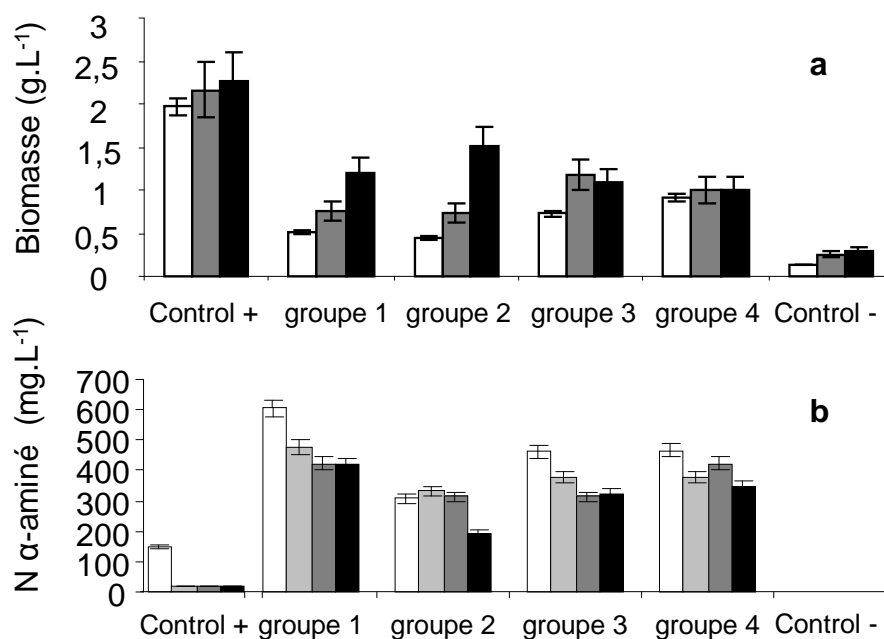


Figure III.4 : Représentation de la production de biomasse (a), la consommation azote alpha aminé (b) à différents temps : 0 h (blanc), 50 h (gris clair), 100 h (gris foncé) et 150 h (noir) en fonction des différents groupes d'acides aminés. Les groupes 1, 2, 3, and 4 sont préparés comme expliqué dans le chapitre matériel et méthode. Le témoin positif est constitué du milieu minimum MOPS supplémenté avec 2 g.L⁻¹ d'extrait de levure. Le témoin négatif contient seulement du milieu minimum MOPS. Culture en fiole de *Sa. algeriensis*, 30°C, 250 rpm.

D'un point de vue quantitatif, le groupe 2 permet la meilleure production de biomasse (1,51 g.L⁻¹ après 150 h), suivi par les groupes 1 (1,18 g.L⁻¹ après 100 h) et 3 (1,08 g.L⁻¹ après 150 h).

Par contre, ce sont les acides aminés appartenant au groupe 3 qui permettent le développement le plus précoce du microorganisme. Après 50h de culture, le groupe 3 permet une croissance de 45% supérieure par rapport au groupe 1 et supérieure d'un facteur 1,7 par rapport au groupe 2. Mais contrairement aux autres groupes, la production de biomasse à partir du groupe 3 demeure constante après 100 h de culture (1,18 g.L⁻¹). Les acides aminés utilisés tous ensemble (groupe 4) permettent une production plus précoce que l'ensemble des autres groupes. 0,94 g.L⁻¹ de biomasse sont produits dès 50 h contre seulement 0,51 g.L⁻¹ pour

le groupe 1, 0,43 g.L⁻¹ pour le groupe 2 et 0,73 g.L⁻¹ pour le groupe 3. L'ensemble des acides aminés a un effet positif synergique sur l'initiation de la croissance mais celle-ci semble se stopper rapidement peut être à cause de l'épuisement rapide d'un des acides aminés.

L'observation de l'évolution de l'azote alpha aminé montre qu'il y a une consommation des acides aminés en milieu synthétique. Elle est de 184 mg.L⁻¹ pour le groupe 1, 113 mg.L⁻¹ pour le groupe 2, 139 mg.L⁻¹ pour le groupe 3 et 118 mg.L⁻¹ pour le groupe 4. Ils pourraient soit être incorporés directement dans la synthèse au cours de la synthèse protéique soit être désaminés et utilisés en tant que source de carbone dans le cycle de Krebs (Voelker et Altaba, 2001). Par contre, l'azote alpha aminé n'est pas totalement épuisé au cours de la culture, les acides aminés ne sont pas, dans leur ensemble, un facteur limitant. Il est cependant possible que certains acides aminés spécifiques soient limitants pour la croissance. Ces acides aminés seraient consommés à des vitesses différentes, ce qui aurait pour conséquence l'épuisement d'un des acides aminés alors que la métabolisation des autres continuerait.

L'évolution de l'azote alpha aminé dans le témoin positif indique que les acides aminés provenant de l'extrait de levure sont consommés au cours des 50 premières heures de culture. En effet, 132 mg.L⁻¹ d'azote alpha aminé sont consommés en moins de 50 h. Ces résultats confirment qu'en milieu semi synthétique, une partie de la croissance du microorganisme s'effectue sur les acides aminés provenant de l'extrait de levure. Les acides aminés des groupes 1 et 3 sont rapidement consommés alors que les acides aminés du groupe 2 sont utilisés plus tardivement après 100 h de culture. Les acides aminés soufrés et polaires seraient plus difficilement assimilés que les acides hydrophobes et chargés. Le groupe 3 pourrait contenir un ou plusieurs acides aminés importants pour la croissance bactérienne car les résultats de la culture effectuée avec ce groupe d'acides aminés montrent que, lorsque leur consommation s'arrête, la concentration en biomasse elle aussi n'évolue plus. A l'inverse, la consommation des acides aminés du groupe 1 stagne alors que la croissance continue.

Les résultats de ces différentes cultures ne permettent pas de déterminer une auxotrophie particulière pour un acide aminé car testés ensemble (groupe 4), ils ne permettent pas une croissance similaire au témoin positif. Il y a deux fois plus de biomasse produite dans le milieu témoin positif que dans le milieu contenant le groupe 4. Par contre, les acides aminés utilisés en milieu synthétique ont quand même un effet positif sur la production de biomasse chez *Sa. algeriensis*, puisque, en moyenne, ils permettent une croissance 4 fois plus importante que le milieu témoin négatif dépourvu d'extrait de levure.

III - 3 - 2 - 2 Effet des bases azotées sur la croissance

La figure III.5 présente les performances des 5 bases azotées (adénine, guanine, thymine, uracile et cytosine) sur la production de biomasse maximale à différents temps de culture (à 100, 150 et 200h de culture). Afin de pouvoir comparer les cultures effectuées sur bases azotées avec celles effectuées sur acides aminés, les bases azotées ont dans un premier temps été évaluées séparément à une concentration de 5 mM. Les résultats de ces cultures étant peu probants, une concentration supérieure a été testée (20 mM). Par ailleurs, elles ont été jaugées ensemble à une concentration de 5 mM chacune.

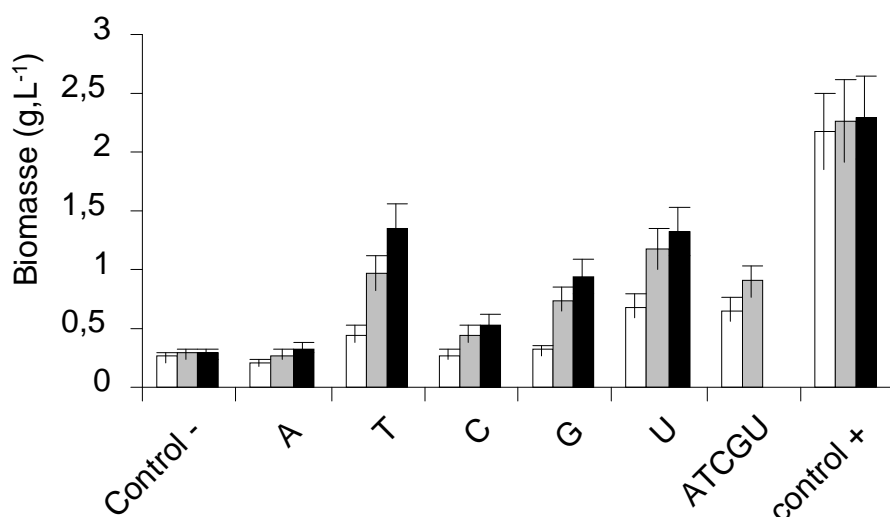


Figure III.5 : Production de biomasse à différents temps : 100 h (blanc), 150 h (gris), et 200 h (noir) de culture, en fonction des bases azotées. Les bases azotées sont testées seules à 20 mM : adénine (A), thymine (T), cytosine (C), guanine (G), et uracile (U) ou ensemble (ATCGU). Le témoin positif contient du milieu minimum MOPS + 2 g.L⁻¹ d'extrait de levure, le témoin négatif ne contient pas d'extrait de levure. Culture en fiole de *Sa. algeriensis*, 30°C, 250 rpm, pH initial 7.

Pour toutes les conditions de culture, la croissance est maximale après 200 h de culture. La concentration en biomasse maximale est de 0,28 g.L⁻¹, dans le milieu ne contenant pas d'extrait de levure et de 0,33 g.L⁻¹, 1,35 g.L⁻¹, 0,53 g.L⁻¹, 0,95 g.L⁻¹, 1,33 g.L⁻¹ et 0,91 g.L⁻¹, dans les milieux synthétiques contenant de l'adénine, la thymine, la cytosine, la guanine,

l'uracile et le mélange des 4 bases respectivement. Elle est de 2,3 g.L⁻¹ dans le milieu semi-synthétique.

L'uracile et la thymine, utilisées seules, permettent une production de biomasse 4 fois supérieure à celle du témoin négatif. Ces valeurs sont encourageantes mais elles sont inférieures de 40 % à la quantité de biomasse produite par le témoin positif : 2,17 ; 2,27 et 2,3 g.L⁻¹ après 100 h, 150 h et 200 h respectivement. La croissance sur uracile débute plus rapidement que celle sur thymine. La guanine et la cytosine induisent une croissance maximale supérieure d'un facteur 3,4 pour la guanine, et d'un facteur 1,8 pour la cytosine, par rapport au témoin négatif avec des concentrations de 0,25 ; 0,32 et 0,28 g.L⁻¹ en 100 h et 0,75 ; 0,46 et 0,29 g.L⁻¹ en 150h et 0,95 ; 0,53 et 0,28 g.L⁻¹ en 200h respectivement. Les valeurs de production de biomasse sur adénine et sur milieu minimum sont voisines quelle que soit la durée de la culture. L'adénine n'a pas d'effet sur la production de biomasse.

Bien que les bases azotées aient un impact positif sur la croissance microbienne, elles induisent une croissance plus tardive que le témoin positif. En effet, dans le témoin positif, la croissance se déroule avant 100h, puis jusqu'à 200h, il n'y a quasiment plus d'évolution de la biomasse (+10%) alors que pour l'uracile et la thymine la croissance s'effectue entre 100 et 200h. Par contre, les bases utilisées ensemble à 5 mM chacune ne semblent pas avoir d'effet positif sur la production de biomasse mais elles induisent une croissance plus précoce. 0,69 et 0,9 g.L⁻¹ de biomasse ont été produits respectivement en 100 et 150h par cette culture.

L'effet positif de bases azotées comme l'uracile sur la croissance microbienne a déjà été décrit dans la littérature, (Hendry, 1983). Il n'est pas surprenant que l'uracile et la thymine donnent des résultats similaires, l'uracile est la base azotée qui remplace la thymine au cours de la synthèse de l'ARN. Leur structure est similaire, la thymine possède un groupement méthyle supplémentaire en position 5.

III - 3 - 2 - 3 Effet des oligoéléments sur la croissance

Les expérimentations préliminaires ayant pour but d'identifier les molécules ayant un effet positif sur la croissance n'ont pas permis de mettre en évidence une auxotrophie spécifique. L'effet des éléments chimiques sous forme de trace (oligoéléments) a été évalué. Un mélange d'éléments emprunté à la littérature (Colombié et al., 2005) a été ajouté au milieu minimum comme décrit dans le chapitre « matériel et méthodes ».

La figure III.6 présente l'évolution du poids sec après différentes durées de culture : 150 h, 260 h et 330 h en fonction des différents mélanges d'oligoéléments ajoutés.

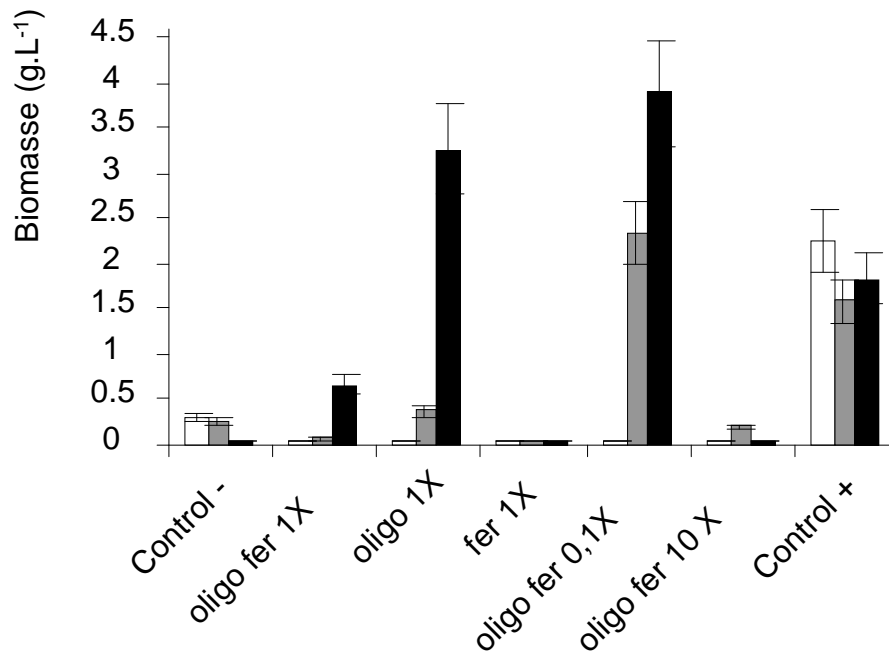


Figure III.6 : Production de biomasse à différents temps : 150 h (blanc), 260 h (gris), et 330 h (noir) de culture en fonction des mélanges d'oligoéléments. Le mélange a été testé à 3 concentrations (cf tableau II.6 dans le chapitre II): « oligo fer 1X », dix fois moins concentré « oligo fer 0,1X », and dix fois supérieur (oligo fer 10X). Le fer est testé en association avec le mélange d'oligoélément ou séparément. Le témoin positif contient du milieu minimum MOPS + 2 g.L⁻¹ d'extrait de levure, le témoin négatif ne contient pas d'extrait de levure. Culture en fiole de *Sa. algeriensis*, 30°C, 250 rpm, pH initial 7.

Les mélanges « oligo fer 1X », « oligo 1X », « fer 1X », « oligo fer 0,1X » et « oligo fer 10X » permettent une production de biomasse maximale de 0,67 ; 3,27 ; 0,04 ; 3,9 et 0,2 g.L⁻¹ respectivement. Les mélanges « oligo 1X » et « oligo fer 0,1X » induisent une croissance supérieure au témoin positif. Il est à noter qu'à 330h de culture, la biomasse diminue dans le témoin négatif ce qui peut s'expliquer par de la lyse cellulaire.

Dans tous les cas, le développement de la bactérie intervient après 150h de culture. Une telle latence s'expliquerait par la composition de chaque mélange qui contient plus de 10 oligoéléments dont certains ont un effet stimulant alors que d'autres ont un effet inhibiteur.

Ainsi, cette régulation complexe et compétitive pourrait expliquer une telle phase de latence de 150h.

L'addition de fer « fer 1 X » induit seulement une croissance faible (0,04 g.L⁻¹ de biomasse en 330h). Cet élément associé avec la mixture standard « oligo fer 1X » permet une production de biomasse 5 fois inférieure à celle observée avec cette même mixture dépourvue de fer « oligo 1X ». Dans nos conditions, il semblerait que le fer ait un effet inhibiteur sur la croissance de *Sa. algeriensis*.

Les performances en termes de production de biomasse sont inversement proportionnelles à la concentration en oligoéléments : le mélange « oligo fer 10X » permet une production de 0,2 g.L⁻¹. Le mélange « oligo fer 1X » permet une production de 0,67 g.L⁻¹. Le mélange « oligo fer 0,1X » permet une production de 3,9 g.L⁻¹. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait qu'un (ou plusieurs) des éléments chimiques du mélange standard d'oligoéléments pourrait avoir un fort effet inhibiteur sur le développement de *Sa. algeriensis*.

III - 3 - 3 Récapitulatif

Le tableau III.1 récapitule les résultats des investigations de la recherche d'un milieu synthétique pour la croissance de *Sa. algeriensis*. Les bases azotées, les acides aminés et les oligoéléments stimulent la croissance de *Sa. algeriensis* sur milieu synthétique, plus particulièrement, l'uracile et la thymine et les acides aminés non polaires. L'ajout d'oligoéléments dans une gamme de concentration très faible permet le développement de la bactérie.

Aucune auxotrophie n'a été mise en évidence. Deux hypothèses peuvent être avancées, soit la cible de l'auxotrophie n'a pas encore été identifiée, soit la souche ne présente pas d'auxotrophie et l'optimisation du milieu de culture doit se poursuivre. Par ailleurs, afin de déceler une éventuelle multi auxotrophie, l'effet combiné des acides aminés, des bases azotées et des vitamines B a été investigué mais aucun résultat probant n'a découlé de ces expérimentations. Toutefois, ces milieux proposés peuvent servir de base à d'autres études précises et quantitatives sur ce microorganisme.

Tableau III.1 : Effet des différents composés testés sur la croissance de *Sa. algeriensis*.

-- : effet très négatif ; - : effet négatif ; = : incidence nulle ; + effet positif ; ++ effet très positif par rapport au milieu minimum. +++ : effet positif par rapport au milieu semi-synthétique.

Dioses	--	Dextrines	=	acides aminés chargés	++
Amidon	-	Adénine	=	acides aminés aliphatiques et aromatiques	++
Mannitol	-	Galactose	+	thymine	++
Glycerol	-	Cytosine	+	uracile	++
oligoéléments 10 X	-	Guanine	+	oligoélément 0,1 X	+++
Fructose	=	acides aminés polaires et soufrés	++	oligoélément 1X	+++

III - 4 Essai en réacteur

La culture en fiole a permis de cribler rapidement un grand nombre de milieux synthétiques. Cependant, ce mode de culture présente de nombreux inconvénients : possibilité d'échantillonnage réduite, non maîtrise de la concentration en oxygène dissous et absence de connaissances sur l'activité respiratoire du microorganisme. Ce manque de données rend toutes interprétations supplémentaires sur le métabolisme du microorganisme approximatives.

L'emploi de l'uracile (20 mM) en complément du glucose (15 g.L⁻¹) et des sels donne des résultats satisfaisants en termes de croissance en culture en erlenmeyer (chapitre III-3-2-2). L'étude qualitative et quantitative précise du microorganisme nécessitant un environnement contrôlé, ce milieu synthétique a donc été testé en réacteur.

La figure III.7 présente la production de biomasse en réacteur batch sur différents milieux de culture, notamment le milieu synthétique développé en fiole.

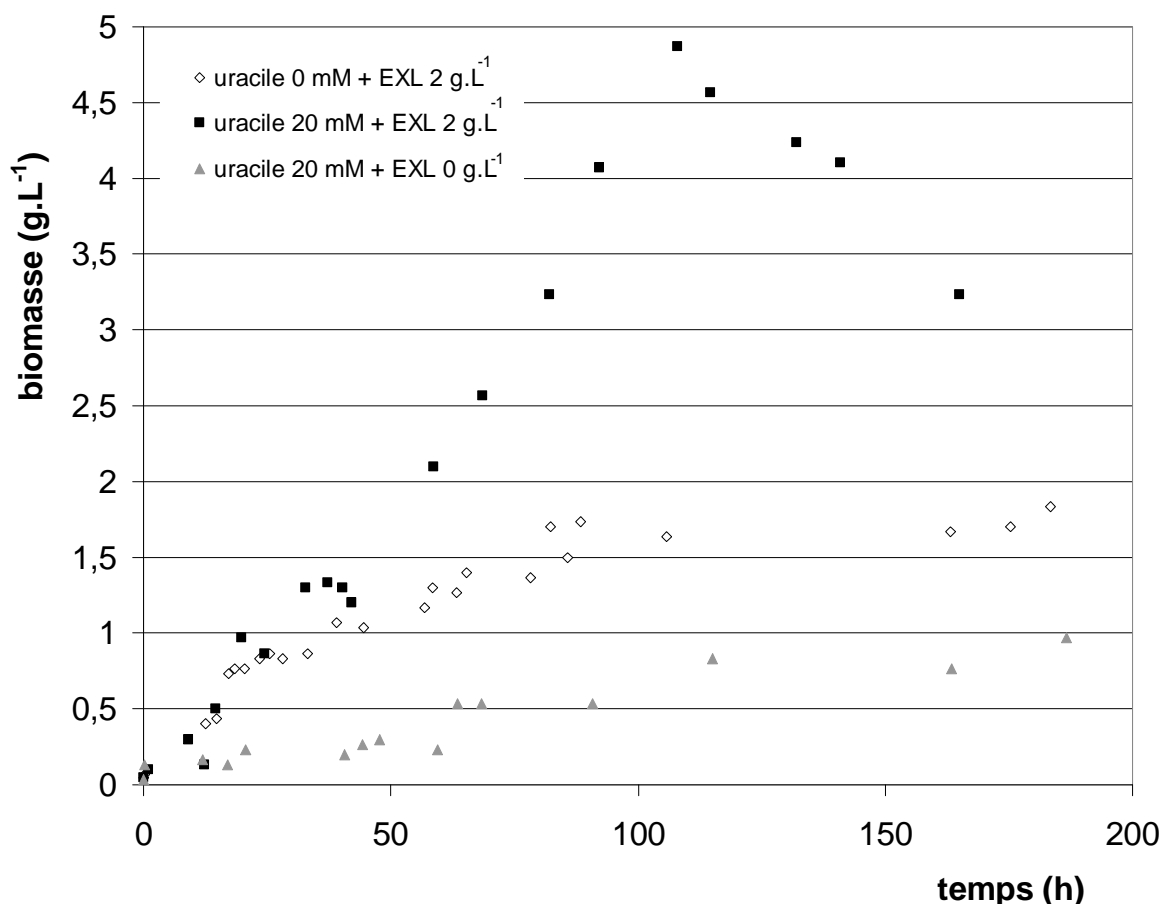


Figure III.7 : Evolution de la production de biomasse sur différents milieux : milieu synthétique (EXL 0 g.L⁻¹ et uracile 20 mM) triangles gris ; milieu semi-synthétique (EXL 2 g.L⁻¹ et uracile 0 mM) losanges blancs et milieu semi-synthétique standard (EXL 2 g.L⁻¹ et uracile 20 mM) carrés noirs. *Sa. algeriensis*, culture en réacteur batch, 30°C, pH 7, 0,5 vvm et 150 rpm.

Après 90h de culture, le milieu synthétique permet la production de 0,55 g.L⁻¹ de biomasse alors que les milieux semi-synthétiques induisent des productions de biomasse de 1,8 g.L⁻¹ (sans uracile) et 4,1 g.L⁻¹ (avec uracile 20 mM). La production de biomasse est trois fois moindre sur milieu synthétique (EXL 0 g.L⁻¹ et uracile 20 mM) par rapport au milieu semi-synthétique (EXL 2 g.L⁻¹ et uracile 0 mM).

Sur le milieu synthétique (EXL 0 g.L⁻¹ et uracile 20 mM), la croissance n'est pas suffisante pour accentuer les phénomènes macroscopiques de consommation et de production. Or, il est important de les accentuer afin que les valeurs expérimentales se situent en dehors des barres d'erreur de mesure et d'éviter ainsi tout problème d'interprétation des données. Un des objectifs de cette étude étant de mener des études quantitatives sur le développement de

Sa. algeriensis en culture liquide, l'utilisation de l'extrait de levure dans le milieu de culture est conservée.

Dans l'état actuel des connaissances sur la bactérie, l'emploi de l'extrait de levure s'avère donc indispensable pour la culture du microorganisme. L'utilisation de l'uracile a également été maintenue car elle présente une action très positive sur la croissance. En effet, la présence d'uracile dans le milieu de culture semi-synthétique (EXL 2 g.L⁻¹) multiplie par un facteur 2,2 la production de biomasse après 90h de culture (figure III.7).

Le milieu employé pour la suite de l'étude contient du glucose (15 g.L⁻¹), de l'EXL (2 g.L⁻¹), de l'uracile (20 mM) et des sels.

Chapitre IV

Analyse qualitative du comportement *Saccharothrix algeriensis*

IV - Analyse qualitative du comportement *Saccharothrix algeriensis* sur milieu semi-synthétique standard.

En vue d'établir un schéma réactionnel général du développement de *Sa. algeriensis* en culture liquide, sa croissance et la production de thiolutine sont décrites puis interprétées dans ce chapitre. Plusieurs expériences ont aussi été menées dans différentes conditions, notamment de limitations nutritionnelles.

IV - 1 Description de la croissance de *Saccharothrix algeriensis* et de la production de thiolutine sur milieu semi-synthétique standard.

Le milieu semi-synthétique standard utilisé au cours de cette étude contient entre autre du glucose (15 g.L^{-1}), de l'uracile (20 mM) de l'extrait de levure (2 g.L^{-1}) et des sels. Au travers d'une expérience menée à 30°C et à pH régulé à 7 en réacteur batch, le développement de *Sa. algeriensis* sur milieu semi-synthétique standard est décrit dans ce paragraphe.

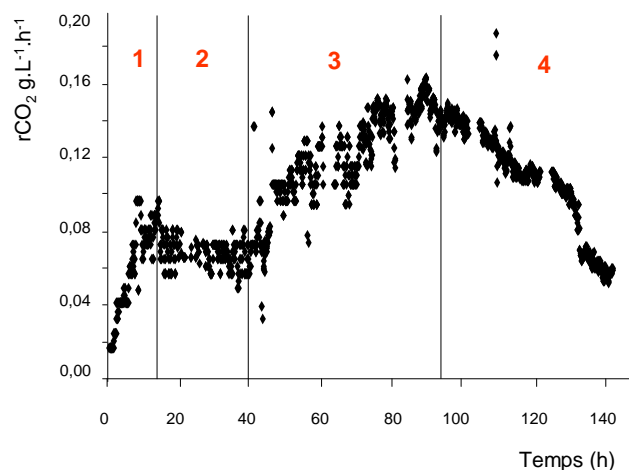


Figure IV.1 : Evolution de la vitesse de production de dioxyde de carbone au cours du temps sur milieu semi-synthétique standard (EXL 2 g.L^{-1} et uracile 20 mM). *Sa. algeriensis*, culture en réacteur batch, 30°C , pH 7, 0,5 vvm and 150 rpm.

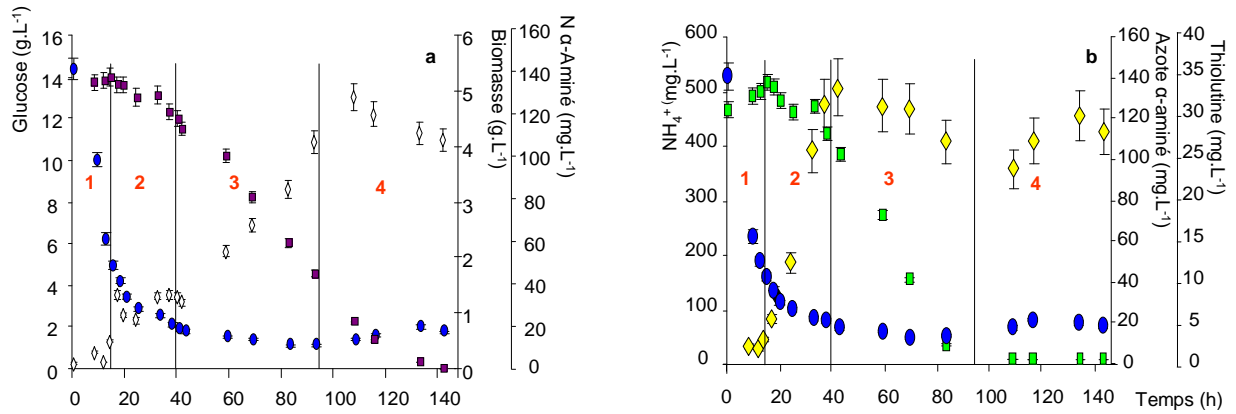


Figure IV.2 : Culture batch de *Sa. algeriensis* sur milieu semi-synthétique standard, 30°C, pH 7, 0.5 vvm and 150 rpm. **a)** Biomasse en g.L⁻¹ (losanges blancs), azote α-aminé en mg.L⁻¹ (ronds bleus) et glucose en g.L⁻¹ (carrés violets). **b)** Thiolutine en mg.L⁻¹ (losanges jaunes), azote α-aminé en mg.L⁻¹ (ronds bleus) et ions ammonium en mg.L⁻¹ (carrés verts).

La figure IV.1 présente la croissance de *Sa algeriensis* ainsi que la production de thiolutine sur le milieu semi-synthétique standard. L'observation des cinétiques de production de la biomasse et de la thiolutine ainsi que celles de la consommation des substrats suggère que, dans ces conditions, la croissance peut être divisée en quatre phases. La première phase (1) est une période de croissance d'une durée de 20h. La seconde phase (2) est une pause ou un fort ralentissement dans la croissance d'une durée d'environ 20h. Elle est suivie d'une seconde phase de croissance d'une durée de 60h (3). La dernière phase (4) correspond à une diminution de la concentration en biomasse.

La mesure du dioxyde est continue. Elle est préférée aux valeurs des constituants (échantillonnage ponctuel : valeurs discrètes) pour définir ces différentes phases. C'est donc l'observation de la figure IV.1 permet de délimiter ces différentes phases.

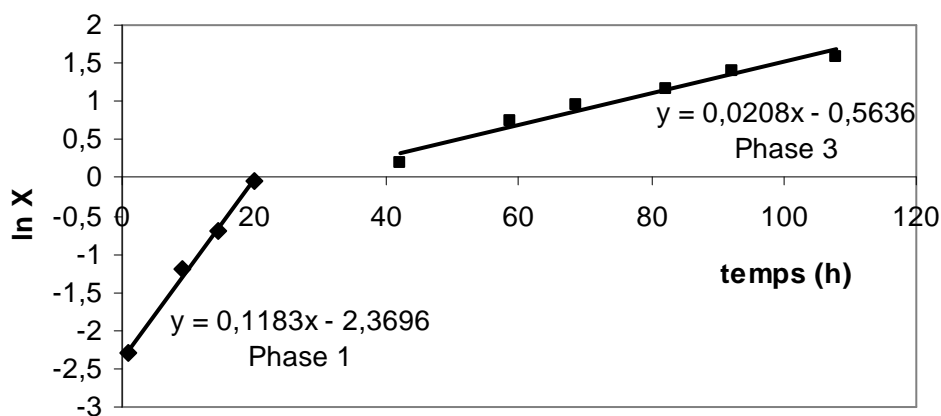


Figure IV.3 : Détermination graphique des vitesses de croissance spécifiques des phases 1 et 3. Le taux de croissance est la pente de la droite $\ln(X) = f(\text{temps})$. Culture batch de *Sa. algeriensis* sur milieu semi-synthétique standard, 30°C, pH 7, 0.5 vvm and 150 rpm.

La phase 1 est caractérisée par une augmentation de la concentration en biomasse (figure IV.2a). Il y a une production de $0,96 \text{ g.L}^{-1}$ de biomasse en moins de 20h avec une vitesse spécifique (μ_1) de $0,118 \text{ h}^{-1}$ (figure IV.3). Elle s'accompagne d'une diminution rapide de la concentration en azote alpha aminé dont la valeur passe de $141,9$ à $30,9 \text{ mg.L}^{-1}$. Parallèlement, il se produit une augmentation de $17,4 \text{ mg.L}^{-1}$ d'ions ammonium au sein du milieu de culture (figure IV.2b). Cette première phase se distingue par une augmentation de la vitesse de production du dioxyde de carbone qui atteint $0,8 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (figure IV.1). Il y a seulement une consommation de $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ de glucose au cours de cette phase. Cette petite quantité de glucose correspondrait à une utilisation en tant que source d'énergie. La mesure du glucose au moment de l'inoculation semble erronée car sa concentration augmente. Elle n'est pas prise en compte. La production de thiolutine débute en début de phase 2 après 14,5h de culture. Sa concentration augmente de 2 à 8 mg.L^{-1} (figure IV.2b).

La phase 2, d'une durée d'environ 25h, est caractérisée par un fort ralentissement de la croissance. La concentration en biomasse augmente de $0,34 \text{ g.L}^{-1}$. Le taux de croissance est divisé par 8 ($\mu_2 = 0,015 \text{ h}^{-1}$). Cette phase s'accompagne d'un ralentissement de la consommation en azote alpha aminé. En effet la quantité d'azote alpha aminé consommée est divisée par 9 (figure IV.2a). La vitesse de production de dioxyde de carbone stagne alors que la consommation des ions ammonium débute ($75,4 \text{ mg.L}^{-1}$ sont consommés). La consommation du glucose quadruple. Au cours de cette phase de croissance ralentie, la

concentration en thiolutine augmente pour atteindre à 40h une concentration maximale de 33 mg.L⁻¹(figure IV.2b).

La phase **3** est une nouvelle phase de production de biomasse. La concentration en biomasse maximale de 4,9 g.L⁻¹ est atteinte au cours de cette période. Elle se distingue de la phase 1 par une durée plus longue (55h) et une vitesse spécifique de production de biomasse cinq fois inférieure ($\mu_3 = 0,021 \text{ h}^{-1}$) (figure IV.3). Les concentrations en glucose et en ions ammonium diminuent fortement de 9,9 g.L⁻¹ et de 408,2 mg.L⁻¹ respectivement. La vitesse de production du dioxyde de carbone double pour atteindre la valeur maximale de 0,16 g.L⁻¹.h⁻¹. La concentration en azote alpha aminé n'évolue quasiment plus. La variation de sa concentration est de seulement 3,5 mg.L⁻¹. La concentration en thiolutine diminue pendant la phase **3**. Elle varie de 33 mg.L⁻¹ à 23,9 mg.L⁻¹.

La quantité de glucose restante est consommée au cours de la phase **4**. La concentration en biomasse et la vitesse de production de dioxyde de carbone diminuent (-20 % et -68 % respectivement). Une reprise de la production de la thiolutine intervient au cours de cette dernière phase. En effet, en 24h, la concentration en cette molécule bio-active augmente de 23,9 à 30,2 mg.L⁻¹.

Au cours du développement du microorganisme, la variable CO₂ est corrélée aux quatre phases de croissances décrites précédemment (figure IV.1). La vitesse de production du dioxyde de carbone est un indicateur efficace pour suivre en ligne le développement de *Sa. algeriensis*. Cette variable pourrait servir, à terme, de moyen de contrôle de la culture liquide de ce microorganisme dans un procédé de production industrielle, par exemple.

La figure IV.4 présente un zoom de l'évolution du taux d'assimilation des différents acides aminés au cours des 40 premières heures de culture, c'est-à-dire pendant les phases 1 et 2 du développement du microorganisme. L'ensemble des acides aminés à l'exception de la leucine, de la lysine et de la proline sont totalement assimilés pendant les deux premières phases du développement de *Sa. algeriensis*. Les acides aminés aspartate et glutamate sont totalement assimilés en moins de 13h. L'alanine, l'asparagine, la serine, glycine, thréonine, l'histidine et la cystéine sont épuisés dès 17,3h de culture. Enfin, la valine, la méthionine, l'isoleucine, la phénylalanine puis la tyrosine et le tryptophane constitue le groupe d'acides aminés consommé plus tardivement, après 19,83h de culture. Après 42h, il reste 21% de leucine, 23% de lysine et 85% de proline. La production de thiolutine débute dès 15h de culture.

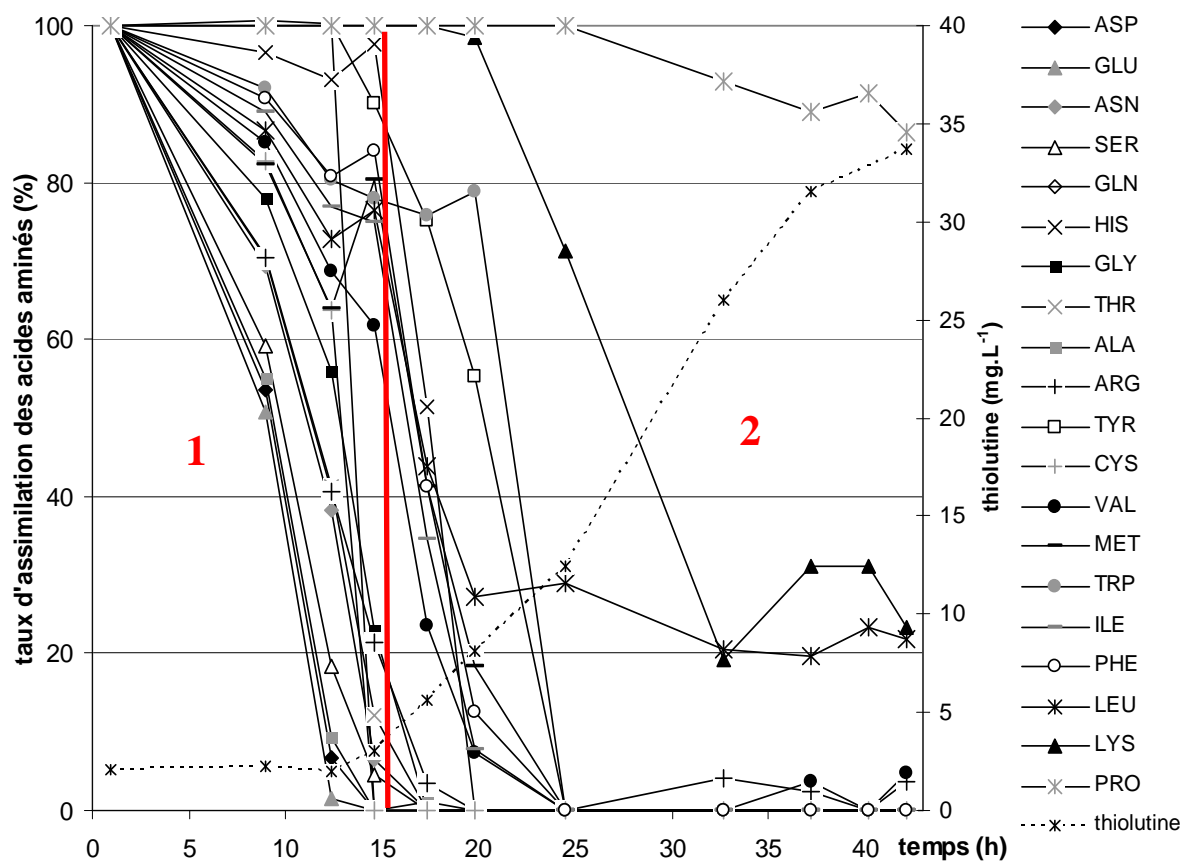


Figure IV.4 : Evolution des taux d'assimilation de chaque acide aminé libre sur milieu semi-synthétique standard (EXL 2 g.L⁻¹ et uracile 20 mM) au cours des phases 1 et 2. La concentration en thiolutine (mg.L⁻¹) est représentée en parallèle. *Sa. algeriensis*, culture en réacteur batch, 30°C, pH7, 0,5 vvm and 150 rpm.

En matière de rapidité d'assimilation les acides aminés peuvent être classés en 4 groupes :

- Groupe « assimilation » 1 : GLU, ASP.
- Groupe « assimilation » 2 : ALA, SER, ASN, THR, ARG, GLY et CYS.
- Groupe « assimilation » 3 : VAL, PHE, HIS, ILE, TRP et TYR.
- Groupe « assimilation » 4 : LYS, LEU et PRO.

L'épuisement des premiers acides aminés appartenant au groupe « assimilation » 1 coïncide avec la transition entre la phase 1 et la phase 2. Cette première carence provoquerait un ralentissement du métabolisme microbien qui se traduirait par une diminution de la vitesse de production de CO₂ et de la vitesse de consommation d'azote alpha aminé (figures IV.1 et IV.2a). La première phase s'effectuerait sur les acides aminés du groupe « assimilation » 1 et sur une grande partie du groupe « assimilation » 2.

Ces groupes « assimilation » ne sont pas les mêmes que les groupes formés selon les propriétés physico-chimiques des acides aminés lors de la recherche d'un milieu synthétique. Ces résultats ne sont donc pas comparables avec les résultats présentés dans le chapitre III.

IV - 2 Interprétations

Pendant la phase 1, la concentration en azote alpha aminé diminue de 111 mg.L⁻¹. Alors que la concentration en ion ammonium augmente de 17,4 mg.L⁻¹. Cette chute correspondrait à une consommation rapide des acides aminés libres apportés par l'extrait de levure. Les acides aminés (ou seulement certains acides aminés) consommés seraient préférentiellement désaminés puis incorporés directement dans la synthèse protéique plutôt que d'être intégrés au cycle de Krebs et être utilisés en tant que source de carbone (Voelker et Altaba, 2001). Leur désamination impliquerait un relargage des ions ammonium dans le milieu de culture (figure IV.2b). D'un point de vue quantitatif, d'après la formule chimique moyenne des acides aminés, la quantité d'ions ammonium relarguée dans le milieu extérieur pourrait correspondre à la quantité d'ammonium issue de la désamination des acides aminés consommés. Ceci corrobore l'hypothèse sur le devenir des acides aminés, citée précédemment.

L'analyse de la figure IV.4 confirme qu'au cours de la première phase de croissance, la bactérie croît sur les acides aminés libres. Seuls 3 acides aminés (leucine, lysine et proline) ne sont pas épuisés au cours de la phase 2. Elle montre que la bactérie semble présenter une préférence pour certains acides aminés. Les acides aminés chargés: glutamate et aspartate, sont consommés les premiers, puis les acides aminés, alanine, glycine, sérine, thréonine, cystéine et asparagine. Certains acides aminés sont polaires et d'autres hydrophobes. La figure IV.5 est le classement des acides aminés par ensemble et sous ensemble en fonction de leurs propriétés de structure. En fait, leur point commun est que ces acides aminés sont à l'exception de l'aspartate de faible poids moléculaire (cf figure IV.5). Par contre, la bactérie semble présenter plus de difficultés à assimiler les acides aminés à structures aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) et aliphatiques (valine et isoleucine), qui sont de nature particulièrement hydrophobes.

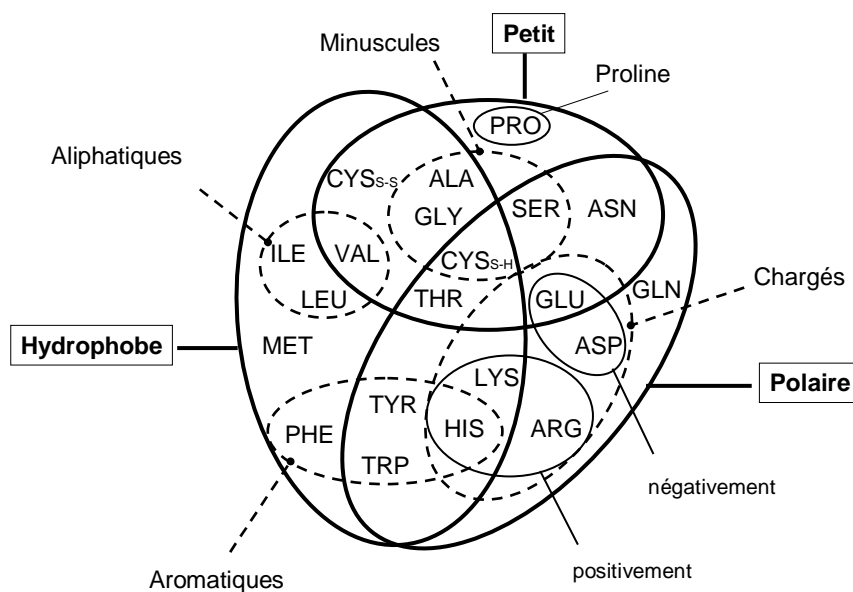


Figure IV.5 : Diagramme de Venn du classement des acides aminés par propriétés de structures.

Sur milieu semi-synthétique standard, les différents substrats sont consommés de manière séquentielle. Dans un premier temps, la bactérie croît à partir des acides aminés libres amenés par l'extrait de levure (figure IV.4). Une fois la majorité des acides aminés épuisés, la bactérie se multiplie plus lentement. En effet, la concentration en biomasse évolue peu pendant la phase 2. Cette période s'apparenterait à une période de diauxie (Lee et al., 1974 ; Narang et Pilyuing 2006). Il s'agirait d'un temps d'adaptation du microorganisme à un nouveau substrat, le glucose, suite à l'épuisement des acides aminés. La bactérie doit changer son équipement enzymatique afin de pouvoir utiliser le substrat restant (induction de nouvelles enzymes et du système de transport adéquat).

Dans notre étude, le glucose, bien que peu consommé pendant la phase 1, s'est avéré être indispensable au développement du microorganisme. Il est certainement utilisé en faible quantité en tant que source d'énergie. Dans ce cas, le glucose qui est un substrat énergétique pendant la phase 1, devient en plus un substrat carboné au cours de la phase 2. Donc, la bactérie aurait besoin d'un laps de temps nécessaire à l'augmentation de ses capacités cataboliques, en terme de flux métabolique du glucose. La production de dioxyde de carbone qui intervient pendant cette période traduit une certaine activité métabolique. La bactérie maintient son activité métabolique au ralenti en attendant de pouvoir utiliser le glucose en quantité supérieure. Puis dès que toutes les structures nécessaires à une utilisation plus

importante du glucose (transporteurs spécifiques et enzymes de dégradation) sont en place, la bactérie redémarre sa croissance sur ce nouveau substrat. D'autres actinomycètes présentent une croissance diauxique sur milieu contenant plusieurs substrats ce qui tend à confirmer ces observations (Novotna et al., 2003). Chez *Streptomyces coelicolor* cultivé sur milieu synthétique contenant un mélange de glutamate et de maltose, la période de diauxie est d'une durée de 10h.

Au cours de la première phase de croissance (phase 1), les acides aminés auraient un double rôle, à la fois de source de carbone et à la fois de source d'ammonium, alors qu'au cours de la deuxième période de production de biomasse (phase 3), les sources de carbone et d'azote sont différentes. Le glucose est source de carbone alors que l'ammonium remplit le rôle de source d'azote. Une étude menée par Novotna (2003) sur *S. coelicolor* en milieu synthétique contenant un acide aminé et un sucre confirme ces résultats. La production de biomasse semble stoppée par l'épuisement des ions ammonium. La diminution de la concentration en biomasse qui suit cet arrêt s'expliquerait par une lyse cellulaire partielle (phase 4). Elle interviendrait après qu'un des substrats ait été épuisé sans que la bactérie ait à sa disposition un substrat alternatif.

L'analyse de l'évolution de la production de thiolutine présentée en parallèle de l'assimilation des acides aminés présentée figure IV.4 indique que la production de thiolutine débute après 15 heures de culture, lorsque les premiers acides aminés (glutamate et aspartate) deviennent indisponibles. La quantité de thiolutine (2 mg.L^{-1}) présente initialement dans le milieu de culture provient de la préculture. L'épuisement du milieu de culture en acides aminés provoquerait un ralentissement de la croissance du microorganisme, ce qui induirait la synthèse de thiolutine. Cette hypothèse correspond à celle évoquée par Hogdson (2000). En effet, lorsque la croissance bactérienne est perturbée par une carence en acides aminés par exemple, le métabolisme secondaire pourrait être induit pour permettre au métabolisme primaire de se maintenir au ralenti en attendant que la carence en question soit comblée.

Par ailleurs, l'apparition d'un second pic de production de thiolutine à 107 h de culture correspond à l'épuisement des ions ammonium du milieu de culture (figure IV.2). Tout comme l'épuisement du milieu de culture en acides aminés, la carence en ions ammonium provoquerait un nouveau ralentissement de la croissance du microorganisme, ce qui induirait une nouvelle synthèse de thiolutine. Cette hypothèse correspond toujours à celle évoquée par Hogdson (2000). En effet, lorsque la croissance bactérienne est à nouveau perturbée par la carence en azote le métabolisme secondaire serait à nouveau induit. Cela implique que,

pendant la deuxième croissance sur glucose, le métabolisme secondaire est lui aussi maintenu en veille.

Au cours de la phase 4, la concentration en thiolutine diminue. Elle pourrait être soit dégradée ou soit transformée en un autre produit qui pourrait être un autre membre de la famille des dithiopyrrolones.

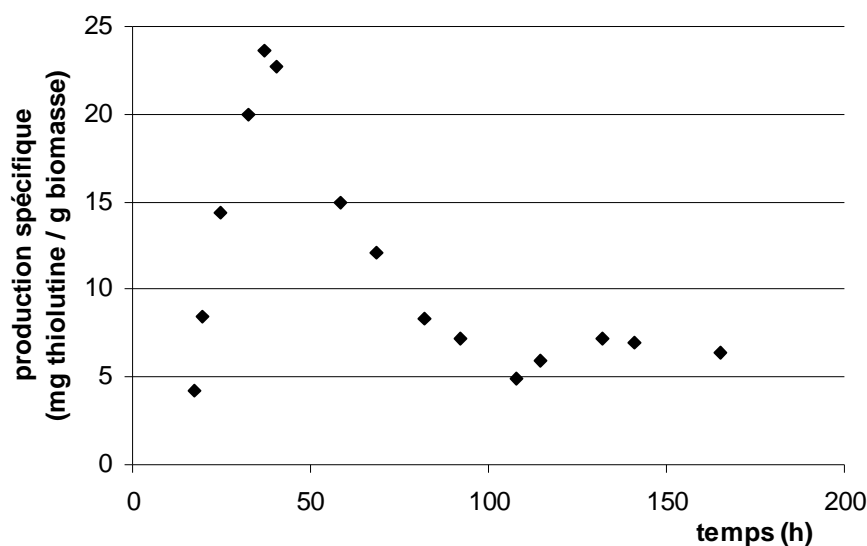


Figure IV.6 : Production spécifique de thiolutine ($\text{mg}_{\text{thiolutine}} \cdot \text{g}_X^{-1}$) sur milieu semi-synthétique. *Sa. algeriensis*, culture en réacteur batch, 30°C, pH7.

La production spécifique de thiolutine (mg de thiolutine par g de biomasse) est présentée figure IV.6. Elle est maximale ($24 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) à 42h de culture, cette période correspond à la fin de la phase de diauxie de la bactérie. Au-delà de 42h, elle chute pour atteindre une valeur de $5 \text{ mg}_{\text{thiolutine}} \cdot \text{g}_X^{-1}$ à 107h de culture puis remonte à $7 \text{ mg}_{\text{thiolutine}} \cdot \text{g}_X^{-1}$ de 107 à 180h de culture. La biomasse qui s'est développée à partir des acides aminés est au moins 3 fois plus productive que celle qui s'est développée à partir du glucose. Ce constat pourrait avoir plusieurs explications. La biomasse âgée serait moins apte à produire de la thiolutine à cause de l'agrégation des pelotes vieillissantes. L'augmentation de leur taille engendrerait différents problèmes de transfert de nutriments au cœur de la biomasse. Il n'y aurait plus assez de précurseur de cette molécule bioactive dans le milieu de culture après 107h.

Ainsi, sur ce type de milieu, si l'objectif était d'obtenir un titre maximum de thiolutine, il ne serait pas nécessaire de faire des cultures d'une durée supérieure à 50 h.

IV - 3 Etude de sensibilité

IV - 3 - 1 Sensibilité des concentrations en glucose et en extrait de levure

Sur un mélange de substrats de natures différentes, par exemple, le glucose et les acides aminés, la bactérie utilise préférentiellement les acides aminés, puis le glucose, pour son développement. Cette utilisation séquentielle des substrats est certainement le fruit d'une régulation précise du catabolisme de la bactérie. En effet, en présence de plusieurs substrats, les microorganismes mettent souvent en place des systèmes de catabolisation finement régulés afin d'optimiser leurs ressources énergétiques et nutritionnelles. Afin de vérifier si la bactérie *Sa. algeriensis* possède de tels systèmes, une série d'expérience a été conduite. L'effet de plusieurs concentrations en glucose et en extrait de levure a été évalué.

Trois concentrations en glucose (3, 5,5 et 8 g.L⁻¹) ont été testées sur milieu semi-synthétique. Les résultats de cette expérience sont présentés figures IV.7 et IV.8. L'observation de la figure IV.7 montre qu'après 30 h, la concentration en thiolutine est de 15 mg.L⁻¹ dans le milieu contenant 3 g.L⁻¹ de glucose et, 7,5 et 3 mg.L⁻¹ dans les milieux contenant respectivement 5,5 et 8 g.L⁻¹ de glucose. A ce stade de la culture, la production de dioxyde de carbone est de 1,45 ; 1,75 et 2 g.L⁻¹ dans les milieux contenant 3 ; 5,5 et 8 g.L⁻¹ de glucose. Ces résultats montrent que plus il y a du glucose dans le milieu de culture, moins la bactérie produit de la thiolutine et de dioxyde de carbone.

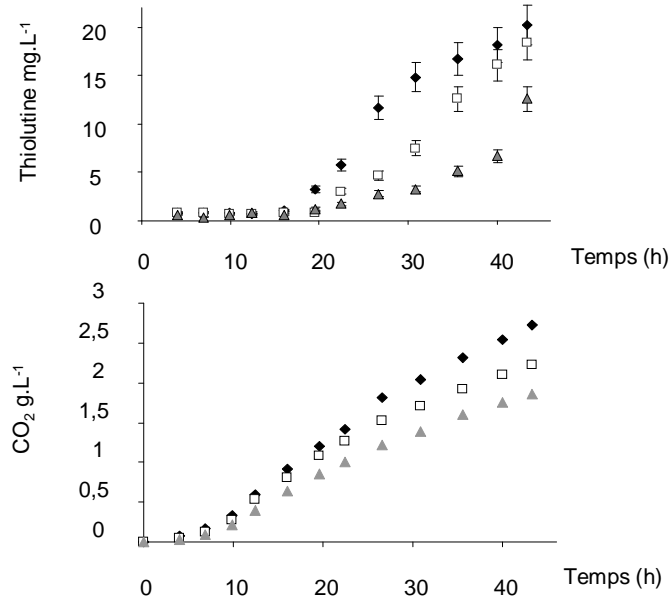


Figure IV.7 : Production de Thiolutine (mg.L^{-1}) et CO_2 (g.L^{-1}) en fonction du temps pour différentes concentrations en glucose : \blacklozenge : 3 g.L^{-1} ; \square : $5,5 \text{ g.L}^{-1}$ and \blacktriangle : 8 g.L^{-1} , sur milieu semi-synthétique (2 g.L^{-1} d'extrait de levure). *Sa. algeriensis*, culture en réacteur batch, 30°C , pH 7, 0,5 vvm and 150 rpm.

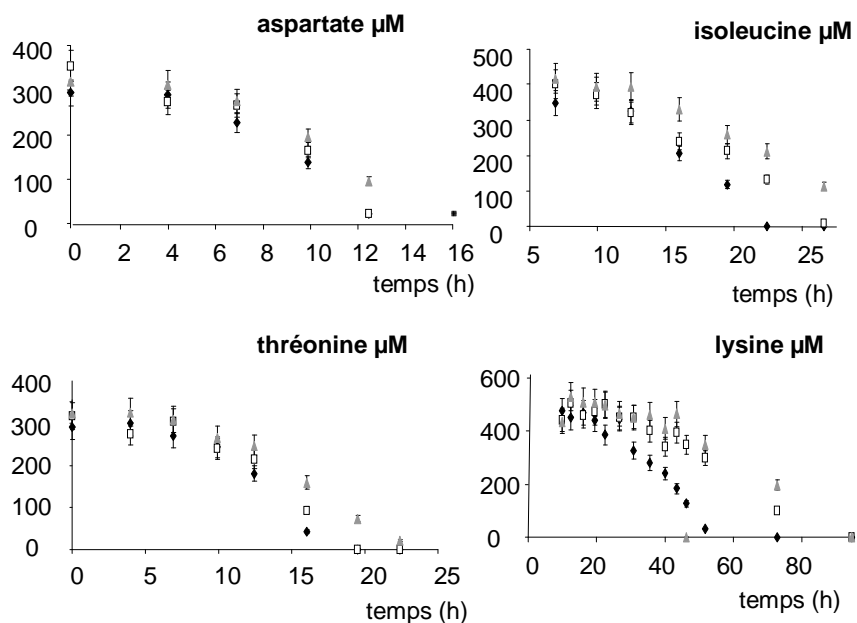


Figure IV.8 : Consommation de l'aspartate (assimilation très rapide), thréonine (assimilation rapide), isoleucine (assimilation lente) et de la lysine (assimilation très lente) en μM en fonction du temps pour différentes concentrations en glucose : \blacklozenge : 3 g.L^{-1} ; \square : $5,5 \text{ g.L}^{-1}$ and \blacktriangle : 8 g.L^{-1} , sur milieu semi-synthétique ($\text{EXL } 2 \text{ g.L}^{-1}$). *Sa. algeriensis*, culture en réacteur batch, 30°C , pH 7, 0,5 vvm and 150 rpm.

La figure IV.8 qui présente l'évolution des concentrations en aspartate, thréonine, isoleucine et lysine qui sont des acides aminés aux temps d'assimilation très différents (cf figure IV.4). L'aspartate appartient au groupe « assimilation » 1, la thréonine est un acide aminé représentant le groupe « assimilation » 2, l'isoleucine appartient au groupe « assimilation » 3 et la lysine fait partie du groupe « assimilation » 4.

Après 10h de culture, 66 %, 48 % et 39 % de l'aspartate présent initialement a été assimilé dans les milieux contenant 3 ; 5,5 et 8 g.L⁻¹ de glucose. Dans ces mêmes milieux, la thréonine est assimilée à hauteur de 86 %, 70 % et 49 % après 15h de culture. Dans ces conditions il reste 32 %, 58 % et 70 % de la concentration initiale en isoleucine dans le milieu de culture après 19h de culture. Enfin, la lysine est totalement assimilée après 72h dans le milieu contenant 3 g.L⁻¹ de glucose alors qu'il en reste 27 % et 73 % dans les milieux contenant 5,5 et 8 g.L⁻¹ de glucose respectivement.

L'analyse de ces données indique que le glucose aurait également un effet répressif sur la vitesse de consommation de ces 4 acides aminés. L'effet répressif du glucose sur le métabolisme de la bactérie serait mis en évidence par cette série d'expérience. Cependant, il demeure faible car la bactérie croît sur les acides aminés même en présence d'une très faible concentration en glucose. Il serait judicieux de tester des concentrations en glucose inférieures à 3 g.L⁻¹ mais non nulles, le glucose étant certainement une source énergétique pour le microorganisme.

La figure IV.9 représente l'évolution de la biomasse et de la thiolutine en fonction de 2 concentrations en extrait de levure. Après 41 h, la concentration en biomasse est de 1,13 g.L⁻¹ dans le milieu EXL_{4gL} et de 1,8 g.L⁻¹, soit 35% de plus, dans le milieu EXL_{6gL}. Après 160 h, la biomasse produite est de 2,5 g.L⁻¹ dans le milieu EXL_{4gL} contre 3,7 g.L⁻¹ dans le milieu EXL_{6gL}. La production de thiolutine débute dès 18,5h dans le milieu EXL_{4gL} et 2h plus tard dans le milieu EXL_{6gL}. Le titre maximal de thiolutine est observé après 50 h de culture pour le milieu EXL_{6gL} (30 mg.L⁻¹) et après 100h pour le milieu EXL_{4gL} (27 mg.L⁻¹).

L'analyse de la figure IV.9 montre que ces cultures suivent les mêmes phases de développement que la culture (EXL 2 g.L⁻¹ et uracile 20 mM) décrites précédemment. Ainsi la phase 1 dure jusqu'à 24h de culture, et la phase 2 se termine après 48h de culture. La phase 4 est matérialisée uniquement pour la culture EXL_{6gL} qui est la seule à atteindre la période de lyse cellulaire suite à l'épuisement du glucose.

La concentration en extrait de levure a un effet positif direct sur la concentration en biomasse produite au cours de la phase 1. En effet, une augmentation de 33% de la concentration en extrait de levure permet une production de biomasse supérieure de 35% pendant la phase 1. Par contre, il y a peu d'influence de la concentration en extrait de levure sur le titre maximal de thiolutine produit. L'extrait de levure aurait un effet négatif sur la production spécifique de cette molécule.

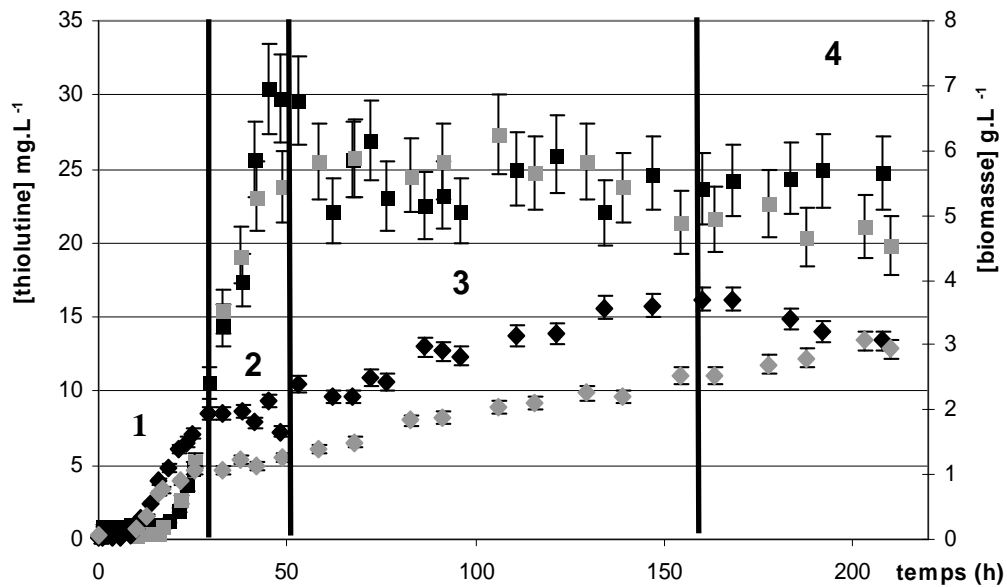


Figure IV.9 : Evolution des concentrations en biomasse (losanges) et en thiolutine (carrées) en fonction de 4 (gris) et 6 (noir) g.L^{-1} d'extrait de levure (uracile 20 mM et glucose 15 g.L^{-1}). *Sa. algeriensis*, culture en réacteur batch, 30°C, pH 7, 0,5 vvm and 150 rpm.

IV - 3 - 2 Incidence d'une limitation en glucose

La figure IV.10 présente l'évolution de la production de thiolutine au cours d'une culture menée en condition de limitation de glucose comparée à une culture en condition non limitante. L'observation de la figure IV.10a indique que le glucose est totalement épuisé après 85h de culture. Il n'y a pas d'épuisement du glucose au cours de l'expérience présentée par la figure IV.10b La cinétique de production de la thiolutine menée en condition limitante (figure IV.10a) présente deux maxima (un premier maximum après 70h et un second après 140h de culture). La culture menée en condition non limitante (figure IV.10b) ne présente qu'un seul maximum après 85h. Chaque maximum correspond à une période de production de thiolutine.

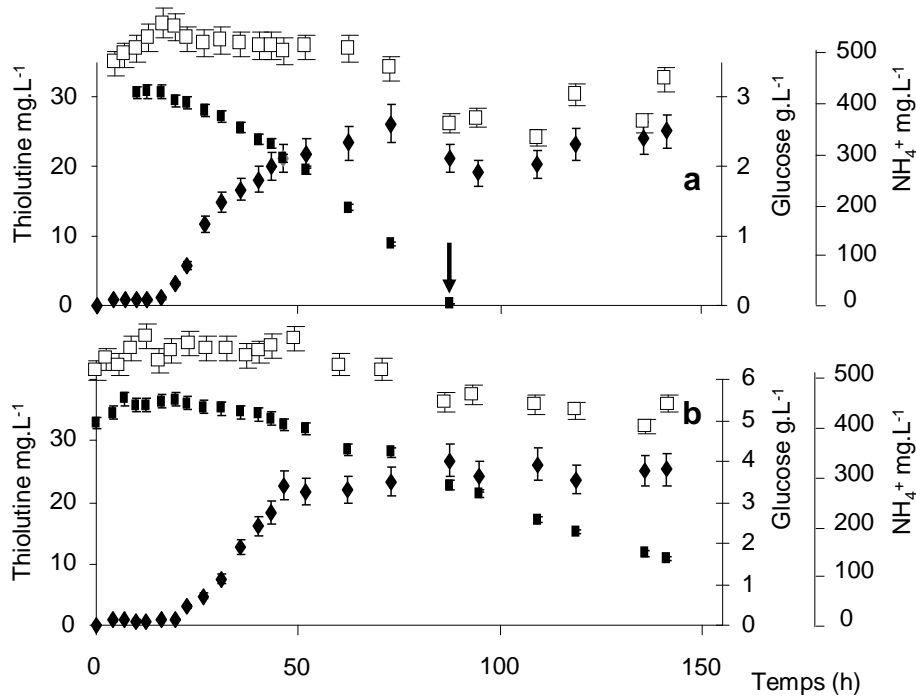


Figure IV.10: Cinétiques de production de la thiolutine en mg.L^{-1} (losanges noirs), de consommation du glucose en g.L^{-1} (carrés noirs) et de la consommation des ions ammonium en mg.L^{-1} (carrés blancs). a) le glucose est limitant, l'ammonium n'est pas limitant. b) Le glucose et l'ammonium ne sont pas des facteurs limitant.

La deuxième période de production de thiolutine coïncide avec l'épuisement du glucose par le microorganisme (flèche noire sur la figure IV.10a). La même culture ne présentant pas cette limitation nutritionnelle ne présente pas de second pic (figure IV.10b). Il semblerait que la carence en glucose induise une nouvelle période de biosynthèse de la thiolutine. Ce phénomène a été aussi observé dans des conditions de culture différentes. La culture conduite avec 6 g.L^{-1} d'extrait de levure présente une deuxième phase de production de thiolutine qui débute à partir de 160h (figure IV.9). Elle correspond aussi à une période de lyse cellulaire. Cette période de lyse cellulaire fait suite à l'épuisement du glucose du milieu de culture par la bactérie.

L'épuisement du glucose provoque un ralentissement du métabolisme primaire de la bactérie. Tout comme le ralentissement causé par l'épuisement en ion ammonium (figure IV.2), ce ralentissement dû à la limitation en glucose induirait à son tour le métabolisme secondaire et donc la production de thiolutine.

IV - 3 - 3 Impact d'un pulse de cystine

Cette étude se consacre principalement à l'étude de la production de thiolutine. Cependant, cette molécule n'est pas la seule dithiopyrrolone produite par *Sa. algeriensis*. La figure IV.11 présente les profils de production de la thiolutine ainsi que celui des autres dithiopyrrolones sur milieu semi-synthétique. Par hypothèse, les autres dithiopyrrolones absorbent la lumière à la même longueur d'onde que la thiolutine et leur spectre d'absorption est identique. Ainsi, les concentrations sont représentées en unités arbitraires. Une étude précédente menée par Bouras a montré l'effet positif de la cystine, à une concentration de 5 mM sur la production spécifique de thiolutine cependant cette étude présente peu de données cinétiques. Un pulse de cystine (5mM) est réalisé après 106 h de culture afin d'évaluer l'influence de cette acide aminé sur les cinétiques de production des dithiopyrrolones. Il est matérialisé par la flèche noire.

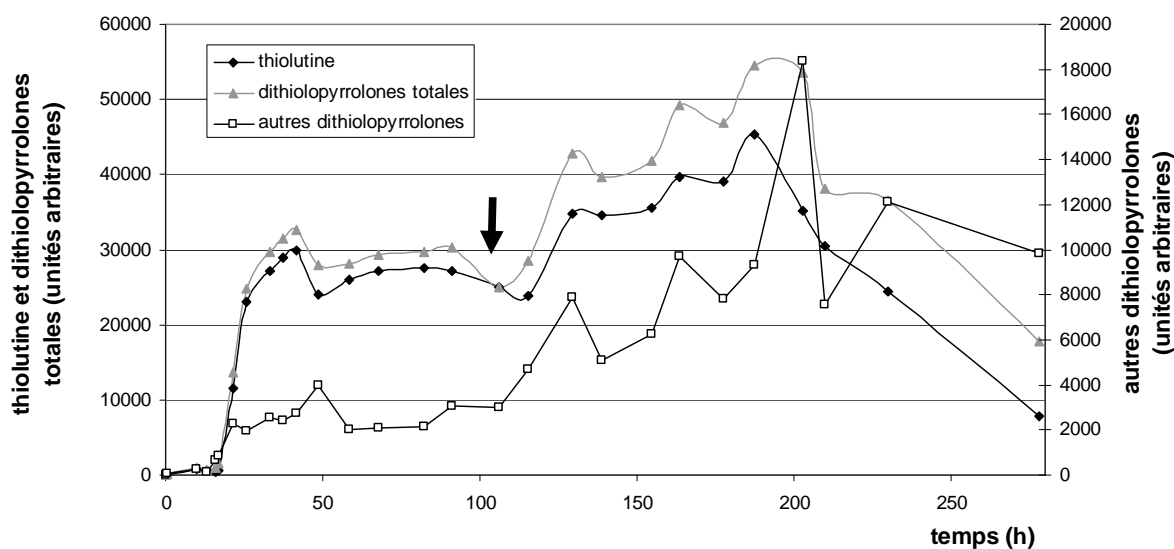


Figure IV.11: Profils de production des dithiopyrrolones sur milieu semi-synthétique. Thiolutine (losanges noirs), dithiopyrrolones totales (triangles gris) et autres dithiopyrrolones (carrés blancs) en unités arbitraires. Pulse de cystine à 5 mM (flèche noire). *Sa. algeriensis*, culture en réacteur batch, 30°C, pH 7.

En condition de culture classique (sans pulse), la production de thiolutine et celle des autres dithiopyrrolones présentent des profils de production similaire. En effet, leurs productions débutent après 18h puis leurs concentrations évoluent peu jusqu'à 100 h de culture. Cependant, la thiolutine est majoritairement produite par rapport à la somme des

autres dithiopyrrolones. Par exemple, à 41h45 de culture, il y a au moins dix fois plus de thiolutine que les autres dithiopyrrolones dans le milieu de culture.

Après 106 h de culture, un pulse de cystine, molécule favorisant la formation de thiolutine en culture en fiole est effectué. Ce pulse est volontairement effectué au cours de la croissance sur glucose, la biomasse produite est alors de 2,36 g.L⁻¹. Il semble induire une nouvelle période de production de thiolutine. Il stimule fortement la formation des autres dithiopyrrolones par rapport à la thiolutine puisqu'après 187,5h de culture, il n'y a plus que 5 fois plus de thiolutine par rapport aux autres dithiopyrrolones contre un facteur 10 en conditions standards. Après 200h, la concentration en thiolutine diminue d'un facteur 4 alors que celle des autres dithiopyrrolones diminue seulement d'un facteur 2.

En culture en réacteur, la cystine présente un effet positif sur la production de la thiolutine et plus particulièrement sur la biosynthèse des autres dithiopyrrolones. Après 200h de culture, la thiolutine est davantage dégradée que les autres dithiopyrrolones.

Il ne s'écoule que 20h entre le pulse de cystine et la reprise de la production de la thiolutine. Étant donné la vitesse d'assimilation maximale des acides aminés (environ 45 µM.h⁻¹ pour l'alanine), ce laps de temps paraît trop court pour expliquer la réactivation du métabolisme secondaire par l'épuisement de la cystine (5 mM) du milieu de culture. Dans ce cas, la cystine agirait comme une molécule inductrice de la voie de biosynthèse de la thiolutine

IV - 4 Validation

Dans le but de confirmer le développement de *Sa. algeriensis* sur les acides aminés apportés par l'extrait de levure, un pulse d'une quantité importante d'extrait de levure (10 g.L⁻¹) a été effectué sur une culture en milieu semi-synthétique (EXL 1g.L⁻¹ et uracile 0 mM).

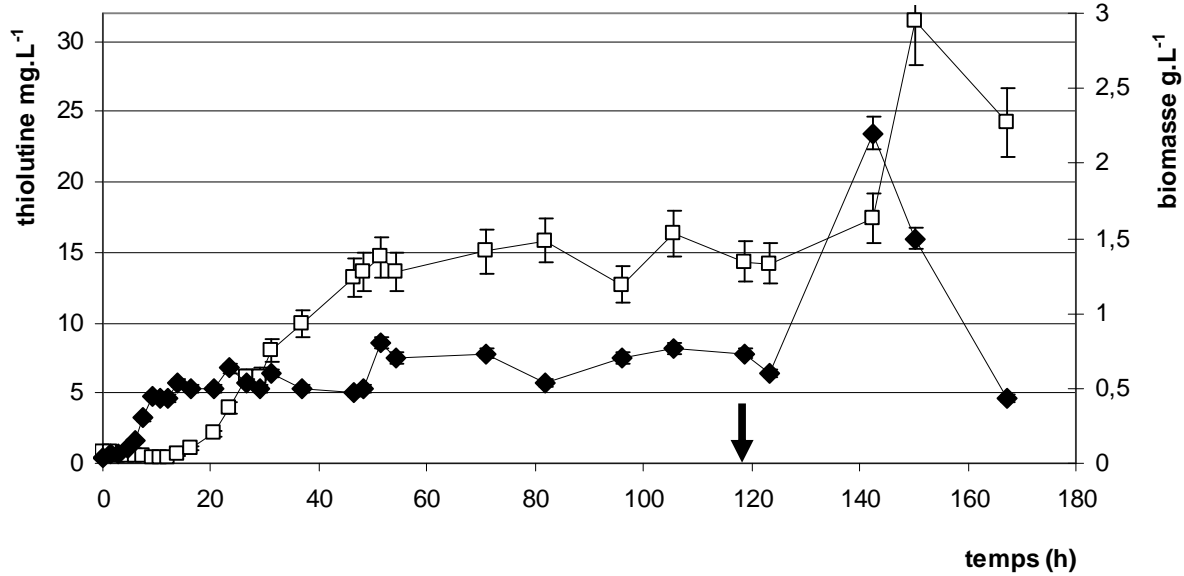


Figure IV.12: Cinétiques de production de la thiolutine en mg.L^{-1} (carrés blancs), et de la biomasse en g.L^{-1} (losanges noirs). Pulse d'EXL de 10 g.L^{-1} (flèche noire). *Sa. algeriensis*, culture en réacteur batch, 30°C , pH 7.

Les évolutions des concentrations en biomasse et en thiolutine sont présentées figure IV.12. Le pulse d'extrait de levure est matérialisé par la flèche noire. Il y a production de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de biomasse en 20 h. Suite à cette période de croissance, la concentration en biomasse évolue peu jusqu'à 118h de culture. La production de thiolutine apparaît découplée de la croissance car elle débute après la période de croissance. La concentration maximale en thiolutine (hors pulse) est atteinte après 82h de culture, elle n'évolue pas jusqu'à 118h.

Le pulse permet une production de biomasse de $2,2 \text{ g.L}^{-1}$ supplémentaire en 24h. Après 142h de culture, la concentration en biomasse diminue. Suite à cette nouvelle période de croissance, la concentration en thiolutine double pour atteindre la valeur de 31 mg.L^{-1} en 27h. La deuxième production de thiolutine provoquée par le pulse est elle aussi découplée de la croissance. Les acides aminés apportés par le pulse sont consommés puis la production de thiolutine débute. Le pulse d'extrait de levure permet la production de $0,15 \text{ g}_X \cdot \text{g}_{\text{EXL}}^{-1}$ et de $1,72 \text{ mg}_{\text{thiolutine}} \cdot \text{g}_{\text{EXL}}^{-1}$. Ces valeurs sont 2 et 3 fois moins importantes que les rendements de production de biomasse et de thiolutine observés sur le milieu contenant 6 g.L^{-1} . Plusieurs explications à ces faibles performances peuvent être avancées. A faible concentration en extrait de levure, l'absence d'uracile pourrait avoir un effet négatif sur la croissance à partir de l'extrait de levure. Il est aussi possible que les pelotes âgées soit moins aptes à se

développer que celles ayant des durées d'existence plus petites à cause des divers problèmes de transfert de nutriments en leur sein.

IV - 5 Conclusion

L'analyse de l'évolution des cinétiques des principaux substrats et produits issus du développement de *Sa. algeriensis* permet de supposer que la croissance de *Sa. algeriensis* est diauxique sur un mélange de substrats. Les acides aminés (en particulier les acides aminés chargés négativement et ceux de faible poids moléculaire) sont dans un premier temps préférés au glucose par la bactérie pour sa croissance. Au cours du développement à partir des acides aminés, le glucose semble être utilisé en faible quantité, certainement à des fins énergétiques. Puis après une période d'adaptation, appelée diauxie, qui, bien qu'il y ait peu de croissance, présente une activité métabolique résiduelle, la bactérie utilise le glucose pour sa croissance. Un faible effet répressif du glucose sur le catabolisme des acides aminés a été mis en évidence. Bien que favorisant la production de biomasse, l'extrait de levure exercerait un effet négatif sur la production spécifique de thiolutine. Par ailleurs, la production de thiolutine semble pouvoir être induite plusieurs fois, en condition de culture batch, à cause de l'utilisation séquentielle des substrats par le microorganisme. D'une manière générale, chaque ralentissement de la croissance (provoqué par une limitation nutritionnelle ou un stress divers) de *Sa. algeriensis* provoquerait la production de la thiolutine.

Chapitre V

Analyse quantitative du comportement *Saccharothrix algeriensis*

V - Analyse quantitative du comportement de *Saccharothrix algeriensis*

Les connaissances actuelles sur *Saccharothrix algeriensis* sont quasi nulles et de ce fait insuffisantes pour permettre de décrire le système de fonctionnement de la bactérie autrement qu'en tant que boîte grise. Ainsi, cette partie du travail consiste à analyser le métabolisme de *Sa. algeriensis* d'un point de vue macroscopique à partir des composés observables. Les cinétiques d'évolution extracellulaires des différents substrats et produits ont été examinées dans l'objectif de rechercher un schéma réactionnel apparent rendant compte du développement de la bactérie.

Dans un premier temps, les bilans carbone et azote ont été analysés afin de vérifier la cohérence des données expérimentales. Une étape de réconciliation des données permet ensuite de corriger les valeurs expérimentales (cf chapitre II).

Par la suite, un schéma réactionnel a été proposé sur la base des résultats du chapitre IV. Afin de déterminer l'adéquation du schéma réactionnel ainsi proposé avec les données expérimentales, une méthodologie originale développée au sein du laboratoire a été utilisée (cf chapitre II). L'identification des coefficients expérimentaux et des avancements de réaction par une procédure de minimisation sous contraintes est détaillée.

Enfin, les essais de validation du scénario proposé ainsi que les interprétations qui en découlent sont présentées

Les cultures microbiennes ont été réalisées par série (tableau V.1). Les conditions de chaque culture sont rappelées dans le tableau ci-après ainsi qu'à chaque présentation de résultats.

Tableau V.1 : Récapitulatif des expérimentations.

Nom	Série d'expérience	[EXL] g.L ⁻¹	[glucose] g.L ⁻¹	Uracile 20 mM.	Remarques
EXL2	Sans uracile	2	15	non	Expérience témoin
2U	uracile	2	15	oui	
6 EXL	EXL variable	6	15	oui	
4 EXL	EXL variable	4	15	oui	
2+2 EXL	EXL variable	2	15	oui	
3 GLU	Glucose variable	2	3	non	
5 GLU	Glucose variable	2	5,5	non	
8 GLU	Glucose variable	2	8	non	
2Ubis	Test acide benzoïque	2	15	oui	
Benzo	Test acide benzoïque	2	15	oui	
BenzoP	Test acide benzoïque	2	15	oui	
Cys	validation	2	15	oui	
4 EXL BIS	validation	4	15	oui	
0,5 EXL	validation	0,5	5	oui	

V - 1 Bilans matière

Les bilans carbone (rouge) et azote (bleu) de la culture « 3 GLU » sont présentés figure V.1. Les bilans des autres expérimentations sont présentés en annexe. Les quantités totales (tot) et théoriques maximales (max) de carbone (C) et d'azote (N) sont indiquées sur chaque figure par des segments horizontaux.

Le carbone total (C_{tot}) représente la quantité totale de carbone présente dans le milieu de culture (EXL - acides aminés compris, thiolutine, biomasse et dioxyde de carbone)

Le carbone maximal (C_{max}) représente la quantité maximale de carbone mesurée qu'on suppose théoriquement assimilable par le microorganisme dans le milieu de culture (acides aminés, thiolutine, biomasse et dioxyde de carbone)

L'azote total (N_{tot}) représente la quantité totale d'azote présente dans le milieu de culture (EXL - acides aminés compris, thiolutine, biomasse et ammonium)

L'azote maximal (N_{max}) représente la quantité maximale d'azote quantifiée qu'on estime théoriquement assimilable par le microorganisme dans le milieu de culture (acides aminés, thiolutine, biomasse et ammonium).

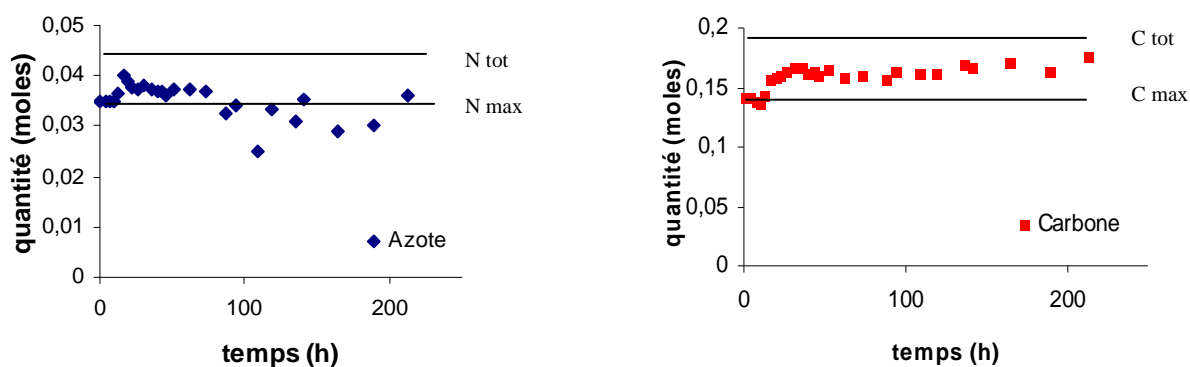


Figure V.1 : Bilan azote (bleu) et carbone (rouge) de l'expérience « 3 GLU » (3 g.L⁻¹ de glucose et 2 g.L⁻¹ d'EXL). *Sa. algeriensis*, culture en réacteur batch, 30°C, pH 7, 0,5 vvm and 150 rpm.

Les pourcentages d'erreurs relatives moyennes par rapport aux quantités maximales théoriques de carbone et d'azote sont respectivement de 12% et 7 % respectivement. Ces erreurs sur les bilans sont acceptables et indiquent que dans leur globalité, sur la durée totale de l'expérience, les valeurs expérimentales sont cohérentes. Cependant, l'analyse détaillée du bilan carbone indique que la quantité de carbone mesurée n'est pas constante au cours du temps. L'observation détaillée du bilan indique qu'il y a une dérive positive du bilan carbone. En effet la valeur du bilan augmente de 13 % au cours des 50 premières heures (dérive). Etant donnée la loi de conservation de la matière, le carbone ne peut pas apparaître (ni disparaître) dans un milieu fermé. Ce déficit a pour explication la non prise en compte d'un substrat présent dans le milieu de culture et consommé par la bactérie, appelé « substrat inconnu ».

L'analyse du bilan azote indique qu'il n'y a pas de dérive du bilan azote. La quantité d'azote est répartie uniformément autour de N_{\max} . Le substrat inconnu ne contiendrait pas ou peu d'azote.

Le tableau V.2 récapitule les pourcentages d'erreur moyenne par rapport aux quantités maximales théoriques de carbone et d'azote. L'erreur moyenne est inférieure à 12 % pour le bilan carbone et inférieure à 13 % pour le bilan azote. Ces valeurs indiquent que les mesures expérimentales des différentes expériences sont entachées d'une erreur de mesure acceptable.

Tableau V.2 : Erreur moyenne relative par rapport aux quantités maximales de carbone et d'azote. Pourcentage de la dérive du bilan carbone au cours des 50 premières heures (= écart entre la quantité de carbone entre 0 et 50h en pourcentage de carbone mesuré à 50h).

Nom	% erreur C	% erreur N	% Dérive 50 h
EXL2	2	12	3
2U	2	8	2
6 EXL	10	10	13
4 EXL	11	13	10
2+2 EXL	2	10	4
3 GLU	12	7	13
5 GLU	7	5	12
8 GLU	8	6	11
2Ubis	8	8	5
Benzo	5	4	6
BenzoP	4	12	3

Pour l'ensemble des expériences, l'analyse des bilans carbone indique que la quantité de carbone mesurée n'est pas constante au cours du temps. Toutes les expériences présentent aussi une dérive systématique du bilan carbone entre 0 et 50h plus ou moins importante (tableau V.2).

Pour les expériences contenant les mêmes concentrations en glucose et en extrait de levure (EXL2, 2U, 2UBIS, Benzo et BenzoP), le pourcentage moyen de la dérive est de 4 %. Pour les expériences contenant une concentration en extrait de levure variable (4 EXL et 6 EXL), la dérive est proportionnelle à la quantité d'EXL initiale. Cette dérive ramenée à 2 g.L⁻¹ d'extrait de levure équivaut aussi à 4 %. La quantité de carbone manquant équivaut à 27% de la quantité de carbone amené par l'extrait de levure. Le substrat non pris en compte pourrait provenir de l'extrait de levure. L'EXL entrant dans la composition du milieu de culture est une source entre autres d'acides aminés, de peptides de différents poids moléculaires et de carbohydrates. Ces différents substrats peuvent être potentiellement catabolisés par la bactérie. En plus des acides aminés libres, il est possible que certains peptides de faible poids moléculaire (dipeptides, tripeptides ...) ou d'autres carbohydrates soient consommés par le microorganisme au cours de la première phase de croissance (phase 1).

L'état des connaissances actuelles ne permet pas de trancher quant à ce substrat inconnu supplémentaire. L'analyse des bilans azote des autres expérimentations ne montre pas de variation systématique de celui-ci. Ainsi, l'analyse de tous les bilans carbone et azote

confirme le fait que le substrat inconnu ne contiendrait pas ou peu d'azote. Il demeure non identifié et sa formule chimique reste inconnue. Par hypothèse, il est assimilé à un carbohydrate apparenté au glucose.

Par ailleurs, le fait que les valeurs des bilans soient comprises entre les valeurs totales et les valeurs théoriques maximales confirme le fait que le substrat inconnu proviendrait de l'extrait de levure.

V - 2 Définition d'un pseudo constituant

Les conclusions du chapitre IV témoignent d'une consommation des acides aminés par la bactérie. Ainsi, en tant que substrats, ils peuvent être intégrés dans le schéma réactionnel de plusieurs manières : individuellement ; par petits groupes ou tous ensemble sous forme d'un seul constituant qui sera appelé pseudo-constituant. Le chapitre IV montre aussi que les acides aminés sont assimilés par le microorganisme à des vitesses relativement voisines. Ainsi, en guise de point de départ de notre travail, un pseudo-constituant « AA » rassemblant tous les acides aminés présents a été déterminé.

Si le schéma réactionnel incluant ce pseudo-constituant ne permet pas une représentation satisfaisante de l'évolution de la biomasse, il sera judicieux d'envisager d'inclure dans notre schéma réactionnel plusieurs pseudo-constituants (« AA₁ », « AA₂ » ...) dont les formules seront établies par groupes d'acides aminés. Ces groupes seront définis par rapport aux vitesses d'assimilation des acides aminés.

Le tableau V.3 présente les formules ainsi que les concentrations initiales, en μM , de chaque acide aminé. La formule du pseudo-constituant « AA » est la moyenne des formules de tous les acides aminés pondérée par leur concentration initiale. La somme des concentrations initiales en acides aminés est de $5338.89 \mu\text{M}$.

Ainsi, ce pseudo-constituant « AA » a pour formule : $\text{C}_{4.73} \text{H}_{9.64} \text{O}_{2.38} \text{N}_{1.26} \text{S}_{0.03}$. Il a pour masse molaire : **123.07 g/mol**

Tableau V.3 : Formule élémentaire et concentration initiale (μM) des acides aminés apportés par l'extrait de levure.

Acides aminés	C	H	O	N	S	Concentration initiale (μM)
Acide aspartique	4	7	4	1	0	283,26
Thréonine	4	9	3	1	0	287,46
Sérine	3	7	3	1	0	399,88
Acide glutamique	5	9	4	1	0	238,83
Glutamine	5	10	3	2	0	8,42
Proline	5	9	2	1	0	83,14
Cystéine	3	7	2	1	1	60,36
Glycine	2	5	2	1	0	407,05
Alanine	3	7	2	1	0	830,84
Valine	5	11	2	1	0	472,61
Méthionine	5	11	2	1	1	102,40
Isoleucine	6	13	2	1	0	328,71
Leucine	6	13	2	1	0	622,87
Tyrosine	9	11	3	1	0	63,68
Phénylalanine	9	11	2	1	0	280,07
Lysine	6	14	2	2	0	312,79
Histidine	6	9	2	3	0	93,09
Tryptophane	11	12	2	2	0	29,81
Arginine	6	14	2	4	0	217,88
Asparagine	4	8	3	2	0	215,73

V - 3 Résultats de la réconciliation des données expérimentales

Dans le but de corriger les valeurs expérimentales et de vérifier la pertinence du pseudoconstituant « AA », les données expérimentales sont réconciliées selon la méthode décrite dans le chapitre II. La figure V.2 présente les données brutes et les données réconciliées de l'expérience « 5 GLU ».

A l'exception de la variable glucose les données expérimentales sont cohérentes avec les données réconciliées. La concentration en glucose réconciliée est majorée de 7% par rapport à la concentration en glucose expérimentale. Cette observation tend à confirmer que l'extrait de levure contiendrait un substrat non mesuré apparenté au glucose. Le substrat inconnu est pris en compte en tant que glucose lors de la réconciliation des données. Ce carbohydrate est inclus en tant que tel dans les simulations suivantes (chapitre V.6).

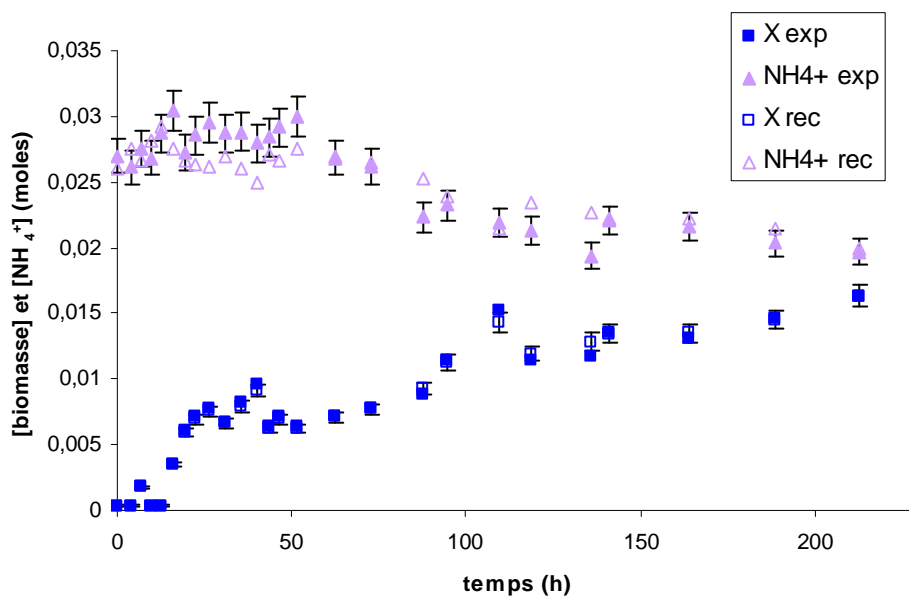
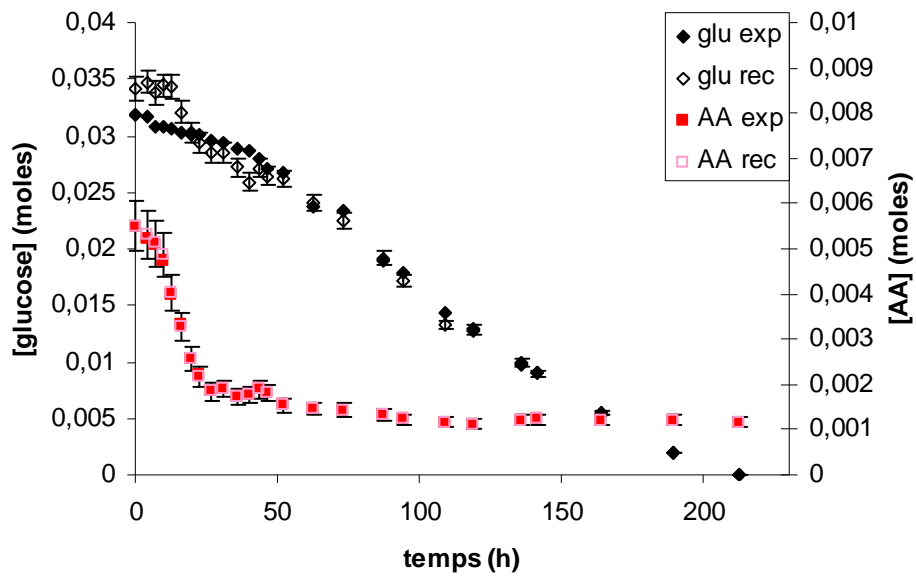


Figure V.2: Données expérimentales (exp) et données réconciliées (rec) au cours d'une culture « batch » de *Sa. algeriensis* (« 5 GLU ») sur milieu semi-synthétique (5 g.L⁻¹ de glucose et 2 g.L⁻¹ d'EXL) pH 7, 30°C, 250 rpm.

Le pseudoconstituant « AA » regroupant tous les acides aminés libres permet une représentation correcte de la consommation des 20 acides aminés libres apportés par l'extrait de levure. Il donc est inclu dans les simulations suivantes (chapitre V.6).

V - 4 Proposition d'un schéma réactionnel

V - 4 - 1 Analyses des données expérimentales

L'analyse macroscopique des cinétiques de consommation des substrats indique que la croissance bactérienne s'effectue en 4 phases (cf chapitre IV).

Rappel des 4 phases :

La première phase est une période de croissance sur les acides aminés. La seconde phase correspond à une pause ou à un fort ralentissement dans la croissance accompagné d'une activité respiratoire. La troisième phase est une seconde période de croissance sur glucose et ammonium. La quatrième phase correspond à une période de lyse cellulaire. Par ailleurs, la production de thiolutine intervient principalement après la consommation des acides aminés. Il a donc été supposé que cet antibiotique était produit à partir du glucose. Les évolutions schématiques des concentrations en biomasse et en thiolutine sont présentées figure V.3.

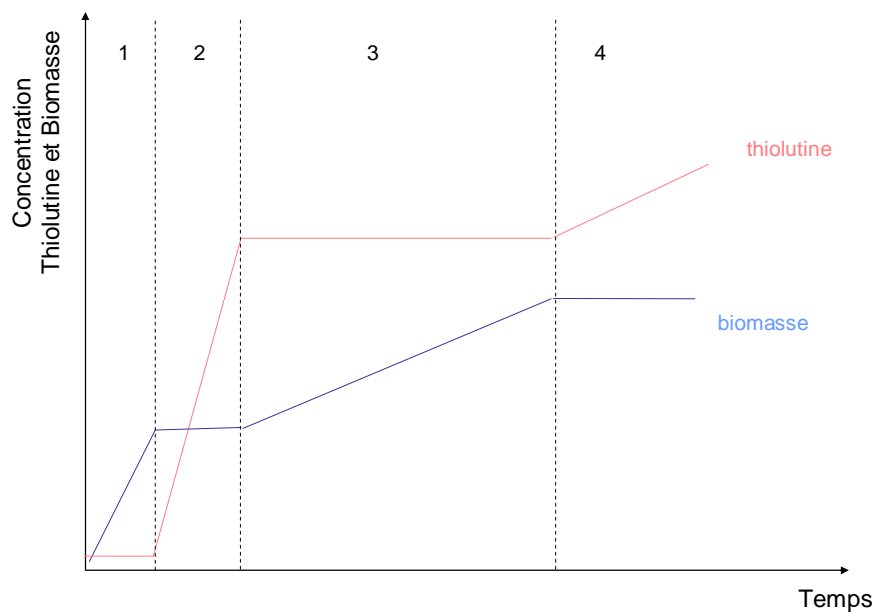


Figure V.3 : Représentation schématique de l'enchaînement des différentes séquences du schéma réactionnel par rapport aux évolutions de la biomasse et de la thiolutine.

L'interprétation des conclusions du chapitre IV et l'observation de la figure V.3 permettent de supposer que :

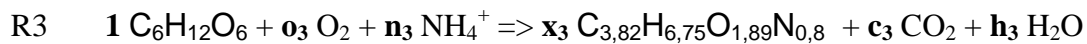
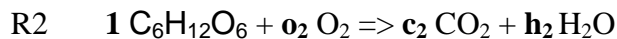
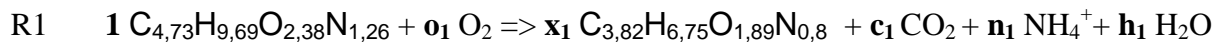
- Les réactions occurrentes au cours du développement de la bactérie sont les suivantes :

R1 Croissance sur acides aminés

R2 Maintenance sur glucose

R3 Croissance sur glucose

R4 Production de thiolutine



Formules élémentaires :



où x, o, c, h, n, s et t sont respectivement les coefficients stœchiométriques de la biomasse, de l'oxygène, du dioxygène, du dioxyde de carbone, de l'eau, de l'ammonium, du sulfate et de la thiolutine.

- Les réactions occurrentes s'enchainent selon le schéma réactionnel suivant :

Phase 1 : Croissance sur acides aminés (R1) + Maintenance sur glucose (R2)

Phase 2 : Maintenance sur glucose (R2) + Production de thiolutine (R4)

Phase 3 : Croissance sur glucose (R3) Par hypothèse, il n'y a pas de dégradation de la thiolutine pendant la croissance sur glucose.

Phase 4 : Maintenance sur glucose (R2) + Production de thiolutine (R4)

V - 4 - 2 Détermination des coefficients stœchiométriques

Les coefficients stœchiométriques sont liés par les bilans élémentaires.

Par exemple, pour la réaction 1, le bilan azote implique :

$$n = -1,26 \times aa - 0,8 \times x$$

Tableau V.4 : Détermination du nombre de coefficients stœchiométriques à identifier par réaction.

Réactions	Bilans atomiques	Coefficients stœchiométriques	Coefficients stœchiométriques à identifier
R1	4	5	1
R2	4	5	0
R3	4	5	1
R4	5	6	1

Le tableau V.4 présente le nombre de coefficients stœchiométriques à identifier par réaction. La différence du nombre de coefficients stœchiométriques et du nombre de bilans élémentaires permet de connaître le nombre de coefficients stœchiométriques à identifier.

Ainsi, les réactions 1, 3 et 4 possèdent un nombre de coefficients stœchiométriques à identifier supérieur au nombre de bilan atomiques possibles. La réaction 2 ne présente pas d'indétermination. Les coefficients \mathbf{x}_1 , \mathbf{x}_3 et \mathbf{t}_4 doivent être identifiés.

V - 5 Initialisation et procédure d'identification

Les avancements de réactions ainsi que les coefficients stœchiométriques à définir doivent être évalués de manière à minimiser l'écart entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées. Les coefficients stœchiométriques des substrats principaux (le pseudo-constituant « aa » dans la réaction 1 et glucose dans les réactions 2, 3 et 4) sont initialisés à 1. D'une façon générale, les avancements de réaction sont fixés à une valeur constante pendant les phases pendant lesquelles la réaction n'est pas active. La démarche est présentée de façon chronologique.

- L'avancement de la réaction R1 est initialisé par rapport à l'évolution de la variable « acides aminés ». Le coefficient stœchiométrique de la biomasse formée à partir des acides aminés (x_1) et l'avancement de la réaction R1 sont ensuite recalculés de manière à minimiser l'écart entre X_{exp} et X_{calc} au cours de la première période de croissance.
- L'avancement de la réaction R4 est initialisé par rapport à la thiolutine. Le coefficient stœchiométrique de la thiolutine formée (t_4) et l'avancement de la réaction R4 sont ensuite recalculés de manière à minimiser l'écart entre $thiolutine_{exp}$ et $thiolutine_{calc}$ au cours de la deuxième phase de croissance. Le coefficient stœchiométrique de la thiolutine est dépendant de l'avancement de la réaction R4 et vice versa. L'avancement de cette réaction et le coefficient stœchiométrique de la thiolutine formée (t_4) peuvent aussi être recalculés de manière à minimiser l'écart entre $NH_4^+_{exp}$ et $NH_4^+_{calc}$ à condition que la production de thiolutine soit totalement indépendante de toute période de production de biomasse à partir de glucose (réaction R3).
- L'avancement de la réaction R2 est déterminé en fonction de l'évolution de la variable glucose au cours des phases 1, 2 puis 4. Il est calculé de façon à minimiser l'écart entre $glucose_{exp}$ et $glucose_{calc}$ au cours des phases 1 et 2. Il est supposé constant pendant la phase 3.
- L'avancement de la réaction R3, est initialisé par rapport à la variable glucose au cours de la phase 3. Le coefficient de la biomasse formée à partir du glucose (x_3) est estimé de manière à minimiser l'écart entre X_{exp} et X_{calc} au cours de la phase 3. Le coefficient x_3 et

l'avancement de la réaction sont ensuite recalculés de manière à minimiser l'écart entre X_{exp} et X_{calc} au cours de la deuxième période de croissance.

V - 6 Présentation des résultats de la minimisation sous contraintes

V - 6 - 1 Coefficients stœchiométriques

Le tableau V.5 répertorie les valeurs des coefficients stœchiométriques x_1 et x_3 pour toutes les cultures analysées. Le coefficient t_4 est le même dans toutes les expérimentations, sa valeur est de 0,159.

Tableau V.5 : Coefficients stœchiométriques de la biomasse dans les réactions 1 (x_1) et 3 (x_3). Critère de minimisation : somme des erreurs absolues au carré pondérée par la mesure maximale de chaque constituant considéré et divisé par le nombre de mesures.

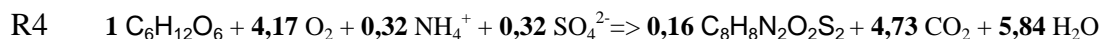
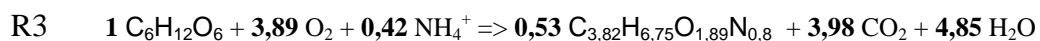
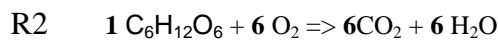
Expérience	[glucose] (g.L ⁻¹)	[EXL] (g.L ⁻¹)	x_1	x_3	Critère de minimisation
BenzoP	15	2	1,2	0,56	1,42
Benzo	15	2	1,2	0,61	1,21
3 GLU	3	2	1,2	0,44	2,17
5 GLU	5	2	1,2	0,44	1,82
8 GLU	8	2	1,2	0,5	3,04
6 EXL	15	6	0,94	0,32	0,92
4 EXL	15	4	0,74	0,26	0,53
2+2 EXL	15	2	0,95	0,53	1,83
2U	15	2	1,2	0,54	3,27
EXL2	15	2	1,2	0,52	0,98
2UBIS	15	2	1,2	0,6	2,37

Dans toutes les expériences, x_1 a une valeur au moins deux fois plus importante que x_3 . Une mole d'acide aminé consommée permet la production de deux fois plus de biomasse que la consommation d'une mole de glucose. De ce fait, la production de biomasse à partir de glucose est accompagnée d'une consommation d'oxygène et d'une production de dioxyde de carbone bien supérieure à la croissance sur acides aminés. La catabolisation des acides aminés en vue de la production de biomasse s'effectue avec une activité respiratoire plus faible que celle du glucose. Cela confirme l'hypothèse sur le devenir des acides aminés proposée dans le chapitre IV. Les acides aminés libres pénétreraient dans la bactérie et seraient incorporés

directement au niveau de la synthèse protéique, sans être catabolisé par le métabolisme primaire.

Par ailleurs, plus la concentration en extrait de levure augmente, plus la valeur des coefficients stœchiométriques de la biomasse (réactions 1 et 2) est faible. L'EXL a une incidence négative sur la stœchiométrie de la production de biomasse à partir des acides aminés. Il pourrait avoir un rôle répresseur sur la biosynthèse de biomasse quel que soit le substrat utilisé.

Les résultats de la procédure de minimisation sous contraintes permettent de proposer le schéma réactionnel présenté ci-après. Les coefficients x_1 et x_3 sont les moyennes des coefficients des expériences menées avec 2 g.L^{-1} d'EXL. Les expériences effectuées avec une concentration supérieure ont été volontairement exclues de la procédure de validation du schéma réactionnel. En effet, il semblerait qu'en présence de concentrations en extrait de levure supérieures à 2 g.L^{-1} , le mécanisme réactionnel est différent de celui proposé dans cette étude. De ce fait, le schéma réactionnel proposé ne tiendra pas compte de ces expérimentations. Ainsi, $x_1 = 1,2$ et $x_3 = 0,53$.



Séquence 1 : R1 + R3_A (+ R2)

Séquence 2 : R2 + R4

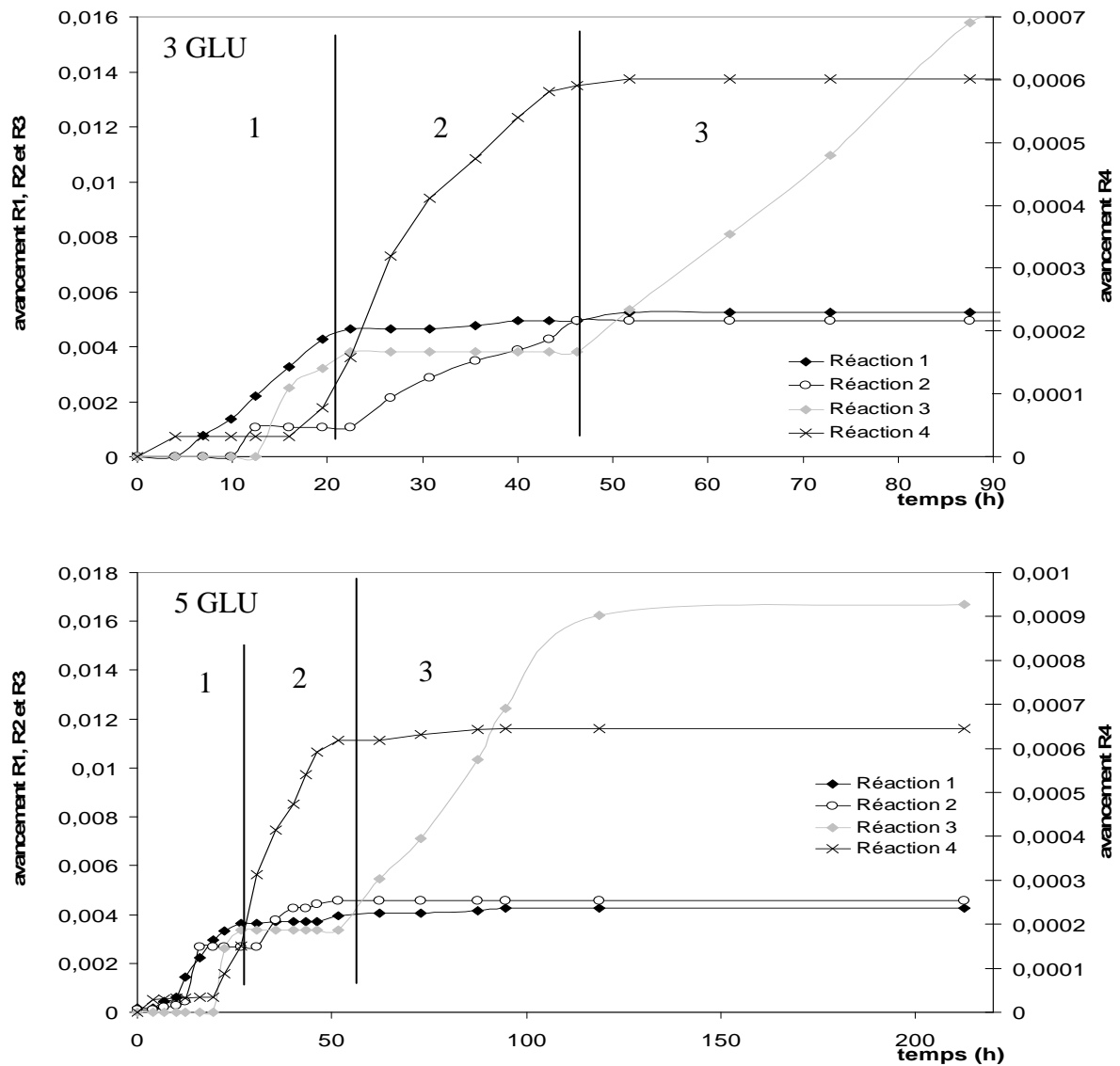
Séquence 3 : R3_B

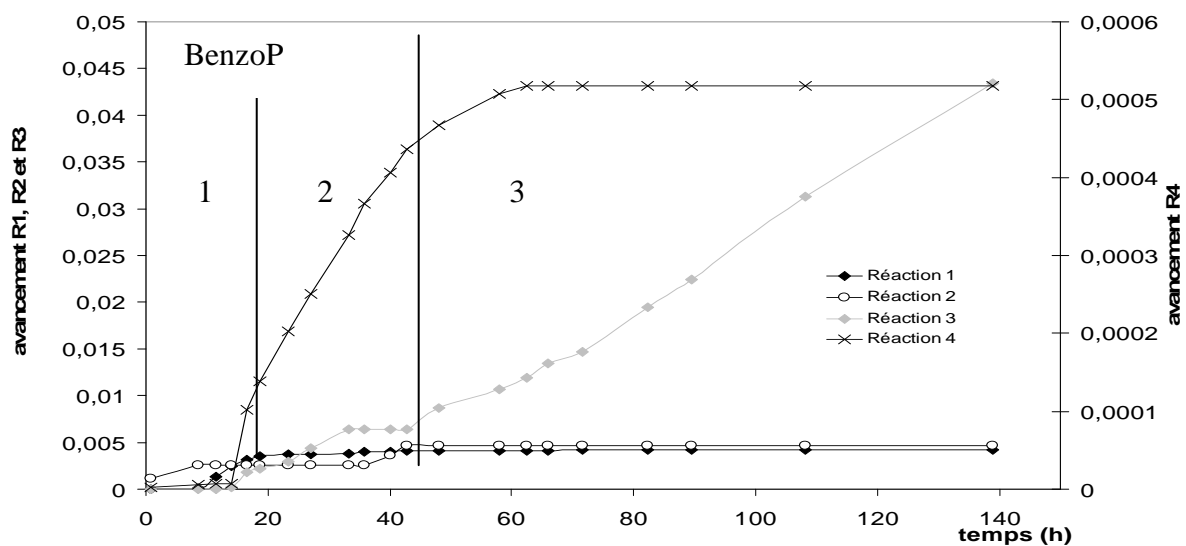
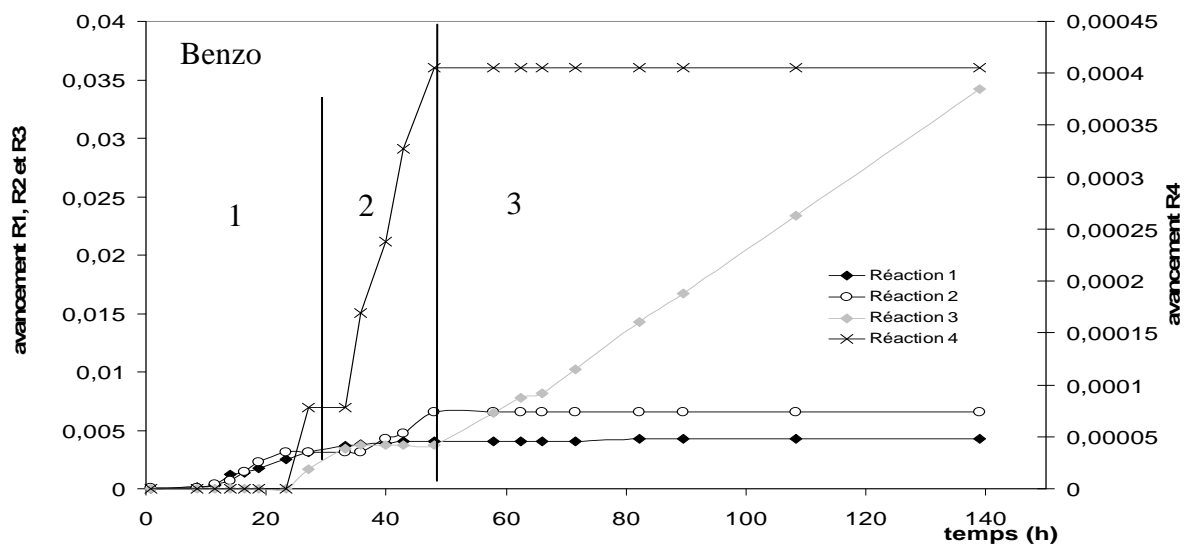
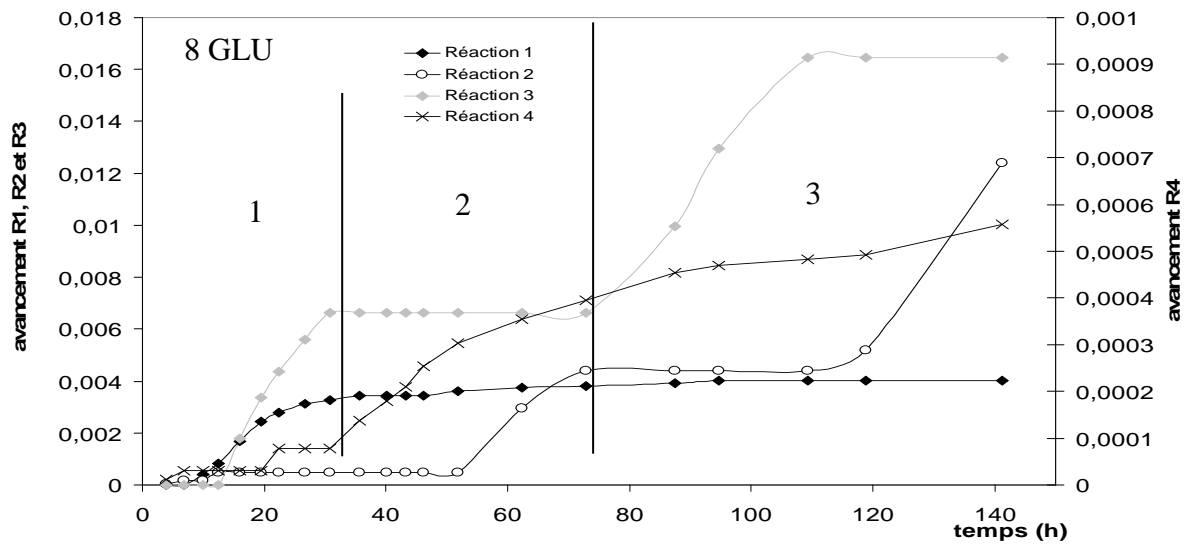
Séquence 4 : R2 (+ R4)

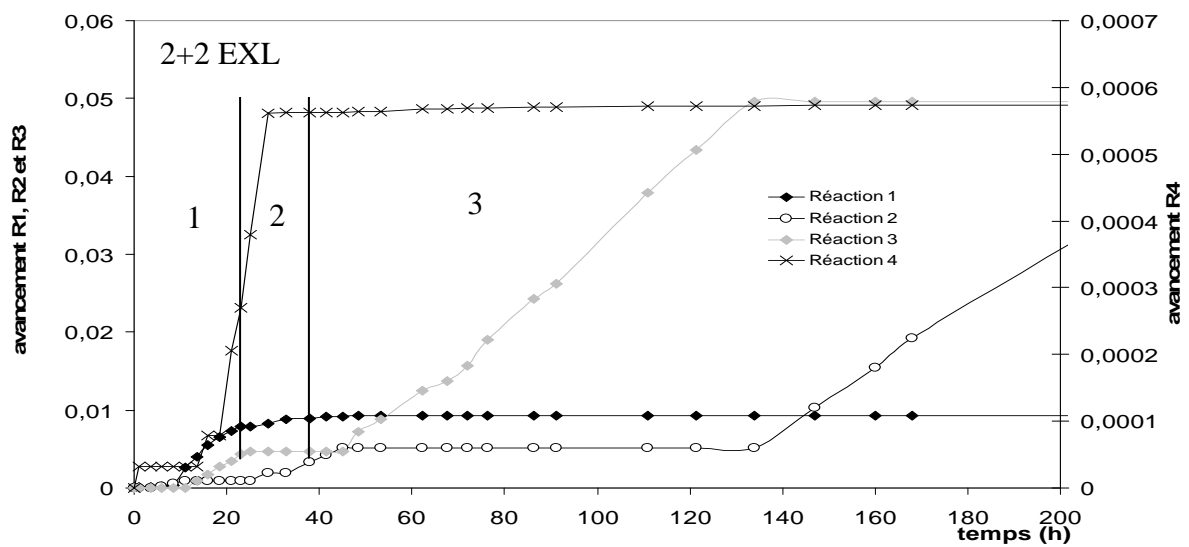
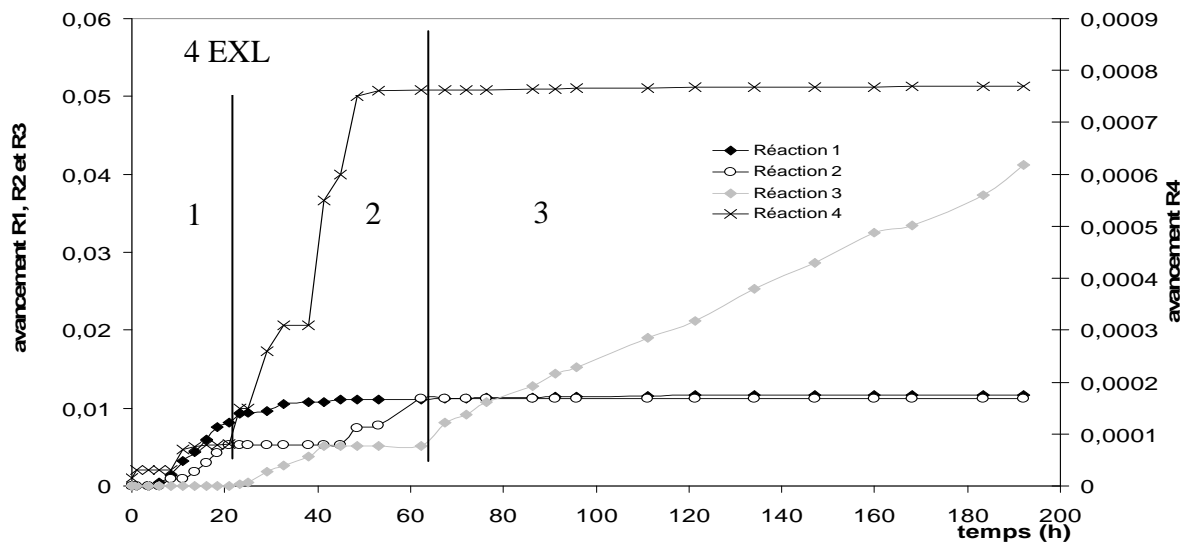
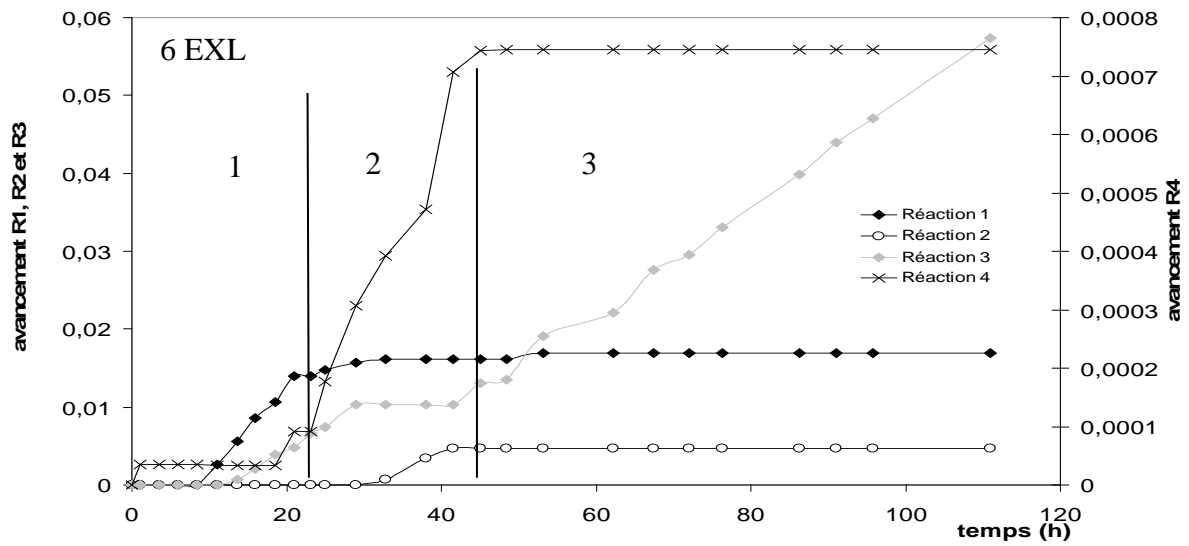
Pour chaque réaction, le rapport des coefficients stœchiométriques CO_2/O_2 est voisin de 1 ou inférieur à 1 (0,68 pour la réaction R1, 1 pour la réaction R2, 1,02 pour la réaction R3 et 1,13 pour la réaction R4). La valeur de ce rapport indique que dans ces conditions, les bactéries ont un métabolisme plutôt oxydatif. Cette observation est compatible avec la production de métabolites secondaires.

V - 6 - 2 Avancements de réaction

La figure V.4 présente les évolutions des avancements de réaction pour chacune des expérimentations. Les différentes phases de croissance décrites dans le chapitre IV sont matérialisées par des segments noirs verticaux.







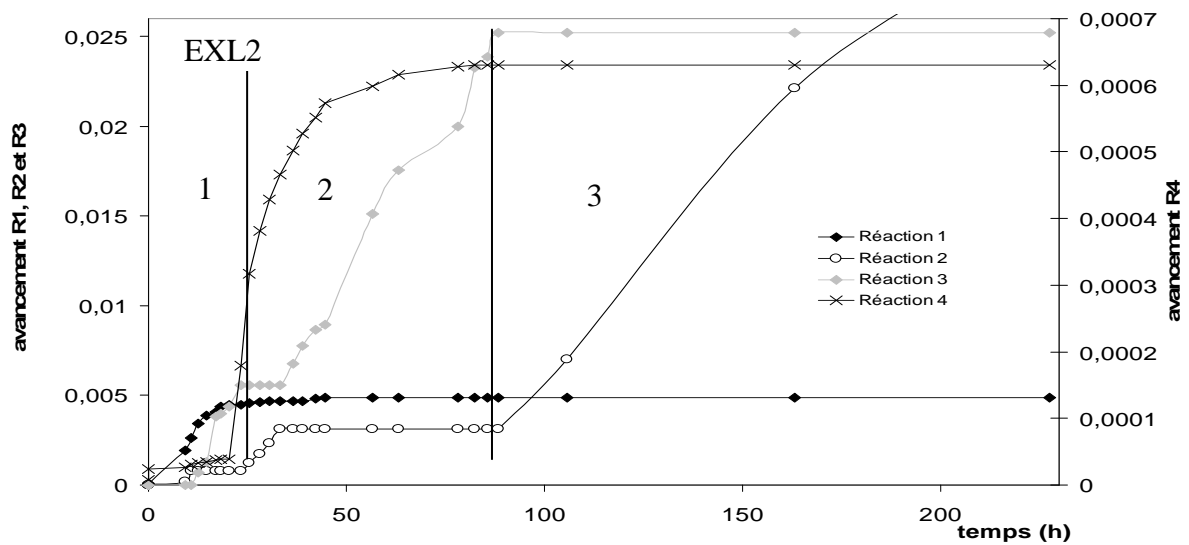
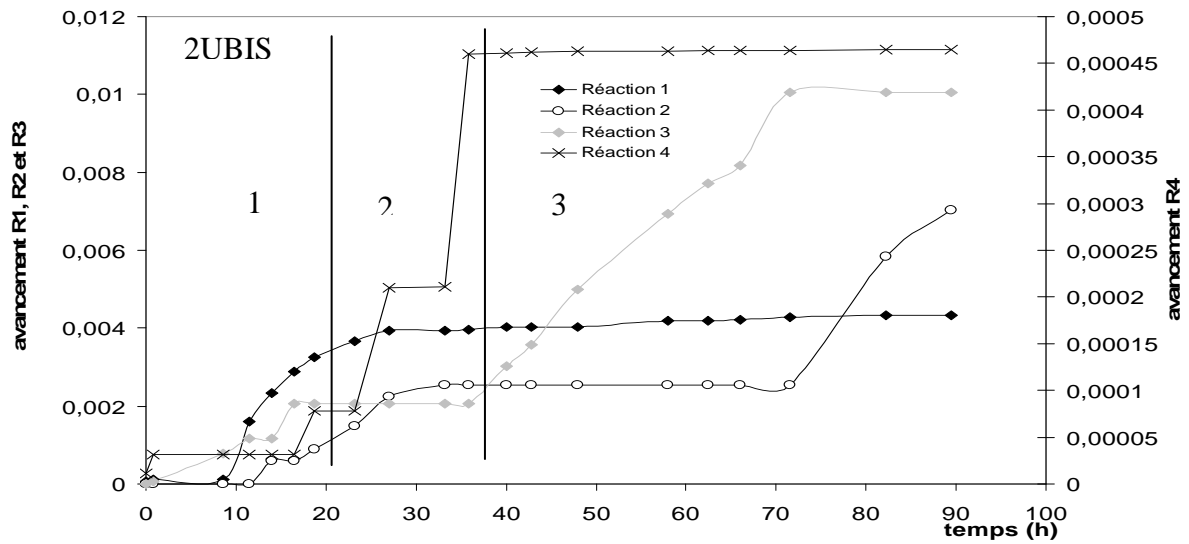
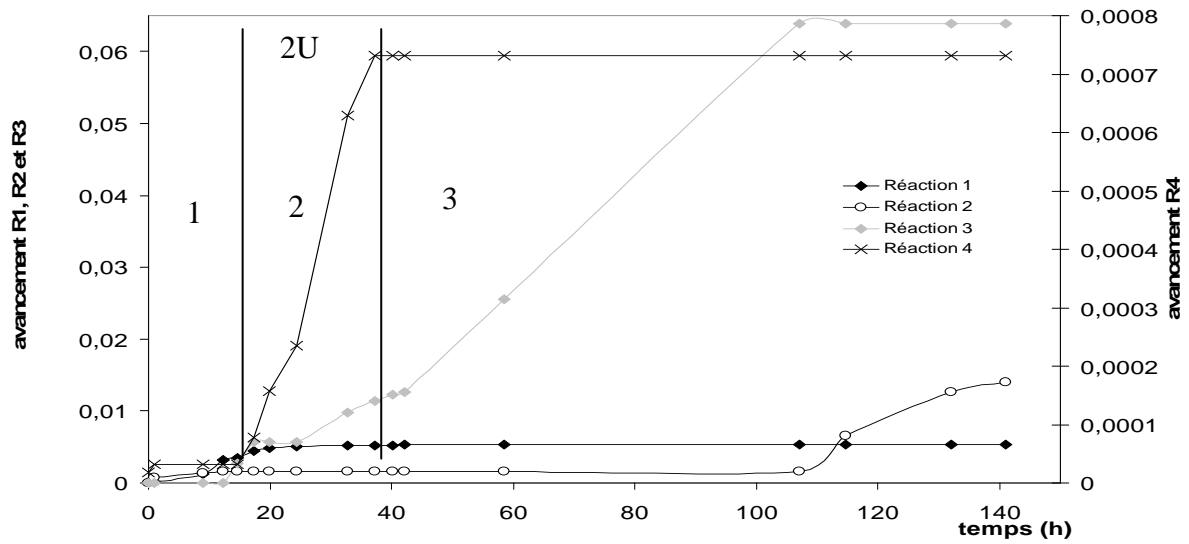


Figure V.4 : Evolutions des avancements de réactions.

D'un point de vue général, les évolutions des avancements de réaction sont similaires sur l'ensemble des expériences simulées. Le commentaire de l'évolution des avancements de réaction de l'expérience « 6 EXL » est détaillé ci-après.

La réaction 1 débute après 8h, et se termine après 35 h de culture. Cette réaction est dans un premier temps rapide ($1,11 \cdot 10^{-2} \text{ mol.h}^{-1}$), puis après 21h, sa vitesse diminue et atteint $2,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol.h}^{-1}$. La réaction 2 démarre à 32h et se termine après 41h. Sa vitesse est de $4,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol.h}^{-1}$. L'évolution de l'avancement de la réaction 3 peut être décrite en 3 parties. La réaction 3 débute après 13h de culture ($6,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.h}^{-1}$). La réaction s'arrête entre 29h et 41h, puis elle démarre à nouveau avec une vitesse similaire de $6,7 \cdot 10^{-3} \text{ mol.h}^{-1}$. La réaction 4 intervient dès 20h de culture et se termine après 45h de culture. La vitesse moyenne de la production de thiolutine à partir de glucose est de $2,9 \cdot 10^{-5} \text{ mol.h}^{-1}$.

En termes de contribution au développement de la bactérie, ces réactions n'ont pas toutes la même importance. La réaction 3 possède l'avancement maximal ($5,3 \cdot 10^{-2}$ moles), les avancements maximum des réactions 1 et 2 sont de $1,7 \cdot 10^{-2}$ et $4,7 \cdot 10^{-3}$ moles. La réaction 4 possède l'avancement le plus faible ($7,5 \cdot 10^{-4}$ moles).

La réaction 3 pourrait être la condensation de 2 réactions. La réaction R3_A serait la réaction de production de biomasse à partir du carbohydrate de formule inconnue. Ce carbohydrate provient de l'extrait de levure. Il est par hypothèse supposé apparenté à du glucose. La réaction R3_B, serait la réaction de production de biomasse à partir du glucose ajouté dans le milieu de culture. Les coefficients stœchiométriques de formation de la biomasse à partir du carbohydrate inconnu et du glucose sont supposés être du même ordre de grandeur.

Ainsi, une nouvelle hypothèse sur le scénario du développement de *Sa. algeriensis* sur milieu semi-synthétique peut être proposé. La réaction 3 est scindée en deux réactions R3_A et R3_B. La réaction R3_A intervient dans la première séquence alors que la réaction R3_B participe à la séquence 3. Les réactions s'enchaînent comme suit :

Phase 1 : R1 + R3_A (+ R2)

Phase 2 : R2 + R4

Phase 3 : R3_B

Phase 4 : R2 (+ R4)

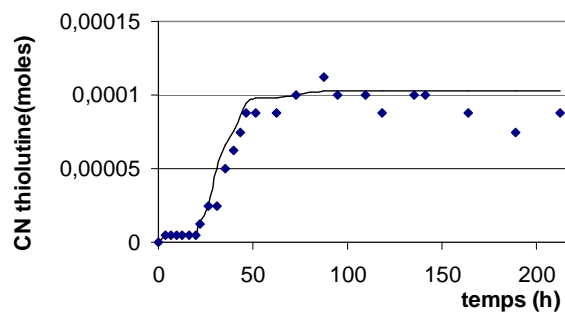
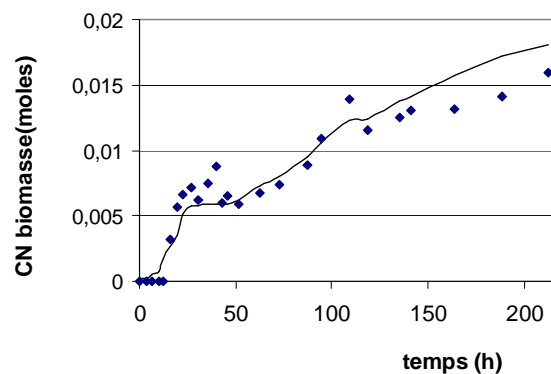
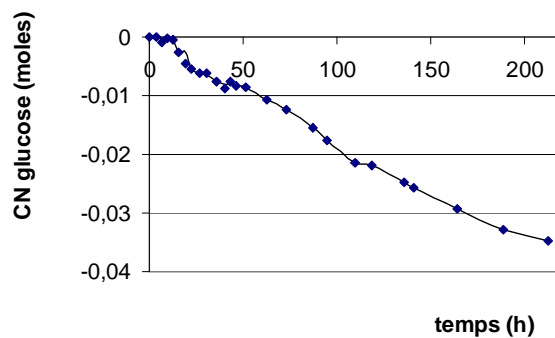
La réaction de maintenance (R2) n'intervient pas obligatoirement dans toutes les expérimentations au cours de la phase 1 (expérience « 6 EXL »). C'est le même cas de figure pour la réaction 4 au cours de la phase 4. Toutes les expérimentations ne sont pas obligatoirement menées dans des conditions où il y a une reprise de production de thiolutine.

L'analyse des évolutions des avancements éclaircit le scénario du développement de *Sa. algeriensis* sur milieu semi-synthétique. Le microorganisme entamerait son développement à partir des nutriments apportés par l'extrait de levure. Il cataboliserait rapidement les acides aminés libres ainsi qu'un carbohydrate inconnu apportés par l'extrait de levure. Suite à l'arrêt ou au ralentissement de la production de biomasse à partir de ces substrats (R1 et R3_A), la production de thiolutine s'amorce (R4). Elle est accompagnée de la réaction de production de dioxyde de carbone. La fin de la production de thiolutine coïncide avec l'entame de la production de biomasse à partir du glucose. La reprise de la croissance stopperait la production de thiolutine. La production de cette molécule bio-active est découplée de la consommation du carbohydrate et des acides aminés libres. La bactérie produit de la biomasse à partir des acides aminés avec une vitesse plus grande qu'à partir des carbohydrates.

La description du développement du microorganisme prend désormais en compte un nouveau substrat entrant dans la composition de l'extrait de levure. L'étude des avancements de réaction rejoint ce qui a été évoqué au chapitre IV.

V - 6 - 3 Données réconciliées versus données simulées

Tout comme les bilans matière, les résultats de la minimisation sous contraintes sont présentés par expérimentation en annexe. La figure V.5 représente les conversions nettes des différents constituants intervenant dans le développement de *Sa. algeriensis*. Elles sont représentées en fonction du temps pour la culture « 5 GLU ». Les points représentent les valeurs expérimentales réconciliées et les lignes continues indiquent les valeurs calculées.



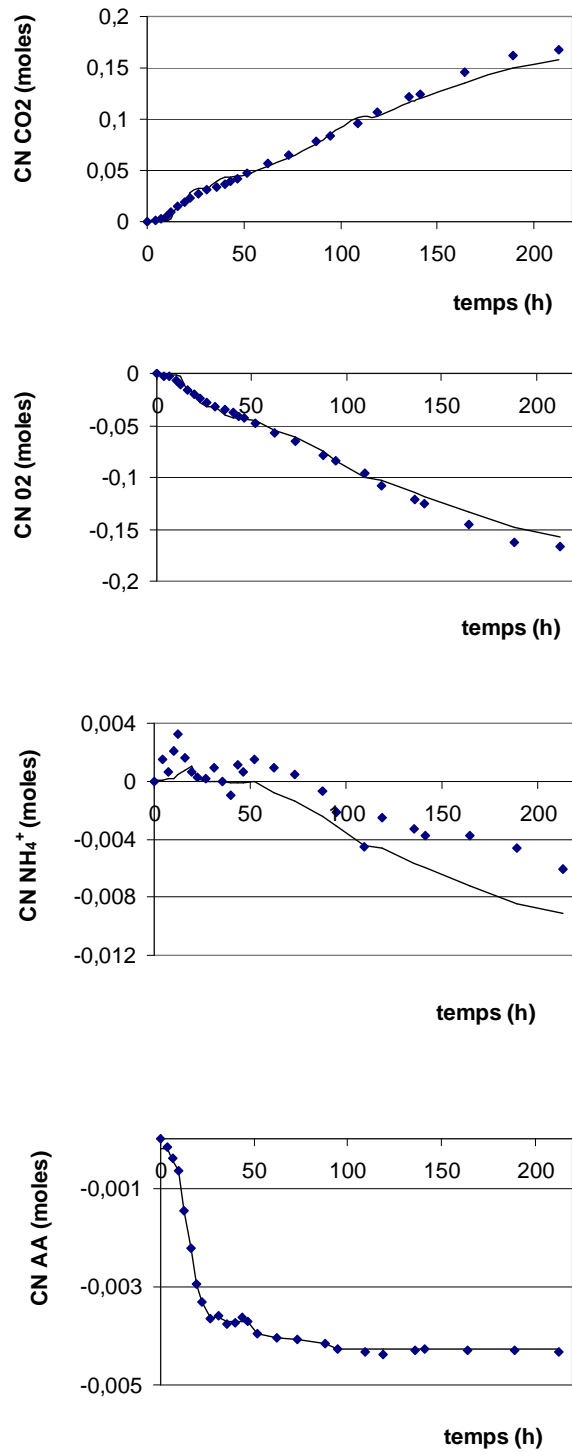


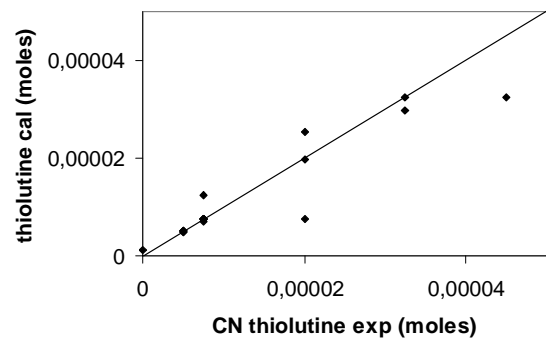
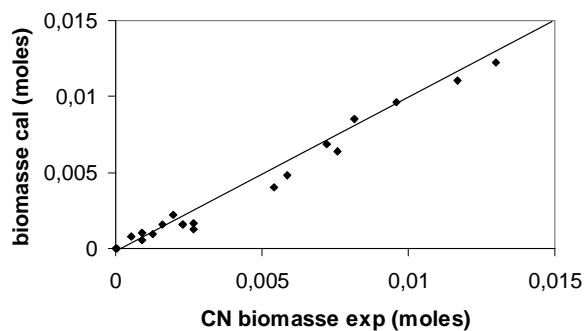
Figure V.5 : Conversions nettes (CN) des différents constituants intervenant dans le développement de *Sa. algeriensis* (glucose, biomasse, thiolutine, CO₂, O₂, ammonium, pseudoconstituant « AA »). Culture « batch » de *Sa. algeriensis* (« 5 GLU ») sur milieu semi-synthétique (5 g.L⁻¹ de glucose et 2 g.L⁻¹ d'EXL) pH 7, 30°C, 250 rpm.

V - 7 Validation sur 3 expérimentations

Le schéma réactionnel et le scénario de développement présentés au chapitre V.6.1 ont été testés sur les données de 3 expériences différentes. Elles contiennent 3 concentrations en extrait de levure différentes : 0,5 ; 2 et 4 g.L⁻¹. Les variables biomasse et thiolutine expérimentales sont représentées en fonction des variables biomasse et thiolutine calculées. La représentation des résultats de la simulation sur la variable thiolutine est présentée à titre indicatif. Pour les raisons évoquées précédemment, ils ne sont pas commentés.

Expérience « validation 0,5 »

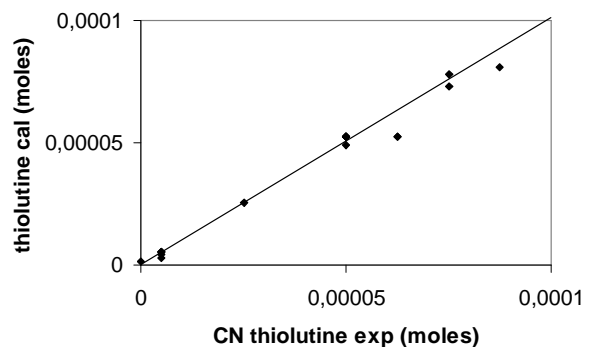
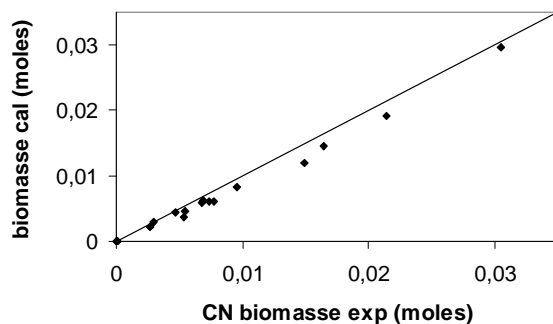
Extrait de levure : 0,5 g.L⁻¹
Glucose : 5 g.L⁻¹



Les valeurs de biomasse simulées sont corrélées aux valeurs expérimentales.

Expérience « validation 2 »

Extrait de levure : 2 g.L⁻¹
Glucose : 15 g.L⁻¹

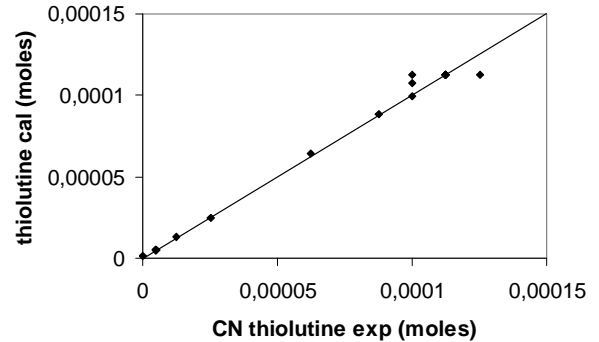
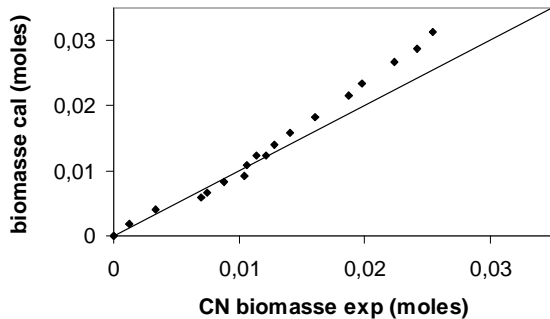


Les valeurs de biomasse simulées sont corrélées aux valeurs expérimentales.

Expérience « validation 4 »

Extrait de levure : 4 g.L⁻¹

Glucose : 15 g.L⁻¹



Pour l'expérience « validation 4 », la représentation de la biomasse calculée versus la biomasse expérimentale présente une dérive. En effet, les valeurs de biomasse simulées supérieures à 0,01 moles sont supérieures aux valeurs expérimentales. Ces valeurs supérieures à 0,01 moles correspondent aux valeurs de biomasse produite à partir du glucose. Ainsi, il semblerait que le coefficient stœchiométrique de la biomasse produite à partir du glucose (x_3) soit trop élevé pour permettre de simuler correctement l'évolution de la biomasse au cours d'une culture de *Sa. algeriensis* sur milieu semi-synthétique. Cette supposition rejoint ce qui a été évoqué précédemment, à savoir qu'en présence de concentration en extrait de levure supérieure à 2 g.L⁻¹, le mécanisme réactionnel est différent de celui proposé. Le coefficient (x_3) moyen des expériences effectuées dans des conditions similaires (à savoir une concentration en extrait de levure supérieure à 2 g.L⁻¹) est de 0,53. Un coefficient x_3 inférieur permettrait d'obtenir des valeurs simulées corrélées aux valeurs expérimentales.

V - 8 Conclusion

L'approche quantitative a permis de proposer un schéma réactionnel ainsi qu'un scénario de croissance pour la culture liquide de *Sa. algeriensis* sur milieu semi-synthétique. Un substrat carbohydrate de formule inconnue a pu être pris en compte dans le développement du microorganisme.

La bactérie se développe dans un premier temps sur les substrats apportés par l'extrait de levure. Suite à l'arrêt de la croissance sur ces substrats, la thiolutine est produite. Cette biosynthèse semble stoppée par la reprise de la production de biomasse à partir du glucose.

Ce schéma a été testé pour des concentrations en extrait de levure comprises entre 0,5 et 4 g.L⁻¹ et pour des concentrations en glucose comprises entre 5 et 15 g.L⁻¹. Le développement de *Sa. algeriensis* peut être raisonnablement décrit en 4 réactions.

Cependant, ce schéma ne peut pas être extrapolé à des expériences menées avec des concentrations en EXL supérieures à 2 g.L⁻¹. Par ailleurs, cette méthodologie ne permet pas de simuler sensiblement la production de thiolutine. Ce métabolite secondaire étant minoritairement produit, le glucose utilisé pour produire cette bio molécule est lui aussi largement minoritaire par rapport au glucose permettant la production de biomasse ou de dioxyde de carbone. Autrement dit, la production de thiolutine a une contribution trop faible dans le bilan carbone. De plus, les incertitudes pesant sur la composition de l'extrait de levure compliquent la détermination de l'avancement de la réaction de production de thiolutine (R4) et le coefficient stœchiométrique associé.

La contribution de la quantité de thiolutine produite est trop faible par rapport à la totalité du carbone présent. Cette méthodologie serait plus adaptée à des procédés de bio-production dans lesquels la molécule d'intérêt serait produite à un titre élevé. Cette molécule ne serait pas forcément un métabolite secondaire. Par ailleurs, le fait que plusieurs réactions soient liées (R2 et R3) au sein d'une même phase complique la mise en place de cette approche quantitative. Les procédés incluant plusieurs substrats seraient des candidats plus intéressants pour tester cette méthodologie à condition qu'ils soient de masses molaires très différentes.

Conclusions Générales

Conclusions Générales

Une nouvelle espèce bactérienne *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 a été isolée du désert algérien (Zitouni *et al.*, 2004). Elle s'est avérée productrice de molécules de la classe des dithiopyrrolones qui présentent des activités antibactériennes, antifongiques et anticancéreuses intéressantes (Webster *et al.*, 2000 ; Oliva *et al.*, 2001 ; Minamiguchi *et al.*, 2001).

Le travail conduit s'est divisé en 3 parties : la recherche d'un milieu chimiquement défini permettant la croissance de *Sa. algeriensis* ; l'analyse qualitative du comportement de ce microorganisme sur un milieu multi substrats et l'analyse quantitative permettant l'établissement d'un schéma réactionnel rendant compte du développement macroscopique de la bactérie.

Ces investigations ont permis de répondre à un certain nombre de questions :

Les bases azotées uracile et thymine, les acides aminés non polaires et les oligoéléments à faible concentration stimulent la croissance de *Sa. algeriensis* sur milieu synthétique en fiole. Cependant, des essais menés à une échelle de culture supérieure (réacteur « batch » de 2 L) sur milieu synthétique n'ont pas permis de reproduire ce qui avait été observé à petite échelle. En plus de l'uracile, l'extrait de levure a donc été conservé dans la composition du milieu de culture utilisé pour la suite de l'étude. La recherche d'un milieu minimum pour la croissance de *Sa. algeriensis* s'est avérée prometteuse mais elle n'est pas aboutie. Elle a cependant permis la mise en évidence de l'effet positif de l'uracile sur la croissance du microorganisme en milieu semi-synthétique.

La bactérie consommerait les différents substrats de façon séquentielle. Ainsi, elle aurait une croissance diauxique. Dans un premier temps, elle croîtrait sur les substrats apportés par l'extrait de levure (principalement, les acides aminés libres) puis après une période d'adaptation elle utiliserait le glucose pour son développement. La production de

thiolutine apparaît découplée de la croissance et interviendrait après un ralentissement significatif de la croissance. Différentes carences, notamment en acides aminés, ammonium ou glucose pourraient engendrer de telles diminutions de la vitesse spécifique de croissance.

L'approche quantitative a permis de proposer un schéma réactionnel ainsi qu'un scénario de croissance pour la culture liquide de *Sa. algeriensis* sur milieu semi-synthétique. Ce schéma stœchiométrique a été testé à différentes concentrations en glucose et en extrait de levure. Le développement de *Sa. algeriensis* peut être raisonnablement décrit en 4 réactions supposées concurrentes.

En terme de production de métabolite secondaire, l'extrait de levure a un rôle trop important par rapport au glucose pour pouvoir le supprimer du milieu. Ainsi, son utilisation, même à faible concentration, complique considérablement l'étude quantitative du métabolisme de *Sa. algeriensis*.

Par ailleurs, malgré des conditions de culture standardisées, il existe des différences quantitatives au niveau des concentrations de biomasse et de thiolutine. Ce manque de reproductibilité pourrait être dû à la variabilité de l'état physiologique de l'inoculum lié à la préparation des cryotubes de spores. Aussi, les problèmes de reproductibilité des résultats lors du « scaling-up » restent récurrents et marquent l'importance de développer des outils mathématiques adaptés à des échelles de production plus proche de la réalité industrielle.

Les résultats du chapitre V ont souligné la difficulté de simuler par notre approche stœchiométrique globale la production d'un métabolite secondaire. En fait, la contribution de la thiolutine est trop faible quantitativement en termes de bilan carbone, le schéma réactionnel proposé n'est pas sensible à l'évolution de la variable thiolutine. Par ailleurs, bien que notre schéma permette de décrire la croissance de *Sa. algeriensis*, il ne permet pas de simuler correctement l'évolution variable biomasse en présence de concentration en extrait de levure élevée. Son champ d'action reste donc limité à des conditions expérimentales proches de cette étude.

Les perspectives à donner à ce travail sont heureusement nombreuses. Pour mener d'autres études quantitatives sur *Sa. algeriensis*, il serait judicieux de prendre le temps de définir un milieu minimum dépourvu d'extrait de levure. Une piste intéressante à suivre serait de tester d'autres mélanges d'oligoéléments, ou alors d'évaluer les potentialités de croissance du microorganisme en présence d'une concentration d'extrait de levure minimisée et

supplémentée d'acides aminés à assimilation rapide (les acides aminés non polaires par exemple). L'ajout de nucléosides ou de nucléotides devrait aussi être évalué. Toutefois si ces approches s'avéraient infructueuses, une étude précise de la composition exacte de l'extrait de levure deviendrait indispensable.

Une fois les conditions de culture parfaitement maîtrisées et standardisées, les paramètres environnementaux pourront être optimisés par plan d'expériences afin d'améliorer la production de thiolutine.

Les différents substrats (acides aminés et glucose) semblent avoir des effets inhibiteurs sur le développement du microorganisme. Des stratégies de culture type « fed-batch » devraient être mises en place afin d'éviter tout problème d'overflow de carbone.

Les problèmes de reproductibilité soulevés par la culture des microorganismes filamenteux soulignent l'importance d'établir un protocole rigoureux d'ensemencement des cultures qui permette de maîtriser et de standardiser l'inoculum.

Etant donné qu'à forte concentration en extrait de levure, le schéma réactionnel incluant un seul pseudo-constituant ne permet pas une représentation satisfaisante de l'évolution de la biomasse, il serait judicieux d'envisager d'inclure plusieurs pseudo-constituants (« AA₁ », « AA₂ » ...) dont les formules seraient établies par groupes d'acides aminés. Ces groupes pourraient être définis par rapport aux vitesses d'assimilation des acides aminés. Un schéma réactionnel englobant un acide organique et la dithiopyrrolone associée, (par exemple, l'acide tiglique et la tigloyl-pyrrothine) devrait être développé.

Enfin, cette approche pourrait être appliquée à un autre procédé de bioconversion microbienne d'une molécule d'intérêt produite à un titre plus appréciable.

Afin de poursuivre l'étude physiologique de la production de dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis*, il sera indispensable d'utiliser d'autres outils liés à la biologie moléculaire et aux biotechnologies (utilisation de mutants bloqués et de substrats marqués). L'étude de cette bactérie sur milieu solide, plus proche de sa niche écologique devrait apporter des informations supplémentaires importantes aux déroulements futurs de cette étude.

Les enjeux fondamentaux et appliqués de la compréhension du métabolisme secondaire microbien sont tels que le travail mené sur la production de dithiopyrrolones par

Sa. algeriensis n'est pas prêt de s'achever. Une approche complémentaire se concentrant sur l'étude du complexe enzymatique mis en jeu dans cette biosynthèse est actuellement en cours dans notre laboratoire. Par ailleurs, l'étude du panel de dithiopyrrolones produites en fonction des nutriments apportés au microorganisme au cours de sa culture se poursuit dans notre département de recherche.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

A

- Aharonowitz, Y. & Demain, A.L. (1978) **Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus***. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **14**, 159-164.
- Aharonowitz, Y. (1980) **Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis**. *Annu. Rev. Microbiol.*, **34**, 209-233.
- Aoki, H., Sakai, H., Kohsaka, M., Konomi, T. & Hosoda, J. (1976) **Nocardicin A, a new monocyclic beta-lactam antibiotic. I. Discovery, isolation and characterization**. *J. Antibiot.*, **29**, 492-500.
- Avignone Rossa, C., White, J., Kuiper, A., Postma, P.W., Bibb, M. & Teixeira de Mattos, M.J. (2002) **Carbon flux distribution in antibiotic-producing chemostat cultures of *Streptomyces lividans***. *Metab. Eng.*, **4**, 138-50.

B

- Barakate, M., Ouhdouch, Y., Oufdou, K. & Beaulieu, C. (2002) **Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from moroccan habitats and their antimicrobial activities**. *World J. of Microbiol. & Biotechnol.*, **18**, 49-54.
- Béal, C., Deschamps, N., Juillard, V., Roissart, H., Richard, J. & Saraux, B. (1994) **Cinétiques de croissance et d'acidification des bactéries lactiques**. *In : Bactérie lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques*. (Eds) Lorica, Uriage, France, **1**, 367-401.
- Berdy, J., Aaszalos, A. & Mc Nitt, K.L. (1987) **CRC Handbook of antibiotic compounds**. *Vol.XIII. Microbial metabolites*. Parts 1,2,3. Florida, USA. CRC Press, Boca Raton.
- Béredy, J. (2005) **Bioactive microbial métabolites**. *J. Antibiot.*, **58**, 1-26.
- Bergman, R. (1989) **Thiolutin inhibits utilization of glucose and other carbon sources in cells of *Escherichia coli***. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **55**, 143-152.
- Bonvin, D. & Rippin, D.W.T. (1990) **Target factor analysis for the identification of stoichiometric models**. *Chem. Eng. Sc.*, **45**, 3417-3426.
- Borodina, I., Krabben, P. & Nielsen, J. (2005) **Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A3(2) metabolism**. *Genome Res.*, **15**, 820-829.

- 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, Algérie.
- Bouras, N. (2005) **Régulation de la production d'antibiotiques dithiopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137.** *Thèse de Doctorat* de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- 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 dithiopyrrolone antibiotics by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137.** *Enzyme Microb. Technol.*, **39**, 1423-1429.
- Bouras, N., Mathieu, F., Sabaou, N. & Lebrihi, A. (2007) **Influence on dithiopyrrolone antibiotic production by organic acids in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137** *Process Biochemistry*, **42**, 925-933.
- Bouras, N., Merrouche, R., Lamari, L., Mathieu, F., Sabaou, N. & Lebrihi, A. (2008) **Precursor-directed biosynthesis of new dithiopyrrolone analogs by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137.** *Process Biochemistry*, **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.
- Brown, D., Foster, J. Hitchcock, M.J., Ochi, K., Troost, T. & Katz, E. (1983) **Regulation of tryptophan metabolism and its relationship to actinomycin D synthesis.** *In: Proceeding of the 4th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms.* (Eds) Ikeda, Y., & Beppu, T., Kodansha Ltd, Tokyo, 85-91.
- Buchanan, R.E. (1918) **Life's phase in bacterial culture.** *J. Infect. Dis.*, **23**, 109-125.
- Bush, B.D., Fitchett, G.V., Gates, D.A. & Langley, D. (1993) U.K. Patent 1990, 2 232 668, CA, 115, 112815u.
- Butler, J.C., Hofmann, J., Cetron, M.S., Elliott J.A. , Facklam, R.R, & Breiman, R.F. (1996) **The continued emergence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States: an update from the Centers for Disease Control and Prevention's Pneumococcal Sentinel Surveillance System.** *J. Infect. Dis.*, **174**, 986-993.

C

- Castro-Martinez, C. (2007) **Brettanomyces bruxellensis : Etude Métabolique, Cinétique et Modélisation. Influence des facteurs environnementaux.** *Thèse de Doctorat* de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- Charles, M. (1985) **Fermentation scale-up: Problems and possibilities.** *Trends in Biotechnology*, **3**, 134-139.
- Chmiel, A. (1986) **Oxygen limitation in citric acid biosynthesis by *Aspergillus niger* with the high mycelium density.** *Acta Microbiol. Pol.*, **35**, 321-323.
- Chmiel, A., Brzeszczyńska, A., Ropenga, J. & Kabza, B. (1986) **Cell proliferation - cephamycine biosynthesis relationship in the culture of *Streptomyces lactamdurans* L 2/6 : phosphate regulation.** *Acta Microbiol. Pol.*, **35**, 259-266.
- Chouayekh, H. & Virolle, M.J. (2002) **The polyphosphate kinase is involved in the phosphate control of actinorhodin production in *Streptomyces lividans*.** *Mol. Microbiol.*, **43**, 919-930.
- Colombié, V. (2005) **Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel.** *Thèse de Doctorat* de l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, France.
- Colombié, V., Bideaux, C., Goma, G. & Uribe Larrea, J.L. (2005) **Effects of glucose limitation on biomass and spiramycin production by *Streptomyces ambofaciens*.** *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **30**, 1-7.
- Colson, S., Nothaft, H., Noens, E., Craig, M., Koerten H.K., Joris, B., Titgemeyer, F., van Wezel, G.P & Rigali, S. (2008) **DasA, la protéine liant le chitobiose, connecte l'utilisation de la chitine et le processus de différenciation morphologique chez *Streptomyces coelicolor*.** *Journées francophones des actinomycètes*, Castanet-Tolosan, France.
- Critchley, I.A., Brown, S.D., Traczewski, M.M., Tillotson G.S. & Janjic, N. (2007) **National and regional assessment of antimicrobial resistance among community-acquired respiratory tract pathogens identified in a 2005-2006 U.S. Faropenem surveillance study.** *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**, 4382-4389.

D

- Daae, E.B. & Ison, A.P. (1999) **Classification and sensitivity analysis of a proposed primary metabolic reaction network for *Streptomyces lividans***. *Metabolic Engineering*, **1**, 153-165.
- Dancer, J.E., Hughes, R.G. & Lindell, S.D. (1997) **Adenosine-5'-phosphate deaminase, a novel herbicide target**. *Plant Physiol.*, **114**, 119-129.
- Demain, A.L. (1982) **Catabolite regulation in industrial microbiology**, *In: Overproduction of microbial products*, (Eds) V. Krumphanzl, B. Sikyta, Z. Vanek, *Academic Press*, New York, 3-20.
- Demain, A.L. (1989) **Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in actinomycetes**. *In: Regulation of secondary metabolism in actinomycetes*. Shapiro, S., editor *Boca Raton, FL: CRC Press*, 127-134.
- Demain, A.L. (1998) **Induction of microbial secondary metabolism**. *Internatl. Microbiol.*, **1**, 259-264.
- Donadio, S., Monciardini, P., Alduina, R., Mazza, P., Chiocchini, C., Cavaletti, L., Sosio, M. & Anna, P.M. (2002) **Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites**. *J. Biotechnology*, **99**, 187-198.
- Doull, J.L., Vats, S., Chaliciopoulos, M., Stuttard, C., Wong, K. & Vining L.C. (1986) **Conjugational fertility and location of chloramphenicol biosynthesis genes on the chromosomal linkage map of *Streptomyces venezuelae***. *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 1327-1338.
- Doull, J.L., Ayer, S.W., Singh, A.K. & Thibault, P. (1993) **Production of a novel polyketide antibiotic, Jadomycin B, by *Streptomyces venezuelae* following heat shock**. *J. Antibiot.*, **46**, 869-871.

E

- Eisenman, W., Minieri, P.P., Abbey, A., Charlebois, J., Moncrieff-Yeates, M. & Rigler, N.E. (1953) **A new sulfur-containing antibiotic, produced by a *Streptomyces*, active against bacteria and fungi**. *Antibio. and chemother.*, **3**, 385-392.
- Elgazwy, A.S.H. (2003) **The chemistry of isothiazoles**. *Tetrahedron*, **59**, 7445-7463.
- Elorza, M.V., Lostau, C.M., Villanueva, J.R. & Sentandreu, R. (1976) **Cell wall synthesis regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Effect of RNA and protein inhibition**, *Biochimica et Biophysica Acta*, **454**, 263-272.

Esener, A.A., Veerman, T., Roels, J.A., Kossen, N.W.F. (1982) **Modeling of bacterial growth; formulation and evaluation of a structured model.** *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 1749-1764.

F

Fillon, M. (1996) **Développement d'une méthodologie pour la modélisation et la simulation des réacteurs discontinus. Application à la fermentation brassicole.** *Thèse de Doctorat* de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France.

Fillon, M., Meyer, M., Pingaud, H. & Joulia, X. (1995). **Data reconciliation based on elemental balances applied to batch experiments.** *Computers Chem. Eng.*, **19**, 293-298.

Friedman, C.R. & Whitney, C.G. (2008) **It's time for a change in practice: reducing antibiotic use can alter antibiotic resistance.** *J. Infect Dis.* **197**, 1082-1083.

Furumai, T., Takeda, K. & 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

Gersch, D., Shurk, A. & Römer, W. (1979) **Phosphate inhibition of secondary metabolism in *Streptomyces hygroscopicus* and its reversal by cyclic AMP.** *Arch. Microbiol.*, **121**, 91-96.

Gonzalez, R., Islas, L., Obregon, A.M., Escalante, L., & Sanchez, S. (1995) **Gentamicin formation in *Micromonospora purpurea* : stimulatory effect of ammonium.** *J. Antibiot.*, **48**, 715-719.

Goodfellow, M. & Williams, S.T. (1983) **Ecology of actinomycetes.** *Ann. Rev. Microbiol.*, **37**, 189-216.

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

H

- Hamer, W. (1989) **Stoichiometric interpretation of multireaction data: application to fed-batch fermentation data.** *Chem. Eng. Sc.*, **44**, 2363-2374.
- Hagio, K. & Yoneda, N. (1974) **Total synthesis of holomycin, thiolutin and aureothricin.** *Bull. Chem. Soc. Japan*, **47**, 1484-1489.
- Halioua, B. (2004) **Histoire de la médecine.** (Eds) Masson, 272 p.
- Harmon, J.L., Duboc, P. & Bonvin, D. (1995) **Factor analytical modelling of biochemical data.** *Comp. Chem. Eng.*, **12**, 1287-1300.
- Hewitt, C.J. & Nienow, A.W. (2007) **The Scale-Up of Microbial Batch and Fed-Batch Fermentation Processes.** *Adv. Appl. Microbiol.*, **62**, 105-135.
- Hodgson, D.A. (2000) **Primary metabolism and its control in Streptomyces: a most unusual group of bacteria.** *Adv. Microb. Phys.*, **42**, 47-238.
- Holt, J.H., Kreig, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. & Williams S.T. (1994) **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** 9^{ème} Edition (Eds.) Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
- Horinouchi, S. & Beppu, T. (1990) **Autoregulatory factors and communication in actinomycetes.** *Annu. Rev. Microbiol.*, **46**, 377-398.
- Horvath, G., Brazhnikova, M.G., Konstantinova, N.V., Tolstykh, I.V. & Potapova, N.P. (1979) **The structure of nocamycin, a new antitumor antibiotic.** *J. Antibiot.*, **32**, 555-558.
- Hozzein, W.N., Li, W.J., Ali, M.I., Hammouda, O., Mousa, A.S., Xu, L.H. & Jiang, C. (2004) ***Nocardiopsis alkaliphila* sp. nov., a novel alkaliphilic actinomycete isolated from desert soil in Egypt.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 247-252.
- Hu, Y.T., Zhou, P.J., Zhou, Y-G., Liu, Z.H. & Liu, S.J. (2004) ***Saccharothrix xinjiangensis* sp. nov., a pyrene-degrading actinomycete isolated from Tianchi lake, Xinjiang, China.** *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **54**, 2091-2094.

I

- Igarashi, M., Kinoshita, N., Ikeda, T., Nakagawa, E., Hamada, M. & Takeuchi, T. (1997a) **Formamicin, a novel antifungal antibiotic produced by a strain of *Saccharothrix* sp. I. Taxonomy, production, isolation and biological properties.** *J. Antibiot.*, **50**, 926-931.
- Igarashi, M., Nakamura, H., Naganawa, H., Takeuchi, T (1997b) **Formamicin, a novel antifungal antibiotic produced by a strain of *Saccharothrix* sp. II. Structure elucidation of formamicin.** *J. Antibiot.*, **50**, 932-936.
- Isshiki, K., Sawa, T., Naganawa, H., Matsuda, N., Hattori, S., Hamada, M., Takeuchi, Oosono, M., Ishizuka, M., Yang, Z., Zhu, B. & 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.
- Isono, K. (1988) **Nucleoside antibiotics: structure, biological activity, and biosynthesis.** *J. Antibiot.*, **41**, 1711-1739.
- Ito, S., Matsuya, T., Omura, S., Otani, M. and Nakagawa, A (1970) **A new antibiotic, kinamycin.** *J. Antibiot.*, **23**, 315-317.

J

- Jain, T.C., Newman, D.J. & Shearer, M.C. (1982) **Polynitroxin antibiotics produced by *Nocardiosis mutabilis* Shearer sp. nov. ATCC 31520.** U.S. patent 4, 317-812.
- Jaureguiberry, S., Hentgen, V., Raholiniana, N., Rasolomahefa, D. & Belec, M. (2001) **Cholera at Tamatave (Madagascar) from February to July 2000 : epidemic characteristics.** *Santé*, **11**, 73-78.
- Jia, J.M., Ma, X.C., Wu, C.F., Wu L.J. & Hu, G.S. (2005) **Cordycydeptide A, a new cyclodipeptide from the culture liquid of *Cordyceps sinensis* (BERK.) SACC.** *Chemical and pharmaceutical bulletin*, **53**, 582-583.
- Jonsbu, E., Christensen, B. & Nielsen, J. **Changes of in vivo fluxes through central metabolic pathways during the production of nystatin by *Streptomyces noursei* in batch culture.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **56**, 93-100.
- Juguet, M., Lautru, S., Gondry, M. & Pernodet, J.L (2008) **Isolement et caractérisation du groupe de genes dirigeant la biosynthèse de la congocidine chez *Streptomyces ambofaciens*.** *Journées francophones des actinomycètes*, Castanet-Tolosan, France.

K

- Katzer, W., Blackburn, M., Charman, K., Martin, S., Penn, J. & Wrigley, S. (2001) **Scale-up of filamentous organisms from tubes and shake-flasks into stirred vessels.** *Biochem. Eng. J.*, **7**, 127-134.
- Kawaguchi, T., Azuma, M., Horinouchi, S. & Beppu, T. (1988) **Effect of B-factor and its analogues on rifamycin biosynthesis in *Nocardia* sp.** *J. Antibiot.*, **41**, 360-365.
- Khaoua, S., Lebrihi, A., Germain, P. & Lefebvre, G. (1991) **Cephamicin C biosynthesis in *Streptomyces cattleya*: nitrogen source regulation.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 253-257.
- Kinoshita, N., Igarashi, M., Ikeno, S., Hori, M. & 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. & Labeda, D.P. (1987) **New antibacterial LL – C 19004 cpd-prepd. by fermentation of *Saccharothrix espanaensis*.** U.S. patent 4, 699-790.
- Koguchi, Y., Khono, J., Suzuki, S., Takahashi, K., Ohnuki, T. & 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.*, **52**, 1069-1076.

L

- Labeda, D.P., Testa, R.T., Lechevalier, M.P. & Lechevalier, H.A. (1984) ***Saccharothrix*: new genus of the *Actinomycetales* related to *Nocardiopsis*.** *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**, 426-431.
- Labeda, D.P. (1987) **Actinomycete taxonomy; generic characterization.** *J. of Ind. Microbiol.*, **28**, 115-121.
- Labeda, D.P. & 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. & Lyons, A.J. (1989) ***Saccharothrix texasensis* sp. nov. and *Saccharothrix waywayandensis* sp. nov.** *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**, 355-358.
- Labeda, D.P. & 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. & Tamura, T. (2001) **Revival of the genus *Lentzea* and proposal for *Lechevalieria* gen. nov.** *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 1045-1050.
- Lacey, J. (1997) **Actinomycetes in composts.** *Ann. Agric. Environ. Med.*, **4**, 113-121.
- Lagamayo, E.N. (2008) **Antimicrobial resistance in major pathogens of hospital-acquired pneumonia in Asian countries.** *Am. J. Infect. Control*, **36**, 101-108.
- Lam, K.S., Veitch, J.A., Golik, J., Rose, W.C., Doyle, T.W. & Forenza, S. (1995) **Production and isolation of two novel esperamicins in a chemically defined medium - antitumor esperamicin-A1c and esperamicin-A2c production by *Actinomadura verrucospora*, purification, characterization and structural determination.** *J. Antibiot.*, **48**, 1497-1501.
- Lamari, L., Zitouni, A., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Lebrihi, A., Lefebvre, G., Seguin, E. & Tillequin, F. (2002a) **New dithiolopyrrolone 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., Lebrihi, A., Germain, P., Seguin, E. & Tillequin, F. (2002b) **New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. II. Physicochemical properties and structure elucidation.** *J. Antibiot.*, **55**, 702-707.
- Lautru, S., Deeth, R. J., Bailey, L. & Challis, G. L. (2005) **Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining.** *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 265-269.
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. & Marinelli, F. (2000) **Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics.** *Antonie van Leeuwenhoek*, **78**, 399-405.
- Lebrihi, A., Lefebvre, G. & Germain, P. (1988) **Carbon catabolite regulation of cephalosporin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 44-51.
- Lebrihi, A., Lamasaiif, D., Lefebvre, G. & 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, K.P. & Pulverer, G. (Eds.). *Zbl. Bakt. suppl.*, **11**, 159-166.
- Lee, I.H., Fredrickson, A.G., & Tsuchiya, H.M. (2003) **Diauxic growth of *Propionibacterium shermanii*.** *Appl. Microbiol.*, **28**, 831-835.
- Li, H., Lu, W., Zhang, Y., Jin, W., Tao, P., Liu, X., He, Y. & Zeng, Y. (1992) **Isolation and characterization of mutactimycin-producing mutant.** *Weishengwu Xuebao*, **32**, 353-358.

- Li, I.V., Terekhova, L.P., Alferova, I.V., Galatenko, O.A. & Gapochka, M.G. (2003) **The application of succession analysis in combination with EHF (extremely high-frequency) irradiation to the selective isolation of actinomycetes from soil.** *Mikrobiologia*, **72**, 131-135.
- Li, J., Chen, G. & Webster, M. (1995) **Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont.** *J. Nat. Prod.*, **55**, 1081-1086.
- Lilley, G., Clark, A.E. & 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.
- Linares, L., Cervera, C., Cofán, F., Ricart, M.J., Esforzado, N., Torregrosa, V., Oppenheimer, F., Campistol, J.M., Marco, F. & Moreno, A. (2007) **Epidemiology and outcomes of multiple antibiotic-resistant bacterial infection in renal transplantation.** *Transplant. Proc.*, **39**, 2222-2224.
- Liras, P., Asturias, J.A. & Martín, J.F. (1990) **Phosphate control sequences involved in transcriptional regulation of antibiotic biosynthesis.** *Tibtech.*, **8**, 184-189.
- Locci, R. & Sharples, G.P. (1984) **Morphology.** *In: "The biology of Actinomycetes"*. Goodfellow, M., Mordarski, M. & Williams, S.T. (Eds.) Academic Press, London., UK, 165-199.
- Lounès, A., Lebrihi, A., Benslimane, C., Lefebvre, G. & Germain, P. (1995a) **Glycerol effect on spiramycin production and valine catabolism in *Streptomyces ambofaciens*.** *Curr. Microbiol.*, **31**, 304-311.
- Lounès, A., Lebrihi, A., Benslimane, C., Lefebvre, G. & Germain, P. (1995b) **Regulation of spiramycin synthesis in *Streptomyces ambofaciens*: Effect of glucose and inorganic phosphate.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 204-211.

M

- 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. & White, A.H. (1991) **Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp. Part 1. Dithiolopyrrolone derivatives with antibiotics activity.** *J. Nat. Prod.*, **54**, 774-784.
- Mc Intyre, M., Berry, D.R. & McNeil, B. (1999) **O₂ limitation response of *Penicillium chrysogenum* to oxygen starvation in glucose- and nitrogen-limited chemostat cultures.** *Enzyme Microb. Technol.*, **25**, 447-454.
- Marin, M.R. (1999) **Alcoholic fermentation modelling: Current state and perspectives.** *Am. J. Enol. Vitic.*, **50**, 166-178.
- Martín, J.F. (1977) **Control of antibiotic synthesis by phosphate.** *Adv. Biochem. Eng.*, **6**, 105-127.

- Masurekar, P.S. (2008) **Nutritional and engineering aspects of microbial process development.** *Prog. Drug. Res.*, **65**, 293-328.
- Matsuo, N., Negishi, A. & Negishi, Y. (2003) **Pravastatin manufacture with *Nocardia nova* and *Saccharothrix mutabilis*** (Godo Shusei Co. Ltd., Japan), Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 6 p.
- Messens, W., Verluyten, J., Leroy, F. & De Vuyst, L. (2003) **Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes.** *Int. J. Food Microbiol.*, **81**, 41-52.
- Minamiguchi, K., Kumagai, H., Maduda, 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.
- Miyairi, N., Miyoshi, T., Aoki, H., Kohsaka, M., Ikuushima, H., Kunugita, K., Sakai, H. & Imanaka, H. (1970) **Studies on thiopeptin antibiotics. I. Characteristics of thiopeptin B.** *J. Antibiot.*, **23**, 113-119.
- Moncheva, P., Tishkov, S., Dimitrova, N., Chipeva, V., Antonova-Nikolova, S. & Bogatzevska, N. (2002) **Characteristics of soil actinomycetes from antarctica.** *Journal of Culture Collections*, **3**, 3-14.
- Monod, J. (1941) **Recherches sur la croissance des cultures bactériennes.** *Thèse de docteur ès sciences naturelles*, n° 2847, Paris, France.
- Moreau, A. (2000) **Contribution au contrôle de la culture de *Brevibacterium linens* en réacteur batch. Modélisation et optimisation des cinétiques de croissance sur substrat mixte.** *Thèse de Doctorat* de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- Mukhopadhyay, J., Das, K., Ismail, S., Koppstein, D., Jang, M., Hudson, B., Sarafianos, S., Tuske, S., Patel, J., Jansen, R., Irschik, H., Arnold, E. & Ebright, R.H. (2008) **The RNA polymerase "Switch Region" is a target for inhibitors.** *Cell*, **135**, 295-307.
- Murakami, R., Tomikawa, T., Shin-Ya, K., Shinozaki, J., Kajiura, T., Seto, H. & Hayakawa, Y. (2001a) **Ammocidin, a new apoptosis inducer in ras-dependant cells from *Saccharothrix* sp. I. Production, isolation and biological activity.** *J. Antibiot.*, **54**, 710-713.
- Murakami, R., Tomikawa, T., Shin-Ya, K., Shinozaki, J., Kajiura, T., Kinoshita, T., Miyajima, A., Seto, H. & Hayakawa, Y. (2001b) **Ammocidin, a new apoptosis inducer in rasdependent cells from *Saccharothrix* sp. II. Physico-chemical properties and structure elucidation.** *J. Antibiot.*, **54**, 714-717.

N

- Naeimpoor, F. & Mavituna, F. (2001) **Metabolic Flux Analysis in *Streptomyces coelicolor*: Effect of nitrogen source.** *Focus Biotechnology*, **1**, 131-145.
- Naidenova, M. & Vladimirova, D. (2002) **Isolation and taxonomic investigation of actinomycetes from specific biotopes in bulgaria.** *Journal of Culture Collections*, **3**, 15-24.
- Nakamura, K., Kimura, T. & Takahashi, E. (1999) **Synthesis and biological activities of phosphonothrixin. Phosphorus, Sulfur and Silicon and the related elements.** *Naturstoff. Angew. Chem.*, **69**, 50-58.
- Narang, A., & Pilyugin, S.S. (2006) **Bacterial gene regulation in diauxic and non-diauxic growth.** *J. Theor. Biol.*, **244**, 326-348.
- Narasimham, S. & Mah, R.S.H. (1987) **Generalized likelihood ratio method for gross error identification.** *AIChE J.*, **33**, 1514-1521.
- Neu, H.C. (1992) **The crisis in antibiotic resistance.** *Science*, **257**, 1064-1073.
- Nguyen, K.T., Nguyen, L.T. & Behal V. (1995) **The induction of valine dehydrogenase activity from *Streptomyces* by L-valine is not repressed by ammonium.** *Biotechnol. Lett.*, **17**, 31-34.
- Niemi, J. (1995) **Hybrid anthracycline antibiotics: Analysis and application of rhodomycine biosynthetic genes from *Streptomyces purpuracens*.** PH.D. Thesis, Univ. Turku (Finland).
- Novotna, J., Vohradsky, J., Berndt, P., Gramajo, H., Langen, H., Li, X.M., Minas, W., Orsaria, L., Roeder, D., & Thompson, C.J. (2003) **Proteomic studies of diauxic lag in the differentiating prokaryote *Streptomyces coelicolor* reveal a regulatory network of stress-induced proteins and central metabolic enzymes.** *Mol. Microbiol.*, **48**, 1289-1303.

O

- Ochi, K. (1986) **Occurrence of the stringent response in *Streptomyces* sp. and its significance for the initiation of morphological and physiological differentiation.** *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 2621-2631.
- Ochi, K. (1987) **A rel mutation abolishes the enzyme induction needed for actinomycin synthesis by *Streptomyces antibioticus*.** *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 829-835.
- Ochi, K. (1988) **Nucleotide pools and stringent response in regulation of *Streptomyces* differentiation.** *In: Proceeding of seventh international symposium on biology of*

Actinomycetes, (Eds) Okami, Y., Beppu, T. and Ogawara, H., *Japan Scientific Societies Press*, Tokyo, 303-337.

- Okanishi, M. & Hotta, K. (1980) **Regulation of antibiotics production in microorganism.** *In: Molecular breeding and genetics of applied microorganisms.* (Eds) Sakagushi, K. & Okanishi, M., *Academic Press*, New York, 9-28.
- Olano, C., Lombó, F., Méndez, C. & Salas J.A. (2008) **Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering.** *Metabolic Engineering, in Press*
- Oliva, B., O'Neill, A., Wilson, J.M., O'Hanlon, P.J. & Chopra, I. (2001) **Antimicrobial properties and mode of action of the pyrrothine holomycin.** *Antimicrob. Agents and Chemother.*, **45**, 532-539.
- Olsvik, E. & Kristiansen, B. (1994) **Rheology of filamentous fermentations.** *Biotechnology Advances*, **12**, 1-39.
- Omura, S., Tazaki, K., Tanaka, Y., Sakakibawa, H., Aizawa, M. and Lukacs, G. (1983) **Valine is a precursor of n-butyrate unit in the biosynthesis of macrolide aglycone.** *J. Antibiot.*, **36**, 614-616.
- O'Neill, A., Oliva, B., Storey, C., Hoyle, A., Fishwick, C. & Chopra, I. (2000) **RNA polymerase inhibitors with activity against Rifampi- Resistant Mutants of *Staphylococcus aureus*.** *Antimicrob. Agents and Chemother.*, **44**, 3163-3166.
- P**
- Papagianni, M. (2004) **Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes.** *Biotechnology Advances*, **22**, 189-259.
- Parisien, A., Allain, B., Zhang, J., Mandeville, R. & Lan, C.Q. (2008) **Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides.** *J. Appl. Microbiol.*, **104**, 1-13.
- Pearl, R. (1972) **The growth of populations.** *Q. Rev. Biol.* **47**, 532-548.
- Perry, D.A., Tone, J. & Maeda, H., (1990) **Antiparasitic menaquinones from *Saccharothrix*.** (Pfizer Ltd., UK). *Brit. UK Pat. Appl.*, 28-109
- Pfefferle, C., Theobald, U., Gürtler, H. & Fiedler, H.P. (2000) **Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions.** *Journal of Biotechnology*, **80**, 135-142.
- Piepersberg, W. & Distler, J. (1997) **Aminoglycosides and sugar components in other secondary metabolites.** *In : Products of secondary metabolism, Rehn H-J & Reed G, editors. Vol. 7. Weinheim: VCH, 397-488.*

Piret, J.M. & Demain, A.L. (1988) **Actinomycetes in biotechnology: an overview**, *In: Actinomycetes in biotechnology*. (Eds) Goodfellow, M., Mordarski, M & Williams S.T., *Academic Press*, London, 461-482.

Pitt, J.I. (1987). - ***Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A**. *Appl. Environ. Microbiol.*, p. 266-269.

Pregnotato, M., Terreni, M., Ubiali, D., Pagani, G., Borgna, P., Pastoni, F. & 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.

R

Ramon-Portugal, F. (1995) **Interaction de type killer entre levures : analyse cinétique, co-culture et modélisation**. *Thèse de doctorat* de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France.

Rius, N., Maeda, K. & Demain, A. (1996) **Induction of L-lysine ϵ -aminotransferase by L - lysine in *Streptomyces clavuligerus*, producer of cephalosporins**. *FEMS Microbiol. Lett.*, **144**, 207-211.

S

Sabaou, N., Boudjella, H., Bennadji, A., Mostefaoui, A., Zitouni, A, Lamari, L., Bennadji, H., Lefebvre, G. & Germain, P. (1998) **Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques**. *Sécheresse*, **9**, 147-153.

Satoh, A., Ogawa, H. & Satomura, Y. (1976) **Role and regulation mechanism of kanamycin acetyltransferase in kanamycin biosynthesis**. *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 191-196.

Stachel, H.D., Eckl, E., Immerz-Winkler, E., Kreiner, C., Weigand, W., Robl C., Wünsch, R., Dick, S. & Drescher, N. (2003a) **Synthesis and reactions of new dithiolo pyrrolones**. *Helvetica Chimica Acta*, **85**, 4453-4467.

Stachel, H.D., Immerz-Winkler, E., Poschenrieder, H., Windt, A., Weigand, W., Drescher, N. & Wünsch, R. (2003b) **Metal complexes of functionalized sulfur-containing ligands, Part XIX, Synthesis and reactions of new pyrroloisothiazoles**. *Helvetica Chimica Acta*, **86**, 2471- 2480.

Sauget, L., Belin, P., Genet, R., Lautru, S., Pernodet, J.L, & Gondry, M. (2008) **Une nouvelle famille d'enzyme impliquées dans la formation de liaisons peptidiques, les cyclopeptide synthases**. *Journées francophones des actinomycètes*, Castanet-Tolosan, France.

- Schachtner, J.E., Nienaber, J. Stachel, H.D. & Waisser, K. (1999) **Fused 1,2-dithioles, V: Carbenoid anions as intermediates in reactions of pyrrothines and their heteroanalogues**, *Pharmazie*, **54**, 335-340.
- Schippers, A., Bosecker, K., Willscher, S., Sproer, C.P., Schumann, C. & Kroppenstedt, R.M. (2002) ***Nocardiopsis metallicus* sp. nov., a metal-leaching actinomycete isolated from an alkaline slag dump**. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 2291-2295. 111
- Seepersaud, M., Kettunen, M., Abu-Surrah, A.S., Voelter, W. & Al-Abed, Y. (2002) **Hydroformylation of glycals using a rhodium(I)(acac)(CO)₂ catalyst**. *Tetrahedron Letters.*, **43**, 8607-8609.
- Shirling, E.B. & Gottlieb, D. (1966) **Methods for characterization of *Streptomyces* species**. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44**, 313-340.
- Singh, S., Malik, B.K. & Sharma, D.K. (2007) **Metabolic pathway analysis of *S. pneumoniae*: an *in silico* approach towards drug-design**. *J. Bioinform. Comput. Biol.*, **5**, 135-53.
- Smirnov, A., Esnault, C., Nowacka-Mazurek, A., Martel, C., Darbon-Rongere, E., Chouayekh, H., Ghorbel, S., Shikura, N., Seghezzi, N. & Virolle, M.J. (2008) **Toward a better understanding of why and how antibiotic biosynthesis is being triggered in *Streptomyces* ?** *In: Proceedings of the 1st industrial biotechnology international conference*, Naples, Italie.
- Solé, M., Rius, N. & Lorén, J.G. (2000) **Rapid extracellular acidification induced by glucose metabolism in non-proliferating cells of *Serratia marcescens***. *Internat. Microbiol.*, **3**, 39-43.
- Spížek, J. & Tichý, P. (1995) **Some aspects of overproduction of secondary metabolites**. *Folia Microbiol.*, **40**, 43-50.
- Stephanopoulos, G. & Stafford D.E. (2002) **Metabolic engineering: a new frontier of chemical reaction engineering**. *Chem. Eng. Sci.*, **57**, 2595-2602.
- Sugawara, T., Tanba, T., Kaneda, Y., Yamamoto, H. & Adachi, T. (1999) **Antifungal thiazolylpyridine 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. & Susaki, K. (1991) **Tetrazomine, a new antibiotic produced by an actinomycete strain. Taxonomy, fermentation, isolation and characterization**. *J. Antibiot.*, **44**, 479-485.
- Szabo, G., Szeszak, F., Vitalis, S. & Toth, F. (1988) **New data on the formation and mode of action of factor C**. *In: Proceeding of Seventh International Symposium on Biology of Actinomycetes*. (Eds) Okami, Y., Beppu, Y. & Ogawara, H., *Japan Scientific Societies Press*, Tokyo, 324-329.

T

- Takahashi, A., Hotta, K., Saito, N., Morioka, M., Okami, Y. & Umuzawa, H. (1986) **Production of novel antibiotic, dopsisamine, by a new subspecies of *Nocardioopsis mutabilis* with multiple antibiotic resistance.** *J. Antibiot.*, **39**, 175-183.
- Takeuchi, M., Takahashi, S., Enokita, R., Sakaida, Y., Haruyama, H., Nakamura, T., Katayama, T. & Inukai, M. (1992) **Galacardins A and B, new glycopeptide antibiotics.** *J. Antibiot.*, **45**, 297-305.
- Terry, J. & Springham, D.G. (1981) **Effect of inorganic phosphate on cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate in streptomycin producing cultures of *Streptomyces griseus*,** *Can. J. Microbiol.*, **27**, 1044-1047.
- Thayer, D.W., Heintz, C.E., Marx, J.N., Cox, D.E. & Huff, R. (1985) **Antibiotic production by *Streptomyces cinnamonensis* ATCC 12308.** *Dev. Ind. Microbiol.*, **26**, 445-454.
- Tohyama, S., Eguchi, T., Dhakal, R. P., Akashi, T., Otsuka, M. & Kakinuma, K. (2004) **Genome-inspired search for new antibiotics. Isolation and structure determination of new 28-membered polyketide macrolactones, halstoctacosanolides A and B, from *Streptomyces halstedii* HC34.** *Tetrahedron*, **60**, 3999-4005.
- Tomita, K., Oda, N., Hoshino, Y., Ohkusa, N. & 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**, 940-948.
- Tsuboya, S., Takayuki, D., Takenori, I. & Kenji, H. (1996) **Substance P antagonists manufacture with microorganism.** *Jpn. Kokai Tokkyo Koho.*, p.16.
- Tsurumi, Y., Ueda, H., Hayashi, K., Takase, S., Nishikawa, M., Kiyoto, S. & 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

- Untrau, S., Lebrihi, A., Lefebvre, G. & Germain, P. (1994) **Nitrogen catabolite regulation of spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens*.** *Curr. Microbiol.*, **28**, 111-118.

V

- Vančura, A., Řezanka, T., Maršálek, J., Melzoch, K., Basarova, G. and Kristan, V. (1988) **Metabolism of L-threonine and fatty acids and tylosin biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **49**, 411-415.**
- Verhulst, P.F. (1838) **Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. *Corr. Math. et Phys.*, **10**, 113-120.**
- Vértesy, L., Barbone, F.P., Cashmen, E., Decker, H., Ehrlich, K., Jordan, B., Knauf, M., Schummer, D., Segeth, M.P., Wink, J. & Seibert, G. (2001) **Pulraflavins, potent antitumor antibiotics from *Saccharothrix* sp. DSM 12931. *J. Antibiot.*, **54**, 718-729.**
- Voelker, F. & Altaba, S. (2001) **Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbiology*, **147**, 2447-2459.**

W

- Wang, L., Zhang, Y., Lu, Z., Shi, Y., Liu, Z., Maldonado, L., & Goodfellow, M. (2001) ***Nocardia beijingensis* sp. nov., a novel isolate from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 1783- 1788.**
- Watanabe, K., Hotta, K., Praseuth, A.P., Koketsu, K., Migita, A., Boddy, C.N., Wang, C.C., Oguri, H., & Oikawa, H. (2006) **Total biosynthesis of antitumor nonribosomal peptides in *Escherichia coli*. *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 423-428.**
- Webster, J.M., Li, J. & Chen, G. (2000) **Anticancer property of dithiolopyrrolones. *U.S. Patent* 6,020,360.**
- Webster, J.M., Chen, G., Hu, K. & Li, J. (2002) **Bacterial metabolites, *In: Entomopathogenic Nematology*, (Eds) Gaugler, R., CAB International., 99-114.**
- Weinberg, E.D. (1973) **Secondary metabolism: control by temperature and inorganic phosphate. *Dev. Ind. Microbiol.*, **15**, 70-81.**
- Weinberg, E.D. (1978) **Secondary metabolism: regulation by phosphate and trace elements. *Folia Microbiol.*, **23**, 496-501.**
- Wilson, C.G. & Bushell, M.E. (1995) **The induction of antibiotic synthesis in *Saccharopolyspora erythraea* and *Streptomyces hygroscopicus* by growth rate decrease is accompanied by a down-regulation of protein synthesis rate. *FEMS Microbiol Lett.* **129**, 89-96.**
- Whitaker, A. (1992) **Actinomycetes in submerged culture. *Appl. Biochem. Biotechnol.* , **32**, 23-35.**

X

Xu, C. (1998) **The stability and cytotoxic properties of xenorxides and xenorhabdins, secondary metabolites of the entomopathogenic nematode symbiont, *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae)**, Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of science.

Y

Yamatodami, S., Asahi, Y., Matsukura, A., Ohmono S. & Abc, M. (1970) **Structure of rugulovasine A, B and their derivatives**. *Agri. Biol. Chem.*, **34**, 485-487.

Z

Zhang, J. & Greasham, R. (1999) **Chemically defined media for commercial fermentations**. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **51**, 407-421.

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, Algérie.

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, France.

Zitouni, A., Boudjella, H., Mathieu, F., Sabaou, N. & 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. & Lebrihi, A. (2004b) **Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103. II. Physicochemical 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. & 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. & Sabaou, N. (2005) ***Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics**. *Research in microbiology*, **156**, 984-993.

Zou, X., Hang, H.F., Chu, J., Zhuang, Y.P. & Zhang, S.L. (2008) **Oxygen uptake rate optimization with nitrogen regulation for erythromycin production and scale-up from 50L to 372m³ scale**. *Bioresour. Technol.*, in press.

Table des illustrations

FIGURES

Figure I.1 : Evolution de la population mondiale en milliards d'habitants	6
Figure I.2 : Densité de la population mondiale en habitant par km ²	7
Figure I.3 : Hydrolyse du noyau β -lactame	10
Figure I.4 Comparaison de la micromorphologie du genre <i>Saccharothrix</i> avec celle du genre <i>Streptomyces</i>	26
Figure I.5 : Structure des principales dithiolopyrrolones produites par <i>Sa. algeriensis</i>	28
Figure I.6 : Voie de biosynthèse hypothétique de la thiolutine	31
Figure II.1 : Schéma du réacteur type « batch »	50
Figure II.2 : Schéma général de l'installation	51
Figure II.3 : Pelote après 24h de culture sur milieu semi-synthétique	58
Figure II.4 : Illustration du phénomène d'adhésion des pelotes sur la paroi du réacteur	60
Figure II.5 : Illustration du phénomène d'adhésion des pelotes sur les éléments métalliques du réacteur	60
Figure III.1 : Evolution de la production de biomasse en fonction du temps sur deux milieux semi-synthétiques (MOPS et CaCO ₃). Culture en fiole	71
Figure III.2 : Evolution de la production de biomasse, de la consommation de glucose et du rendement biomasse/glucose en fonction du temps sur milieu semi-synthétique (MOPS). Culture en fiole	72
Figure III.3 : Rendement Biomasse / Substrat spécifique en fonction des différents carbohydrates ($g_X \cdot g_S^{-1}$) a) sur milieu minimum MOPS et b) sur milieu semi-synthétique MOPS. Glucose, galactose, fructose, lactose, maltose, saccharose et glycérol (83 mM). Dextrines et amidon (15 g.L ⁻¹). Culture en fiole	75
Figure III.4 : Représentation de la production de biomasse (a), la consommation azote alpha aminé (b) à différents temps en fonction des différents groupes d'acides aminés. Culture en fiole	77
Figure III.5 : Production de biomasse à différents temps, en fonction des bases azotées. Culture en fiole	79

Figure III.6 : Production de biomasse à différents temps en fonction des mélanges d'oligoéléments. Culture en fiole	81
Figure III.7 : Evolution de la production de biomasse sur différents milieux : milieu synthétique (EXL 0 g.L ⁻¹ et uracile 20 mM); milieu semi-synthétique (EXL 2 g.L ⁻¹ et uracile 0 mM) et milieu semi-synthétique standard (EXL 2 g.L ⁻¹ et uracile 20 mM). Culture en réacteur batch	84
Figure IV.1 : Evolution de la vitesse de production de dioxyde de carbone au cours du temps sur milieu semi-synthétique standard. Culture en réacteur batch	87
Figure IV.2 : Culture batch de <i>Sa. algeriensis</i> sur milieu semi-synthétique standard a) Biomasse en g.L ⁻¹ , azote α-aminé en mg.L ⁻¹ et glucose en g.L ⁻¹ . b) Thiolutine en mg.L ⁻¹ , azote α-aminé en mg.L ⁻¹ (ronds blancs) et ions ammonium en mg.L ⁻¹ .	88
Figure IV.3 : Détermination graphique des vitesses de croissance spécifique des phases 1 et 3. Culture en réacteur batch	89
Figure IV.4 : Evolutions des taux d'assimilation de chaque acide aminé libre sur milieu semi-synthétique standard (EXL 2 g.L ⁻¹ et uracile 20 mM) au cours des phases 1 et 2. La concentration en thiolutine est représentée en parallèle. Culture en réacteur batch	91
Figure IV.5 : Diagramme de Venn du classement des acides aminés par propriétés de structures	93
Figure IV.6 : Production spécifique de thiolutine sur milieu semi-synthétique. Culture en réacteur batch	95
Figure IV.7 : Production de Thiolutine et CO ₂ en fonction de différentes concentrations en glucose sur milieu semi-synthétique (2 g.L ⁻¹ d'extrait de levure). Culture en réacteur batch	97
Figure IV.8 : Consommation de l'aspartate, thréonine, isoleucine et de la lysine en fonction de différentes concentrations en glucose sur milieu semi-synthétique (EXL 2 g.L ⁻¹). Culture en réacteur batch	97
Figure IV.9 : Evolution des concentrations en biomasse et en thiolutine en fonction de concentrations en EXL différentes. Culture en réacteur batch	99
Figure IV.10: Cinétiques de production de la thiolutine, de consommation du glucose et de la consommation des ions ammonium. a) le glucose est limitant, l'ammonium n'est pas limitant. b) Le glucose et l'ammonium ne sont pas des facteurs limitant	100
Figure IV.11: Profils de production des dithiopyrrolones sur milieu semi-synthétique. Thiolutine, dithiopyrrolones totales et autres dithiopyrrolones. Pulse de cystine à 5 mM. Culture en réacteur batch	101

Figure IV.12: Cinétiques de production de la thiolutine et de la biomasse. Pulse d'EXL de 10 g.L ⁻¹ . Culture en réacteur batch	103
Figure V.1 : Bilans azote et carbone de l'expérience « 3 GLU ». Culture en réacteur batch	107
Figure V.2: Données expérimentales (exp) et données réconciliées (rec) au cours d'une culture « batch » (« 5 GLU »)	111
Figure V.3 : Représentation schématique de l'enchaînement des différentes séquences du schéma réactionnel par rapport aux évolutions de la biomasse et de la thiolutine	112
Figure V.4 : Evolutions des avancements de réactions	121
Figure V.5 : Conversions nettes (CN) des différents constituants intervenant dans le développement de <i>Sa. algeriensis</i> . Culture « batch » (« 5 GLU »)	125

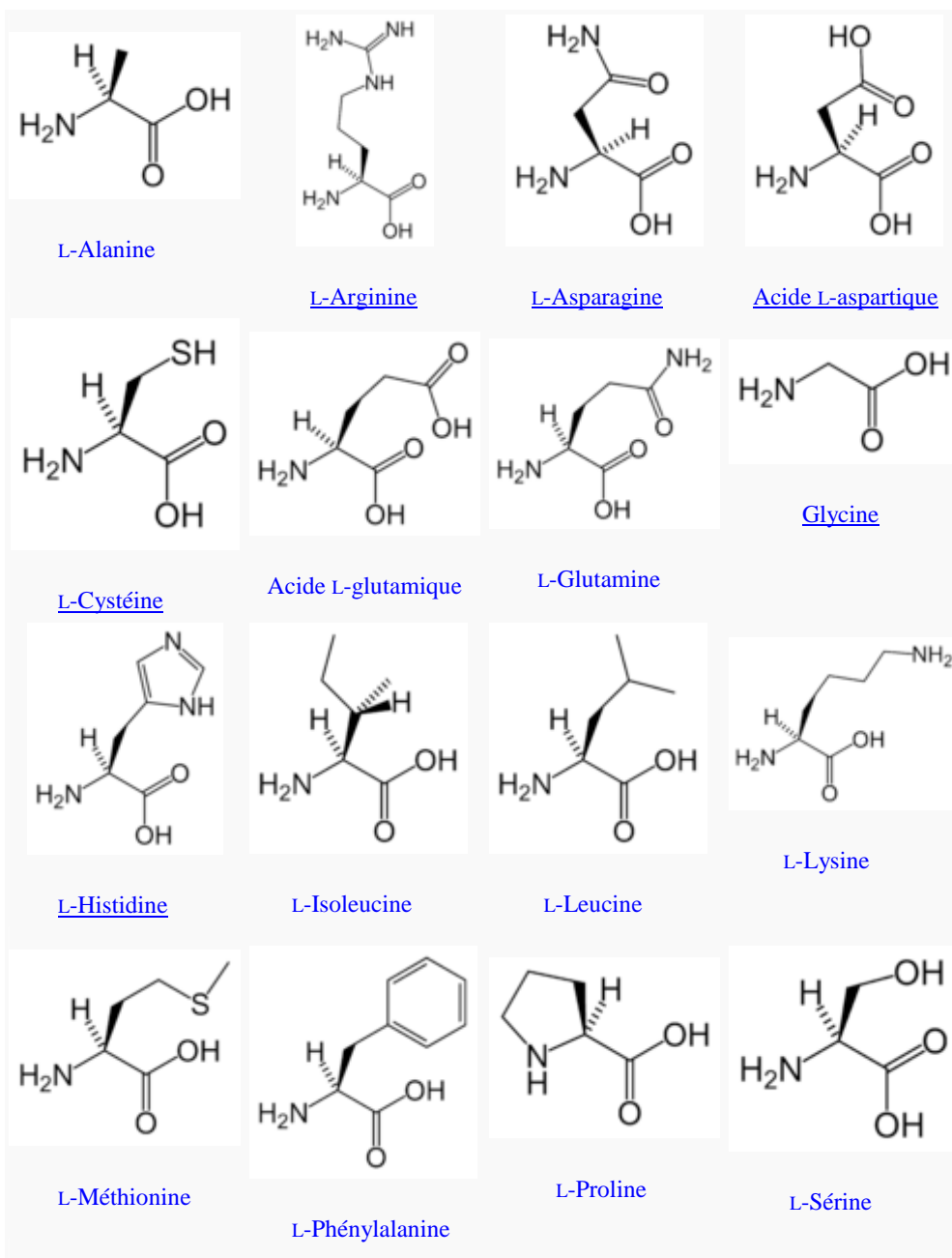
TABLEAUX

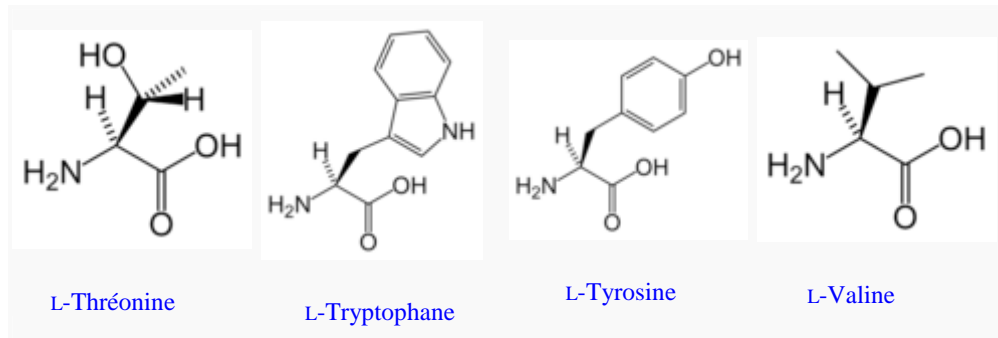
Tableau I.1 Principales substances ayant une activité biologique et synthétisées par les souches appartenant au genre <i>Saccharothrix</i>	27
Tableau I.2 : Microorganismes producteurs de dithiopyrrolones	30
Tableau II.1 : Composition élémentaire de l'extrait de levure utilisé	43
Tableau II.2 : Concentrations en acides aminés libres et en éléments atomiques dans l'extrait de levure utilisé	44
Tableau II.3 : Carbohydrates testés	45
Tableau II.4 : Bases azotées évaluées	45
Tableau II.5 : Acides aminés criblés	46
Tableau II.6 : Composition du mélange d'oligoéléments évalués	46
Tableau II.7 : Conditions d'élutions des dithiopyrrolones par HPLC	53
Tableau III.1 : Effet des différents composés testés sur la croissance de <i>Sa. algeriensis</i>	83
Tableau V.1 : Récapitulatif des expérimentations	106
Tableau V.2 : Erreurs moyennes relatives par rapport aux quantités maximales de carbone et d'azote. Pourcentage de la dérive du bilan carbone au cours des 50 premières heures	108
Tableau V.3 : Formule élémentaire et concentration initiale (μM) des acides aminés apportés par l'extrait de levure	110
Tableau V.4 : Détermination du nombre de coefficients stœchiométriques à identifier par réaction.	114
Tableau V.5 : Coefficients stœchiométriques de la biomasse dans les réactions 1 (x_1) et 3 (x_3). Critère de minimisation	116

Annexes

Annexes

Structure des acides aminés





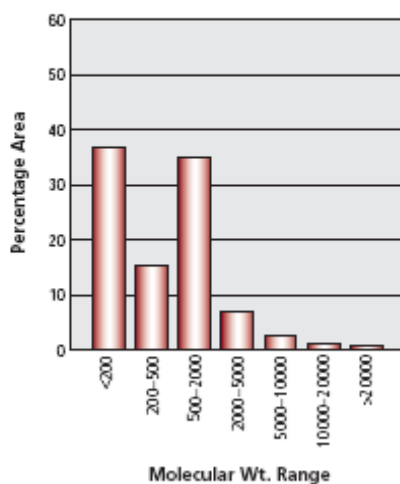
Masse Molaire des acides aminés + Codes à 1 et à 3 lettre(s)

Nom	Code à 1 lettre	Code à 3 lettres	Masse molaire (g.mol ⁻¹)
Alanine	A	Ala	89
Arginine	R	Arg	174
Asparagine	N	Asn	132
Aspartate	D	Asp	133
Cystéine	C	Cys	121
Glutamate	E	Glu	147
Glutamine	Q	Gln	146
Glycine	G	Gly	75
Histidine	H	His	155
Isoleucine	I	Ile	131
Leucine	L	Leu	131
Lysine	K	Lys	146
Méthionine	M	Met	149
Phénylalanine	F	Phe	165
Proline	P	Pro	115
Sérine	S	Ser	105
Thréonine	T	Thr	119
Tryptophane	W	Trp	204
Tyrosine	Y	Tyr	181
Valine	V	Val	117

Principales caractéristiques d'un extrait de levure YEAST EXTRACT BACTO™ (Référence 212750)

Molecular Weights

Bacto Yeast Extract

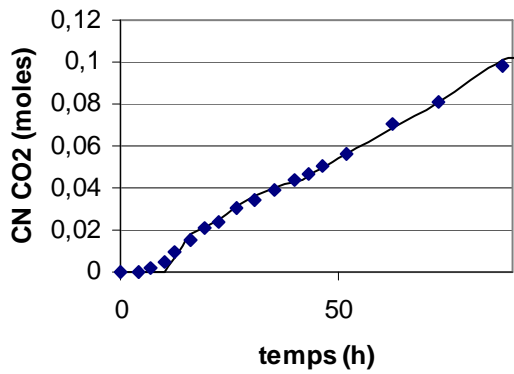
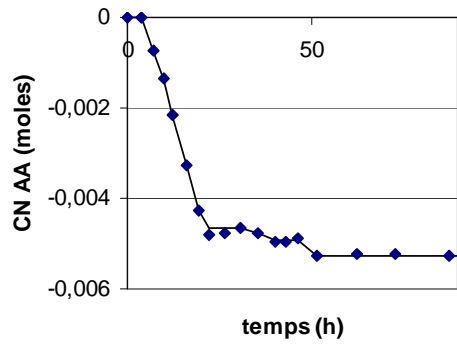
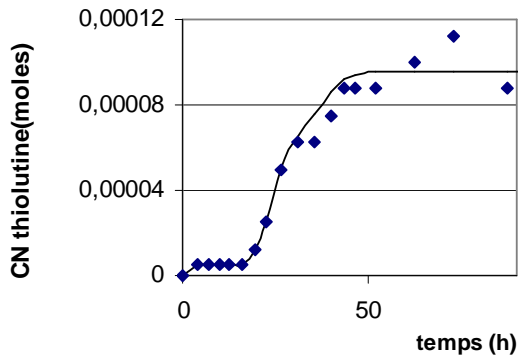
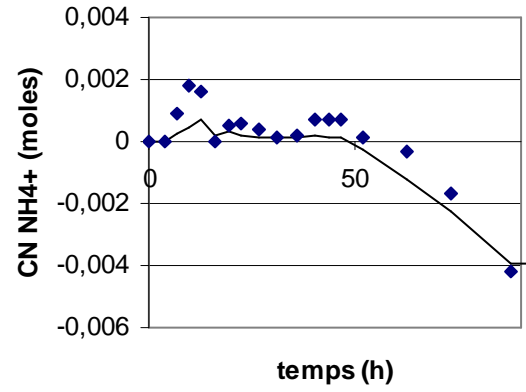
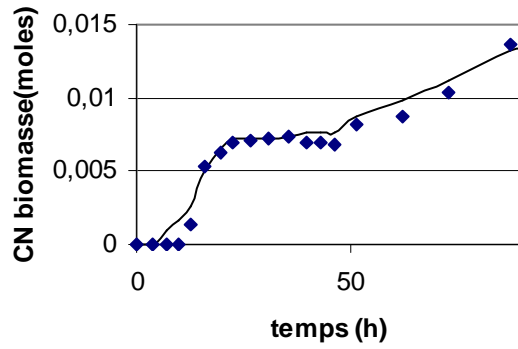
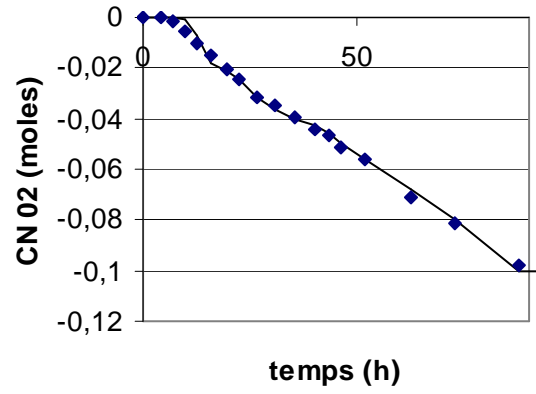
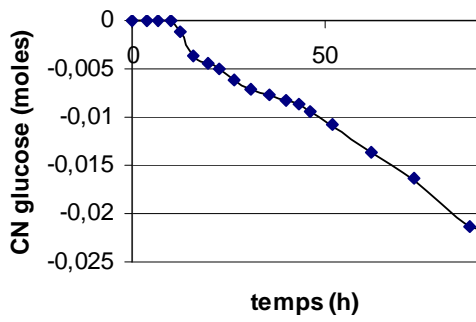


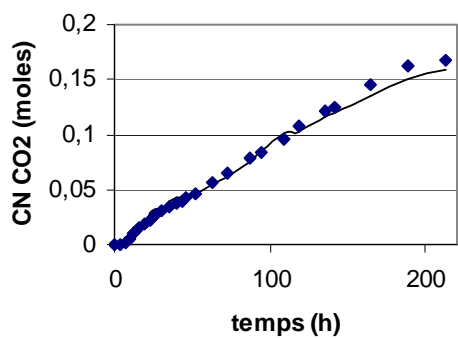
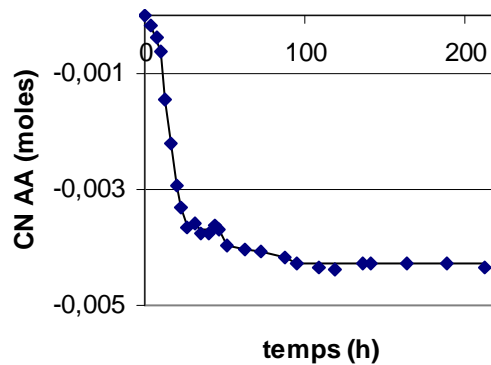
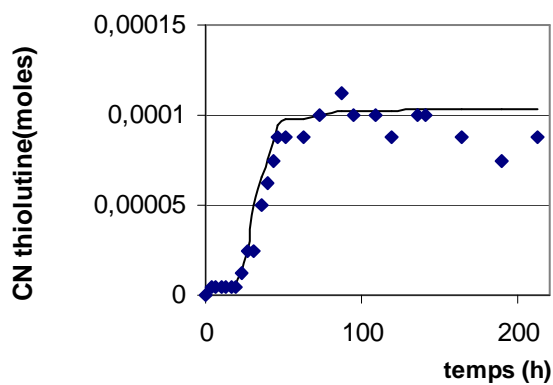
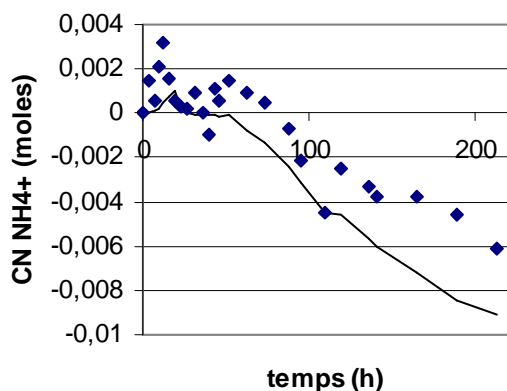
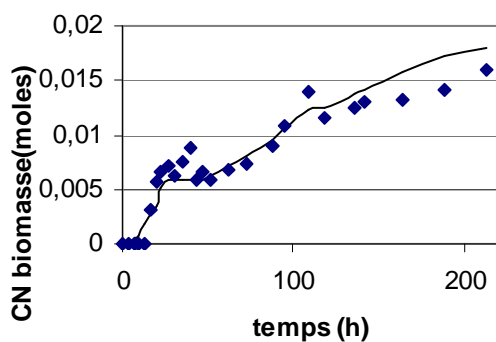
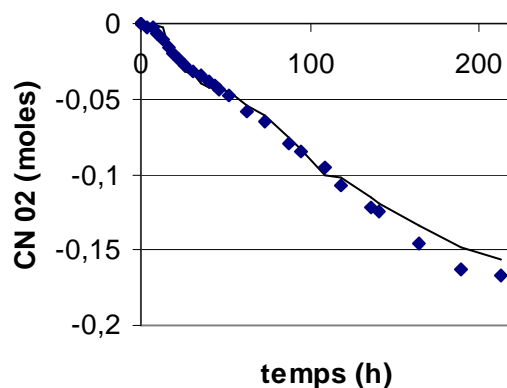
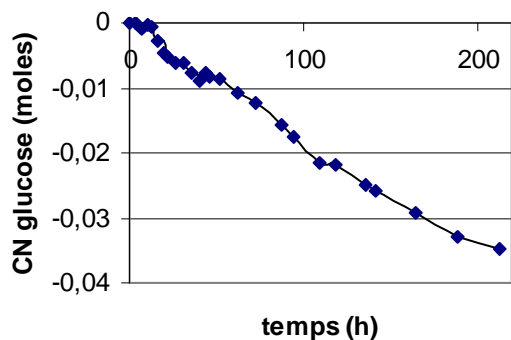
Total Nitrogen (%)	10.9
Amino Nitrogen (%)	6.0
AN/TN	0.55
Total Carbohydrate (mg/g)	163.3
Ash (%)	11.2
Loss on Drying (%)	3.1
NaCl (%)	0.1
pH (2 % Solution)	6.7
Calcium (ug/g)	130
Magnesium (ug/g)	750
Potassium (ug/g)	31950
Sodium (ug/g)	4900
Chloride (%)	0.38
Sulfate (%)	0.09
Phosphate (%)	3.27
Alanine (% Free)	4.4
Alanine (% Total)	5.6
Arginine (% Free)	1.4
Arginine (% Total)	2.6
Asparagine (% Free)	1.0
Aspartic Acid (% Free)	1.6
Aspartic Acid (% Total)	5.3
Cystine (% Free)	0.2

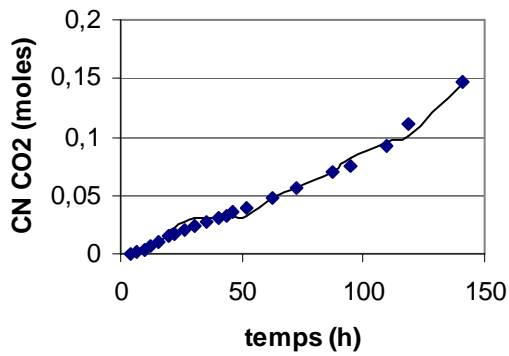
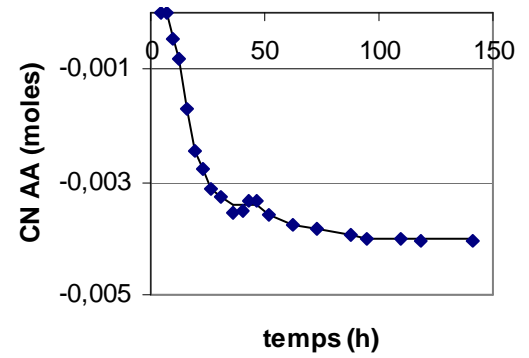
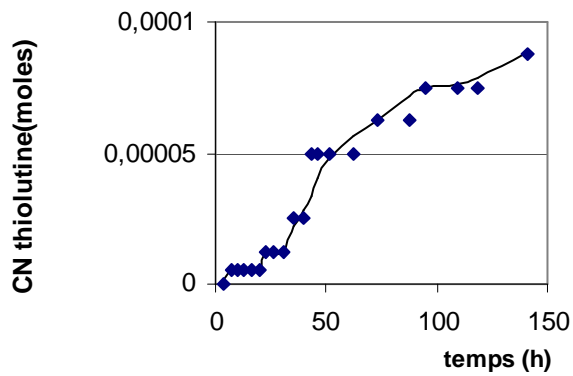
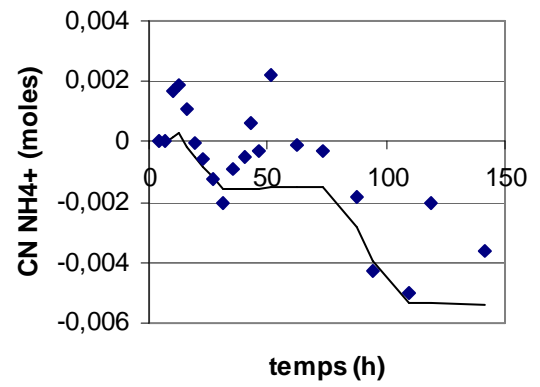
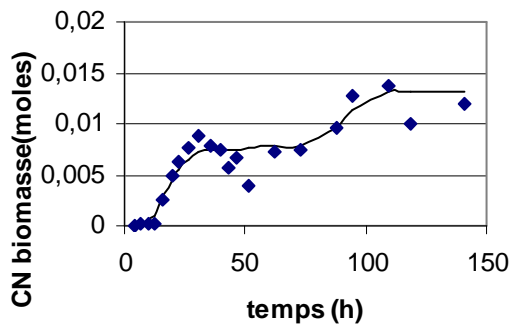
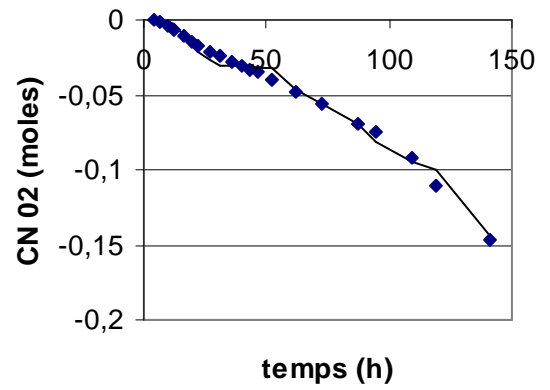
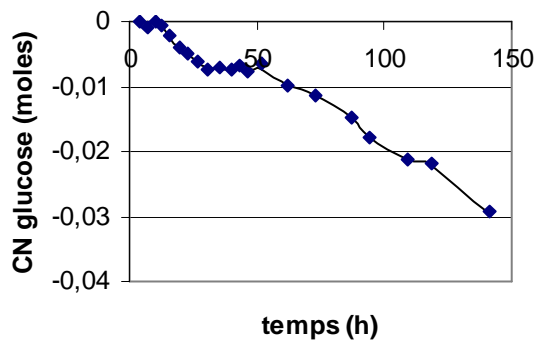
Glutamic Acid (% Free)	6.6
Glutamic Acid (% Total)	9.4
Glutamine (% Free)	0.2
Glycine (% Free)	1.0
Glycine (% Total)	3.0
Histidine (% Free)	0.4
Histidine (% Total)	1.3
Isoleucine (% Free)	1.8
Isoleucine (% Total)	3.0
Leucine (% Free)	3.0
Leucine (% Total)	4.1
Lysine (% Free)	1.9
Lysine (% Total)	4.6
Methionine (% Free)*	0.6
Methionine (% Total)	0.8
Phenylalanine (% Free)	2.0
Phenylalanine (% Total)	2.6
Proline (% Free)	0.8
Proline (% Total)	2.0
Serine (% Free)	1.3
Serine (% Total)*	1.6
Threonine (% Free)	1.1
Threonine (% Total)	1.6
Tryptophan (% Free)	0.5
Tyrosine (% Free)	0.8
Tyrosine (% Total)	1.2
Valine (% Free)	2.2
Valine (% Total)	3.5

Données réconciliées versus données simulées

Expérience «3 GLU» Extrait de levure : 2 g.L^{-1}
Glucose : 3 g.L^{-1}





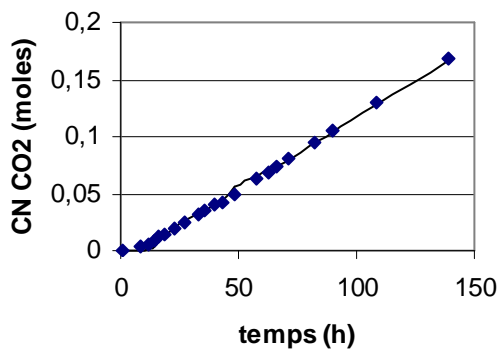
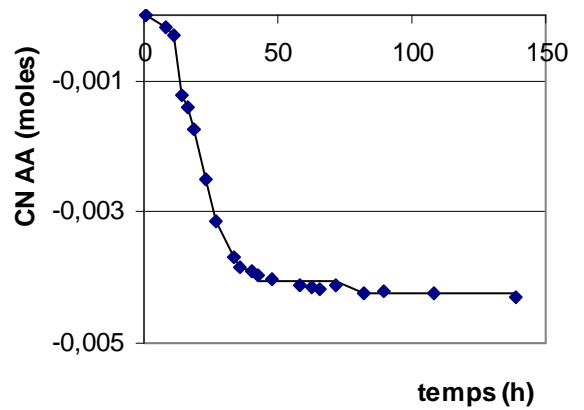
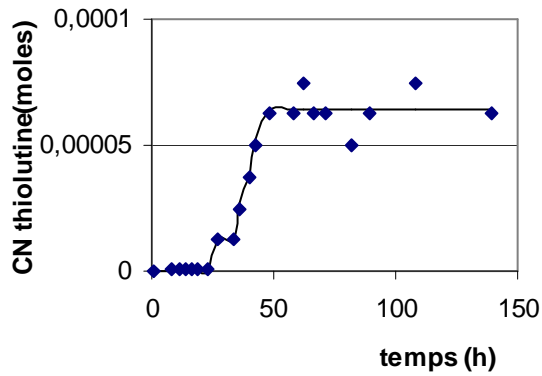
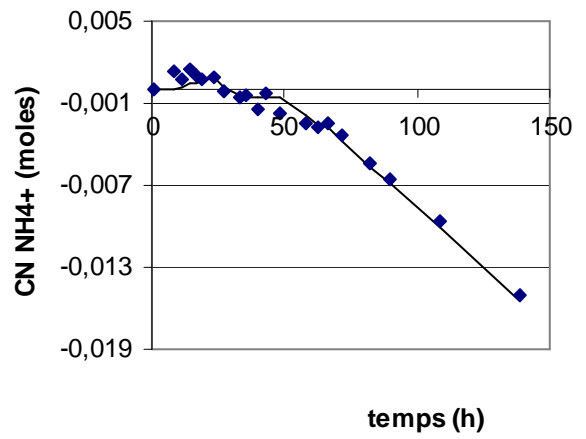
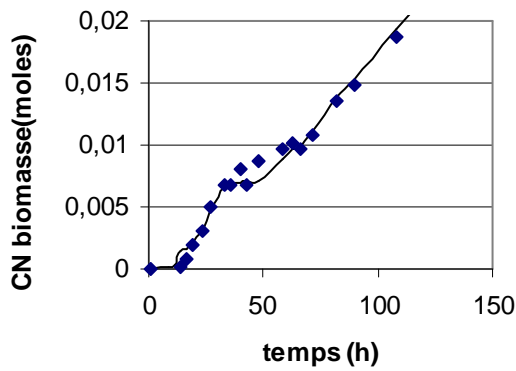
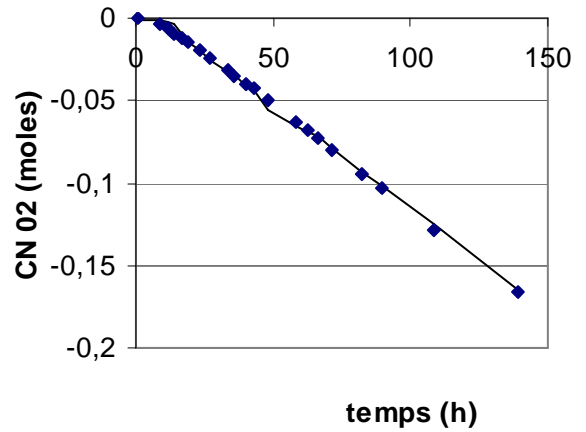
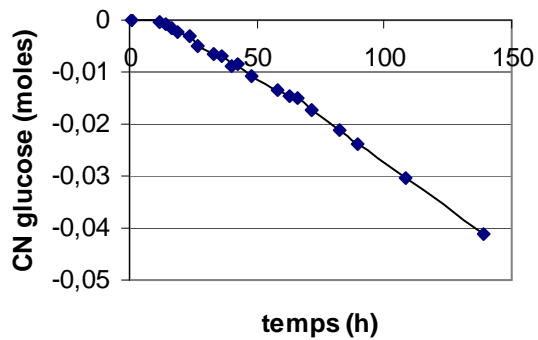


Expérience «Benzo»

Extrait de levure : 2 g.L⁻¹

Glucose : 15 g.L⁻¹

Acide benzoïque : 5 mM

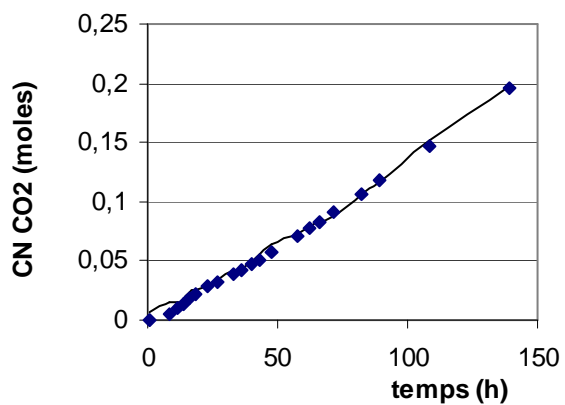
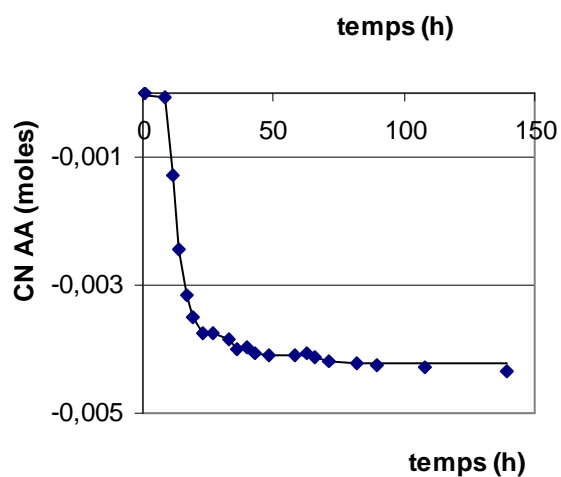
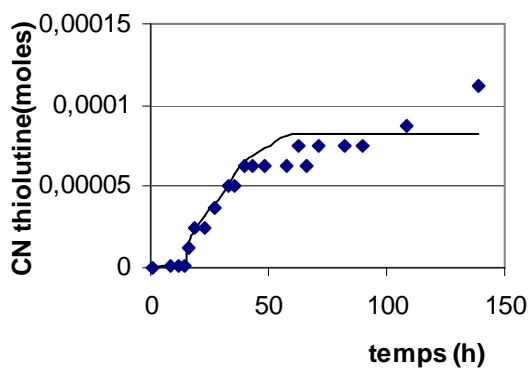
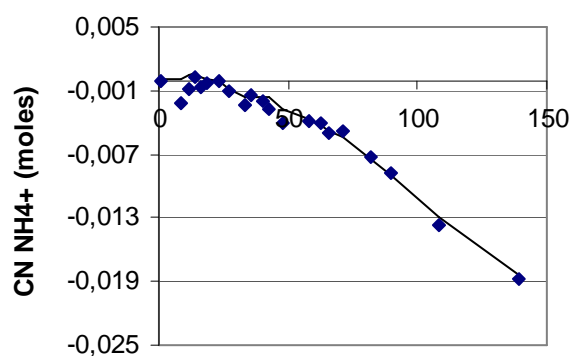
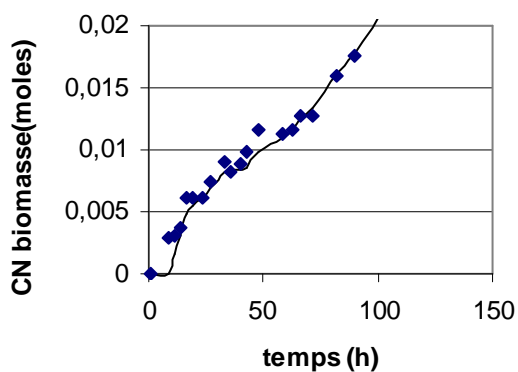
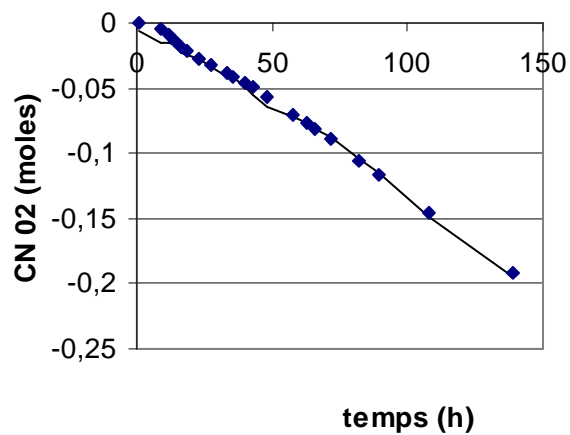
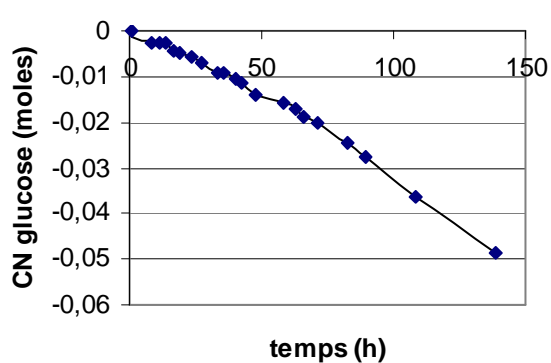


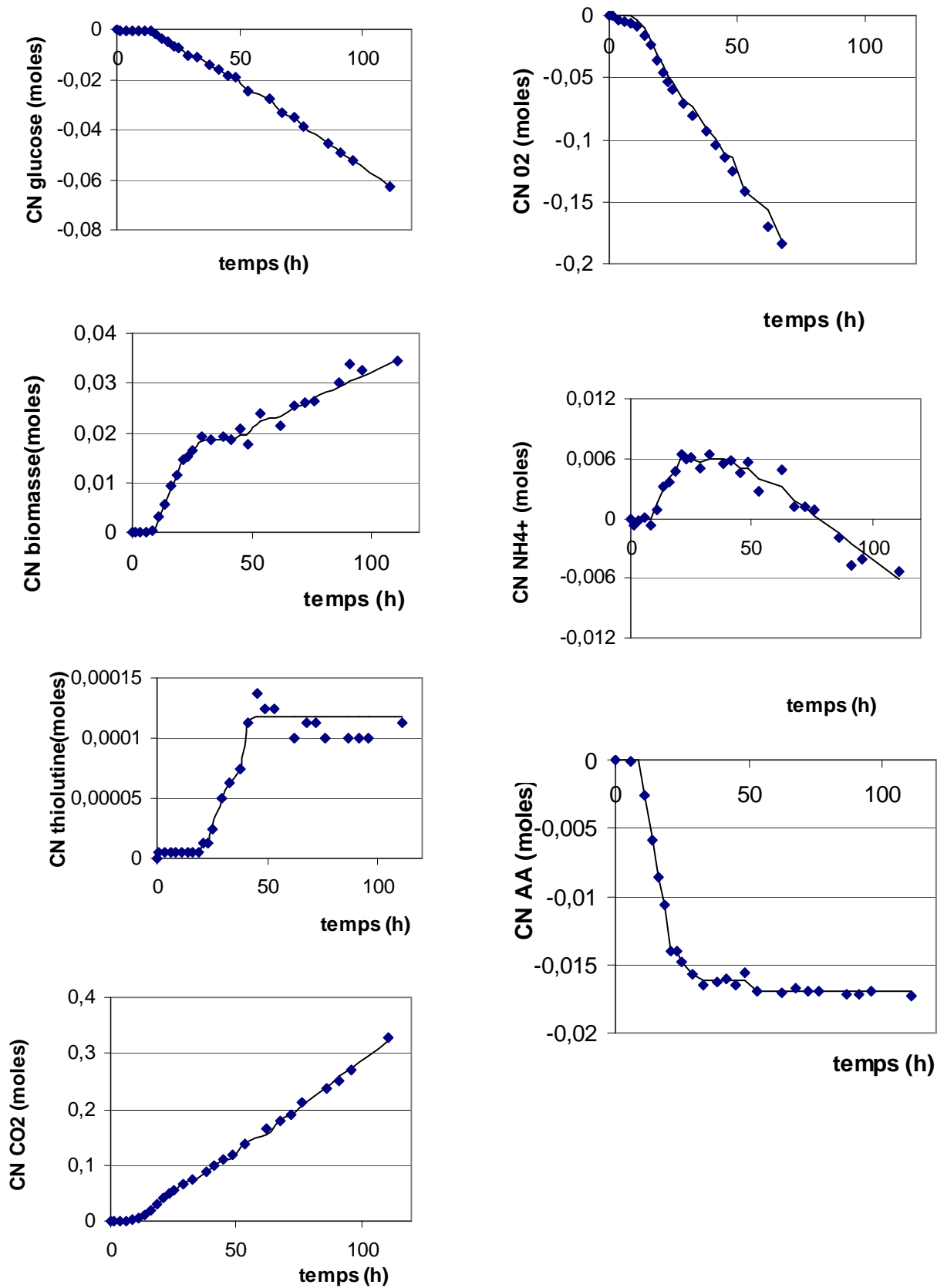
Expérience « BenzoP »:

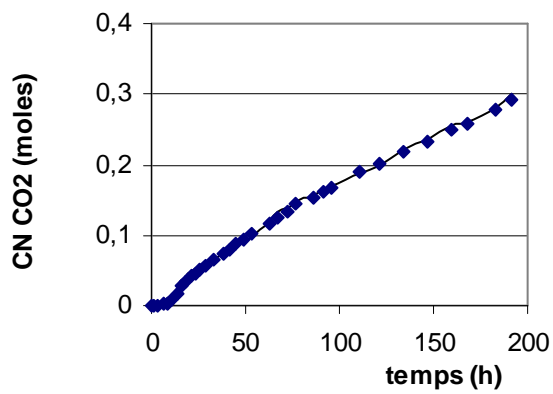
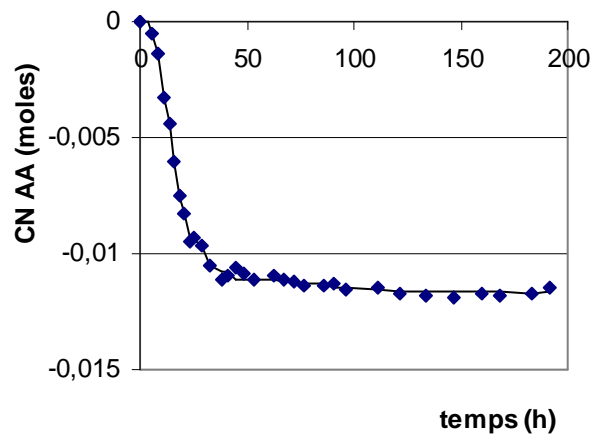
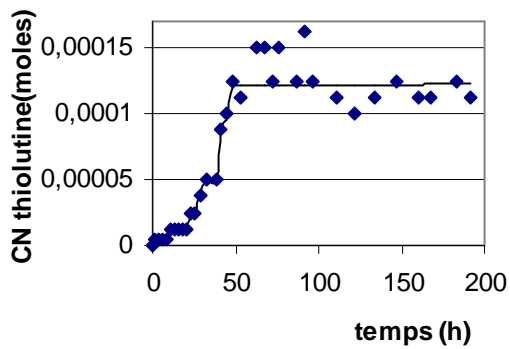
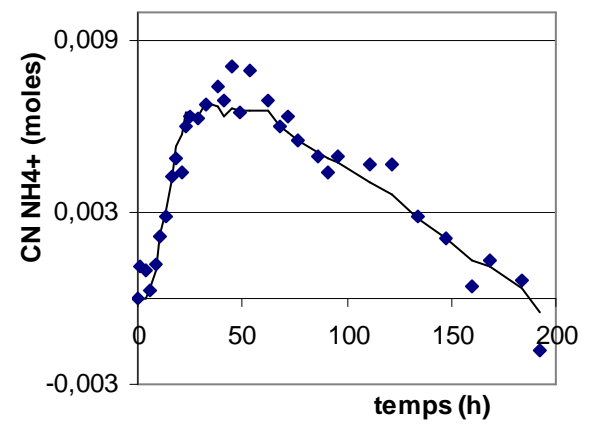
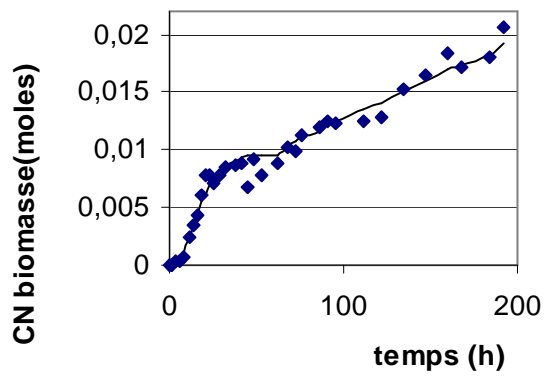
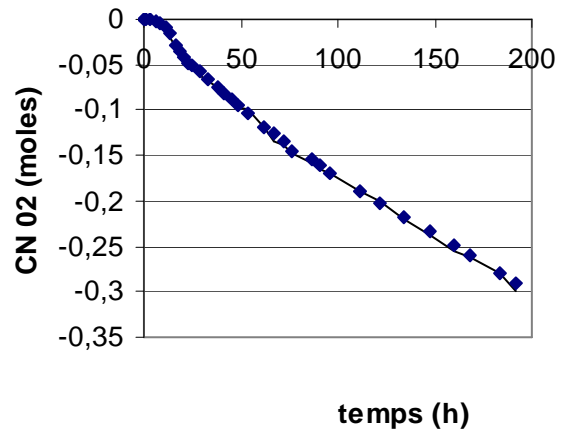
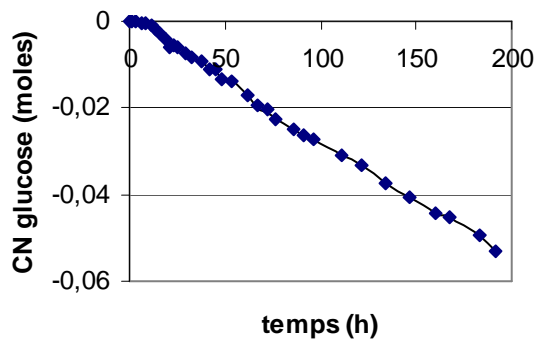
Extrait de levure : 2 g.L⁻¹

Glucose : 15 g.L⁻¹

Acide benzoïque : 5 mM

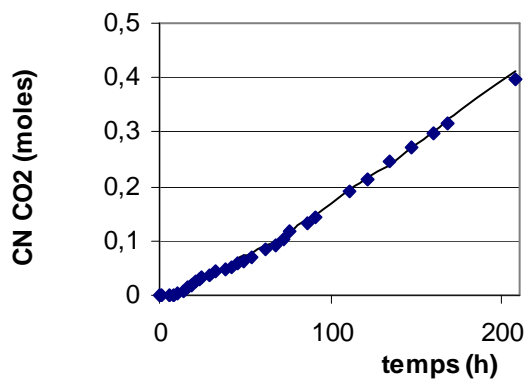
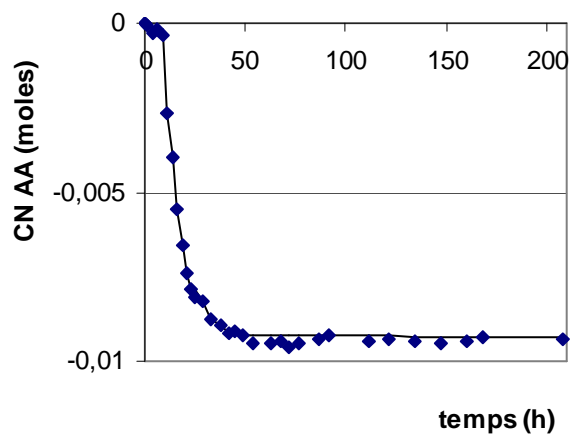
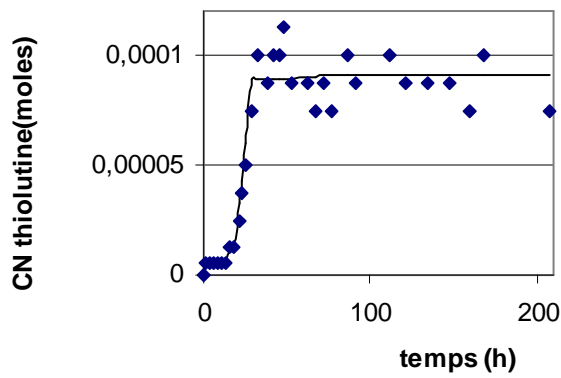
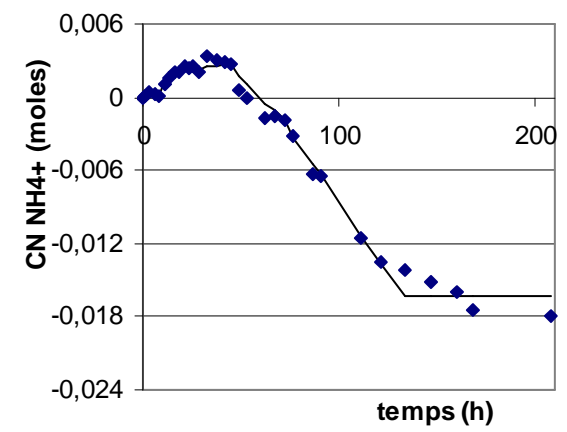
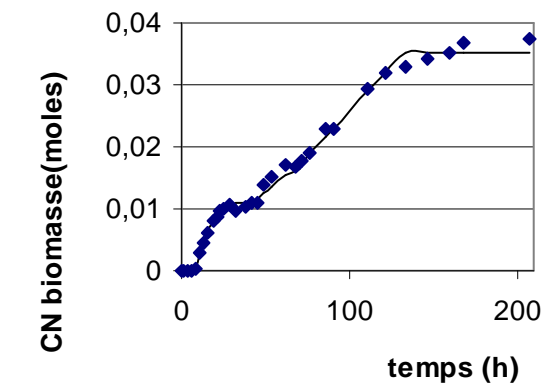
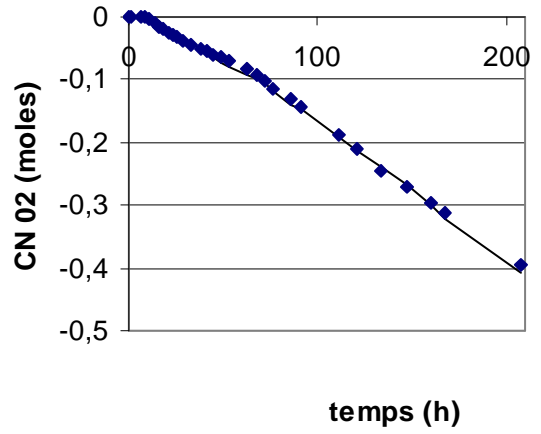
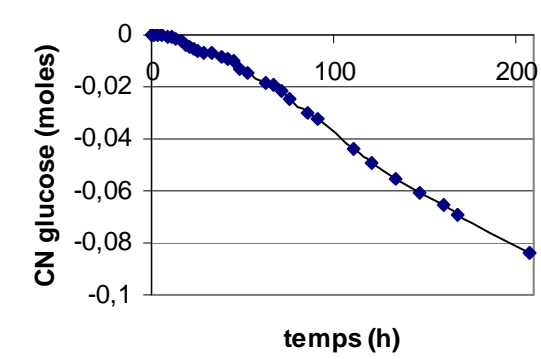






Expérience « 2+2 EXL »

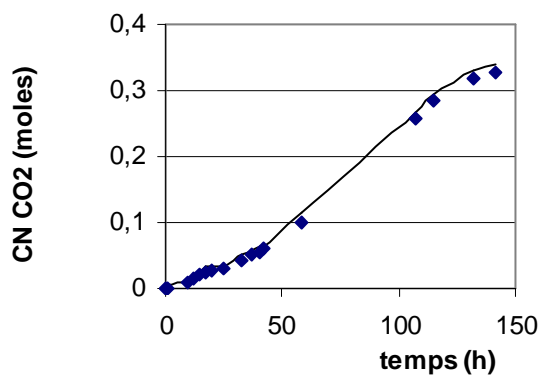
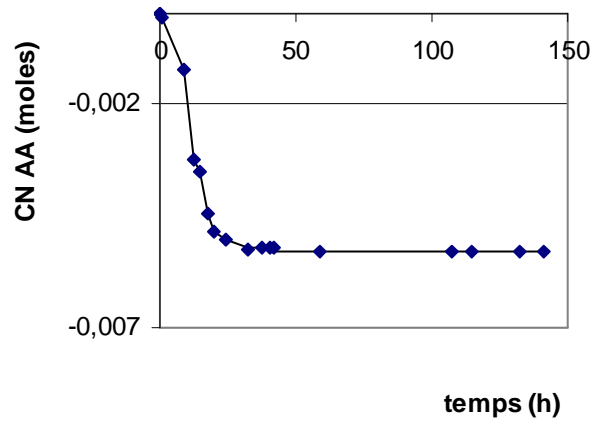
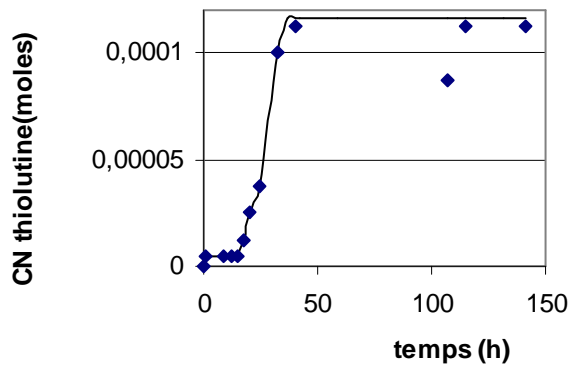
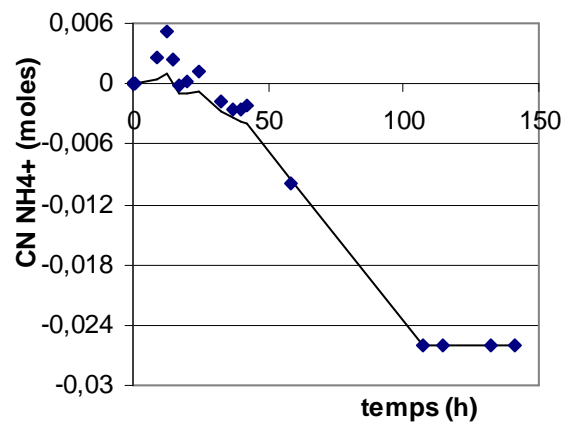
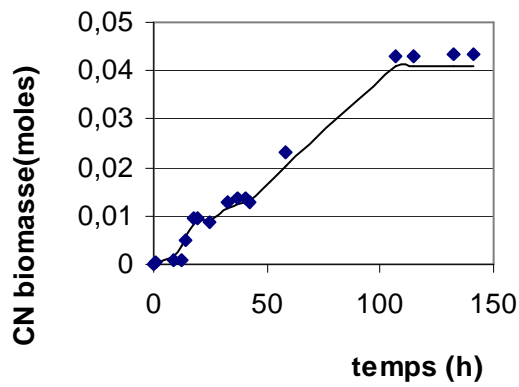
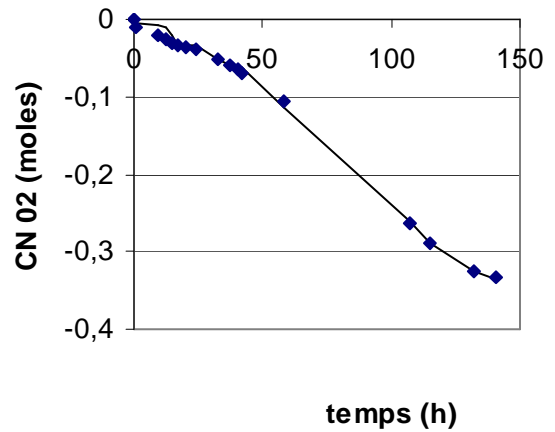
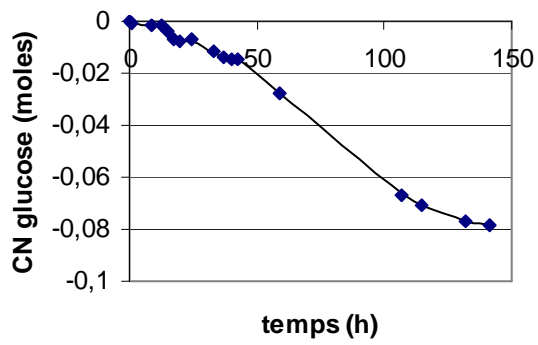
Extrait de levure : 2 g.L⁻¹
Equivalent « acides aminés »: 2 g.L⁻¹
Glucose : 15 g.L⁻¹

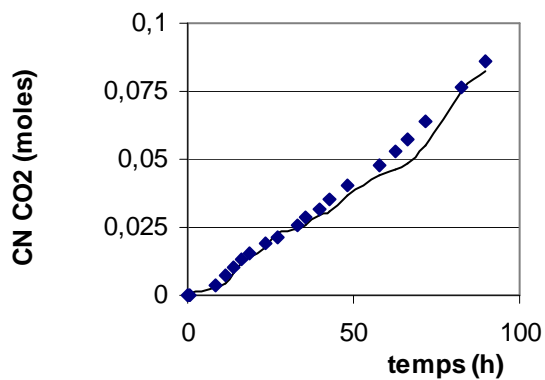
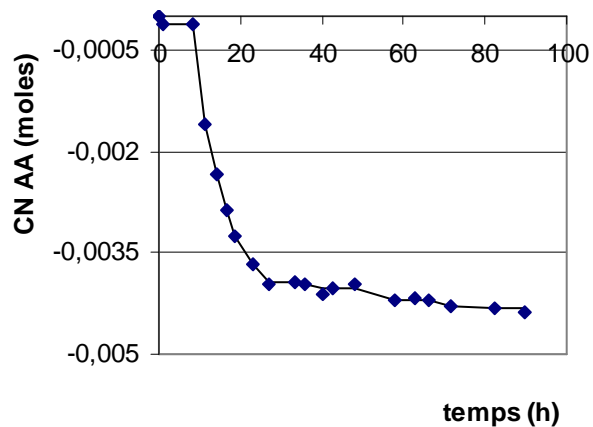
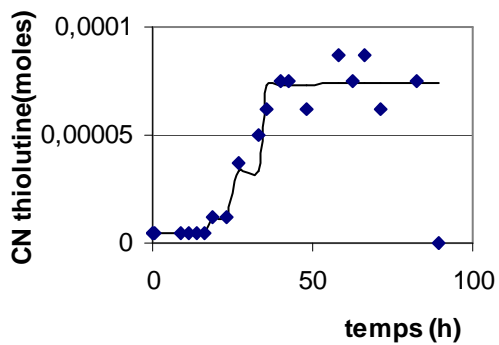
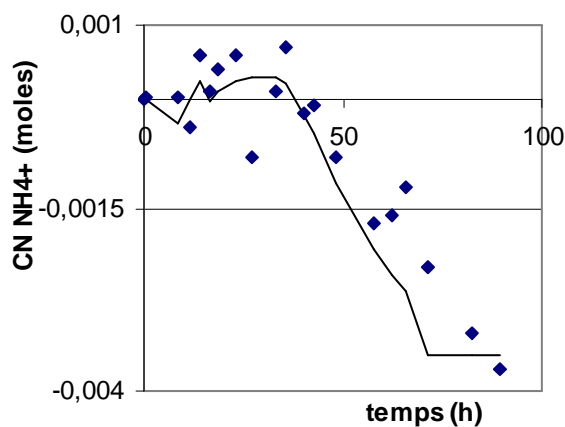
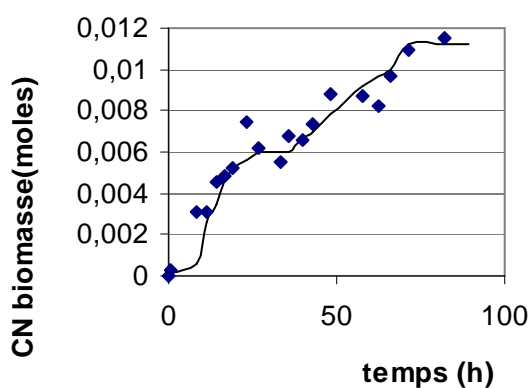
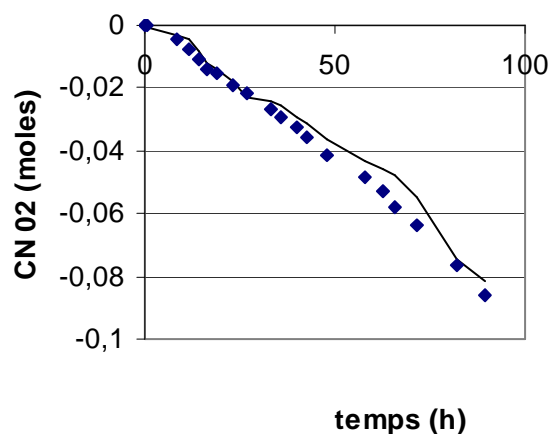
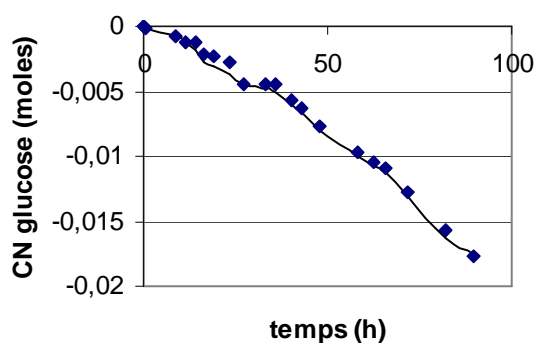


Expérience « 2U »

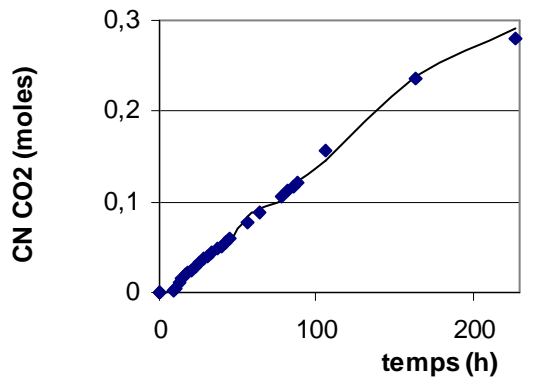
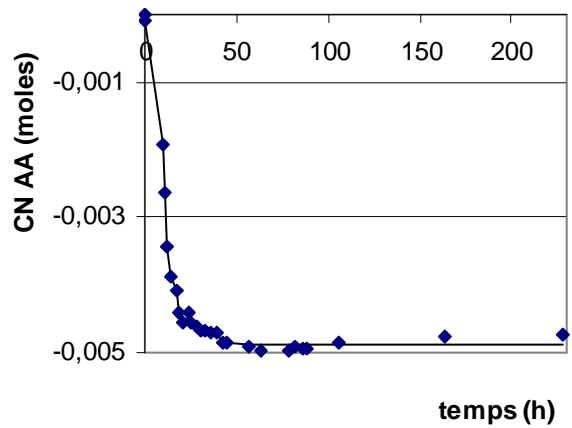
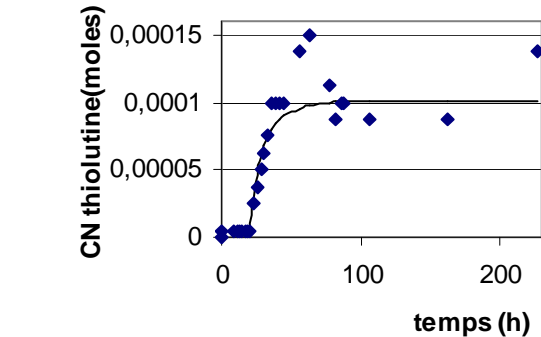
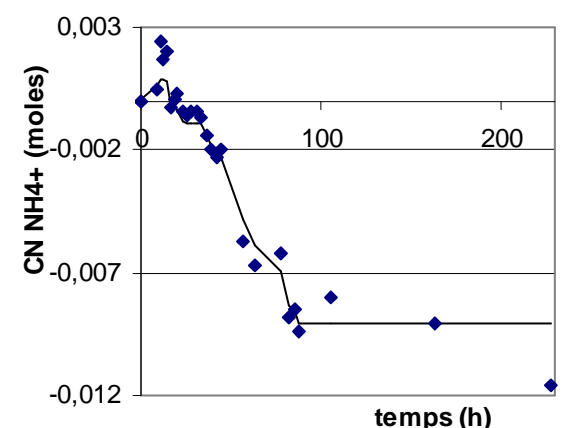
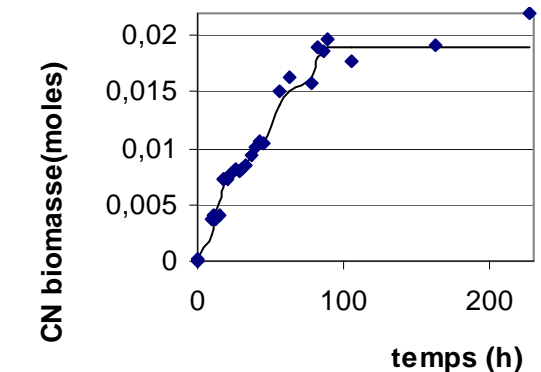
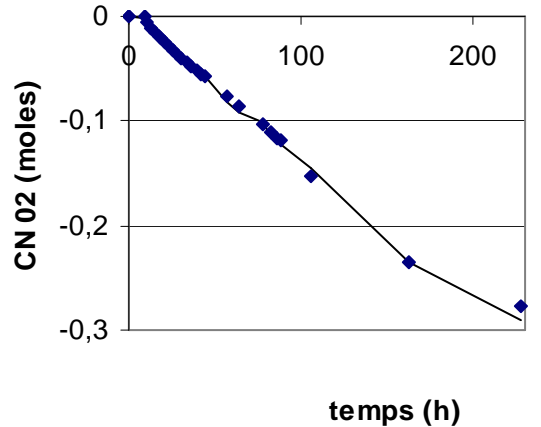
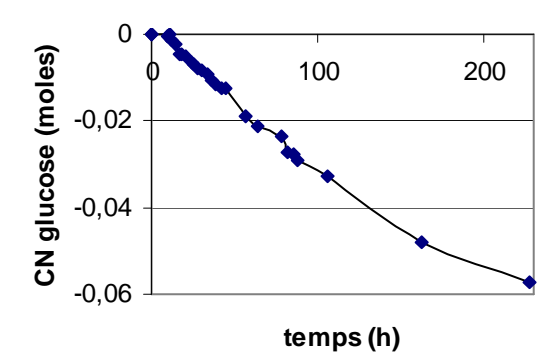
Extrait de levure : 2 g.L⁻¹

Glucose : 15 g.L⁻¹





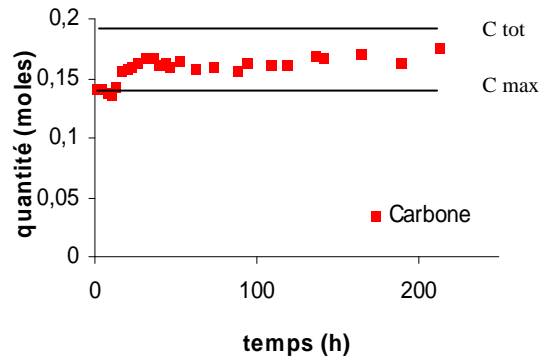
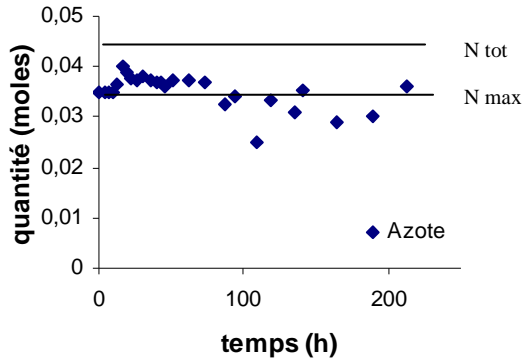
« EXL2 » Extrait de levure : 2 g.L⁻¹
 Glucose : 15 g.L⁻¹



Bilans Azote et Carbone

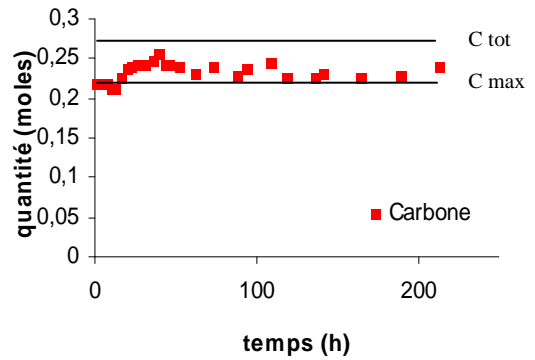
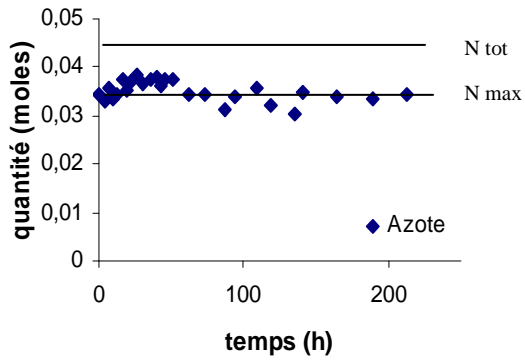
Expérience «3 GLU»

Extrait de levure : 2 g.L⁻¹
Glucose : 3 g.L⁻¹



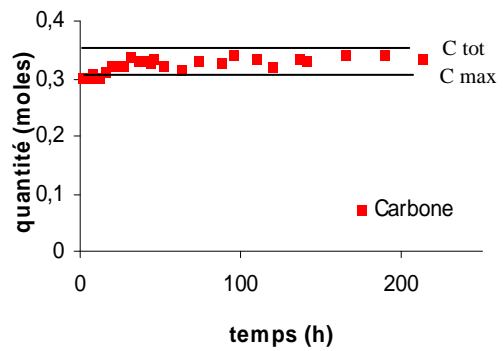
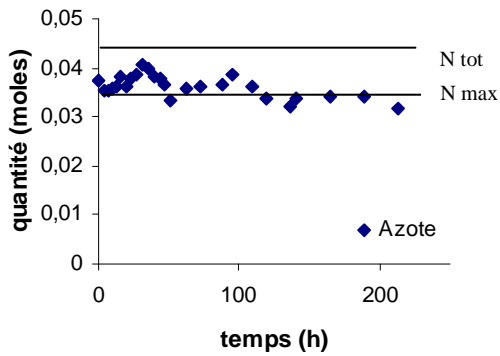
Expérience «5 GLU»

Extrait de levure : 2 g.L⁻¹
Glucose : 5,5 g.L⁻¹



Expérience «8 GLU»

Extrait de levure : 2 g.L⁻¹
Glucose : 8 g.L⁻¹

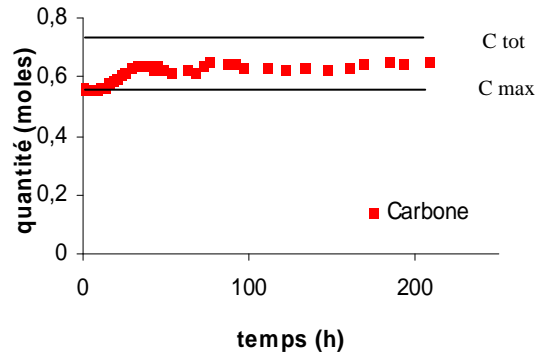
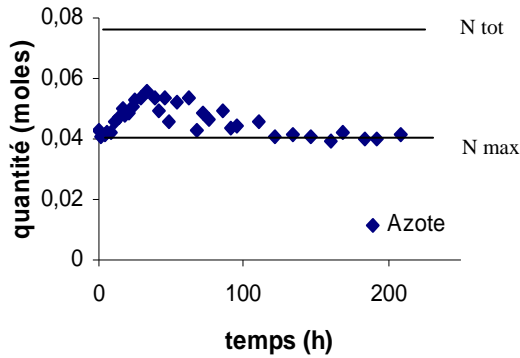


Expérience «6 EXL»

Extrait de levure : 6 g.L⁻¹

Uracile : 20 mM

Glucose : 15 g.L⁻¹

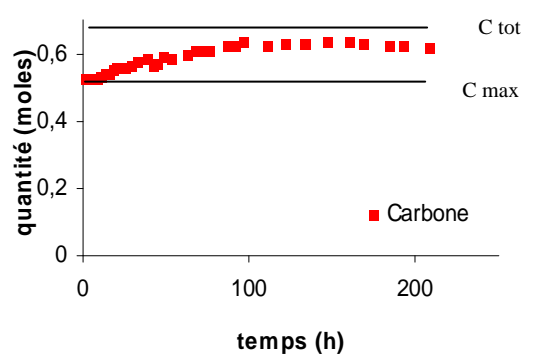
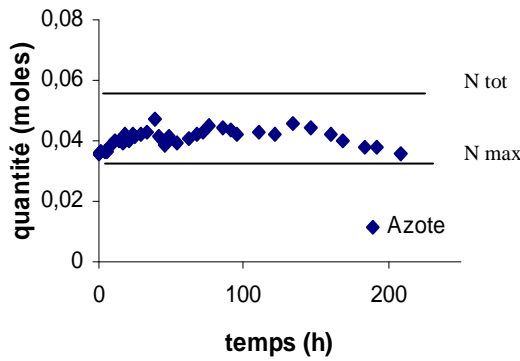


Expérience «4 EXL»

Extrait de levure : 4 g.L⁻¹

Uracile : 20 mM

Glucose : 15 g.L⁻¹

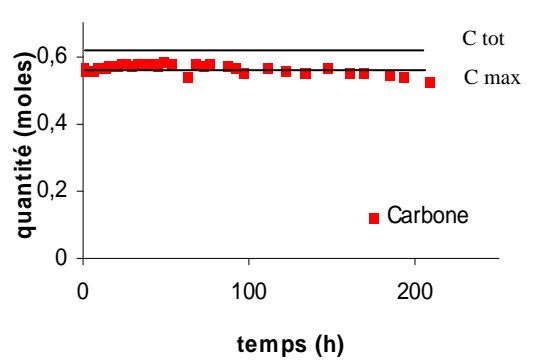
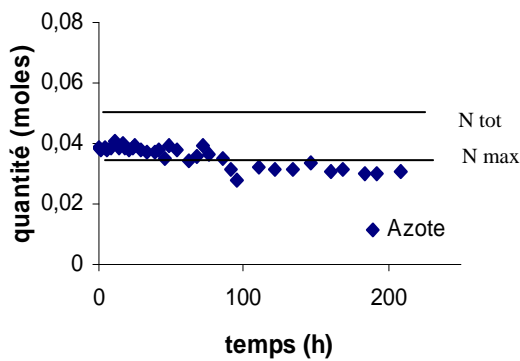


Expérience «2+2 EXL»

Extrait de levure : 2 g.L⁻¹

Equivalent « acides aminés »: 2 g.L⁻¹

Uracile : 20 mM Glucose : 15 g.L⁻¹

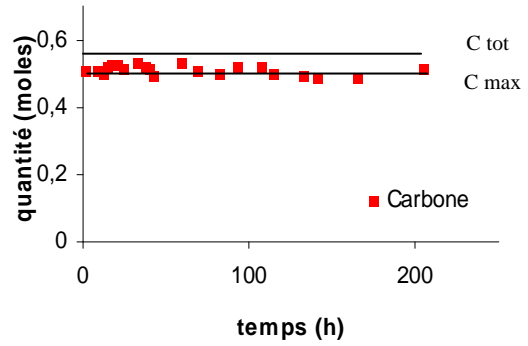
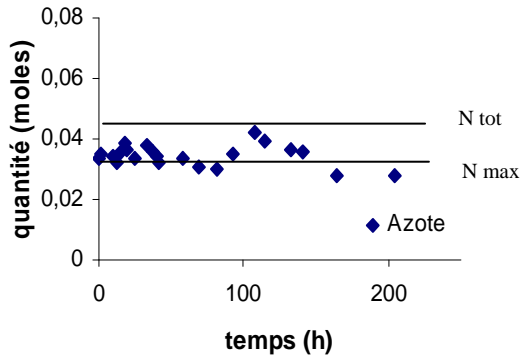


Expérience «2U»

Extrait de levure : 2 g.L⁻¹

Uracile : 20 mM

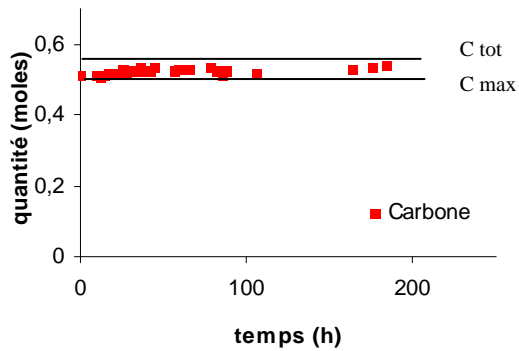
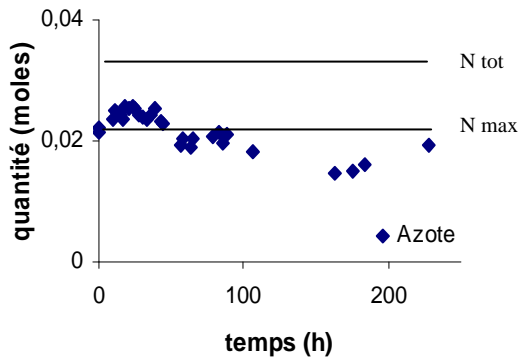
Glucose : 15 g.L⁻¹



Expérience «EXL2»

Extrait de levure : 2 g.L⁻¹

Glucose : 15 g.L⁻¹

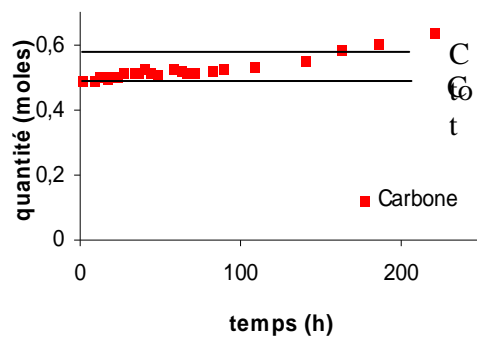
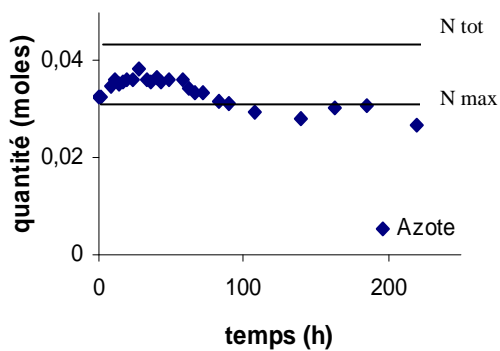


Expérience «2UBIS»

Extrait de levure : 2 g.L⁻¹

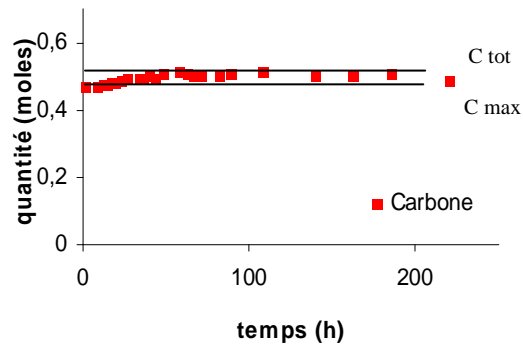
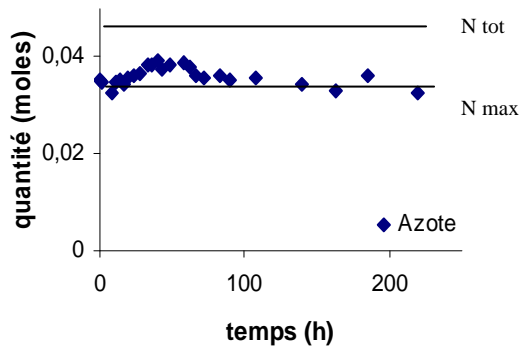
Uracile : 20 mM

Glucose : 15 g.L⁻¹



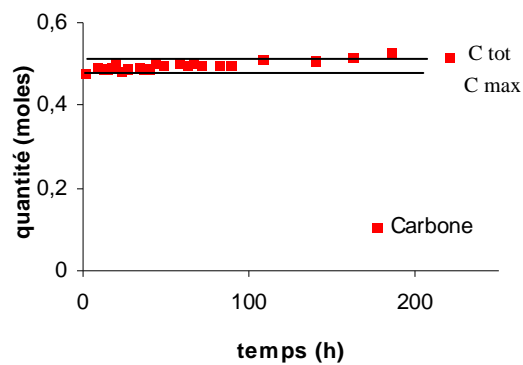
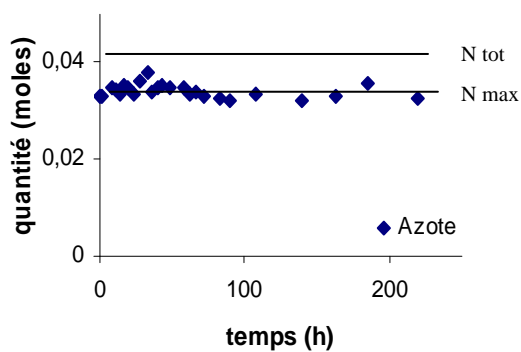
Expérience « Benzo »

Extrait de levure : 2 g.L⁻¹
Uracile : 20 mM
Acide benzoïque : 5 mM
Glucose : 15 g.L⁻¹



Expérience « BenzoP »

Extrait de levure : 2 g.L⁻¹
Uracile : 20 mM
Acide benzoïque : 5 mM
Glucose : 15 g.L⁻¹



**Résumé
&
Abstract**

Résumé

La production de nouvelles molécules bioactives est actuellement une préoccupation importante au plan mondial du fait de la prolifération de microorganismes pathogènes ayant développé une résistance aux molécules actuelles. Dans ce contexte, une bactérie isolée du sol saharien, *Saccharothrix algeriensis*, fait l'objet de cette étude. Elle a la capacité de produire des molécules aux potentialités bio-actives remarquables : les dithiopyrrolones.

L'objectif du travail se concentre sur les aspects macroscopiques de l'analyse du comportement du microorganisme en milieu liquide en vue du développement d'un procédé de bioproduction. Une première étape a consisté en la recherche d'un milieu de culture chimiquement maîtrisé. Afin de s'affranchir de l'utilisation d'extrait de levure, substrat difficilement maîtrisable, l'influence de la teneur en différentes bases azotées, acides aminés et oligoéléments sur la croissance a été étudiée. L'uracile et la thymine, les acides aminés non polaires ainsi que les oligoéléments favorisent la croissance de *Saccharothrix algeriensis*. Le milieu synthétique donnant les meilleurs résultats en terme de croissance et de production d'antibiotique a été testé en fermenteur « batch » de 2 L équipé d'un analyseur gaz autorisant une étude cinétique plus fine et un environnement physico-chimique maîtrisé. L'analyse qualitative des fermentations a montré que sur milieu contenant plusieurs substrats, la bactérie consomme les nutriments séquentiellement. Sa croissance apparaît diauxique. La synthèse des dithiopyrrolones semble découplée de la croissance de la souche. Cette analyse qualitative a permis d'établir un schéma réactionnel décrivant la croissance de *Saccharothrix algeriensis* en milieu semi-synthétique. L'analyse factorielle des données cinétiques a permis de décrire raisonnablement le comportement du microorganisme en 4 réactions.

Mots clés : microorganisme filamenteux, métabolisme secondaire, modélisation stœchiométrique, schéma réactionnel, *Saccharothrix algeriensis*, dithiopyrrolones, thiolutine, milieu semi-synthétique.

Abstract

Nowadays, production of new bioactive molecules is an important concern around the world. Due to development of bacterial resistance to antibiotics, investigations are performed to discover rare bacteria, which can produce such bioactive molecules. In view of this, *Saccharothrix algeriensis*, a bacterium isolated from Sahara desert, is here studied. It produces molecules with noteworthy bioactive potentialities: the dithiolopyrrolones.

The objective of this study focuses on the macroscopic aspects of the micro-organism behaviour in liquid medium, in order to develop a bio-production process. A first step has consisted in the research of a chemically defined medium. So as to avoid used of yeast extract, which is a difficult substrate to control, the effect of nucleobases, amino acids, and oligoelements on its growth has been investigated. Uracil and thymine, non polar amino acids and oligoelements had a positive impact on *Saccharothrix algeriensis* growth. The synthetic medium, which allows the best bacterial growth and antibiotic production, has been tested in 2 L batch fermentor. It is connected to a gas analyser, which allows an accurate kinetic study and provides a controlled physicochemical environment to the micro-organism. Qualitative analysis of the cultures has shown that, on a medium which contains several substrates, the bacterium sequentially consumes the nutrients. Bacterial growth seems to be diauxic. Dithiolopyrrolone synthesis seems to be uncoupled with the growth of the stain. This quantitative analysis has allowed to establish a reaction scheme, which describes *Saccharothrix algeriensis* growth on semi-synthetic medium. Factor analysis of kinetic data had reasonably lead to a description of *Saccharothrix algeriensis* behaviour in 4 reactions

Keywords: filamentous microorganisms, secondary metabolism, stoichiometric modelisation, reaction scheme, *Saccharothrix algeriensis*, dithiolopyrrolones, thiolutine, semi-synthetic medium.

Communications scientifiques

Investigations of *Saccharothrix algeriensis* Growth on Synthetic Media

Running title: SYNTHETIC MEDIA FOR *S. ALGERIENSIS*

Caroline Strub,¹ Cédric Brandam,¹ Xuan Meyer,¹ and Ahmed Lebrihi^{2*}

Université de Toulouse, Laboratoire de Génie Chimique, UMR CNRS-INPT 5503, Institut National Polytechnique de Toulouse BP 34038, 6 allée Emile Monso, 31029 Toulouse cedex 4, France¹ and Université de Toulouse, Laboratoire de Génie Chimique, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, 1 avenue de l'agrobiopôle, BP 32607 Auzeville-Tolosane, F 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France²

Received 12 February 2008/Accepted 7 May 2008

[Key words: actinomycete, dithiopyrrolone, nucleobase consumption, amino acid consumption, synthetic medium optimization, traces metal elements]

*Corresponding author. [e-mail: lebrihi@ensat.fr](mailto:lebrihi@ensat.fr)

phone: +33-5-62-19-39-44 fax: +33-5-62-19-39-44

Abstract

Development of bacterial resistance to antibiotics has led to investigations of rare bacteria, which produce new bioactive molecules. *Saccharothrix algriensis* has been isolated from the desert Maghreb. It produces dithiopyrrolones, some of which were newly identified. In order to optimize and control production of dithiopyrrolones, investigation regarding microorganism metabolism was required. Growth on semisynthetic medium containing $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ of yeast extract was complicated because it was performed on several substrates. Moreover, because development of this bacterium on minimum medium was difficult, its composition was optimized by screening of different compounds led by yeast extract. Uracil added to the minimum medium allowed a maximum biomass production of $1.35 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ compared to $0.32 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ without uracil. Moreover, nonpolar amino acids and trace metal elements stimulated *Saccharothrix algeriensis* growth.

Introduction

Antibiotic resistance has been increasing rapidly during the last decade (1, 2). This phenomenon is problematic, especially in a hospital environment where multiple antibiotic resistant bacteria such as *Staphylococcus aureus* appear (3). Two main solutions to overcome this problem are: better use of antibiotics and reduction of their consumption, and identification of new bioactive molecules. In this study, *Saccharothrix algeriensis*, a bacterium belonging to the actinomycetes family and producing dithiopyrrolone, a new class of antibiotics, was isolated from Saharan soils of Algeria (4).

These antibiotics are also known to have anticancer and anti-allergic activities (Stahl, P., Seidel, H., Von der Eltz, H., Wilhelms, O.H. and Roesch, A., U.S. Patent 1988-4760077, 1988 and Webster, J.M., Li, J. and Chen, G., U.S. patent 2000-6020360, 2000). Recently, it was found that *S. algeriensis* is able to produce at least five dithiopyrrolone antibiotics containing N-acyl derivatives of 6-amino-4,5-dihydro-4-methyl-5-oxo-1,2-dithiolo [4,3-b] pyrrole: thiolutine, seneciroyl-pyrrothine (SEP), tigloyl-pyrrothine (TIP), isobutyryl-pyrrothine (ISP), butanoyl-pyrrothine (BUP) and benzoyl-pyrrothine (5, 4) as shown in Fig.1.[Remark 5] TIP and SEP are produced only by *S. algeriensis*. The dithiopyrrolone core consists of two 5-membered heterocycles: a dithiol cycle and a pyrrole cycle linked to a radical by nitrogen 4

and 7 (Fig. 1). The cyclical core results from the cyclization of cystine (6). Each association with radical-nucleus grants the dithiopyrrolone different properties.

Previous studies showed the influence of the composition of culture medium on the production of derivatives. Thus, the addition of tiglic and benzoic acids multiplied the production of specific TIP and thiolutine by nine-fold and at least ten-fold, respectively (7). It was also shown that the addition of different amino and organic acids can induce the synthesis of 18 new dithiopyrrolones.

Two separate approaches exist to increase the biomolecule concentration of microbial productions. The first approach is to improve the specific production of the bioactive molecule of interest and the next is to increase the total biomass production. The first approach has already been investigated; previous studies carried out on this bacterium (8, 9) have focused on the specific production of these secondary metabolites. As antibiotic production is easily induced by the addition of various organic acids, we focused on increasing the growth of *S. algeriensis* in the present manuscript.

The present work proposes to define a synthetic-medium devoid of yeast extract (YE), to explore the development of *S. algeriensis* from a qualitative and quantitative point of view. Thus, carbohydrates, amino acids, and nucleobases were screened on minimum medium to develop a synthetic media. Moreover, the influence of trace elements was assessed.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism and flasks culture conditions

S. algeriensis NRRL B-24137 was used as the study bacterium. Microbial spores were obtained from solid culture on petri dishes filled with conservation medium. They were maintained in 25% glycerol at -20°C . A 100 ml volume of semi-synthetic medium was inoculated by 3.5 ml of this suspension and incubated on a rotary shaker (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) at 250 rotation per minute (rpm) at 30°C for 52 h. Five ml of the resulting preculture was used to inoculate each culture. Before inoculation, the pH was adjusted to 7 by addition of $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH. Cultures were performed in 500 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of medium under the same conditions. They were carried out in, at a minimum, duplicate for at least 200 h.

Media composition

Sporulation and conservation medium: ISP2 had the following composition (per liter of distilled water): malt extract, 10 g; yeast extract, 4 g; glucose, 4 g; and agarose, 18 g. Minimum media buffered with CaCO_3 ($\text{MM}_{\text{CaCO}_3}$) was used in previous studies (8). However, from a practical point of view, CaCO_3 complicated the determination of dry cell weight. Thus, a second minimum medium buffered with morpholinepropanesulfonic acid MOPS (MM_{MOPS}) was tested in place of the first one and used as a negative control in this study. $\text{MM}_{\text{CaCO}_3}$ contains: glucose, 15 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g; NaCl, 2 g; KH_2PO_4 , 0.5 g; K_2HPO_4 , 1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g; and CaCO_3 , 5 g; per liter of distilled water. MM_{MOPS} contains: glucose, 15 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g; NaCl, 2 g; KH_2PO_4 , 0.5 g; K_2HPO_4 , 1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g; MOPS, 20 g; and $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 g.

A semi-synthetic medium was used as positive control. It contained (per liter of distilled water): $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ of YE added to the minimum medium ($\text{MM}_{\text{CaCO}_3}$ or MM_{MOPS}).

The culture media used to evaluate the influence of different compounds on the bacterium growth was based on the minimum medium to which the various components to be screened were added. Carbohydrates tested were glucose, sucrose, fructose, galactose,

maltose, mannitol, glycerol, lactose at 0.83 mM each, and starch and dextrin at 15 g·l⁻¹ each. Amino acids were screened in groups. Groups 1, 2, and 3 contained amino acids at 5 mM each. Group 1 contained glycine, alanine, leucine, isoleucine, valine, tryptophan, phenylalanine, and proline. Group 2 contained tyrosine, serine, threonine cysteine, and methionine. Group 3 contained lysine, arginine, histidine, glutamate, aspartate, glutamine, and asparagine. Group 4 contained 20 amino acids at 1.7 mM each. Nucleobases (adenine, guanine, cytosine, thymine, and uracil) were evaluated individually at 20 mM each and in combination at 5 mM each. Oligoelements mix (X) was tested at three concentrations: 0.1 X, 1X, and 10 X. Composition of X is given in Table 1.

The nature and the concentration of the compounds to be tested were selected on basis of the composition of YE used in this study and on previous investigations (8, 9) conducted on *S. algeriensis*. The amino acid concentrations tested in this study are in the same range as those amino acids produced in the culture medium by 2 g·g⁻¹ of YE (reference no 212720 from Difco). These choices allowed comparison of the experiments results with those of the positive control.

The effect of glucose on biomass production was evaluated in minimal and semi-synthetic conditions. Sucrose, starch, dextrin, fructose, galactose, glycerol, maltose, lactose, and mannitol were evaluated at the same molarity as glucose. Performances of amino acids, nucleobases, and trace metal element (oligoelements) were evaluated on minimal medium. Amino acids are classified into four groups based on physical and chemical properties. Group 1 contains nonpolar amino acids; Group 2, amino acids with sulfur or alcohol groups; Group 3, polar amino acids remaining and charged amino acids; and Group 4, all amino acids. Table 1 represents the oligoelements composition used in this study. The chemical elements can potentially produce activating or inhibitory effects on the microbial metabolism; they were added to span a wide range of concentration. For example, in addition to the trace metal solution met in literature at the concentration 1X (oligo iron 1X), the mixture diluted ten times (oligo iron 0.1X), and the mixture concentrated 10 times (oligo iron 10x) were used. Moreover, iron usually plays an enzymological role in microbial metabolism (10, 11) and was separately added (iron 1X) to the basic mixture (oligo 1X). Media were sterilized at 120°C during 20 min.

Growth estimation

To estimate the dry cell weight (DCW), 3 ml samples of homogenized culture broth were centrifuged at 16000 g for 10 min in pre-weighed Eppendorf tubes. The pellet was washed twice with distilled water; the supernatant was reserved for other analysis. Eppendorf tubes containing pellets were dried at 105°C for 48 h and cooled for 30 min in a dessicator. The relative error is 5 %.

The average specific growth rate (μ) is calculated from the DCW.

$$\mu = \frac{r_{DCW}}{DCW} \quad (r_{DCW} \text{ is the DCW evolution rate, } r_{DCW} = \frac{\Delta DCW}{\Delta t}. \text{ DCW is in g} \cdot \text{l}^{-1} \text{ and t is in h)}$$

Determination of glucose concentration

A biochemical analyzer with enzymes fixed on a membrane was used (YSI 2700 select) with glucose oxidase. Glucose was determined with amperometric quantification after

its enzymatic oxidation. The amperometer quantification was linear for glucose concentration ranging from 0–25 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. The relative error is 3 %.

Alpha amino nitrogen quantification

Alpha amino nitrogen is quantified using a specific enzymatic method (Microdon kit using glutamate oxidase) and an automatic multiparametric analyzer (Mascott, Lisabio, Pouilly en Aixoise, France). The signal quantification was linear for alpha amino nitrogen concentration ranging from 0–500 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. The relative error is 5 %.

RESULTS AND DISCUSSION

Calcium carbonate substitution in the composition of the culture medium

CaCO_3 was initially used to buffer the culture medium, but DCW determination was complicated, and was replaced by MOPS in the culture medium composition. Calcium was then provided by CaCl_2 . Evaluation of the effect of the substitution of MOPS and CaCl_2 on bacterial growth was performed. Figure 2 shows the evolution of biomass as a function of time in the two synthetic media and that after 12 h of culture, the MOPS buffered medium produced 1.48 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ of biomass compared to 0.17 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ by CaCO_3 buffered medium. In addition, the medium buffered with MOPS allowed a maximal production of biomass, 2.5 times higher than the biomass obtained on calcium carbonate buffered medium.

Thus, replacement of CaCO_3 by MOPS allowed growth of *S. algeriensis* in a semi-synthetic medium. Moreover, the MOPS buffered medium had a positive impact on biomass production.

Growth on semi-synthetic medium buffered with MOPS

Figure 3 illustrates the growth of *S. algeriensis* on a medium supplemented with a small quantity of YE (2 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), referred to as semi-synthetic medium (7–9). Biomass production and glucose consumption were monitored during the 45 h. Biomass yield, biomass formed per gram of glucose consumed, is represented in the same figure.

The results indicate that the growth of the bacterium on this medium could be split into two parts: from starting point to approximately 12 h of culture and from approximately 12 h to the end. In this first period, there was a production of 1.48 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ of biomass with a biomass yield of 1.1 $\text{g}_{\text{DCW}}\cdot\text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$. This yield was much higher than the maximal actinomycete biomass yield of 0.46 $\text{g}_{\text{DCW}}\cdot\text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$ referenced in literature (12). This indicates that during this period, biomass was formed mainly from a substrate other than glucose. During this first step of growth, the average specific growth rate was 0.27 h^{-1} .

In the second period, the bacteria multiplied slowly. Less than 0.5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ of biomass was formed in 30.5 h. At the same time, 2.25 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ glucose was consumed. The average specific growth rate was 0.007 h^{-1} , which is forty times lower than the previous period. This phase was characterized by a lower biomass yield of 0.19 $\text{g}_{\text{DCW}}\cdot\text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$. Such a result indicated that during the second period, glucose could be the only source of carbon used for the bacterial growth. In addition, this low value could indicate that the bacterium growth was limited by an unidentified element.

YE are predominantly composed of field proteins. It is likely that the initial phase of growth uses the amino acid available from the YE as carbon and nitrogen substrates. The *Saccharothrix* genus was relatively and genetically close to the *Streptomyces* genus (13). Moreover, numerous studies have discussed their capacity to catabolize amino acids (14).

Growth on minimum medium

No significant growth occurred in the minimum medium. Glucose alone was not sufficient to induce *S. algeriensis* development; thus, the bacterium was missing an essential element for its growth. Yeast extract would be a source of growth factors filling an auxotrophy. Moreover, preliminary experiments have shown that glucose was indispensable for the bacterium development. Based on our results, the hypothesis that glucose was used as an energy source for the metabolism could be debated upon (15, 16).

Influence of carbohydrates on growth in the semi-synthetic and minimum media

In order to determine if glucose was the best carbon source for *S. algeriensis* growth, other carbohydrates were tested both in minimal and favorable conditions at 0.83 mM. Results are presented in figure 4a and 4b. The specific maximal biomass $[X_{\max}]_{\text{specific}}$ was the maximum biomass produced, reported as concentration of glucose in $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, because the carbohydrates tested did not contain the same number of carbon atoms. Glucose, galactose, fructose, and mannitol contain 6 carbon atoms. Lactose, maltose, and sucrose contained 12 carbon atoms. Glycerol consisted of 3 atoms of carbon. Dextrin and starch were glucose polymers.

In the presence of YE (Fig. 4b), there was an average of 3.6 times more specific biomass production than in the absence of YE (Fig. 4a). Moreover, the highest level of biomass produced without YE did not reach the minimal value of biomass produced with YE. The performance of various carbohydrates on the specific production of biomass was different depending upon the presence or absence of YE (Fig. 4a, b). We noted that in presence of YE, carbohydrates that contain 6 carbons produced the best specific production while those containing 12 carbons induced the lowest specific production. In the absence of YE, maltose and sucrose, which are disaccharides, gave the lowest specific productions.

When the bacterium was in presence of YE that was in adequate nutritional conditions for development, glucose produced the second best specific production of biomass. The carbohydrate responsible for higher biomass, galactose, was not a classic sugar; therefore, glucose was used as the carbon substrate residue for the result of this work.

Growth on synthetic medium

In order to detect this potential auxotrophy, the possible candidates exhibiting it and that may be potentially present in yeast extract have been listed. Thus, amino acids, nucleobases, and trace elements have been screened on minimum medium. The results of these investigations are presented below.

Effect of amino acids on growth

As shown in Fig. 5a, the four groups of amino acids allowed for a better growth than the negative control, but no group equaled the values of biomass produced by the positive control. From a quantitative point of view, group 1 led to the best biomass production, $1.2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ in 150 h, groups 3 and 2 resulted in $1.18 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ in 100 h and $1.05 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ in 150 h, respectively.

The amino acid group 3 led to an earlier development of the microorganism than the other amino acids, but biomass production in group 3 remained constant after 100 h of culture, unlike the other groups. The amino acids used together (group 4) produced earlier growth than the cluster groups of amino acids (groups 1, 2, and 3). The cluster groups had a positive synergistic effect on initiation of growth; however, this growth stopped rapidly. This may have occurred because one of the amino acids was rapidly depleted. Observation of alpha-amino nitrogen evolution (Fig. 5b) in culture broth demonstrated the consumption of amino acids by bacteria in synthetic medium. Several authors have already emphasized the ability of *Streptomyces* to metabolize amino acids (14). They are either incorporated directly into protein synthesis or de-aminated or used as a source of carbon in the Krebs cycle (17). Because the concentration of alpha-amino nitrogen was not null, it was not a limiting factor as a whole. However, it is still possible that specific amino acids were growth limiting. Specific amino acids may have been consumed at different rates, resulting in depletion of one amino acid while metabolism of others continued.

The observation of alpha-amino nitrogen evolution in the positive control showed that the amino acids from YE were consumed in the first 50 h of culture. In the semi-synthetic medium, the first growth phase occurred on the amino acids from the YE, which was confirmed as stated above. Amino acids belonging to the groups 1 and 3 were rapidly consumed. By contrast, amino acids from group 2 were consumed later, after 100 h of culture. The sulfured amino acid and those with a hydroxyl group were assimilated with more difficulty than nonpolar and charged amino acids by the bacteria. Group 3 could contain one or several important amino acids for the bacterial growth because, in this group, when there was no amino acids consumption left, biomass production stopped. Moreover, the amino acid consumption of the group 1 stagnated while growth continued. In this case, the hydrophobic amino acids would facilitate the formation of biomass from glucose after 100 h.

Evolution of these different cultures made it difficult to determine a specific auxotrophy, or a multi-auxotrophy because amino acids tested as a single group did not induce growth similar to the positive control (see amino acids together group 4). However, the amino acids did produce a positive effect on biomass production by *S. algeriensis*.

Effect of nucleobases on growth

Figure 6 shows the performance of the 5 nucleobases (adenine, thymine, cytosine, guanine, and uracil) on the maximum production of biomass at different times of culture (100, 150, and 200 h). Nucleobases were tested separately at 20 mM each and together at 5 mM each.

Figure 6 shows that uracil and thymine at 20 mM allowed production of biomass, which was higher than the negative control and other nucleobases. Thus, 1.35 and 1.33 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ of biomass were produced in 200 h in the presence of uracil and thymine, respectively. These values remained encouraging but were 40 % lower than the amounts of biomass produced by positive culture control: 2.17, 2.27, and 2.3 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ in 100, 150, and 200 h, respectively. The growth on uracil took place with less latency than growth on thymine. Adenine, guanine, and cystine induced similar or better production of biomass compared to our negative control, with biomass concentrations of 0.215, 0.315, 0.275, and 0.260 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ in 100 h, 0.28, 0.75, 0.46, and 0.29 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ in 150 h and 0.33, 0.95, 0.56, and 0.28 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ in 200 h, respectively.

Although these nucleobases had a positive effect on the amount of biomass produced, they induced later growth than the positive culture control. In effect, between 100–200 h, the amount of biomass increased by only 10 % of the growth increase seen in the positive control culture; biomass production was increased three- with addition of thymine and two-fold with uracil. It should be noted that nucleobases used together at 5 mM each did not show a positive effect on maximal produced biomass but did induce earlier growth: 0.65 and 0.9 g·l⁻¹ of biomass were produced from this last culture in 100 and 150 h, respectively.

The positive effect of nucleobases such as uracil on bacterial growth has been described in the literature (18). Moreover, nucleobases could be a carbon source for *S. algeriensis* because *Streptomyces*, which are genetically close to *Saccharothrix*, are able to catabolize nucleobases (14). It is not surprising that these two nucleobases (uracil and thymine) provide similar results. Uracil is the nucleobase that replaces thymine in RNA. They have a similar structure, with the difference of an additional methyl group at position 5 of thymine.

Effect of mineral solution on growth

Preliminary experiments identified molecules that have a positive effect on growth but did not allow identification of a specific auxotroph. Effect of trace metal elements on growth has been estimated. An element mixture borrowed from the literature (19, 20) was added in the minimum culture medium as described in Materials and Methods.

The following figure presented DCW at various time points: 150, 260, and 330 h according to the various trace metal element mixtures added. The oligo iron 1X, oligo 1X, iron 1X, oligo iron 0.1 X, and oligo iron 10X mix allowed maximum biomass production of 0.67, 3.27, 0.04, 3.9 and 0.2 g·l⁻¹, respectively. The mixtures of oligo 1X and oligo iron 0.1X induced growth higher than that of the positive control. We noted that in 330 h of cultures, biomass decreased in the negative control, possibly due to bacterial cell lysis.

In all cases, the development of the bacterium occurred after more than 150 h of culture. Such latency could be explained by the composition of the mixtures. Each “oligo” mix contained more than 10 micronutrients *e.g.*, some may have had a stimulatory effect, while others may have been inhibitory. Thus, this complex and competing regulation could explain the long latency of more than 150 h.

The addition of iron only induced low growth (0.04 g·l⁻¹ biomass in 330 h) and this element associated with the standard mixture (oligo iron 1X) allowed a biomass production of almost five times lower than that seen in the presence of oligoelements mixed alone without iron (oligo 1X). In our conditions, it seemed that the iron had an inhibiting effect on *S. algeriensis* growth.

The performances, in term of biomass production, were inversely proportional to the trace metal concentrations: oligo iron 10X allowed a production of 0.2 g·l⁻¹, oligo iron 1X produced 0.67 g·l⁻¹, and oligo iron 0.1 X produced 3.9 g·l⁻¹. This would emphasize a strong inhibitor trait of one (or more) of the oligoelements mixture component.

Thiolutine specific production on synthetic medium: key-data

A synthetic medium containing uracil at 20 mM allowed a specific production of 2.3 mg of thiolutine per g of biomass. The oligoelements mixture (without iron) permits a specific production of 2.1 mg of thiolutine per g of biomass. Galactose and maltose used in synthetic medium in place of glucose enable a specific production of 8.3 and 7.2 mg of thiolutine per g of biomass, respectively.

Adding benzoic acid (at 5 mM) to the mixture of the 5 nucleobases (at 5 mM each), in a culture medium devoid of yeast extract, allows a specific production of 32.3 mg of thiolutine per g of biomass. This data shows the possibility of thiolutine production by *S. algeriensis* in synthetic medium. Moreover, this specific production is improved by the addition of benzoic acid.

Nucleobases, amino acids, and oligoelements stimulated *S. algeriensis* development on synthetic media, particularly uracil and thymine nucleobases and non polar amino acids. Low concentrations of oligoelements allowed bacterial growth. No auxotrophy was detected. Two assumptions are made from these results: an auxotrophy or multi- auxotrophy target has not been discovered yet, or there is no auxotrophy and optimization of the synthetic medium that is not complete. In the state of current knowledge, we suggest a minimum medium containing 20 mM of uracil for the development of *S. algeriensis* in synthetic conditions.

This research has helped develop a synthetic basis media which facilitates the growth of *S. algeriensis*. Although these media permit a certain bacterial growth, biomass production could still be improved. However, the media determined in the present experiment could be used as tracks for the development of a nutritionally matched synthetic medium allowing for “batch” cultivation of the strain. Thus, these different medium compositions could be a starting point for accurate and quantitative studies on the metabolism and induction of dithiopyrrolones production in *S. algeriensis*.

REFERENCES

- 1. Butler, J.C., Hofmann, J., Cetron, M.S., Elliott, J.A., Facklam, R.R., and Breiman, R.F.:** The continued emergence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States: an update from the Centers for Disease Control and Prevention’s Pneumococcal Sentinel Surveillance. *Syst. J. Infect. Dis.*, **174**, 986–993 (1996).
- 2. Critchley, I.A., Brown, S.D., Traczewski, M.M., Tillotson, G.S., and Janjic, N.:** National and regional assessment of antimicrobial resistance among community-acquired respiratory tract pathogens identified in a 2005–2006 U.S. Faropenem surveillance study. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **51**, 4382–4389 (2007).
- 3. Linares, L., Cervera, C., Cofán, F., Ricart, M.J., Esforzado, N., Torregrosa, V., Oppenheimer, F., Campistol, J.M., Marco, F., and Moreno, A.:** Epidemiology and outcomes of multiple antibiotic-resistant bacterial infection in renal transplantation. *Transplant. Proc.*, **39**, 2222–2224 (2007).
- 4. Zitouni, A., Lamari, L., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Gaouar, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., and Labeda, D.P.:** *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., isolated from Saharan soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 1377–1138 (2004).
- 5. Lamari, L., Zitouni, A., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Lebrihi, A., Lefebvre, G., Seguin, E., and Tillequin, F.:** New dithiopyrrolones antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233: I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **55**, 696–701 (2002).
- 6. Furumai, T., Takeda, K., and Okanishi, M.:** Function of plasmids in the production of

- aureothricin. I. Elimination of plasmids and alteration of phenotypes caused by protoplast regeneration in *Streptomyces kasugaensis*. J. Antibiot. (Tokyo), **35**, 1367–1373 (1982).
- 7. Bouras, N., Mathieu, F., Sabaou, N., and Lebrihi, A.:** Influence on dithiolopyrrolone antibiotic production by organic acids in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Process Biochem., **42**, 925–933 (2007).
- 8. Bouras, N., Mathieu, F., Sabaou, N., and Lebrihi, A.:** Effect of amino acids containing sulfur on dithiolopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. J. Appl. Microbiol., **100**, 390–397 (2006).
- 9. Bouras, N., Mathieu, F., Sabaou, N., and Lebrihi, A.:** Nutritional requirements for the production of dithiolopyrrolone antibiotics by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Enzyme Microb. Technol., **39**, 23–142 (2006).
- 10. Chen, D. and Frey, P.A.:** Phenylalanine hydroxylase from *Chromobacterium violaceum*. Uncoupled oxidation of tetrahydropterin and the role of iron in hydroxylation. J. Biol. Chem., **273**, 25594–25601 (1998).
- 11. Li, J., Chen, G., and Webster, J.M.:** Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont. J. Nat. Prod., **58**, 1081–1086 (1995).
- 12. Borodina, I., Krabben, P. and Nielsen, J.:** Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A3(2) metabolism. Genome Res., **15**, 820–829 (2005).
- 13. Labeda, D.P. and Kroppenstedt, R.M.:** Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa: proposal for *Actinosynnemataceae* fam. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **50**, 331–336 (2000).
- 14. Hodgson, D.A.:** Primary metabolism and its control in *Streptomyces*. Adv. Microbio. Physiol., **42**, 47–238 (2000).
- 15. Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., and Leão, C.:** Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. J. Appl. Microbiol., **9**, 540–545 (2004).
- 16. Mounier, J., Rea, M.C., O'Connor, P.M., Fitzgerald, G.F. and Cogan, T.M.:** Growth characteristics of *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, and *Staphylococcus* spp. isolated from surface-ripened cheese. Appl. Environ. Microbiol., **73**, 7732–7739 (2007).
- 17. Voelker, F. and Altaba, V.:** Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in '*Streptomyces pristinaespiralis*'. Microbiology, **147**, 2447–2459 (2001).
- 18. Hendry, A.T.:** Growth responses of *Neisseria gonorrhoeae* auxotypes to required amino acids and bases in liquid medium. Can. J. Microbiol., **29**, 1309–13 (1983).
- 19. Egli, T. and Fiechter, A.:** Short communication: theoretical analysis of media used in the growth of yeast on methanol. J. Gen. Microbiol., **1**, 153–165 (1981).
- 20. Colombié, V., Bideaux, C., Goma, G., and Uribe Larrea, J.L.:** Effects of glucose limitation on biomass and spiramycin production by *Streptomyces ambofaciens*. Bioprocess Biosyst. Eng., **30**, 1–7 (2005).

Figures Legends

FIG. 1. Dithiolopyrrolone antibiotic structure

FIG. 2. Evolution of *S. algeriensis* biomass as function of time on two semi-synthetic media. One media is buffered with CaCO_3 (grey square) and the other with MOPS (closed diamond). Batch culture: 30°C, 250 rpm

FIG. 3. Evolution of biomass production, glucose consumption, and biomass yield. Closed square, Biomass $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; open circle, glucose $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; and grey diamond, biomass yield (biomass formed per gram of glucose consumed $\text{g}_X\cdot\text{g}_{\text{Glu}}^{-1}$) as a function of time on MOPS buffered semi-synthetic medium. Batch culture of *S. algeriensis*: 30°C, 250 rpm

FIG. 4. Maximal specific biomass production in presence of different carbohydrates on a) MOPS buffered minimum medium and b) MOPS buffered semi-synthetic medium. Glucose, galactose, fructose, lactose, maltose, sucrose, and glycerol (83 mM). Dextrin and starch (15 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Batch culture of *S. algeriensis*, 30°C, 250 rpm.

FIG. 5 (a) Biomass production and (b) ammonium ions consumption at different time points: 0 (open bars, only for panel b), 50 (grey bars), 100 (dark grey bars), and 150 (closed bars) h of culture, as a function of amino acid groups. Positive control contains MM_{MOPS} medium + 2 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ of YE. Negative control contains only MM_{MOPS} medium. Groups 1, 2, 3, and 4 are prepared as explained in Materials and Methods. Batch culture of *S. algeriensis*: 30°C, 250 rpm.

FIG. 6. Biomass production at different times: 100 (white), 150 (grey), and 200 (black) h of culture, as a function of nucleobases. Nucleobases were tested alone at 20 mM, adenine (A), thymine (T), cytosine (C), guanine (G), and uracil (U) and together (ATCGU) at 5 mM each.

Positive control contains MM_{MOPS} medium +2 g·l⁻¹ of YE. Negative control contains only

MM_{MOPS} medium. Batch culture of *S. algeriensis*: 30°C, 250 rpm.

FIG. 7. Biomass production at different times: 150 (open bars), 260 (grey bars), and 330 (black bars) h of culture, as a function of oligoelements mix. The mixture is tested at 3 concentrations (Table 1): (oligo iron 1X), ten times lower (oligo iron 0.1X), and ten times higher (oligo iron 10X). The iron is tested in association with the mixture and separately (iron). The mixture is evaluated without iron (oligo 1X). Controls: MM_{MOPS} medium (negative control) and MM_{MOPS} medium + 2 g·l⁻¹ YE (positive control). Batch culture of *S. algeriensis*: 30°C, 250 rpm.

Table

TABLE 1. Oligoelements mix (1X) composition

Oligoelements	mix 1X
Composition	g·l ⁻¹
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.02968
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.003353
H ₃ BO ₃	0.0014
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.0525
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0308
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.007
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.0035
KI	0.00231
AlCl ₃ ·6H ₂ O	0.0028
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.09

Figures

Figure no 1

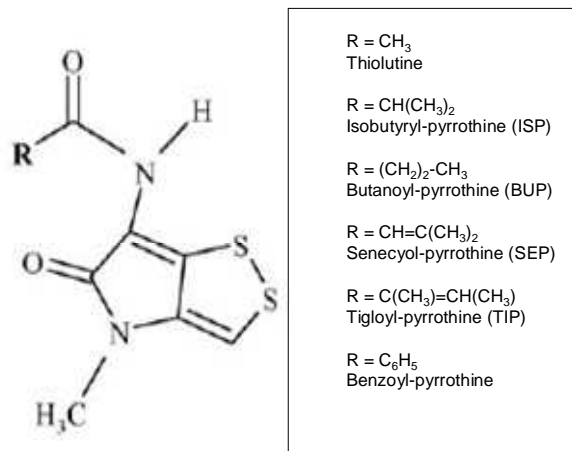


Figure no 2

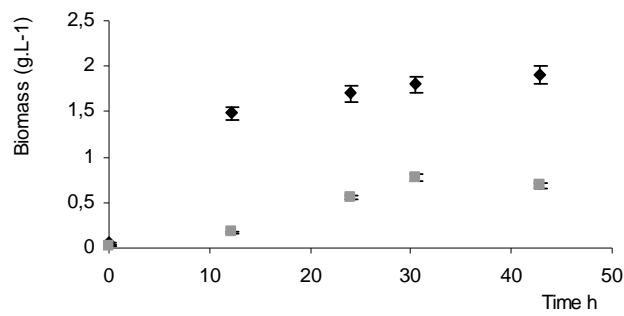


Figure no 3

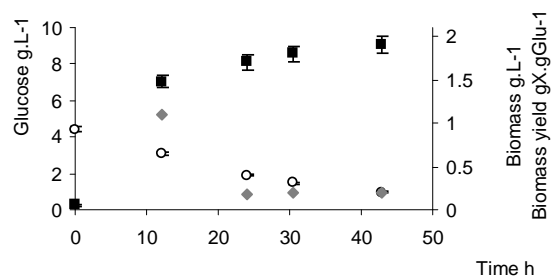


Figure no 4

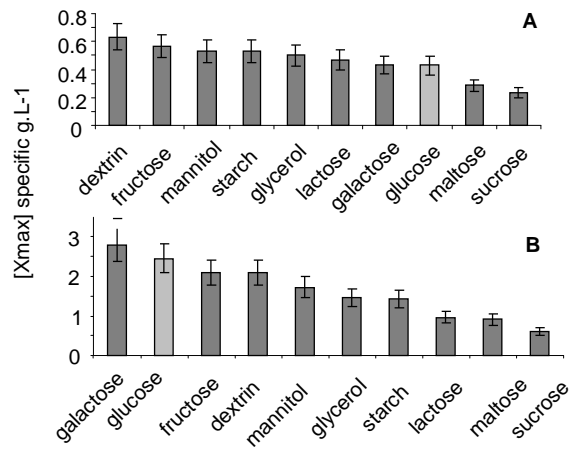


Figure no 5

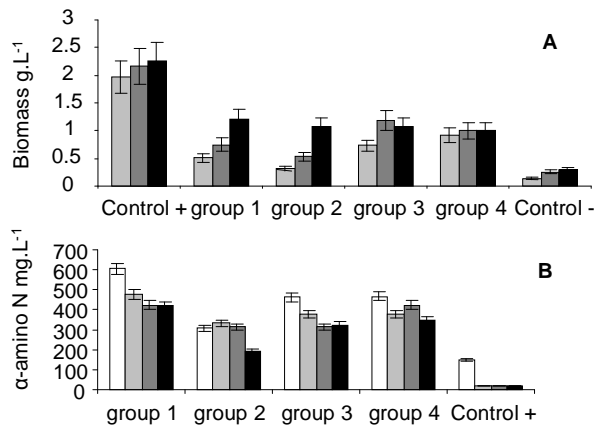


Figure no 6

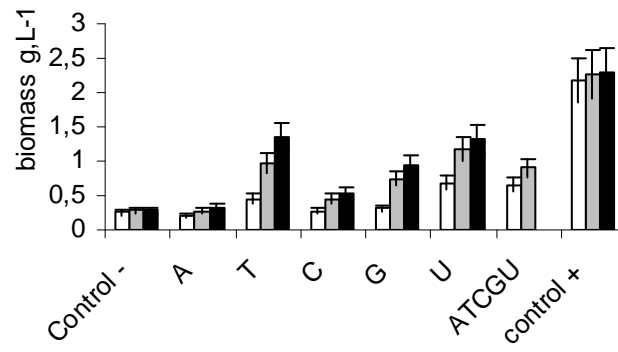
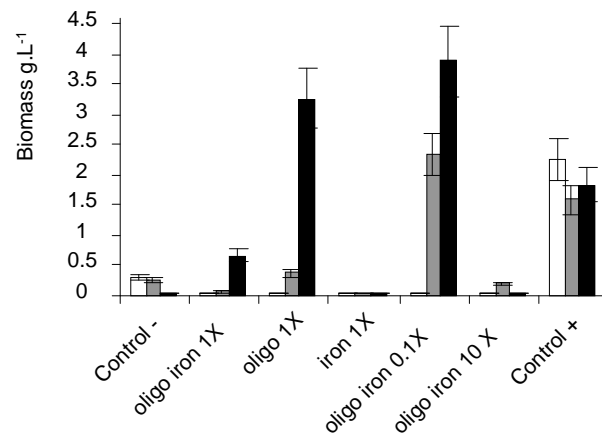


Figure no 7



Saccharothrix algeriensis, a new antibiotic producer: investigations on its secondary metabolism

Strub C¹, Brandam C¹, Meyer X¹ and Lebrihi A¹

¹Laboratoire de Génie Chimique, UMR-CNRS 5503,
BP 1301, 5 rue Paulin Talabot, 31106 Toulouse cedex 1

The constant growth of the antibiotic world market leads to study rare actinomycete. Therefore, the bacterium *Saccharothrix algeriensis* which products new antibiotics of dithiopyrrolone class is studied in liquid culture. The aim of this work is to better apprehend the mechanisms which govern the bacterial growth as well as the dithiopyrrolones synthesis and to capitalize this knowledge in a general reactional scheme of the metabolism. The growth of *Saccharothrix algeriensis* was performed in a batch reactor, on a semi-synthetic medium. The growth, the thiolutine (the main dithiopyrrolone) and the carbon dioxide production and the substrates consumption were monitored. The influence of the substrate concentration on growth and on the production of dithiopyrrolones was evaluated. It seems that diauxic growth occurs on amino acids then on glucose. The thiolutine synthesis would be induced by carbon substrates exhaustion and by ammonium ions deficiency. Glucose seems to exert a catabolite repression on the secondary metabolic activities of the cell.

1. Introduction

The production of new bio active molecules is now a major concern to answer to the fact of the proliferation of microbial pathogen strains resistant to the molecules currently available (Butler et al. 1996; Critchley et al. 2007; Linares et al. 2007). Thus researches tend to exploit the biodiversity in order to find new bio active molecules with microbial origin (Boudjella et al, 2005). In this context, the bacterium *Saccharothrix algeriensis*, belonging to actinomycetes family and producing new antibiotics of dithiopyrrolone class, has been isolated in Saharan soils in Algeria (Zitouni et al. 2004). Dithiopyrrolone antibiotics have others interesting properties: antifungi, insecticide and anticancer activities (Webster and Chen, 2000; Minamiguchi et al. 2001, Webster et al. 2002, Xu 1998).

Sa algeriensis is able to produce at least five dithiopyrrolone antibiotics: thiolutine, senecyol-pyrrothine (SEP), tigloyl-pyrrothine (TIP), isobutyryl-pyrrothine (ISP) and butanoyl-pyrrothine (BUP) as shown in figure 1. *Sa algeriensis* is the only known microorganism able to produce TIP and SEP (Lamari et al. 2002; Bouras et al. 2006). Recent works showed that the nature of the radical R depends on the culture medium composition. Each association "organic acid-heterocycles" leads to different molecules with different properties, which makes it an interesting model to study (Bouras et al. 2006; Bouras et al. 2007). But few data exist on the macroscopic behaviour of the bacterium in a semi-synthetic medium.

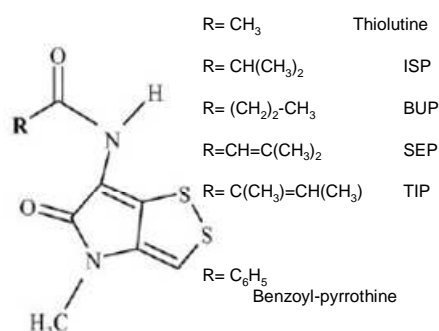


Fig.1 Dithiopyrrolone antibiotic structures

The aim of this work is to study the development of *Sa algeriensis* in different conditions to capitalize knowledge on its metabolism and at term to control qualitatively and quantitatively dithiopyrrolone production. The development of *Sa algeriensis* was followed on semi-synthetic medium where majority of the substrates was identified. The cultures have been carried out in batch reactor with probes for monitoring and controlling physical and chemical environment of the bacterium. In parallel substrates and products concentrations have been followed by offline measurements.

2. Materials and Methods

2.1 Flasks and reactors cultures conditions

Sa algeriensis NRRL B-24137 was used in this study. Spores were maintained in 25% glycerol at -20°C. Spores were obtained from solid culture of *Sa algeriensis* on conservation medium.

For the precultures, a volume of 100 mL of semi synthetic medium was inoculated by 3.5 mL of spores suspension and incubated on a rotary shaker (New Brunswick Scientific Co., NJ, USA) at 250 rotation per minute (rpm) and 30°C for 52 h.

Reactors were inoculated with 100 mL of preculture. Cultures were performed in a NBS fermentor containing 2 L of medium. Culture lasted for at least one week. pH was maintained at 7 ± 0.035 by automatic addition of NaOH solution (1 mol.L^{-1}) and HCl solution (1 mol.L^{-1}). Aeration rate of one vessel volume per minute (vvm) was employed. The agitation rate was controlled to keep the dissolved oxygen level above 30% of the saturation with a starting rate of 150 rpm. The pH and dissolved oxygen level were monitored using Ingold specific electrodes. Temperature was regulated at 30°C. O₂ and CO₂ content in the exhaust gas were determined by a gas analyser (Servomex 4100, paramagnetic transductor for O₂ and infrared transductor for CO₂).

2.2 Culture media compositions

Conservation media: International Streptomyces project 2 (ISP2)

The ISP2 medium had the following composition (per liter of distilled water): 10 g malt extract, yeast extract 4 g, glucose 4 g and agarose 18 g.

Growth and production medium

The semi-synthetic medium used as growth and production medium contained (per liter of distilled water): glucose 15 g, yeast extract 2 g, NaCl 2 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, KH₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 1g, MgSO₄.7H₂O 0.2g, CaCl₂.2H₂O 1 g, and MOPS 2 g, Uracil 20 mmol.

2.3 Analytical procedures

For the estimation of dry cell weight (DCW), 3 mL samples of homogenized culture broth were centrifuged at 16000 g for 10 min in preweighed Eppendorf tubes. Pellet was washed twice with distilled water. Supernatant was kept for other analysis. Eppendorf tubes containing pellets were dried at 105°C for 48 h, and weighted after being cooled for 30 min in a dessicator (Bouras et al., 2006). The measurement relative error is 5 %.

The analysis of dithiopyrrolone antibiotics was carried out by non polar chromatography (HPLC, Bio-Tek Instruments (Bouras et al., 2007)) The measurement relative error is 10 %. Supernatant coming from DCW determination was filtered at 0.2 µm and used to measure metabolites.

A biochemical analyzer with enzymes fixed on membrane has been used (YSI2700 select) to quantify glucose. Amperometric quantification after the enzymatic oxidation allows determining glucose concentration in the culture broth. The amperometer answer is linear for a concentration in glucose between 0 and 25 g.L⁻¹. The measurement relative error is 3 %.

Ammonium ions and α-amino nitrogen have been quantified using specific enzymatically methods (Diagnostics Ammonia kit from Boehringer-Mannheim, using glutamate deshydrogenase and Microdom kit using glutamate oxydase respectively) and an automatic multiparametric analyser (Mascott Lisabio). The signal answer is linear for concentrations in α-amino nitrogen and ammonium ion between 0 and 500 mg.L⁻¹. The measurement relative error is 5 %.

3. Results

3.1 Growth on semi-synthetic medium

Figures 2 and 3 present the evolution of glucose, α-amino nitrogen, biomass, ammonium ion and thiolutine during a batch culture of *Sa algeriensis* on semi-synthetic medium. Four periods can be distinguished. The first period (1) is a growth phase of the microorganism. It is accompanied by a diminution of α-amino nitrogen concentration (figure 2); it is to say amino acids consumption, and an increase in the ammonium ions concentration. It could be explained by the deamination of the consumed amino acids from yeast extract (figure 3). There is no apparent glucose consumption, by against the amino acids are quickly consumed by the bacterium. The second period (2) is characterized by a brake in the growth. During this period, the rest of the amino acids and the glucose are consumed. The ammonium ions concentration is stable. The third period is a growth phase on glucose and ammonium ions longer than the first one on amino acids (3). The ammonium ions

could be used as nitrogen source. The last period (4) is characterized by a decrease of biomass concentration that seems to coincide with ammonium ions exhaustion. It is probably caused by cell lysis.

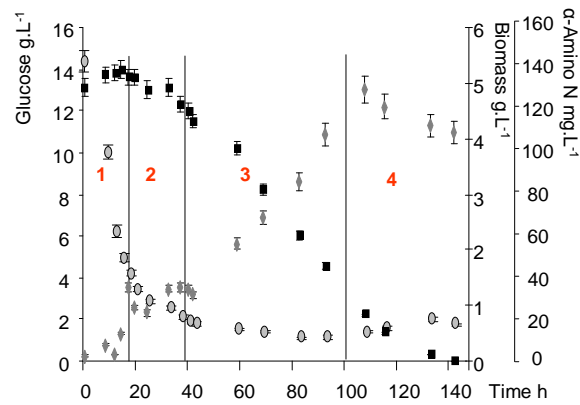


Fig.2 *Sa. algerinsis* batch culture on semi-synthetic medium in batch reactor, 30°C, pH 7.00 ± 0.035 upH, 0.5 vvm and 250 rpm. ○ α -amino N (mg.L⁻¹), ■ glucose (g.L⁻¹) consumption and ♦ biomass production (g.L⁻¹).

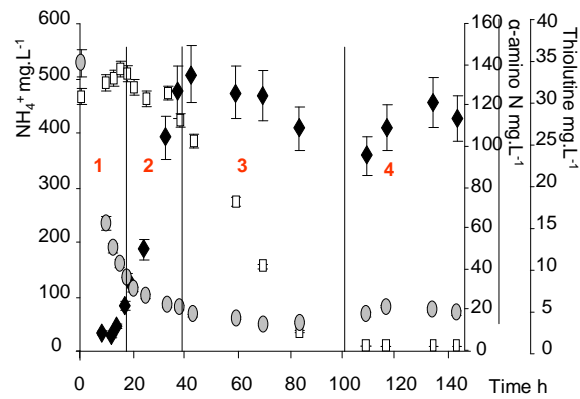


Fig.3 Thiolutine production ♦ (mg.L⁻¹), α -amino N ○ (mg.L⁻¹), and ammonium ions □ (mg.L⁻¹) in *Sa algerinsis* batch culture on semi-synthetic medium, 30°C, pH 7.00 ± 0.035 upH, 0.5 vvm and 250 rpm.

Sa algerinsis growth seems to be diauxic (Narang and Pilyugin 2006) on semi-synthetic medium. Indeed, in the first time, the amino acids are used for biomass production (period 1), and then when they are almost exhausted, after an adaptation period (period 2), the bacterium uses glucose and ammonium ions for its development (period 3). The fact that other actinomycetes have a diauxic growth confirms our comments (Novotna et al. 2003).

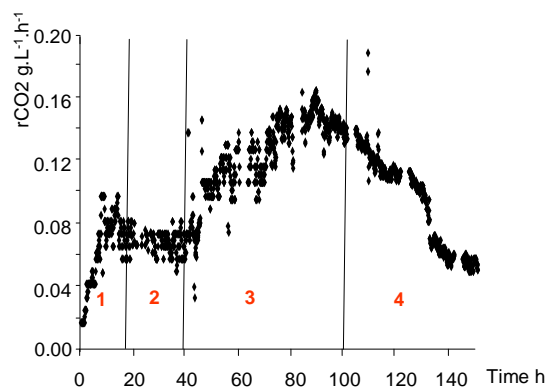


Fig.4: *Sa. algeriensis* batch culture on semi-synthetic medium in batch reactor, 30°C, pH 7.00 ± 0.035 upH, 0.5 vvm and 250 rpm. ♦ Carbon dioxide consumption speed (r_{CO_2} in $g.L^{-1}.h^{-1}$).

Figure 4 shows the CO₂ production speed evolution during the same culture.

It appears that the evolution phases of CO₂ production speed is perfectly calked on the phases of the biomass development (Figure 2). The period 1 is accompanied by an increase of the CO₂ production speed. It does not change during the period 2 because of this adaptation phase. The next period (3) is characterized by an increase of the CO₂ production speed. The last period of cells lysis (4) is accompanied by a decline in this production speed. From a practical point of view, the on-line study of the carbon dioxide production by gas analysis allows observing the important metabolic events, like biomass development or changes of consumed substrate. As a result, the on-line CO₂ measures can be used as a mean of monitoring the culture in absence of off-line measures.

3.2 Secondary metabolism induction

The thiolutine production in parallel to the α -amino nitrogen and ammonium ions consumptions is presented in figure 3. The thiolutine concentration starts to increase at the end of the period 1 when most of the amino acids are exhausted from the culture broth. In the period 3, the thiolutine concentration decreases. The thiolutine would be degraded or transformed into other dithiolopyrrolones derivatives by the microorganism. There is a second phase of thiolutine production following ammonium ion depletion during the period 4. Carbon and nitrogen limitations induce a slowdown in growth or metabolic activity of the microorganism which would cause the thiolutine synthesis in the culture broth (Wilson and Bushell 1995; Melzoch et al. 1997). However, the fact that a microorganism produces sequentially its secondary metabolites is rarely described in literature (Bushell and Fryday 1983).

3.3 Glucose catabolite repression

Figure 5a presents the thiolutine production as a function of the time at three glucose concentrations (3, 5.5 and 8 g.L⁻¹). Figure 5b presents biomass production at three different times of culture for these same glucose concentrations. The three concentrations allow the thiolutine production. On the other side, it is important to notice that they have no impact on biomass production. However, production depends on the initial glucose concentration. Culture containing 8 g.L⁻¹ glucose reaches the lower production (14.8 mg.L⁻¹ in 30 h) while the one containing the least of glucose allows the best production of thiolutine (3.28mg.L⁻¹ in 30 h). The more initial glucose concentration in the culture medium the less production of thiolutine in the first 30 h of culture is.

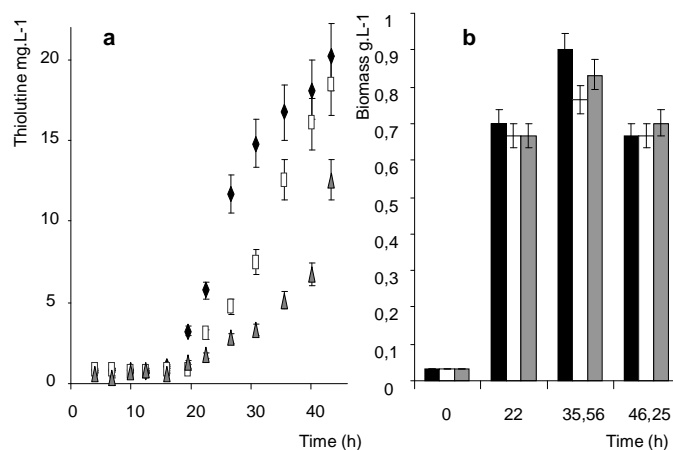


Fig.5 a) Thiolutine production (mg.L^{-1}) versus different glucose concentrations. \blacklozenge : 3 g.L^{-1} ; \square : 5.5 g.L^{-1} and \blacktriangle : 8 g.L^{-1} . **b)** Biomass production (g.L^{-1}) versus different glucose concentrations black: 3 g.L^{-1} ; white: 5.5 g.L^{-1} and grey: 8 g.L^{-1} . *Sa. algeriensis* batch culture on semi-synthetic medium in batch reactor, 30°C , $\text{pH } 7.00 \pm 0.035$ upH, 0.5 vvm and 250 rpm

Moreover, the observation of figure 5b shows that whatever the time of culture, biomass produced is nearly the same in the three conditions. It seems that the glucose has a repressive effect on the secondary metabolism. Then it does not affect the growth of the bacterium. This regulation exists in other actinomycetes (Demain 1998; Hodgson 2000) but not on their biosynthetic activities.

4. Conclusion

Sa algeriensis is able to grow from several substrates sequentially consumed. On the other hand, from a practical point of view, the CO_2 consumption speed measure allows an easily monitoring of the various culture phases. The secondary metabolism of this actinomycete seems to be induced by exhaustion of different carbon and nitrogen substrates which are in the culture broth. Thiolutine production occurs when the substrate which is currently metabolised became limiting. As the several changes of substrate during the batch culture, the production phenomenon can occur several times during a batch culture.

The establishment of a general reaction scheme should allow validating the hypotheses the diauxic growth of the microorganism. It will be tested on other experimental conditions. A mathematical model representing the growth of the bacterium can be developed. At term, it will allow the control of the produced derivate, and certainly the production of dithiolopyrrolone class new members

5. References

- Bouras N. (2005) Régulation de la production d'antibiotiques dithiopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137, PhD Thesis, Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- Bouras N., F. Mathieu, N. Sabaou and A. Lebrihi, (2006) Effect of amino acids containing sulfur on dithiopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137, *J. Appl. Microbiol.*, 100(2),390.
- Bouras N., F. Mathieu, N. Sabaou and A. Lebrihi (2007) Influence on dithiopyrrolone antibiotic production by organic acids in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochemistry*, 42(6),925.
- Butler J.C., J. Hofmann, M.S. Cetron, J.A. Elliott, R.R. Facklam and R.F. Breiman , 1996, The continued emergence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States: an update from the Centers for Disease Control and Prevention's Pneumococcal Sentinel Surveillance System, *J. Infect. Dis.*, 174(5),986.
- Boudjella H., K. Bouti, A. Zitouni, F. Mathieu, A. Lebrihi and N. Sabaou, 2005, Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil, *Microbiol. Research*, 161(4),288.
- Bushell M.E. and A. Fryday (1983) The application of materials balancing to the characterization of sequential secondary metabolite formation in *Streptomyces cattleya* NRRL 8057, *J. Gen. Microbiol.*, 129(6),1733.
- Critchley I.A., S.D. Brown, M.M. Traczewski, G.S. Tillotson and N. Janjic, 2007, National and regional assessment of antimicrobial resistance among community-acquired respiratory tract pathogens identified in a 2005-2006 U.S. Faropenem surveillance study, *Antimicrob. Agents Chemother*, 51(12),4382.
- Demain A.L. (1998) Induction of microbial secondary metabolism. *Internatl. Microbiol.*,1, 259.
- Hogdson D.A. (2000) Primary metabolism and its control in *Streptomyces*, *Adv. Microbio. Physiol.*, 42,47.
- Lamari L., A. Zitouni, H. Boudjella, B. Badji, N. Sabaou, A. Lebrihi, G. Lefebvre, E. Seguin and F. Tillequin, 2002, New dithiopyrrolones antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233 : I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities, *J. Antibiot. (Tokyo)*, 55,696.
- Linares L., C. Cervera, F. Cofán, M.J. Ricart, N. Esforzado, V. Torregrosa, F. Oppenheimer, J.M. Campistol, F. Marco and A. Moreno, 2007, Epidemiology and outcomes of multiple antibiotic-resistant bacterial infection in renal transplantation, *Transplant. Proc.*, 39(7),2222.
- Melzoch K., M.J. Teixeira de Mattos and O.M. Neijssel (1997) Production of actinorhodin by *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in chemostat culture, *Biotechnol Bioeng* 54(6),557.
- Minamiguchi K., H. Kumagai, T. Maduda, M. Kawada, M. Ishizuka and T. Takeuchi, 2001, Thiolutine, an inhibitor of huvec adhesion to vitronectin, reduces paxillin in huvecs and suppresses tumor cell-induced angiogenesis, *Int. J. Cancer*, 93, 307.
- Narang A. and S.S. Pilyugin (2006) Bacterial gene regulation in diauxic and non-diauxic growth, *J. Theor. Biol.* 244(2),326.
- Novotna J., J. Vohradsky, P. Berndt, H. Gramajo, H. Langen, X.M. Li, W. Minas, L. Orsaria, D. Roeder and C.J. Thompson (2003) Proteomic studies of diauxic lag in the differentiating prokaryote *Streptomyces coelicolor* reveal a regulatory network of stress-induced proteins and central metabolic enzymes, *Mol. Microbiol.*, 48(5),1289.
- Xu C.,1998, The stability and cytotoxic properties of xenorhoxides and xenorhabins, secondary metabolites of the entomopathogenic nematode symbiont, *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae), Thesis submited in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of science.
- Webster J.M., J. Li and G. Chen, 2000, Anticancer property of dithiopyrrolones, US patent n° 6020360.
- Webster J.M., G. Chen, K. Hu and J. Li, 2002, Bacterial metabolites, In: *Entomopathogenic Nematology*, R Gaugler R. (ed.). CAB International. 99.
- Wilson C.G. and M.E. Bushell (1995) The induction of antibiotic synthesis in *Saccharopolyspora erythraea* ad *Streptomyces hygroscopicus* by growth rate decrease is accompanied by a down-regulation of protein synthesis rate, *FEMS microbiol. lett.*, 129(1),89.
- Zitouni A., L. Lamari, H. Boudjella, B. Badji, N. Sabaou, A. Gaouar, F. Mathieu, A. Lebrihi and D.P.Labeda, 2004, *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., isolated from Saharan soil. *Int. J. Sys.t Evol. Microbio.*,54,1377.

Développement d'un milieu synthétique pour *Saccharothrix algeriensis* en vue de la production de nouvelles substances bio-actives.

STRUB Caroline^{a,b}, BRANDAM Cédric^b, MEYER Xuan^a et LEBRIHI Ahmed^b

^a *Laboratoire de Génie Chimique, UMR-CNRS 5503,*

BP 1301, 5 rue Paulin Talabot, 31106 Toulouse cedex 1

^b *École Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse,*

Avenue de l'Agrobiopole, BP 32607 Auzeville Tolosane, 31326 Castanet-Tolosan

Correspondant : lebrihi@ensat.fr

Résumé

Les premières études menées sur la croissance de *Saccharothrix algeriensis* et sur sa production de dithiopyrrolones ont été réalisées sur un milieu contenant du glucose et de l'extrait de levure. L'objectif de cette étude est de déterminer la composition d'un milieu synthétique permettant d'étudier le métabolisme de cette bactérie. L'utilisation d'extrait de levure dans ce contexte est délicate dans la mesure où sa composition est difficilement maîtrisable. L'étude consistant à cibler différents éléments laisse penser à une stimulation de la croissance de *Saccharothrix algeriensis* par les bases azotées et met en évidence le rôle important joué par certains éléments comme le tungstène. Les résultats confirment que le glucose est la source de carbone la plus intéressante pour la production de dithiopyrrolones. Un milieu synthétique, composé de sels, de glucose (15g/L) et d'uracile (20 mM) a été retenu pour la réalisation de culture en fermenteur « Batch » de 2L équipé d'un analyseur gaz autorisant une étude cinétique plus fine. La synthèse des dithiopyrrolones semble partiellement découplée de la croissance du microorganisme.

Mots-clés : antibiotiques milieu synthétique bactéries filamenteuses fermentation

1. Introduction

La production de nouvelles molécules « bio-actives » est actuellement une préoccupation importante à l'échelle mondiale du fait de la prolifération de souches microbiennes pathogènes résistantes aux molécules actuellement disponibles. C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude. Au sein du laboratoire, une nouvelle espèce bactérienne *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 (Zitouni et al., 2004) a été isolée en 1992 de la palmeraie d'Adrar (Algérie). Cette bactérie filamenteuse appartient au groupe des actinomycètes. Celle-ci s'est avérée productrice de molécules de la classe des dithiopyrrolones et présente des activités antibactériennes, antifongiques et anticancéreuses intéressantes (Webster et al., 2000 ; Oliva et al., 2001 ; Minamiguchi et al., 2001).

Le noyau dithiopyrrolone possède une structure composée de deux hétérocycles de 5 atomes : un cycle dithiol et un cycle pyrrol qui porte des radicaux reliés à l'azote 4 et 7 (« position N4 et N7 » cf figure 1). Le noyau cyclique résulte de la cyclisation de la cystine. Chaque association « radical-noyau » confère à la dithiopyrrolone des propriétés différentes, ce qui rend ce modèle d'étude intéressant.

Saccharothrix algeriensis produit principalement six molécules de cette classe possédant toutes un groupement méthyl- en position N7 et variant par leur radical R en position N4 (Lamari et al., 2002):

R= CH₃ Thiolutine

R= CH(CH₃)₂ Isobutyryl-pyrrothine (ISP)

R= (CH₂)₂-CH₃ Butanoyl-pyrrothine (BUP)

R=CH=C(CH₃)₂ Senecyol-pyrrothine (SEP)

R= C(CH₃)=CH(CH₃) Tigloyl-pyrrothine (TIP)

R= C₆H₅ Benzoyl-pyrrothine (détecté sur milieu ISP2)

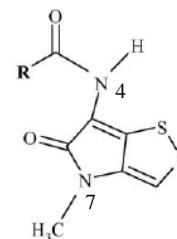


Figure 1. Structure générale des dithiopyrrolones

Malheureusement le genre *Saccharothrix* fait partie des Actinomycètes rares très peu étudiés. Aucune donnée intéressante sur ce groupe n'est disponible au niveau de la littérature.

Des travaux antérieurs (Bouras, 2005), ont permis de mettre en évidence l'influence de la composition du milieu de culture sur la production relative de ce panel de molécules. De plus, de nouveaux dérivés dithiopyrrolones ont pu être produits suivant le milieu de culture.

Ces potentialités synthétiques remarquables sont prometteuses. Dans l'objectif de comprendre les mécanismes qui régissent cette activité synthétique, une étude approfondie est en cours dans notre laboratoire. Elle a pour but la mise au point d'un modèle stœchio-cinétique rendant compte du comportement de la bactérie d'un point de vue macroscopique et donc de maîtriser ainsi que d'optimiser cette production de composés bio-actifs.

Une étape clé de cette étude consiste à concevoir un milieu de culture synthétique maîtrisé permettant une étude cinétique et stœchiométrique plus fine. Ce type de milieu facilite l'identification des différents substrats de la bactérie, et donc aide à la formulation d'hypothèses sur le fonctionnement métabolique de la bactérie.

Dans un premier temps, les molécules source de carbone ont été testées suivant un panel varié afin de cibler la plus intéressante d'un point de vue croissance et production de dithiopyrrolones. Fructose, lactose, maltose, saccharose, mannitol, amidon, dextrans, glycérol et galactose ont été testés à la même concentration molaire que le glucose (83 mM).

Jusqu'à présent, les milieux utilisés pour l'étude de *Saccharothrix algeriensis* contenaient de l'extrait de levure. La suppression de l'extrait de levure du milieu de culture entraîne un arrêt de la croissance de *Saccharothrix algeriensis* (résultats non présentés). Il apporte donc des éléments, comme des facteurs de croissances, vitamines, bases nucléiques et/ou acides aminés...) nécessaires pour la croissance de *Saccharothrix algeriensis*. Cependant, sa composition est difficilement maîtrisable et il est donc intéressant d'identifier le ou les éléments contenus dans l'extrait de levures intervenant dans la croissance de *Saccharothrix algeriensis* ainsi que la production de dithiopyrrolones associée.

Les molécules susceptibles de combler une auxotrophie sont testées groupées afin de déceler une éventuelle poly-auxotrophie puis pour les groupes qui induisent une croissance, les molécules sont criblées individuellement. Les acides aminés, les 5 bases azotées et les vitamines des groupes B et C sont testés. Les acides aminés et les bases azotées sont à 5 mM chacun. Les vitamines sont en excès par rapport aux compositions des milieux de culture qui les utilisent (Sebald et Costilow., 1975).

Par ailleurs, la composition de l'extrait de levure en élément chimique a été déterminée afin d'identifier d'autres potentielles sources de carence.

L'ensemble de ces molécules a d'abord été criblé en série en erlenmeyers. Puis les molécules les plus prometteuses ont été testées en fermenteur Batch pour une première analyse cinétique.

2. Matériel et méthodes

2.1 Cultures microbiennes

Composition du milieu de culture

Glucose	15 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g.L ⁻¹
NaCl	2 g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,5 g.L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	1 g.L ⁻¹
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,2 g.L ⁻¹
CaCl ₂	1 g.L ⁻¹
MOPS	20 g.L ⁻¹ (culture à pH non régulé) ou 2 g.L ⁻¹ (culture à pH régulé)
Extrait de levure	2 g.L ⁻¹ ou composé à tester 5 mM
Eau distillée	1000 mL q.s.p.

Le milieu minimum est composé des sels, du tampon MOPS et du glucose. Le milieu synthétique correspond au milieu minimum auquel est ajouté le composé à tester. Le milieu minimum et l'extrait de levure constituent le milieu semi-synthétique.

L'équipement des fermenteurs permet des mesures de pH, de concentration en O₂ dissous, de température et l'analyse des gaz de sortie (O₂ et CO₂), du débit d'air. Le pH est régulé à 7. La température de culture est de

30°C. La concentration en oxygène dissout est maintenue en permanence au dessus de 30 % de la saturation du milieu en oxygène.

2.2 Méthodes analytiques

Les méthodes de mesure présentées sont détaillées dans la littérature (Bouras, 2005).

Biomasse : La concentration en biomasse est déterminée à partir d'un prélèvement de 3 mL repartis en 2 fois 1,5 mL dans 2 tubes eppendorffs préalablement dessiqués et tarés. Les tubes sont ensuite centrifugés à 16000 g pendant 10 min. Le culot est lavé trois fois par centrifugation en utilisant 1 mL d'HCl (0,35 M) afin d'éliminer les molécules solubles à pH acide et une dernière fois avec de l'eau distillée. La masse de cellules est déterminée après que le culot ait été séché 48h à 105°C. Le poids sec ainsi déterminé est ensuite exprimé en gramme de matière sèche par litre de milieu de culture. Les pesées sont effectuées avec une balance de précision (Sartorius 2006® MP™). L'erreur expérimentale est de 5% de la valeur.

Dithiopyrrolones : La concentration en dithiopyrrolones dans le milieu de culture est déterminée par HPLC. La colonne utilisée est rempli par une phase inversée C18 (longueur = 150 mm, diamètre intérieur = 4,6 mm) précédée d'une colonne de garde (10 x 4 mm). La phase mobile est un mélange polaire d'eau et d'acétonitrile. L'élution s'effectue en gradient (acétonitrile : 0 – 5 min, de 0 à 30 % ; 5 – 30 min, de 30 à 100 %). La détection s'effectue par UV à 390 nm (longueur d'onde d'absorption maximale des dithiopyrrolones).

Glucose : Le glucose est dosé avec un appareil automatique YSI (Yellow Spring Instruments®, modèle 2700 Select) qui utilise la glucose oxydase immobilisée sur membrane. La membrane est couplée à une sonde électrochimique. L'erreur de mesure est de 3% de la valeur

Éléments chimiques : Les éléments chimiques contenus dans le milieu de culture sont dosés par spectrométrie d'émission atomique (Spectromètre d'émission optique Ultima 2®, JY Horiba, www.jyhoriba.com). L'écart-type sur la mesure n'excède pas 1,5 %.

3. Résultats et discussion

Au cours de cette étude, 96 cultures en erlenmeyers et 5 cultures en fermenteurs ont été effectuées. La synthèse de ces expériences est présentée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Synthèse des différentes expériences réalisées

Nombre d'expériences	Milieu de culture
62	Milieu Semi-Synthétique
21	Milieu Synthétique
13	Milieu Minimum

3.1 Criblage des sources de carbone

Dans un premier temps, différentes sources de carbone ont été évaluées en milieu semi-synthétique (2 g.L⁻¹ d'extrait de levure). Ce test préliminaire a pour but de déterminer quelle est la meilleure source de carbone pour la croissance et la production de dithiopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis*.

Les molécules carbonées ont été choisies les plus variées possibles : des hexoses (glucose et galactose), un pentose (fructose), des disaccharides (lactose, maltose et saccharose), des poly-alcools (mannitol et glycérol) et deux polymères de glucose (amidon et dextrine). Les résultats sont présentés sur la figure 2.

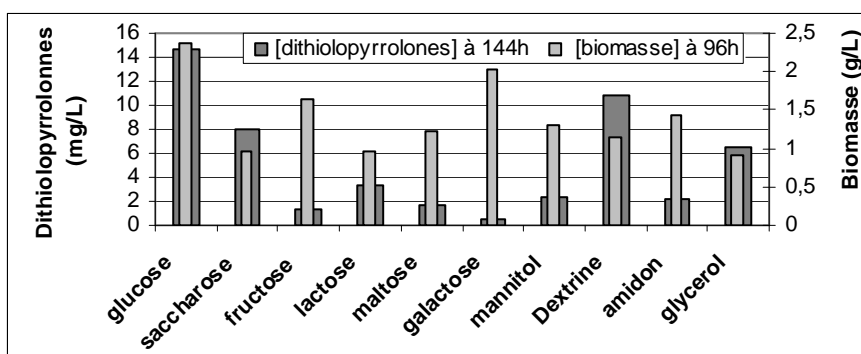


Figure 2. Concentration en biomasse et en dithiopyrrolones respectivement après 96 et 144 h de culture en fonction des sources de carbone utilisées sur milieu semi-synthétique.

Le glucose et le galactose permettent une bonne croissance du microorganisme : respectivement 2,03 et 2,36 g.L⁻¹ de biomasse en 96 h de croissance. Cependant, le glucose permet une production de dithiopyrrolones 30 fois supérieure à celle du galactose à 144h de culture. Par ailleurs, contrairement au glucose qui conduit principalement à la production de thiolutine, les autres sucres (galactose, lactose, saccharose, maltose et fructose, l'amidon, les dextrines, le mannitol et le glycérol) induisent un spectre de production de dithiopyrrolones plus large : production de nouveaux dérivés dithiopyrrolones ayant les temps de rétention HPLC suivants : 12,5 15,61 et 16,9 min.

Le glucose est la source de carbone la plus adaptée pour la croissance de *Saccharothrix algeriensis* et la production de dithiopyrrolones associée.

3.2 Recherche des composés pour lesquels le microorganisme pourrait être auxotrophe

L'extrait de levures étant indispensable à la croissance de *Saccharothrix algeriensis*, il est nécessaire de déterminer les auxotrophies qu'il comble afin de le substituer par des substrats maîtrisés. L'extrait de levures étant principalement une source d'acides aminés, de bases azotées et de vitamines, leur performance sur la croissance de *Saccharothrix algeriensis* a été évaluée en erlenmeyers. Ces molécules sont dans un premier temps testées par groupes : acides aminés hydrophobes, souffrés et chargés ; bases azotées (Adénine, Thymine, Cytosine, Guanine, et Uracile) et vitamines (groupes B et C). L'ensemble de ces groupes a été également évalué de manière couplée de façon à déceler une éventuelle poly-auxotrophie. Les concentrations maximales en biomasse et en dithiopyrrolones ont été observées.

Seul le mélange des 5 bases azotées (5mM / base azotée) induit une croissance du microorganisme : [biomasse]_{165h} = 2,63 g.L⁻¹ et [glucose consommé]_{165h} = 4,1 g.L⁻¹. Des investigations supplémentaires ont montré que l'uracile à 20 mM permet le meilleur compromis entre croissance ([biomasse]_{141h} = 0,53 g.L⁻¹) et production de dithiopyrrolones ([dithiopyrrolones]_{207h} = 5,79 mg.L⁻¹). Par ailleurs, il apparaît que la cytosine (20 mM) induit une production spécifique de molécules bioactives 3 fois supérieure à celle de l'uracile (20mM) : soit 27,67 contre 9,63 mg.g⁻¹.L⁻¹.

3.3 Investigations supplémentaires: les oligoéléments

La recherche d'une molécule comblant une éventuelle auxotrophie n'ayant pas donné de résultats probants. L'attention doit être portée sur la recherche d'autres éléments apportés par l'extrait de levure. La substitution de l'extrait de levures par un mélange d'oligoéléments emprunté à la littérature (Colombié et al., 2005) a été testée. Les résultats sont présentés dans le tableau 2. L'ajout de ce mélange induit, après 259h de latence une croissance de *Saccharothrix algeriensis* ainsi qu'une production de dithiopyrrolones variées en quantité appréciable ([biomasse]_{332h} = 3,26 g.L⁻¹ et [dithiopyrrolones]_{332h} = 25,75 mg.L⁻¹). En effet, les oligoéléments tels que le manganèse ou le molybdène peuvent remplir chez certaines espèces bactériennes des rôles biologiques fondamentaux. Les différents niveaux d'activation et de répression des voies métaboliques pourraient expliquer une telle latence.

L'effet positif sur la croissance et la production de dithiopyrrolones de l'extrait de levure ainsi que sa substitution possible par un mélange d'oligoéléments ayant été mis en évidence, sa composition en cations a été analysée qualitativement. Il est apparu qu'il contenait de manière significative les éléments chimiques suivant :

Mg, Co, Al, V, Ca, W, P, Mn, Zn, Zr et B. Ces éléments ont été recherchés en début et en fin de culture (88h) sur milieu semi-synthétique (2 g.L⁻¹ d'extrait de levure). Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2. Concentration en ppb des différents éléments chimiques dans le milieu semi-synthétique pendant la culture.

Éléments chimiques	Concentration à t = 0h	Concentration à t = 88h	Consommation
Mg	17342	8338	9004
Al	34	10	24
Ca	165490	17941	147549
W	443	0	443
P	309790	124733	185057
Mn	22	2	20
Co	2	1	1

L'analyse qualitative comparée de la composition en ces éléments chimiques en début et en fin de culture montre que plusieurs éléments chimiques diminuent de manière significative : Mg, Ca, W et P. Le tungstène est le seul élément épuisé après 88h de culture. Il pourrait être limitant pour la croissance de la bactérie car sa concentration passe de 443 à 0 mg.L⁻¹ en 88h. Il jouerait un rôle biochimique essentiel dans le métabolisme de *Saccharothrix algeriensis*. Ce résultat n'est pas surprenant. Le tungstène est un co-facteur enzymatique qui a un rôle semblable au molybdène, notamment chez les oxydoréductases. De plus, le sous-sol du sud du Maghreb est connu mondialement pour abriter des gisements important de tungstène (Gisement de Djebel Aouam au Maroc, mine de Bachir en Algérie). Or la bactérie *Saccharothrix algeriensis* a été isolée à partir d'un échantillon de la palmeraie d'Adrar dans le sud ouest algérien. Ce point est à approfondir.

3.4 Analyse cinétique

L'uracile à 20 mM, la molécule induisant les meilleures croissances et production de dithiopyrrolones en erlenmeyer, est testée en fermenteur « batch » dans le but de confirmer les résultats en erlenmeyer. De plus, cette base azotée est également ajoutée au milieu semi-synthétique (2 g.L⁻¹ d'extrait de levure) pour observer l'incidence de la nature du milieu de culture (synthétique ou semi-synthétique) sur le comportement de la bactérie. Les bilans de matière sur l'élément carbone montreraient que cette base agit comme facteur de croissance et qu'elle n'est pas assimilée en tant que substrat carboné par la bactérie. Les cinétiques expérimentales de croissance, de consommation de glucose et de production de dithiopyrrolones sont présentées figure 3a (milieu semi-synthétique) et 3b (milieu synthétique).

L'observation de l'évolution de la concentration en biomasse dans le réacteur montre que la croissance débute dès les 12 premières heures de culture. La concentration en biomasse augmente linéairement jusqu'à atteindre une valeur de 4,86 g.L⁻¹ à 107 h de culture. Pendant la phase de croissance le taux de croissance moyen est de 0,043 h⁻¹. Au-delà de 107 h, la concentration en biomasse diminue du fait de la lyse cellulaire.

Le calcul du rendement biomasse formée sur glucose consommé est supérieur à 1 de 0 à 32h ce qui signifie que pendant cette période, la croissance se fait sur un substrat carboné autre que le glucose. Il pourrait s'agir des acides aminés contenu dans l'extrait de levure. La deuxième partie de la croissance est accompagnée d'une diminution de la concentration en glucose avec un rendement de 0,32 g de biomasse formée par g de glucose consommé.

La production de thiolutine est associée à la croissance. Une augmentation est constatée entre 12 et 52h avec [thiolutine]_{52h} = 33 mg.L⁻¹ suivie d'une diminution de 52 à 107h avec [thiolutine]_{107h} = 23 mg.L⁻¹. Une reprise de production est constatée entre 107 et 132h [thiolutine]_{132h} = 30 mg.L⁻¹ et enfin une diminution jusqu'à la fin de la culture.

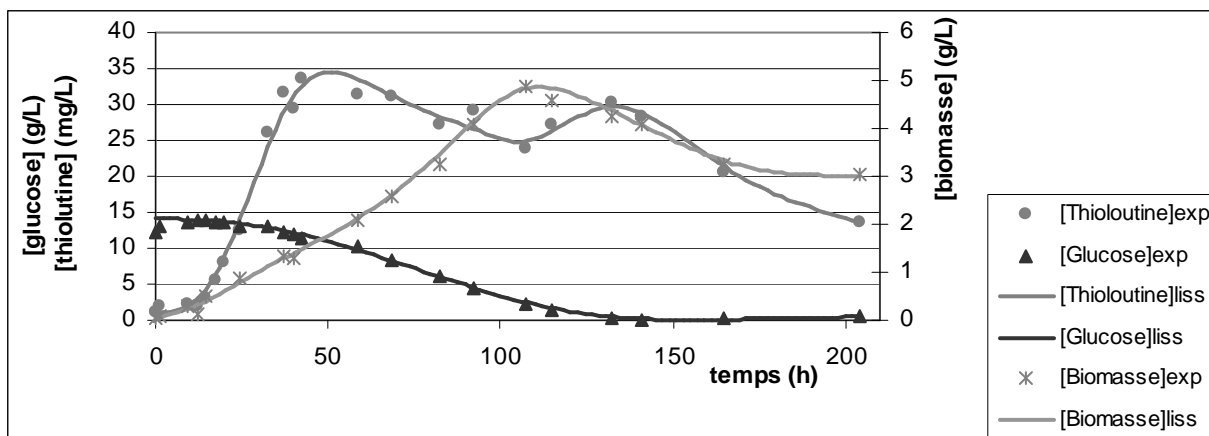


Figure 3a. Culture de *Saccharothrix algeriensis* en fermenteur batch ($pH=7$, $pO_2 > 30\%$, agitation = 150 rpm et $T = 30^\circ C$) sur milieu semi-synthétique.

La bactérie entame la production de thiolutine dès le début de sa croissance et il semblerait que se soit l'arrêt de la croissance sur acides aminés qui induise l'arrêt de la synthèse de thiolutine. Par contre la fin de la croissance sur glucose provoquerait une nouvelle augmentation de la concentration en thiolutine. La dégradation de la thiolutine en d'autres composés ou consommation de celle-ci par la bactérie pourrait expliquer les deux phases de diminution de la concentration en thiolutine (de 52 à 107 h et après 132h).

La première partie de la croissance se déroule sur un substrat différent du glucose et s'accompagne de la majeure partie de la production de thiolutine. La seconde partie de la croissance s'effectue sur glucose et engendre une nouvelle production de thiolutine.

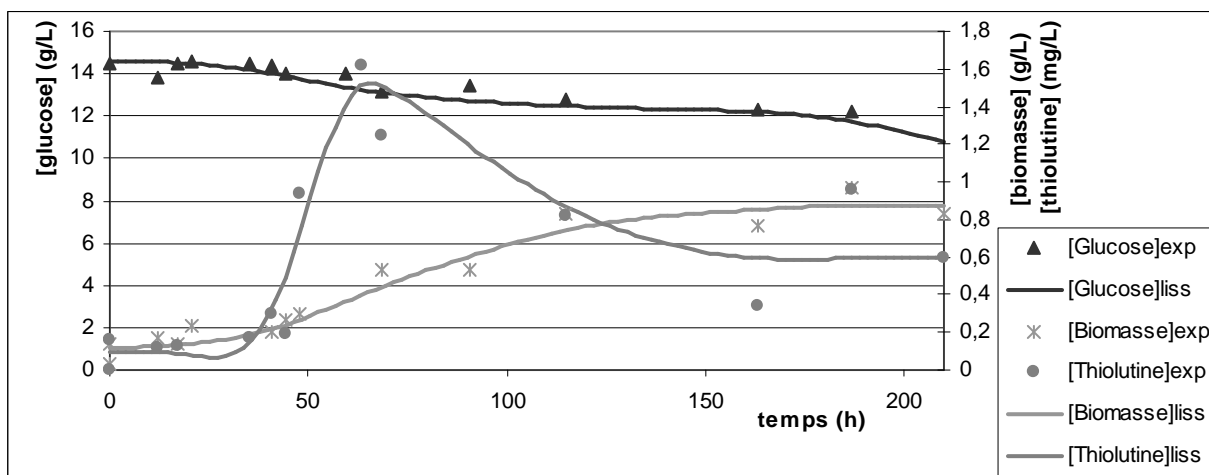


Figure 3b. Culture de *Saccharothrix algeriensis* en fermenteur batch ($pH=7$, $pO_2 > 30\%$ agitation = 150 rpm et $T = 30^\circ C$) sur milieu minimum.

D'une manière générale, les concentrations en biomasse et dithiopyrrolones sont inférieures à celles obtenues sur milieu semi-synthétique : $0,96 \text{ g.L}^{-1}$ (5 fois inférieur) et $1,6 \text{ mg.L}^{-1}$ (20 fois inférieur).

La croissance se déroule linéairement de 30 à 183h avec un taux de croissance moyen de $0,008 \text{ h}^{-1}$. Le rendement de gramme de biomasse produite par gramme de glucose consommé est voisin de $0,31 \text{ g.L}^{-1}$.

L'évolution de la concentration en thiolutine se caractérise par une phase de production : $[\text{thiolutine}]_{63h} = 1,6 \text{ mg.L}^{-1}$ suivie d'une diminution. La production de thiolutine ne commence pas avec le début de la croissance.

Ces deux fermentations permettent de mieux cerner le comportement de la bactérie qui adopte des profils de croissance et de production très différents suivant le milieu dans lequel elle croît, ce qui montre l'importance de maîtriser le milieu de culture pour l'étude de *Saccharothrix algeriensis*.

5. Conclusion

Cette étude a permis de montrer que les bases azotées permettent une certaine croissance de la *Saccharothrix algeriensis* ainsi qu'une production de dithiopyrrolones optimisables en milieu synthétique. Cependant, ces travaux n'ont pas permis de mettre en évidence une auxotrophie franche de la bactérie pour les différents composés testés. L'extrait de levures utilisé pour la préparation du milieu semi-synthétique contient peut être d'autres composés carbonés comblant une auxotrophie et non testés ici.

Cette étude a permis de montrer le développement possible de *Saccharothrix algeriensis* sur un milieu synthétique supplémenté d'éléments chimiques. D'autre part, l'importance d'éléments chimiques autres que carbone, soufre, hydrogène et oxygène dans l'extrait de levure contenu dans le milieu semi-synthétique sur la croissance a été mise en évidence. Ces éléments chimiques sont utilisés par la bactérie pendant sa croissance. Une analyse plus fine des cinétiques de consommation de ces éléments chimiques permettrait la mise au point rapide d'un milieu synthétique performant et permettant l'étude approfondie de ce microorganisme.

Des investigations supplémentaires devront être rapidement mises en œuvre pour définir plus précisément le rôle de l'extrait de levure dans le développement de *Saccharothrix algeriensis*.

L'une des suites à donner à ces travaux est de développer un modèle stœchio-cinétique représentant, au niveau macroscopique, la croissance et la production de dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*. Cet outil mathématique devrait permettre, à terme, de maîtriser la molécule produite et d'optimiser sa production en jouant sur les paramètres environnementaux de culture.

Références

- Bourras N. (2005).** Régulation de la production d'antibiotiques dithiopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Thèse en science des procédés et de l'environnement. Toulouse : Institut National Polytechnique de Toulouse. 238 p.
- Colombié V., Bideaux C., Goma G., Uribe Larrea J.L. (2005).** Effects of glucose limitation on biomass and spiramycin production by *Streptomyces ambofaciens*. *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, **28**, 55-61.
- Labeda D.P., Kroppenstedt R. M. (2000).** Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa : proposal for *Actinosynnemataceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 331-336.
- Lamari L., Zitouni A., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Lebrihi A., Lefebvre G., Seguin E., Tillequin F. (2002).** New dithiopyrrolones antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233 : I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **55**, 696-701.
- Minamiguchi K., Kumagai H., Masuda T., Kawada M., Ishizuka M., Takeuchi T. (2001).** Thiolutin, an inhibitor of HUVEC adhesion to vitronectin, reduces paxilline in HUVECS and suppresses tumor cell-induced angiogenesis. *Int. J. Cancer*, **93**, 307-316.
- Oliva B., O'Neill A., Wilson J.M., O'Hanlon P.J., Chopra I. (2001).** Antimicrobial properties and mode of action of the pyrrothine holomycin. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**, 532-539.
- Sebald M., Costilw RN. (1975).** Minimal growth requirements for *Clostridium perfringens* and isolation of auxotrophic mutants. *Appl. Microbiol.*, **29**, 1-6.
- Tipper D.J. (1973).** Inhibition of yeast ribonucleic acid polymerases by thiolutin. *J. Bacteriol.*, **116**, 245-256.
- Zitouni A., Lamari L., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Gaouar A., Mathieu F., Lebrihi A., Labeda D.P. (2004).** *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., isolated from Saharan soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 1377-1381.
- Zitouni A., Boudjella H., Lamari L., Badji B., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. (2005).** *Nocardioopsis* and *Saccharothrix* genera in saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterisation of antibiotics. *Res. Microbiol.*, **156**, 984-993.
- Webster J.M., Li J., Chen G.** Anticancer property of dithiopyrrolones. Brevet PN6020360. 1^{er} Février 2000.

Résumé

La production de nouvelles molécules bioactives est actuellement une préoccupation importante au plan mondial du fait de la prolifération de microorganismes pathogènes ayant développé une résistance aux molécules actuelles. Dans ce contexte, une bactérie isolée du sol saharien, *Saccharothrix algeriensis*, fait l'objet de cette étude. Elle a la capacité de produire des molécules aux potentialités bio-actives remarquables : les dithiopyrrolones.

L'objectif du travail se concentre sur les aspects macroscopiques de l'analyse du comportement du microorganisme en milieu liquide en vue du développement d'un procédé de bioproduction. Une première étape a consisté en la recherche d'un milieu de culture chimiquement maîtrisé. Afin de s'affranchir de l'utilisation d'extrait de levure, substrat difficilement maîtrisable, l'influence de la teneur en différentes bases azotées, acides aminés et oligoéléments sur la croissance a été étudiée. L'uracile et la thymine, les acides aminés non polaires ainsi que les oligoéléments favorisent la croissance de *Saccharothrix algeriensis*. Le milieu synthétique donnant les meilleurs résultats en terme de croissance et de production d'antibiotique a été testé en fermenteur « batch » de 2 L équipé d'un analyseur gaz autorisant une étude cinétique plus fine et un environnement physico-chimique maîtrisé. L'analyse qualitative des fermentations a montré que sur milieu contenant plusieurs substrats, la bactérie consomme les nutriments séquentiellement. Sa croissance apparaît diauxique. La synthèse des dithiopyrrolones semble découplée de la croissance de la souche. Cette analyse qualitative a permis d'établir un schéma réactionnel décrivant la croissance de *Saccharothrix algeriensis* en milieu semi-synthétique. L'analyse factorielle des données cinétiques a permis de décrire raisonnablement le comportement du microorganisme en 4 réactions.

Mots clés : microorganisme filamenteux, métabolisme secondaire, modélisation stœchiométrique, schéma réactionnel, *Saccharothrix algeriensis*, dithiopyrrolones, thiolutine, milieu semi-synthétique.

Abstract

Nowadays, production of new bioactive molecules is an important concern around the world. Due to development of bacterial resistance to antibiotics, investigations are performed to discover rare bacteria, which can produce such bioactive molecules. In view of this, *Saccharothrix algeriensis*, a bacterium isolated from Sahara desert, is here studied. It produces molecules with noteworthy bioactive potentialities: the dithiopyrrolones.

The objective of this study focuses on the macroscopic aspects of the micro-organism behaviour in liquid medium, in order to develop a bio-production process. A first step has consisted in the research of a chemically defined medium. So as to avoid used of yeast extract, which is a difficult substrate to control, the effect of nucleobases, amino acids, and oligoelements on its growth has been investigated. Uracil and thymine, non polar amino acids and oligoelements had a positive impact on *Saccharothrix algeriensis* growth. The synthetic medium, which allows the best bacterial growth and antibiotic production, has been tested in 2 L batch fermentor. It is connected to a gas analyser, which allows an accurate kinetic study and provides a controlled physicochemical environment to the micro-organism. Qualitative analysis of the cultures has shown that, on a medium which contains several substrates, the bacterium sequentially consumes the nutrients. Bacterial growth seems to be diauxic. Dithiopyrrolone synthesis seems to be uncoupled with the growth of the stain. This quantitative analysis has allowed to establish a reaction scheme, which describes *Saccharothrix algeriensis* growth on semi-synthetic medium. Factor analysis of kinetic data had reasonably lead to a description of *Saccharothrix algeriensis* behaviour in 4 reactions

Keywords: filamentous microorganisms, secondary metabolism, stoichiometric modelisation, reaction scheme, *Saccharothrix algeriensis*, dithiopyrrolones, thiolutine, semi-synthetic medium.