

N° d'ordre: 2294.

**INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE**

**ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE AGRONOMIQUE DE TOULOUSE  
LABORATOIRE DE GÉNIE CHIMIQUE UMR 5503 (CNRS/INPT/UPS)  
DEPARTEMENT GÉNIE DES PROCÉDÉS ET SYSTÈMES MICROBIENS**

**THÈSE**

Présentée à l'INP

par

**Noureddine BOURAS**

En vue d'obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE**

École doctorale: **SCIENCES DES PROCÉDÉS**

Spécialité: **SCIENCES DES PROCÉDÉS ET DE L'ENVIRONNEMENT**

**RÉGULATION DE LA PRODUCTION D'ANTIBIOTIQUES  
DITHIOLOPYRROLONES CHEZ *SACCHAROTHRIX ALGERIENSIS*  
NRRL B-24137**

**Soutenue le 25 Novembre 2005, devant le Jury composé de:**

**M. J-L. PERNODET (D.R.U. Orsay, Paris XI)**

**M. A. LEBRIHI (Pr. ENSAT-INPT)**

**M. N. SABAOU (Pr. ENS de Kouba, Alger)**

**M. C. BRANDAM (M.C. ENSIACET-INPT)**

**Président de Jury**

**Rapporteur**

**Directeur de thèse**

**Rapporteur**

**Examineur**

*A mes très chers parents,  
qui m'ont tant offert sans jamais se lasser,  
qui m'ont transmis le désir d'apprendre et m'ont toujours accompagné tout au  
long de mes études avec leur amour, leur soutien, leur compréhension et leurs  
encouragements, et m'ont permis de devenir ce que je suis,  
avec tout mon amour et ma reconnaissance.*

*A ma sœur Aïcha et à mes frères Hadjdaoud, Réda et Kamel-eddine, avec une  
profonde tendresse.*

*A ma fiancée Chacha, avec toute mon affection et mon amour.*

*A toute la famille, dans le sens large du terme, pour leur soutien qui m'a été fort  
précieux.*

*A tous mes amis, mes enseignants et camarades de classes du collège, lycée,  
l'école El-Djabiria, l'ENS d'Alger et de l'ENSAT de Toulouse.*

*Je dédie affectueusement cette thèse  
et J'adresse à tous un grand merci pour tout*

## AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Génie Chimique (UMR 5503, CNRS-INPT-UPS) au sein du département « Bioprocédés et Systèmes Microbiens » sous la direction de Monsieur le Professeur Ahmed LEBRIHI à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (ENSAT-INP).

Il m'est particulièrement agréable d'adresser mes remerciements à:

Monsieur le Professeur Ahmed LEBRIHI, pour m'avoir proposé ce sujet, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour m'avoir guidé et conseillé, pour l'intérêt qu'il porte à ce sujet et ses précieux conseils qui m'ont été tout le temps fructueux. Je lui exprime ma profonde gratitude et toute ma reconnaissance.

Monsieur le Professeur Nasseridine SABAOU, Professeur à l'ENS de Vieux-Kouba (Alger), pour m'avoir conseillé et pour avoir bien voulu juger ma thèse. Je lui exprime mes sincères remerciements et toute ma reconnaissance.

Que soit vivement remercié Monsieur le Professeur Jean-Luc PERNODET (Directeur de Recherche CNRS d'Orsay, Paris XI) qui m'a fait l'honneur d'accepter de juger mon travail.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Cédric BRANDAM, Maître de Conférences à l'INP-ENSIACET qui a accepté d'examiner et de juger mon travail.

Madame Florence MATHIEU, Maître de Conférences et Chercheur dans notre laboratoire, pour la codirection de ma thèse. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour ses bons et précieux conseils pratiques.

Je souhaiterais également remercier tous les membres du laboratoire pour leurs aides et leurs encouragements, en particulier Ali ATOUI, Hadjira BOUDJELLA, Abdelghani ZITOUNI, Gamal AWAD, Boubakeur BADJI, Huy Phong DAO et Hend BEJAOUI. Un merci à tous les membres de passage dans notre laboratoire qui m'ont accompagné pour l'ambiance amicale qu'ils ont su créer durant ces trois dernières années: Mohamed LARBI, Muriel APAYA, Sandra GARCIA, Ikram EL-GANNABE, Emilie DEL ROSSO, Rafik ERRAKHI, Abdelouahed HAJJAJI, Fatma Zahra KARMACH, Noura EL MOURABITE, Irène KOUADIO, Awanwee PETCHKONGKAEW,... Un grand merci à tous les membres du laboratoire des Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse

(LPBVB) de l'ENS d'Alger: Amar RIBA, Rabiâa MERROUCHE, Lynda LAMARI, Tahar DOB, Farida BOUDJELAL, Atika MEKLAT. Une pensée particulière à tous mes professeurs de l'ENS, en particulier Leïla SAÂDI, Malika NEBBALI, Abdelkarim KAMELI, Nasser BOUZEKRIA, Messaoud BOUDJENIBA, Mohamed TOUMI, Zohra BOUNOUARA,...

Je souhaite exprimer mes remerciements à Monsieur le Professeur Pierre STREHAIANO, notre chef du département BioSyM pour être à l'écoute de chacun des thésards, ainsi qu'à Cédric BRANDAM pour ses bons et précieux conseils pratiques et sa collaboration lors des expériences en fermenteurs, Claudia CASTRO-MARTINEZ, Huberson AKIN, Maria-Helena HERNANDEZ-ROJAS, Audrey SPITZ-SERRA, Patricia TAILLANDIER, Marie-Line DELIA, Jean-Pierre MONNA, pour leur aide précieuse et leur disponibilité, avec une pensée particulière à Felipe RAMON-PORTUGAL, pour son aide, ses conseils, et son amitié.

Je remercie le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique de l'Algérie pour le soutien financier dans le cadre d'une bourse intergouvernementale. J'aimerais exprimer ma profonde gratitude à Madame POUEYMIRO du CROUS de TOULOUSE pour sa gentillesse, et son aide.

A Monsieur le Professeur Yves TARDY, Monsieur Mustapha BARAKATE et au Directeur du centre de viticulture Monsieur Marc GARCIA, pour leur gentillesse, leurs encouragements et leur sympathie.

Un grand merci à Monsieur Henri AVRIL, Professeur de l'anglais à l'ENSAT et à Monsieur le Professeur Arnold. L. DEMAÏN (DREW University, Madison, USA), pour leurs encouragements et pour la correction des publications.

A Messieurs Yannick COPPEL (Laboratoire de Chimie de Coordination, CNRS, Toulouse) et Frédéric PONT (Service de spectrométrie de masse de l'IFR 30, INSERM, Hôpital de PURPAN) pour la réalisation des spectres de RMN et de masse, respectivement, ainsi que pour les interprétations.

A tous les techniciens et le personnel de notre laboratoire: Gérard VIGNAU, Patricia NOUVET, Josiane TRILLES, Josiane DESPAX, sans oublier la Formidable Paule TABARELLI, ...

Au personnel de la bibliothèque de l'ENSAT, et un grand merci également à Gérard SURAN de l'accueil de l'ENSAT, pour leur gentillesse, leur sympathie et leur disponibilité.

Je souhaite aussi adresser ma reconnaissance à Monsieur Bernard LACROUX, et son épouse Liliane, pour m'avoir accueilli à Toulouse et avoir accepté d'accueillir ma famille en Juillet-Août de l'année 2004, et pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Un grand merci au Docteur Abdellah DOUDOU pour son amitié et ses encouragements.

Mes remerciements vont également à: la famille TIZOUGGAGHINE, en particulier Daddi Salah ! et la famille DADDI-HAMMOU, en particulier M. Yahya, Moussa et Mohammed. Un grand merci pour leur accueil chaleureux et leur grande gentillesse.

Il m'est particulièrement agréable d'adresser un remerciement très chaleureux et très particulier à mon ami Faouzi ATTIA pour son aide morale et ses encouragements, vraiment Faouz ! Tu es *Magnifico*. Un merci également à tous mes amis de Toulouse: Faouzi Mohamed KASERAoui, Sami EL-OMARI, Charef BEDDANI, Abed MALTI, Houari KHENNOUS, Didier FORT, Jessica TABARELLI pour n'avoir épargné aucun effort pour m'aider. Un grand merci également à tous mes amis de Béni-Isguèn, en particulier: Zoheir KERBA, Abdelwahab FARTAS, Djaber HADJ-SAÏD, Rafik MOKNINE, Banouh NOUH-MEFNOUN, Mustapha DAOUD, Nacer BOURAS, Bakir METIAZ, Hamada ABDERRAHMANE, Mustapha BENNACER, Mohammed BAKELLI, Mohamed HADJ-MESSAOUD FEKHAR, merci une autre fois pour votre amitié, nos débats, nos souvenirs,... !!!

J'adresse une pensée particulière à tous ceux que j'ai eu le plaisir de rencontrer à Toulouse, en particulier Ahmed MOGAHED, Jamal IDRIS, Didier FORT, Majid SADI, Idriss BOUKHEFFA, Nisrine BOUCHEFAA, Nawroz TAHIR ABDERREZZAK, CHIZUKO ODA, Pierre GNONHOSSOU, Claire-Marie DAVID, Sylviane BOURGAULT-CÔTE, Marie-Christine FORTIN, Katrin DE CLERCQ, Abdoulaye DIAWARA, Wassim CHEIKH-ARABE, ...

J'adresse également mes remerciements à toutes les personnes qui, de diverses façons et à différents moments m'ont apporté leur aide et leur soutien, plus particulièrement aux gens du laboratoire présents et de passage qui m'ont accompagné, supporté et soutenu pendant ces trois années.

Enfin, il me tenait à cœur de remercier les tous ceux qui me sont, et qui me seront toujours chers. Ils sauront se reconnaître. Mes remerciements vont également à tous ceux qui m'ont soutenu tout au long de ce travail, ils savent bien la place que je leur réserve au fond de mon cœur.

## SOMMAIRE

Avant-propos

INTRODUCTION GENERALE.....1

### CHAPITRE I.

#### REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>I.- LE GENRE <i>SACCHAROTHRIX</i></b> .....	5
1.- Caractéristiques et position taxonomique du genre <i>Saccharothrix</i> .....	5
2.- Espèces appartenant au genre <i>Saccharothrix</i> .....	7
3.- Métabolites secondaires sécrétés par <i>Saccharothrix</i> .....	8
4.- Caractéristique et position taxonomique de <i>Sa. algeriensis</i> NRRL B-24137.....	9
5.- Spectre d'action et antibiotiques sécrétés par <i>Sa. algeriensis</i> NRRL B-24137.....	11
5.1.- Spectre d'action de <i>Sa. algeriensis</i> NRRL B-24137.....	11
5.2.- Antibiotiques sécrétés par <i>Sa. algeriensis</i> NRRL B-24137.....	11
<b>II.- DONNEES SUR LES DITHIOLOPYRROLONES</b> .....	12
1.- Caractéristiques chimiques des dithiolopyrrolones.....	12
1.1.- Propriétés physico-chimiques .....	12
1.2.- Propriétés spectroscopique.....	13
1.- Microorganismes producteurs de dithiolopyrrolones.....	16
3.- Spectre d'action des dithiolopyrrolones.....	17
4.- Mode d'action des dithiolopyrrolones .....	19
5.- Biosynthèse et synthèse chimique des dithiolopyrrolones.....	19
5.1.- Biosynthèse des dithiolopyrrolones .....	19
5.2.- Synthèse chimique des dithiolopyrrolones.....	22
6.- Domaines d'utilisation des dithiolopyrrolones.....	22
6.1.- Utilisation dans l'agriculture.....	22
6.1.- Utilisation dans d'autres domaines.....	23
7.- Toxicité des dithiolopyrrolones .....	24
8.- Résistance aux dithiolopyrrolones.....	24
<b>III.- REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DES ANTIBIOTIQUES</b> .....	25
1.- Facteurs physico-chimiques.....	25
2.- Inoculum.....	25
3.- Facteurs nutritionnels.....	26
3.1.- La source de carbone.....	27
3.1.1- Régulation par les substrats glucidiques.....	27
3.1.2- Régulation par les acides gras.....	28
3.2.- La source d'azote.....	29
3.2.1.- Régulation par les ions ammonium .....	29
3.2.2.- Régulation par les acides aminés .....	30

3.3.- La source de phosphate.....	33
3.4.- Les sels minéraux et les oligoéléments .....	34
4.- Taux de croissance.....	35
5.- Régulation de la production des précurseurs des antibiotiques.....	35
5.1.-Cas des acides aminés et métabolisme de soufre .....	35
5.1.1.- Biosynthèse et rôle de la cystéine.....	35
5.2.- Cas des acides organiques.....	37
5.2.1.- Origine des acides gras à courtes chaînes .....	37
5.2.1.1- $\beta$ -Oxydation des acides gras à longues chaînes.....	39
5.2.1.2- Catabolisme des acides aminés et glycolyse.....	39
5.2.1.3- Activation des acides acétique et propionique.....	41
6.- Signaux régulateurs.....	42
6.1.- Facteurs d'induction.....	42
6.2.- Messagers nucléotides phosphorylés.....	43
6.2.1- AMPc.....	43
6.2.1- ppGpp et pppGpp.....	44

## CHAPITRE II.

### MATERIEL ET METHODES

<b>I.- MICROORGANISME.....</b>	<b>45</b>
<b>II.- APPAREILS ET PRODUITS CHIMIQUES.....</b>	<b>45</b>
1.- Appareillage.....	45
2.- Produits chimiques.....	47
<b>III.- MILIEUX DE CULTURE ET STERILISATION.....</b>	<b>47</b>
1.- Milieu de conservation et de sporulation.....	47
2.- Méthode de conservation dans du glycérol .....	47
3.- Milieu de pré-culture et de culture.....	48
4.- Stérilisation des milieux de culture.....	49
<b>IV.- CONDITIONS DE FERMENTATION.....</b>	<b>49</b>
1.- Pré-cultures.....	49
2.- Cultures en Erlenmeyers.....	49
3.- Cultures en fermenteur.....	50
<b>V.- METHODES ANALYTIQUES.....</b>	<b>50</b>
1.- Mesure du poids sec.....	50
2.- Mesure du pH.....	51
3.- Extraction des dithiopyrrolones.....	51
4.- Dosage des dithiopyrrolones par HPLC.....	51
5.- Dosage du glucose et des acides organiques par HPLC.....	53
6.- Dosage du glucose par la méthode enzymatique YSI.....	55
7.- Dosage de l'azote ammoniacal.....	55
7.- Dosage de l'azote ammoniacal.....	55

7.1.- Principe.....	56
7.2.- Protocole.....	56
7.3.- Expression des résultats.....	57
8.- Dosage de l'azote total.....	59
8.1.- Principe.....	59
8.2.- Protocole.....	59
9.- Détermination des spectres UV-visible.....	60
10.- Spectrométrie de masse par impact électronique direct des dithiopyrrolones.....	60
<b>VI- DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES MICROBIENS ET DES RENDEMENTS DES FERMENTATIONS.....</b>	<b>60</b>
1.- Fermentations en fioles Erlenmeyer.....	60
2.- Fermentations en réacteur.....	61
2.1.- Calcul des vitesses globales.....	61
2.2.- Calcul des vitesses spécifiques.....	61

### CHAPITRE III.

## REGULATION DE LA PRODUCTION DES DITHIOPYRROLONES CHEZ *SACCHAROTHRIX ALGERIENSIS* NRRL B-24137 PAR LES ACIDES AMINES ET LES ACIDES ORGANIQUES

INTRODUCTION.....	62
RESULTATS.....	62
1.- Mise au point d'un milieu de culture semi-synthétique.....	62
2.- Cinétique de croissance et de production des dithiopyrrolones chez <i>Sa. algeriensis</i> NRRL B-24137 dans le milieu MSS.....	63
3.- Effet de l'addition des acides aminés soufrés à différents temps d'addition sur la croissance et la production des dithiopyrrolones chez <i>Sa. algeriensis</i> .....	64
4.- Effet de différentes concentrations de la cystéine et de la cystine sur la production des dithiopyrrolones chez <i>Sa. algeriensis</i> .....	64
5.- Effet de la nature et de la concentration de différents acides aminés et de l'acide humique sur la croissance et la production des dithiopyrrolones chez <i>Sa. algeriensis</i> .....	65
5.1.- Effet de différents acides aminés et de l'acide humique sur la croissance et la production des dithiopyrrolones chez <i>Sa. algeriensis</i> .....	65
5.2.- Effet de différentes concentrations de L-méthionine, DL-éthionine, L-proline et d'acide humique sur la croissance et la production des dithiopyrrolones chez <i>Sa. algeriensis</i> .....	66
6.- Effet de la nature et de la concentration de différents acides organiques sur la croissance et la production des dithiopyrrolones chez <i>Sa. algeriensis</i> .....	67
6.1.- Effet des acides organiques à une concentration de 5 mM sur la croissance et la production des dithiopyrrolones chez <i>Sa. algeriensis</i> .....	67



6.2.- Effet de différentes concentrations des acides acétique, butyrique, pimélique, tiglique, méthacrylique, pamoïque et férulique sur la croissance et la production des dithiopyrrolones chez <i>Sa. algeriensis</i> .....	68
<b>DISCUSSION</b> .....	69

## ARTICLE 1

### **Effect of amino acids containing sulfur on dithiopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137**

<b>ABSTARCT</b> .....	74
<b>1- INTRODUCTION</b> .....	75
<b>2- MATERIALS AND METHODS</b> .....	76
2.1.- Microorganism.....	76
2.2.- Culture medium.....	77
2.3.- Culture conditions.....	77
2.4.- Measurement of DCW and pH.....	77
2.5.- High performance liquid chromatography (HPLC) analysis.....	78
2.6.- Statistical analysis.....	78
<b>3- RESULTS</b> .....	79
3.1.- Kinetics of growth and dithiopyrrolone productions in <i>Sa. algeriensis</i> .....	79
3.2.- Effect of amino acids containing sulfur at different times of addition on growth and dithiopyrrolone productions in <i>Sa. algeriensis</i> .....	79
3.3.- Effect of different concentrations of cysteine and cystine on dithiopyrrolone productions by <i>Sa. algeriensis</i> .....	80
<b>4- DISCUSSION</b> .....	81
<b>5- REFERENCES</b> .....	84

## PROJET ARTICLE 2

### **Regulation of dithiopyrrolone antibiotic productions by amino acids and humic acid in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137**

<b>Abstract</b> .....	93
<b>1- Introduction</b> .....	94
<b>2- Materials and Methods</b> .....	95
2.1- Producing strain.....	95
2.2- Culture medium.....	96
2.3- Culture conditions.....	96
2.4- Measurement of DCW and pH.....	96
2.5- Dithiopyrrolone extractions and high performance liquid chromatography analysis.....	97
<b>3- Results</b> .....	98

3.1-Effect of different amino acids and humic acid on growth and dithiopyrrolone specific productions.....	98
3.2- Effect of L-proline, L-methionine and DL-ethionine concentrations on growth and dithiopyrrolone specific productions.....	99
3.3- Effect of humic acid concentrations on growth and dithiopyrrolone specific productions.....	100
<b>4- Discussion.....</b>	<b>100</b>
<b>5- References.....</b>	<b>103</b>

### PROJET ARTICLE 3

#### **Control of dithiopyrrolone antibiotic productions by organic acids in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137**

<b>Abstract.....</b>	<b>113</b>
<b>1.- Introduction.....</b>	<b>114</b>
<b>2.- Materials and Methods.....</b>	<b>114</b>
2.1- Producing strain.....	114
2.2- Culture medium.....	115
2.3- Culture conditions.....	115
2.4- Measurement of DCW and pH.....	115
2.5- High performance liquid chromatography (HPLC) analysis.....	116
<b>3- Results.....</b>	<b>117</b>
3.1- Effect of different organic acids on growth and dithiopyrrolone specific productions.....	117
3.2- Effect of organic acids concentrations on growth and dithiopyrrolone specific productions.....	118
<b>4- Discussion.....</b>	<b>119</b>
<b>5- References.....</b>	<b>123</b>

### CHAPITRE IV.

#### **REGULATION DE LA PRODUCTION DES NOUVELLES DITHIOPYRROLONES CHEZ *SACCHAROTHRIX ALGERIENSIS* B-24137 PAR LES ACIDES ORGANIQUES ET LES ACIDES AMINES**

<b>I- INTRODUCTION.....</b>	<b>134</b>
<b>II- RESULTATS.....</b>	<b>135</b>
<b>1.- Induction de nouvelles dithiopyrrolones par l'addition de certains acides organiques et acides aminés.....</b>	<b>135</b>
1.1.- Acides organiques cycliques induisant la production de nouvelles dithiopyrrolones.....	137
1.1.1.- Acides organiques cycliques induisant la formation de AJ 1 et/ou PR 16,64.....	138

1.1.2.- Acides organiques cycliques induisant la formation de diverses autres dithiopyrrolones.....	144
1.2.- Acides organiques aliphatiques induisant la production de nouvelles dithiopyrrolones.....	146
1.3.- Acides aminés induisant la production de nouvelles dithiopyrrolones.....	151
<b>2.- Effet de différentes concentrations de quelques acides organiques et acides aminés sélectionnés sur la production de nouvelles dithiopyrrolones par <i>Sa. algeriensis</i>.....</b>	<b>156</b>
2.1.- Effet des acides benzoïque, sorbique, cinnamique et 4-bromobenzoïque sur la biomasse et la production spécifique de quelques nouvelles dithiopyrrolones par <i>Sa. algeriensis</i> .....	156
2.1.1.- Effet sur la production de biomasse maximale.....	157
2.1.2.- Effet sur les productions spécifiques de quelques nouvelles dithiopyrrolones.....	157
2.2.- Effet de différentes concentrations des acides propionique et valérique sur la biomasse et la production spécifique de la nouvelle dithiopyrrolone PR3.....	160
2.2.1.- Effet sur la production de la biomasse maximale.....	160
2.2.2.- Effet sur la production spécifique de la nouvelle dithiopyrrolone PR 3.....	161
2.3.- Effet de différentes concentrations de cystéine et de cystine sur la biomasse et la production spécifique de quelques nouvelles dithiopyrrolones.....	162
<b>3.- Analyses spectrométriques de masse par impact électronique direct de quelques dithiopyrrolones nouvellement apparues.....</b>	<b>163</b>
<b>III- DISCUSSION.....</b>	<b>166</b>

## CHAPITRE V.

### ETUDE CINETIQUE DE LA CROISSANCE DE *SACCHAROTHRIX ALGERIENSIS* ET DE LA PRODUCTION DES DITHIOPYRROLONES EN FERMENTEUR BATCH SUR UN MILIEU SEMI-SYNTHETIQUE

<b>I- INTRODUCTION.....</b>	<b>180</b>
<b>II- RESULTATS.....</b>	<b>180</b>
<b>1.- Effet sur la croissance de <i>Sa. algeriensis</i>.....</b>	<b>180</b>
<b>2.- Effet sur le pH et le P(O<sub>2</sub>) .....</b>	<b>182</b>
<b>3.- Effet sur la consommation des substrats.....</b>	<b>183</b>
<b>4.- Effet sur la production des dithiopyrrolones.....</b>	<b>188</b>
4.1.- Effet sur la production de la thiolutine.....	188
4.2.- Effet sur la production de la SEP et de la TIP.....	190
4.3.- Effet sur la production de l'ISP et de la BUP.....	192
4.4.- Effet sur la production de nouvelles dithiopyrrolones.....	194
<b>VI- DISCUSSION.....</b>	<b>195</b>
<b>DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES.....</b>	<b>197</b>
<b>REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>202</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>238</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

A:	Absorbance
ADP:	Adénosine Diphosphate
ADN:	acide désoxyribonucléique
AMP:	Adénosine Monophosphate
AMPc:	Adénosine Monophosphate Cyclique
ARNr:	Acide Ribonucléique Ribosomique
ATP:	Adénosine Triphosphate
B.:	Bacillus
CoA:	coenzyme-A
D.O:	Densité Optique
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
h:	heure
HPLC:	Chromatographie Liquide à Haute Performance
ISP2:	International <i>Streptomyces</i> Project 2
$\mu$ :	Vitesse spécifique de croissance (ou taux spécifique de croissance)
$\mu_{\max}$ :	Taux spécifique maximal de croissance
min.:	Minutes
mM:	millimoles, millimolaires
NAD <sup>+</sup> :	Nicotine Adénine Dinucléotide Oxydé / nicotine adénine = nicotinamide oxydée).
NADH:	Nicotine Adénine Dinucléotide Réduit
NADP <sup>+</sup> :	Nicotine Adénine Dinucléotide phosphate Oxydé
NADPH:	Nicotine Adénine Dinucléotide phosphate Réduit
nm:	nanomètre
OA:	oxalo-acétate
PM:	poids moléculaire
PS:	poids sec de la biomasse sèche
PS <sub>max</sub> :	poids sec maximum
q:	quotient métabolique
q <sub>ant</sub> :	taux de production de l'antibiotique glucose (ou vitesse spécifique de production de l'antibiotique)
q.s.p.:	quantité suffisante pour
rpm:	rotations par minute
S:	substrat
<i>S.</i> :	<i>Streptomyces</i>
s:	seconde
<i>Sa.</i> :	<i>Saccharothrix</i>
spp.:	espèce
TR:	temps de rétention
vvm:	volume à volume par minute
[ ]:	concentration

# **CHAPITRE I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## INTRODUCTION GENERALE

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 ( $G + C > 55 \text{ mol } \%$ ) 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).

Les actinomycètes sont universellement répandus. Ils constituent en général 10 à 20% du total de la microflore tellurique (Dommergues et Mangenot, 1970; Ishizawa et Araragi, 1976). Ils sont rencontrés sur une grande variété de substrats naturels: sols, air, fumier, composts, foin, débris végétaux, résidus fibreux de cannes à sucre, pollen des plantes, sédiments marins, lacs, rivières, mers et océans, etc. (Lacey, 1973; Cross, 1981; Goodfellow et Williams, 1983; Lacey, 1997). Ils sont retrouvés également dans les environnements extrêmes tels que les sols glaciaires de l'Arctique, les déserts chauds et secs de divers continents, les sols pollués par du pétrole ou des métaux lourds, les lacs extrêmement alcalins et dans certains milieux très salés (Lechevalier, 1981).

Les actinomycètes sont généralement saprophytes, mais quelques-uns sont pathogènes pour les plantes tel *Streptomyces scabies*, responsable de la gale de la pomme de terre (Loria, 1986) ou encore, pathogènes pour l'homme, telles les infections causées par certaines espèces de *Nocardia*, de *Nocardiosis*, d'*Actinomyces* ou de *Streptomyces* (Lacey, 1997; Peltola *et al.*, 2001).

Les actinomycètes constituent l'un des plus grands groupes de la population microbienne du sol. Ils sont aptes à dégrader les composés organiques non biodégradables par les champignons et les bactéries non mycéliennes et contribuent ainsi à la fertilisation des sols (Lechevalier, 1981; Goodfellow et Williams, 1983). Grâce à leurs propriétés antagonistes, les actinomycètes sont utilisés dans la lutte biologique pour la réduction des maladies fongiques de certaines plantes et quelques succès ont été enregistrés dans ce domaine (Dommergues et Mangenot, 1970; Goodfellow et Williams, 1983). Certains antifongiques non polyéniques sécrétés par les actinomycètes, comme la blasticine S, la kasugamycine et les polyoxines B et D, sont utilisés à grande échelle et depuis longtemps dans l'agriculture japonaise, contre certaines maladies du riz (Misato, 1982). La tylosine produite par *Streptomyces fradiae* est utilisée comme additif alimentaire pour le bétail (Hamill *et al.*, 1961).

Les actinomycètes jouent un rôle très important dans le domaine industriel. Ils produisent de nombreuses enzymes dont certaines sont déjà utilisées dans les domaines agro-alimentaire et médical, comme la glucose isomérase, la glucoamylase, les protéases, les cellulases, les ligninases et les cholestérol oxydases (Pokorny *et al.*, 1979; Young *et al.*, 1980). Ils produisent également de nombreux composés à haute valeur ajoutée comme les vitamines (Piret et Demain, 1988) importants aussi bien dans le domaine médical, que dans le domaine vétérinaire, comme additif nutritionnel pour l'élevage par exemple (Oestergaard *et al.*, 2001). Ils interviennent également dans la bioconversion des stéroïdes (Sallam *et al.*, 1995). Par ailleurs, les protéases alcalines des actinomycètes sont utilisées dans les détergents pour lessive (Lin *et al.*, 1994; Matsuo *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1995; Moreira, 2002).

Les actinomycètes peuvent aussi produire des vasodilatateurs, des inhibiteurs enzymatiques, des hormones, des analgésiques, des activateurs immunitaires, des immunosuppresseurs, des hypoglycémisants, des substances anti-cholestérolémiques, etc. (Asselineau et Zalta, 1973; Deshpande *et al.*, 1988; Ohmori *et al.*, 1988; Umezawa, 1988; Papp *et al.*, 1992; Tsuboya *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1998; Murakata *et al.*, 1998; Eder *et al.*, 2002).

La grande diversité métabolique des actinomycètes leur confère parfois certaines propriétés inhabituelles (Brown, 1995; Davidson, 1995). Par exemple, quelques espèces sont capables de dégrader ou de transformer certaines toxines produites par des champignons toxigènes (mycotoxines) et réduire ainsi leur teneur dans les produits alimentaires (Holzapfel *et al.*, 2002). Plusieurs espèces appartenant aux genres *Streptomyces*, *Nocardiosis*, etc., produisent la géosmine qui donne à la terre une odeur de moisi (terreux) et à l'eau des réservoirs un goût et une odeur désagréable (Lechevalier, 1981; Goodfellow et Williams, 1983). Certaines substances produites par les actinomycètes sont utilisées pour le traitement des emballages (ex.: pimaricine) et d'autres, pour la protection de certains fromages (Block, 1983; Vandamme, 1985). Les autres centres d'intérêt des actinomycètes concernent la dégradation des résines polylactates (Tokiwa *et al.*, 2001), des hydrocarbures (Dixit *et al.*, 2000) et du phénol dans les déchets des industries textiles et de teinture (Bhathena *et al.*, 2002).

Cependant, les actinomycètes sont surtout réputés pour leur grande capacité à produire des antibiotiques: environ 70% des molécules actives d'origine microbienne (Okami et Hotta, 1988) dont plusieurs sont utilisés dans les domaines thérapeutique, vétérinaire et agronomique (antibactériens, antifongiques). Ils peuvent avoir une activité antibactérienne (chloramphénicol, tétracycline, kanamycine, etc.), antifongique (nystatine, pimaricine, etc.), antibactérienne et antifongique (Berdy *et al.*, 1987; Bycroft, 1988) ou herbicides, pesticides, régulateurs de croissance, etc. (Burg, 1982; Miller *et al.*, 1983; Culter, 1988).

Les actinomycètes peuvent produire également des composés qui ont des activités intéressantes et sont utilisées en chimiothérapie, telles que les substances antitumorales (carcinostatine, adriamycine, daunomycine, etc.), antimitotiques (ansamitocine, etc.), antidermatophytes (dermostatine, etc.), acaricides (altémicidine, etc.), herbicides, antiparasites (distamycine), anticoccidiens, insecticides (avermectine, polyoxines, etc.) et antivirales (mutactimycines) (Takiguchi *et al.*, 1980; Kase *et al.*, 1986; Kusakabe *et al.*, 1987 et 1988; Perry *et al.*, 1990; Xuguang *et al.*, 1993; Lombardi et Crisanti, 1997; Raty *et al.*, 2002).

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 (autres que *Streptomyces*, genre étudié beaucoup plus) provenant de milieux extrêmes (Sabaou *et al.*, 1998; Lazzarini *et al.*, 2000; Naidenova et Vladimirova, 2001; Barakate *et al.*, 2002; Donadio *et al.*, 2002; Moncheva *et al.*, 2002). Ainsi, à partir d'un sol saharien d'Algérie, une souche d'actinomycète, identifiée au genre *Saccharothrix*, a été isolée. Cette souche s'est avérée être une nouvelle espèce et a été nommée *Saccharothrix algeriensis* (Zitouni *et al.*, 2004c). Des travaux antérieurs ont permis de constater que cette souche produisait des antibiotiques à large spectre, assez puissants et ayant à la fois une activité antifongique et antibactérienne (Lamari *et al.*, 2002a). Ces molécules appartiennent au groupe des dithiopyrrolones, antibiotiques hétérocycliques contenant deux atomes de soufre et un autre d'azote (Lamari *et al.*, 2002b). Selon Büchi et Lukas (1964), le noyau dithiopyrrolone peut être obtenu chimiquement par la condensation de deux cystéines ou à partir d'une molécule de cystine. Ces antibiotiques diffèrent très souvent entre eux uniquement par la chaîne latérale composée par un acide organique relié au cycle par une liaison amide. Les voies de biosynthèse de ce groupe d'antibiotique n'ont jamais fait l'objet de travaux, à l'exception d'une étude préliminaire réalisée par Furumai *et al.* (1982) chez *Streptomyces kasugaensis*.

En tenant compte des informations ci-dessus, en raison du spectre d'action très intéressant de ces molécules et au vu de l'intérêt que leur accordent les chercheurs (matérialisé par le dépôt d'un nombre important de brevets), nous avons approfondi, dans la présente étude, les travaux sur la souche de *Saccharothrix algeriensis*, en essayant de voir l'influence de certains composés sur la production de dithiopyrrolones, aussi bien de point de vue qualitatif que quantitatif.

Ainsi,

- dans une première partie, nous avons étudié l'influence des acides aminés soufrés sur la production des dithiopyrrolones. Plusieurs acides aminés non soufrés ont été également utilisés, car ils pourraient éventuellement intervenir dans une étape précoce de la biosynthèse, par exemple, en étant transformés en précurseurs des dithiopyrrolones.



- dans une deuxième partie, nous avons étudié l'influence de nombreux acides organiques sur la production des dithiopyrrolones. Ces acides organiques se transformeraient en acyl-CoA avant d'être incorporés au noyau pyrrothine.

- dans une troisième partie, nous avons réalisé une étude sur la cinétique de production des dithiopyrrolones en fermenteur (fermentations contrôlées) après addition de certains acides organiques préalablement sélectionnés.

Dans ces trois parties, l'influence des acides aminés et organiques a été étudiée aussi bien sur les dithiopyrrolones connues pour être synthétisées par *Sa. algeriensis*, que sur celles pouvant être nouvellement induites par l'addition des composés sus-cités.

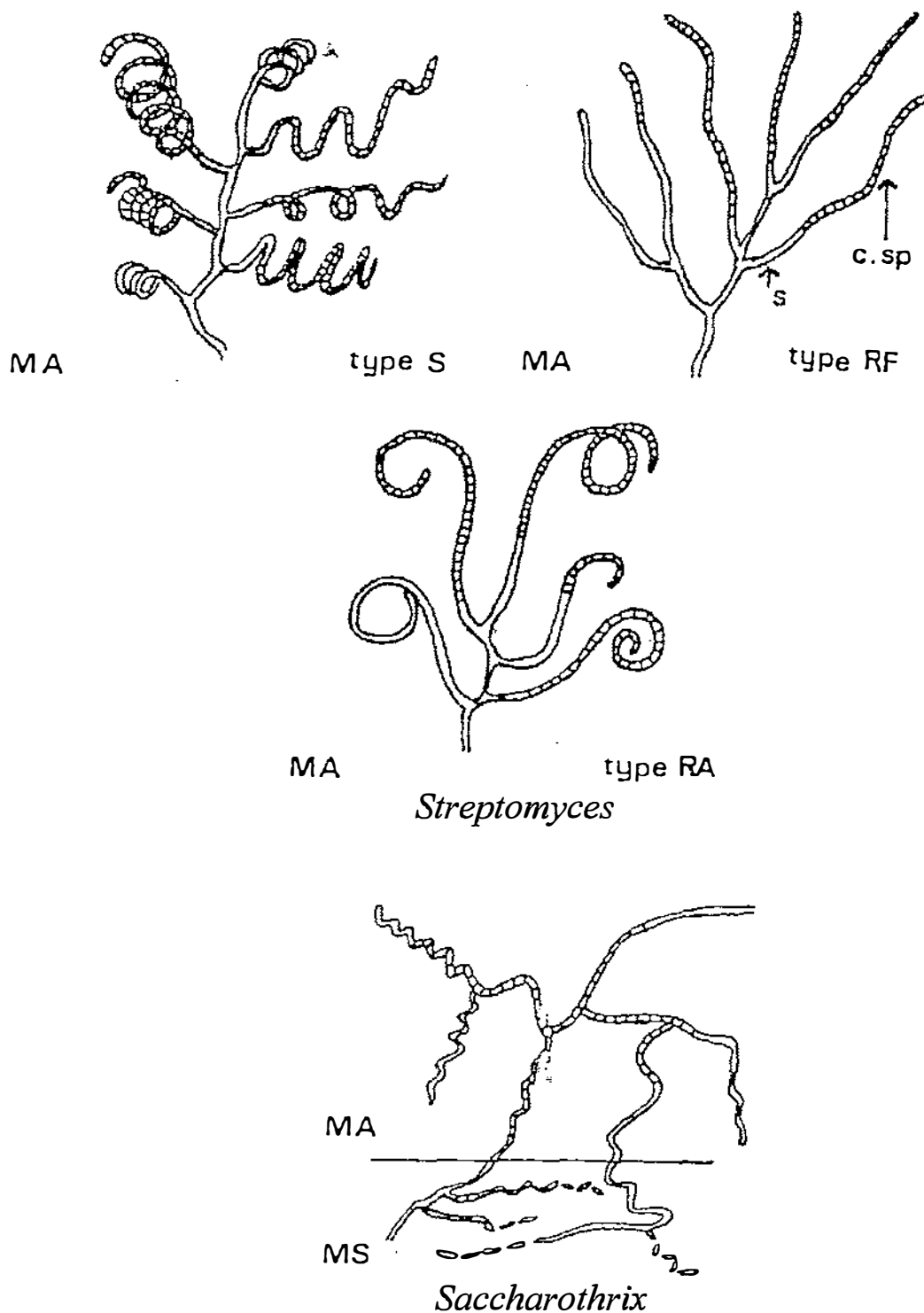
## I.- LE GENRE *SACCHAROTHRIX*

Le genre *Saccharothrix* reste minoritaire parmi les actinomycètes. 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. (Kinoshita *et al.*, 1999; Chun *et al.*, 2000; Evtushenko *et al.*, 2000; Peltola *et al.*, 2001; Al-Zarban *et al.*, 2002; Kämpfer *et al.*, 2002; Schippers *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Hozzein *et al.*, 2004; Zitouni *et al.*, 2005). Le pourcentage des isolats de *Saccharothrix* par rapport au total des actinomycètes oscille entre 0 et 0,5% (Athalye *et al.*, 1985). Dans plusieurs échantillons de sols sahariens, ce pourcentage varie entre 8 et 15% (Sabaou *et al.*, 1998). *Saccharothrix*, comme la grande majorité des actinomycètes, est saprophyte, chimio-organotrophe hétérotrophe et aérobie stricte.

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

Le genre *Saccharothrix* fut créé en 1984 par Labeda *et al.*, avec comme espèce-type *Saccharothrix australiensis*. Celle-ci fut incluse dans un premier temps dans la famille des *Pseudonocardiaceae* (Embley *et al.*, 1988), puis par la suite, sur la base des parentés phylogénétiques, dans la famille des *Actinosynnemataceae* (Labeda et Kroppenstedt, 2000). *Saccharothrix* est caractérisé par sa morphologie et son chimiotype.

Les colonies portent en général un mycélium aérien, lequel peut être abondant ou très peu produit selon les espèces et les souches. Les filaments du mycélium aérien se fragmentent de manière anarchique, souvent en "zig-zag", en éléments de plus en plus courts aboutissant à la formation de longues chaînes de spores ovoïdes ou en bâtonnets (1 à 2  $\mu\text{m}$  x 0,7 à 1  $\mu\text{m}$ ) 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. Une comparaison de la micromorphologie du genre *Saccharothrix* avec celle du genre *Streptomyces*, est illustrée dans la figure 1. En plus de la micromorphologie, l'un des critères les plus importants pour l'identification des genres d'actinomycètes est leur composition cellulaire en acides aminés, en sucres et en lipides (Manuel de Bergey, 1994). Sur cette base, des chimiotypes furent ainsi définis.



**Figure 1.** Une comparaison de la micromorphologie du genre *Saccharothrix* avec celle du genre d'actinomycète le plus abondant dans la nature, *Streptomyces* (*In*. Bergy, 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.

Chimiquement, *Saccharothrix* est caractérisé par une paroi cellulaire de type III E (Labeda, 1987; Labeda et Kroppenstedt, 2000; Labeda *et al.*, 2001), c'est-à-dire, présence de l'isomère DL (*méso*) de l'acide diaminopimélique et absence de glycine (au niveau de la paroi), présence de sucres caractéristiques qui sont le rhamnose, le galactose et le mannose (dans les cellules entières) et absence d'acides mycoliques pariétaux. Les phospholipides membranaires sont, selon la classification de Lechevalier *et al.* (1977), du type P II (présence de phosphatidyléthanolamine = PE et d'hydroxy-PE) ou du type P IV (PE + hydroxy-PE + phospholipides contenant de la glucosamine). Les ménaquinones (lipides membranaires) sont de type MK-9 (H4) ou MK-10 (H4), constitués d'un noyau quinone méthylé et d'une chaîne carbonée aliphatique contenant neuf ou dix unités isoprènes dont quatre sont hydrogénées (4 sites d'hydrogénation).

Quelques années après la création de ce genre, plusieurs espèces de *Saccharothrix* furent découvertes (Labeda et Lechevalier, 1989; Labeda et Lyons, 1989). Quelques isolats appartenant au genre *Nocardiosis* et à d'autres genres, furent reclassés parmi les *Saccharothrix* (Grund et Kroppenstedt, 1990). Dans la majorité des cas, les espèces nouvelles ont été mises en évidence grâce, tout d'abord, à l'utilisation de la taxonomie numérique (Labeda *et al.*, 1986; Labeda 1986 et 1988; Grund et Kroppenstedt, 1989 et 1990), puis aux critères moléculaires, notamment le séquençage de l'ADNr 16S et l'hybridation ADN-ADN (Kinoshita *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2004; Zitouni *et al.*, 2004c).

## **2.- Espèces appartenant au genre *Saccharothrix***

Récemment, et sur la base des parentés phylogénétiques, le genre *Saccharothrix* a été marqué par quelques remaniements. Ainsi, *Sa. waywayendensis* et *Sa. aerocolonigenes* ont été rattachées à *Lentzea*, genre créé par Yassin *et al.* (1995) et *Sa. flava* a été incluse dans *Lechevalieria*, créée par Labeda *et al.* (2001). Le genre comporte actuellement dix espèces décrites (tableau 1).

**Tableau 1.** Liste des espèces de *Saccharothrix*.

Espèces	N° d'accès	Références
<i>Sa. australiensis</i>	ATCC 31497	Labeda <i>et al.</i> , 1984
<i>Sa. texasensis</i>	ATCC 51593	Labeda et Lyons, 1989
<i>Sa. espanaensis</i>	ATCC 51144	Labeda et Lechevalier, 1989
<i>Sa. mutabilis</i> subsp. <i>mutabilis</i>	ATCC 31520	Labeda et Lechevalier, 1989
<i>Sa. mutabilis</i> subsp. <i>capreolus</i>	ATCC 23892	Grund et Kroppenstedt, 1990
<i>Sa. coeruleofusca</i>	ATCC 35108	Grund et Kroppenstedt, 1990
<i>Sa. longispora</i>	ATCC 35109	Grund et Kroppenstedt, 1990
<i>Sa. syringae</i>	ATCC 51364	Grund et Kroppenstedt, 1990
<i>Sa. 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

### 3.- Métabolites secondaires sécrétés par *Saccharothrix*

Le genre *Saccharothrix* sécrète plusieurs antibiotiques de nature chimique assez diversifiée (tableau 2), dont environ la majorité a été découverte durant les dix dernières années. Le nombre de molécules actives (en comptant les complexes et isomères) dépasse actuellement la cinquantaine. Parmi les premiers antibiotiques décrits, nous citerons la nocamycine, sécrétée par une souche de *Sa. syringae* (Brazhnikova *et al.*, 1977; Horvath *et al.*, 1979). On peut ainsi trouver des polyamines ou des aminoglycosides (Takahashi *et al.*, 1986), des benzoquinones (Takahashi *et al.*, 1986; Isshiki *et al.*, 1989), des alcaloïdes (Suzuki *et al.*, 1991), des glycopeptides (Takeuchi *et al.*, 1992), des nucléosides carbocycliques (Bush *et al.*, 1993), des composés phosphorés acides et hydrophiles (Takahashi *et al.*, 1995), des hétérocycles azotés et soufrés (Tsurumi *et al.*, 1995; Lamari *et al.*, 2002a,b), des heptadecaglycosides qui appartiennent à une nouvelle classe d'antibiotique (Singh *et al.*, 2000), des anthracyclines (Zitouni *et al.*, 2004a,b) et des macrolides (Zitouni, 2004).

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

Il est à signaler que plusieurs souches de *Saccharothrix* productrices des molécules bioactives ont fait l'objet de plus de 60 dépôt de brevets (Tresner *et al.*, 1980; Jain *et al.*, 1982; Kirby *et al.*, 1987) dont 34 entre 2000 et 2005 ([www.uspto.gov/patft/](http://www.uspto.gov/patft/)).

#### **4.- Caractéristique et position taxonomique de *Sa. algeriensis* NRRL B-24137**

L'espèce *Sa. algeriensis* a été isolée en 1992 à partir d'un échantillon de sol prélevé de la palmeraie d'Adrar (oasis du Sud-Ouest algérien). Initialement rattachée au genre *Nocardioopsis* (Boudjella, 1994) et reclassée par la suite dans le genre *Saccharothrix* (Zitouni, 1995). La micromorphologie de la souche est typiquement celle du genre. Le mycélium aérien est abondant et de couleur jaune-orange. Le mycélium du substrat est jaune vif. Des pigments solubles de même couleur sont abondamment 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. Une taxonomie numérique, incluant 77 tests physiologiques, ainsi qu'une analyse phylogénétique (séquençage de l'ADNr 16S, hybridation ADN-ADN) ont montré que la souche diffère nettement des espèces connues et a été nommée *Sa. algeriensis*. Celle-ci a été déposée dans deux collections mondiales: NRRL et DSM sous le numéro d'accession B-24137 et 44581, respectivement (Zitouni *et al.*, 2004c).

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

Substances	Propriétés	Origines	Références
Nocamycine	Antibactérienne, antitumorale	<i>Sa. syringae</i>	Brazhnikova <i>et al.</i> , 1977; 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 (1 et 2)	Antibactériennes, antitumorales	<i>Saccharothrix</i> sp.	Isshiki <i>et al.</i> , 1989.
Ménaquinones (I, II et III)	Antiparasitaires	<i>Saccharothrix</i> sp.	Perry <i>et al.</i> , 1990.
Sekothrixide	Antitumorale	<i>Saccharothrix</i> sp.	Kim <i>et al.</i> , 1991; Seto <i>et al.</i> , 1992.
Tetrazomine	Antibactérienne, antitumorale	<i>Sa. mutabilis</i> subsp. <i>chichijimaensis</i>	Suzuki <i>et al.</i> , 1991.
Fluvirucines (A1, A2, B1, B2, B3, B4 et B5)	Antivirales	<i>Sa. mutabilis</i> subsp. <i>Schijijamaensis</i>	Tomita <i>et al.</i> , 1991.
Galacardines (A et B)	Antibactériennes	<i>Saccharothrix</i> sp.	Takeuchi <i>et al.</i> , 1992.
Coformycine	Herbicide	<i>Saccharothrix</i> sp.	Bush <i>et al.</i> , 1993; Dancer <i>et al.</i> , 1997.
WS75624 A et B	Inhibiteur d'enzyme convertissant l'endotheline	<i>Saccharothrix</i> sp.	Tsurumi <i>et al.</i> , 1995; Yoshimura <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; Kinoshita <i>et al.</i> , 1999.
Phosphonothrixine	Herbicide	<i>Saccharothrix</i> sp.	Kimura <i>et al.</i> , 1995; Takahashi <i>et al.</i> , 1995; 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 (A, B et E)	Antitumorales	<i>Saccharothrix</i> sp.	Vértesy <i>et al.</i> , 2001.
Saccharomicines (A et B)	Antibactériennes	<i>Sa. espanaensis</i>	Singh <i>et al.</i> , 2000. Wang <i>et al.</i> , 2001.
Dithiopyrrolones (AJ, C1, C2, A et B)	Antibactériennes, antifongiques	<i>Sa. algeriensis</i>	Lamari <i>et al.</i> , 2002a,b.
Pravastatine	Anti-cholestérolémique	<i>Sa. mutabilis</i>	Matsuo <i>et al.</i> , 2003.
(GBC33-O)	Antiparasite, insecticide	<i>Saccharothrix</i> sp.	U.K. Pat., 1990, 2 232 668, CA, 115, 112815u.
(FZO32-W)	Antiparasite, insecticide	<i>Saccharothrix</i> sp.	U.K. Pat., 1990, 2 232 668, CA, 115, 112815u.
(GBC32-N)	Antiparasite, insecticide	<i>Saccharothrix</i> sp.	U.K. Pat., 1990, 2 232 668, CA, 115, 112815u.
Kinamycine G	Antibactérienne, antitumorale	<i>Saccharothrix</i> sp.	Ito <i>et al.</i> , 1970.
RUG 13A	Analgésique	<i>Saccharothrix</i> sp.	Abe <i>et al.</i> , 1969; Yamatodani <i>et al.</i> , 1970.
RUG 13B	Analgésique	<i>Saccharothrix</i> sp.	Abe <i>et al.</i> , 1969; 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.

## 5.- Spectre d'action et antibiotiques sécrétés par *Sa. algeriensis* NRRL B-24137

### 5.1.- Spectre d'action de *Sa. algeriensis* NRRL B-24137

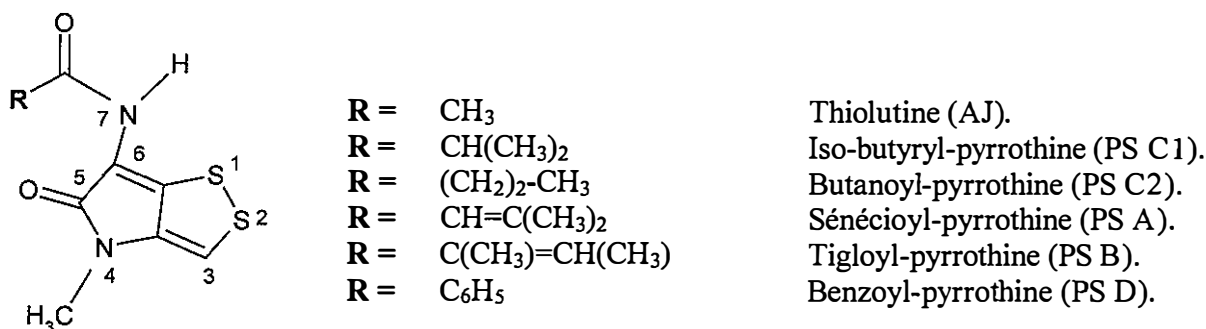
*Sa. algeriensis* NRRL B-24137 présente un spectre d'action très large, qui touche aussi bien les bactéries à Gram positif (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) et à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas fluorescens* 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). Il est intéressant de noter que les champignons phytopathogènes tels que *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*, *F. oxysporum* f. sp. *lentis*, *F. oxysporum* f. sp. *lini*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Pythium irregulare* et *Mucor ramannianus*, ainsi que *Alternaria* sp. et *Penicillium* sp., sont fortement inhibés (Zitouni, 1995; Lamari *et al.*, 2002a).

### 5.2.- Antibiotiques sécrétés par *Sa. algeriensis* NRRL B-24137

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. Après analyse par HPLC, le premier produit, nommé AJ s'est révélé être constitué par un seul antibiotique, tandis que la deuxième tache PS s'est révélé être un complexe de cinq antibiotiques nommés PS A, PS B, PS C1, PS C2 et PS D.

Après purification et analyses spectroscopiques, la structure chimique des six molécules a été déterminée. Ces antibiotiques font partie du groupe des dithiopyrrolones qui sont des hétérocycles contenant des atomes de soufre et d'azote (Lamari *et al.*, 2002a,b). L'antibiotique principal, AJ, a été identifié à la thiolutine (*syn.* acétyl-pyrrothine, acéto-pyrrothine, farcinicine). La structure chimique de ces antibiotiques est donnée par la figure 2. *Sa. algeriensis* est le seul taxon de *Saccharothrix* à produire des antibiotiques de la famille des dithiopyrrolones.





**Figure 2.** Antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones synthétisés par *Sa. algeriensis* NRRL B-24137.

## II.- DONNEES SUR LES DITHIOLOPYRROLONES

### 1.- Caractéristiques chimiques des dithiopyrrolones

Les dithiopyrrolones sont des dérivés d'un hétérocycle caractérisé par la présence d'un noyau appelé dithiopyrrolone (pyrrolinodithiole, pyrrolinonodithiole ou encore pyrroloisothiazole) de type 1,2-dithiolo-[4,3-*b*] pyrrol-5(4H)-one. Leur structure bi-cyclique est composée de deux cycles 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. La structure aromatique confère aux dithiopyrrolones une couleur variant entre le jaune, l'orangé, le vert et le noir (Eisenman *et al.*, 1953; Schachtner *et al.*, 1999). Plusieurs structures ont été décrites dans le groupe des dithiopyrrolones, mais deux types sont principalement distingués, selon la nature de groupement lié à l'azote n° 4 (H ou CH<sub>3</sub>). La principale dithiopyrrolone est la thiolutine, découverte par Tanner *et al.* (1950).

Les propriétés physico-chimiques et spectroscopiques des dithiopyrrolones, d'après Seneca *et al.* (1952), Celmer et Solomons (1955), Yamagishi *et al.* (1971) et Lamari *et al.* (2002b), sont résumés ci-dessous.

#### 1.1.- Propriétés physico-chimiques

- Formule brute générale: C<sub>(5-30)</sub>H<sub>(4-44)</sub>O<sub>(1-11)</sub>N<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (tableau 3).

- Aspect: Poudre ou cristaux de couleur jaune vif orangé ou vert noirâtre (Aiguilles brillantes dans le *n*-butanol).
- Solubilité: généralement 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.
- Stabilité: thermostabilité remarquable (une heure à 100 °C ou plus de 20 min. à 120 °C pour la thiolutine), stable dans les solutions acides et neutres et non ou peu stable dans les solutions alcalines.
- Point de fusion: 243-245 °C (pour la thiolutine).
- Point de décomposition: 273-276 °C (pour la thiolutine).
- Sublimation: 200° / 0,1 mm (pour la thiolutine).

### ***1.2.- Propriétés spectroscopiques***

- Spectrométrie de masse: fragment principal: 172 pour les dérivés N-H (azote n° 4, voir figure 2) et 186 pour les dérivés N-CH<sub>3</sub> (azote n° 2) (Okamura *et al.*, 1977; Mc Inerney *et al.*, 1991).
- Poids moléculaire: entre 172 (holothine) et 673 (thiomarinole B).
- Spectroscopie UV-Visible: le spectre des dithiolopyrrolones présente une absorption dans le visible (due à la couleur jaune). Ils sont caractérisés par des longueurs d'ondes maximales de 205 à 219, 287 à 311 et 386 à 406 nm.
- Spectroscopie Infra-Rouge (dans du KBr): Principales bandes d'absorption: 740, 1235, 1547, 1600, 1640, 1670, 3050 et 3250 cm<sup>-1</sup>. Cette analyse a permis de déterminer certains groupements fonctionnels (NH<sub>2</sub>, OH, CO, etc.), d'aromatiques, de groupements CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, etc. L'interprétation effectuée, selon Williams et Flemings (1989), montre la présence d'aromatique (bandes à 1605 et 3050 cm<sup>-1</sup>), de fonctions cétones (bandes à 1640 et 1670 cm<sup>-1</sup>), de liaison NH (bandes à 1550 et 3260 cm<sup>-1</sup>) et de groupements CH<sub>3</sub> (bandes à 2975 cm<sup>-1</sup>).

Tableau n° 3. Caractéristiques de différentes dithiopyrrolones sécrétées par les microorganismes.

Antibiotique	Formule et PM	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Espèces productrices	Références
Pyrrhothine	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> PM: 186	CH <sub>3</sub>	H-N-H	<i>Streptomyces</i> sp.	Furumai <i>et al.</i> , 1982 ; Oliva <i>et al.</i> , 2001.
Thiolutine ( <i>syn.</i> : acétyl-pyrrothine, acéto-pyrrothine, farcinicine).	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> PM: 228	CH <sub>3</sub>	H-N-CO-CH <sub>3</sub>	<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> .	Celmer et Solomons, 1955; Celmer et Solomons, 1963; Yamagish <i>et al.</i> , 1971; Lamari <i>et al.</i> , 2002a,b.
Auréothricine ( <i>syn.</i> : propionyl-pyrrothine, propio-pyrrothine).	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> PM: 242	CH <sub>3</sub>	H-N-CO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	<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).	Umezawa <i>et al.</i> , 1949; Celmer <i>et al.</i> , 1952; Celmer et Solomons, 1955; Yamagishi <i>et al.</i> , 1971; Juhl et Clark, 1990; Naik <i>et al.</i> , 2001.
Iso-butyryl-pyrrothine ( <i>syn.</i> : iso-butyro-pyrrothine, 2-methylpropanoyl-pyrrothine).	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> PM: 256	CH <sub>3</sub>	H-N-CO-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<i>Streptomyces pimprina</i> . <i>Saccharothrix algeriensis</i> , (et aussi synthétisé chimiquement).	Bhate <i>et al.</i> , 1960; Lamari <i>et al.</i> , 2002a,b.
Xénorhabdine VII ( <i>syn.</i> : butanoyl-pyrrothine, butyro-pyrrothine).	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> PM: 256	CH <sub>3</sub>	H-N-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. luminescens</i> , <i>X. biovienii</i> , <i>Saccharothrix algeriensis</i> .	Lamari <i>et al.</i> , 2002a,b., Webster <i>et al.</i> , 2002.
Sénéciol-pyrrothine ( <i>syn.</i> : 3-méthyl-2-butenoyl-pyrrothine).	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> PM: 268	CH <sub>3</sub>	H-N-CO-CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<i>Saccharothrix algeriensis</i> .	Lamari <i>et al.</i> , 2002a,b.
Tigloyl-pyrrothine	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> PM: 268	CH <sub>3</sub>	H-N-CO-C(CH <sub>3</sub> )=CH(CH <sub>3</sub> )	<i>Saccharothrix algeriensis</i> .	Lamari <i>et al.</i> , 2002a,b.
Benzoyl-pyrrothine	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> PM: 290	CH <sub>3</sub>	H-N-CO-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	<i>Saccharothrix algeriensis</i> .	Lamari <i>et al.</i> (Résultats non publiés).
2-méthyl-pentanoyl-pyrrothine	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> PM: 299	CH <sub>3</sub>	H-N-CO-CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CH-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<i>Saccharothrix algeriensis</i> .	Lamari <i>et al.</i> (Résultats non publiés).
Xénorhabdine VI ( <i>syn.</i> : 3-méthylbutanoyl-pyrrothine).	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> PM: 270	CH <sub>3</sub>	H-N-CO-CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. luminescens</i> , <i>X. biovienii</i> .	Mc Inerney <i>et al.</i> , 1991; Webster <i>et al.</i> , 2002.
Xénorhabdine IV	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> PM: 284	CH <sub>3</sub>	H-N-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>3</sub>	<i>Xenorhabdus</i> spp.	Mc Inerney <i>et al.</i> , 1991; Paik <i>et al.</i> , 2001; Webster <i>et al.</i> , 2002.
Pentanoyl-pyrrothine	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> PM: 284	CH <sub>3</sub>	N-H-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub>	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. luminescens</i> , <i>X. biovienii</i> .	Webster <i>et al.</i> , 2002.
Xénorhabdine V ( <i>syn.</i> : 5-méthylhexanoyl-pyrrothine).	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> PM: 298	CH <sub>3</sub>	H-N-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. luminescens</i> , <i>X. biovienii</i> .	Mc Inerney <i>et al.</i> , 1991; Paik <i>et al.</i> , 2001; Webster <i>et al.</i> , 2002.

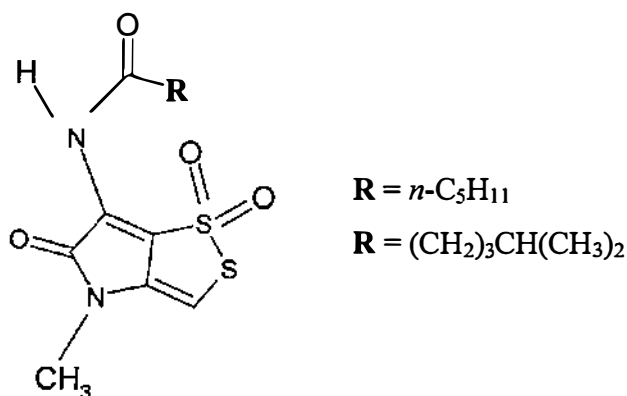
Holomycine ( <i>syn.</i> : déméthylthiolutine).	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> PM: 214	H	H-N-CO-CH <sub>3</sub>	<i>Streptomyces</i> sp. P6621, <i>S. griseus</i> , <i>S. clavuligerus</i> , <i>S. clavuligerus</i> , <i>S. pimprina</i> .	Ettlinger <i>et al.</i> , 1959; Okamura <i>et al.</i> , 1977; De la Fuente <i>et al.</i> , 2002.
Propionyl-holothine	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> PM: 228	H	H-N-CO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	<i>Streptomyces</i> P6621, (et aussi synthétisé chimiquement).	Okamura <i>et al.</i> , 1977.
Xénorhabdine I ( <i>syn.</i> : hexanoyl-holothine).	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> PM: 270	H	H-N-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>3</sub>	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. luminescens</i> , <i>X. biovienii</i> .	Li <i>et al.</i> , 1996; Forst et Neilson, 1996; Webster <i>et al.</i> , 2002.
Xanthidrol (dérivé de la Xénorhabdine I).	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> PM: 450	Xantho- dryl	H-N-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>3</sub>	Transformation chimique de la Xénorhabdine I.	Mc Inerney <i>et al.</i> , 1991.
Xénorhabdine II ( <i>syn.</i> : 5-méthylhexanoyl-holothin).	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> PM: 284	H	H-N-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. luminescens</i> , <i>X. bovienii</i> .	Mc Inerney <i>et al.</i> , 1991; Paik <i>et al.</i> , 2001; Webster <i>et al.</i> , 2002.
Xénorhabdine III ( <i>syn.</i> : octanoyl-holothine).	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> PM: 298	H	H-N-CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CH <sub>3</sub>	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> .	Mc Inerney <i>et al.</i> , 1991; Webster <i>et al.</i> , 2002.
Thioaurine ( <i>syn.</i> : orosomycine ou antibiotique vD 844)	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> PM: 214	H	CH <sub>3</sub> -N-CHO	<i>Streptomyces</i> sp.	Von Daehne <i>et al.</i> , 1969; Laskin et Lechevalier, 1984.
Antibiotique vD 846	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> PM: 200	H	H-N-CHO	<i>Streptomyces</i> sp.	Laskin et Lechevalier, 1984.
Thiomarinole A	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub> PM: 640	H	H-N-CO-C <sub>25</sub> H <sub>40</sub> O <sub>7</sub>	<i>Alteromonas rava</i> .	Shiozawa <i>et al.</i> , 1993; Shiozawa et Takahashi, 1994.
Thiomarinole B	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> N <sub>2</sub> O <sub>11</sub> S <sub>2</sub> PM: 672	H	H-N-CO-C <sub>25</sub> H <sub>40</sub> O <sub>9</sub>	<i>Alteromonas rava</i> .	Shiozawa <i>et al.</i> , 1995.
Thiomarinole C	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub> PM: 624	H	H-N-CO-C <sub>25</sub> H <sub>40</sub> O <sub>6</sub>	<i>Alteromonas rava</i> .	Shiozawa <i>et al.</i> , 1995.
Thiomarinole D	C <sub>31</sub> H <sub>46</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub> PM: 654	H	H-N-CO-C <sub>26</sub> H <sub>42</sub> O <sub>7</sub>	<i>Alteromonas rava</i> .	Shiozawa <i>et al.</i> , 1997.
Thiomarinole E	C <sub>32</sub> H <sub>48</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub> PM: 668	H	H-N-CO-C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O <sub>7</sub>	<i>Alteromonas rava</i> .	Shiozawa <i>et al.</i> , 1997.
Thiomarinole F	C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub> PM: 638	H	H-N-CO-C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> O <sub>7</sub>	<i>Alteromonas rava</i> .	Shiozawa <i>et al.</i> , 1997.
Thiomarinole G	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub> PM: 624	H	H-N-CO-C <sub>25</sub> H <sub>40</sub> O <sub>6</sub>	<i>Alteromonas rava</i> .	Shiozawa <i>et al.</i> , 1997.

## 2.- Microorganismes producteurs de dithiopyrrolones

La thiolutine a été isolée pour la première fois par Tanner *et al.* (1950) à partir de différentes souches de *Streptomyces albus*. Sa structure chimique fut déterminée pour la première fois par Celmer et Solomons en 1955. Par la suite, la thiolutine a été isolée à partir d'autres espèces de *Streptomyces*: *S. celluloflavus*, *S. Kasugaensis*, *S. luteoreticuli*, *S. pimprina* et *S. thioluteus* (Yamagishi *et al.*, 1971 ; Furumai *et al.*, 1982).

Plusieurs autres dithiopyrrolones tels que l'auréothricine, l'holomycine, les xénorhabdines et les thiomarinoles (Minamiguchi *et al.*, 2001), furent isolés de certaines espèces de *Streptomyces* citées précédemment, mais aussi de *S. cyanoflavus* et *S. griseus* (Seneca *et al.*, 1952; Celmer *et al.*, 1952; Eisenman *et al.*, 1953; Ettlinger *et al.*, 1959; Bhate *et al.*, 1960; Von Daehne *et al.*, 1969; Yamagishi *et al.*, 1971; Okamura *et al.*, 1977) ou de bactéries non mycéliennes telles que *Xenorhabdus bovienii*, *X. luminescens* et *X. nematophilus* qui sont des *Enterobacteriaceae* vivant en symbiose avec certains nématodes pathogènes d'insectes nuisibles dans l'agriculture (Mc Inerney *et al.*, 1991; Isaacson et Webster, 2002; Webster *et al.*, 2002), ou encore de *Alteromonas rava*, une bactérie marine (Shiozawa *et al.*, 1993). Lamari *et al.* (2002a,b) ont isolés des antibiotiques dithiopyrrolones à partir de *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137, montrant ainsi pour la première fois qu'une souche d'actinomycète autre que *Streptomyces* pouvait produire des antibiotiques de ce groupe. Une liste des microorganismes producteurs de dithiopyrrolones est donnée dans le tableau 3.

Les xénorxides font partie d'un autre groupe de métabolites proche des dithiopyrrolones, synthétisés également par les genres *Xenorhabdus*, mais aussi par *Photorhabdus*. Ces substances possèdent la même structure que les dithiopyrrolones avec, cependant, une oxydation d'un atome de soufre (figure 3). Les xénorxides possèdent des activités antibactériennes, antifongiques et anticancéreuses (Webster *et al.*, 2002).



**Figure 3.** Antibiotiques du groupe des xénorhoxides synthétisés par les genres *Xenorhabdus* et *Photorhabdus*.

### 3.- Spectre d'action des dithiopyrrolones

La thiolutine, tout comme les autres dithiopyrrolones, possède un spectre d'action assez large. L'activité biologique des dithiopyrrolones a été étudiée par plusieurs chercheurs: Gopalkrishnan et Jump (1952), Lewis et Michener (1954), Li et Webster (1995), Zitouni (1995), Yang *et al.* (1998), Yang *et al.* (2001), Merrouche (2001), Oliva *et al.* (2001), Lamari *et al.* (2002a) et Meklat (2004). Ce spectre est très large et touche les bactéries (à Gram positif et à Gram négatif), les levures, 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, tout comme les anthracyclines (Niemi, 1995). Certaines dithiopyrrolones possèdent une activité anticancéreuse; cependant, elles présentent aussi des effets secondaires toxiques (Xu, 1998). Les microorganismes inhibés par la thiolutine ou par d'autres dithiopyrrolones, sont cités dans le tableau 4 (liste non exhaustive).

**Tableau 4.** Liste des microorganismes inhibés par les dithiopyrrolones.

	Microorganismes-cibles
Bactéries à Gram positif	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium</i> sp., <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Mycobacterium phlei</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Mycobacterium</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> et <i>Streptococcus pyogenes</i> .
Bactéries à Gram négatif	<i>Aerobacter aerogenes</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> , <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Erwinia amylovora</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Neisseria catarrhalis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Salmonella paratyphi</i> , <i>Salmonella schottmulleri</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Shigella sonnei</i> , et <i>Vibrio cholerae</i> .
Champignons filamenteux ou levuriformes pathogènes pour l'homme	<i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida kefyr</i> , <i>Candida vulgaris</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Endomyces albicans</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Microsporion audouini</i> , <i>Microsporium fulvum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> et <i>Trichophyton rubrum</i> .
Champignons filamenteux phytopathogènes	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Botrytis fabae</i> , <i>Cercospora arachidicola</i> , <i>Chaetomium globosum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i> , <i>F. o. f. sp. ciceri</i> , <i>F. o. f. sp. lentis</i> , <i>F. o. f. sp. lini</i> , <i>F. o. f. sp. lycopersici</i> , <i>Myrothecium verrucaria</i> , <i>Peronospora tabacina</i> , <i>Phytophthora boehmeriae</i> , <i>Phytophthora cinnamoni</i> , <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Plasmopora viticola</i> , <i>Puccinia recondita</i> , <i>Pyricularia oryzae</i> , <i>Pythium irregulare</i> , <i>Pythium ultimum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Venturia inaequalis</i> et <i>Verticillium albo-atrum</i> .
Champignons filamenteux et levuriformes non pathogènes	<i>Alternaria</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., <i>Mucor ramannianus</i> , <i>Penicillium notatum</i> , <i>Rhizopus nigricans</i> et <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .
Protozoaires pathogènes (parasites) pour l'homme	<i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Leishmania donovani</i> , <i>Leishmania tropica</i> , <i>Sporotrichum schenkii</i> , <i>Trichomonas fetus</i> et <i>Trypanosoma cruzi</i> .
Larves et insectes	<i>Heliothis punctigera</i> et <i>Lucilia sericata</i> .

Note:- l'activité est généralement très forte contre les bactéries à Gram positif, forte contre les champignons, moyenne à forte contre les levures et faible à moyenne contre les bactéries à Gram négatif.

#### 4.- Mode d'action des dithiopyrrolones

La thiolutine, comme d'autres dithiopyrrolones, empêche la synthèse de l'ARN messager en inhibant les ARN polymérase. Cette action a été démontrée chez les eucaryotes comme *Saccharomyces cerevisiae* (Tipper, 1973; Jimenez *et al.*, 1973; Herrick *et al.*, 1990; Adams et Gross, 1991; Lee *et al.*, 1996; Webster *et al.*, 2002) et chez les procaryotes comme *Escherichia coli* (Khachatourians et Tipper, 1974; Sivasubramanian et Jayaraman, 1976 et 1980; O'Neill *et al.*, 2000). L'action principale de la thiolutine concerne surtout l'ARN messager et la synthèse des protéines. Cet antibiotique empêche d'une façon réversible la synthèse de l'ARNm chez *Saccharomyces cerevisiae* à des concentrations inférieure à 2 µg/mL. En revanche, cette synthèse est bloquée immédiatement, et d'une façon irréversible, à des concentrations entre 2 et 4 µg/mL et le blocage de la synthèse protéique se fait après 20 minutes (Webster *et al.*, 2002). 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 du milieu comme l'uridine exogène, à l'intérieur des cellules de *Salmonella typhimurium* (Joshi *et al.*, 1982) ou encore du glucose et d'autres sources carbonées, dans les cellules d'*Escherichia coli* (Bergman, 1989). Selon O'Neill *et al.* (2000), la thiolutine et l'holomycine sont considérées comme importantes pour une utilisation en thérapie.

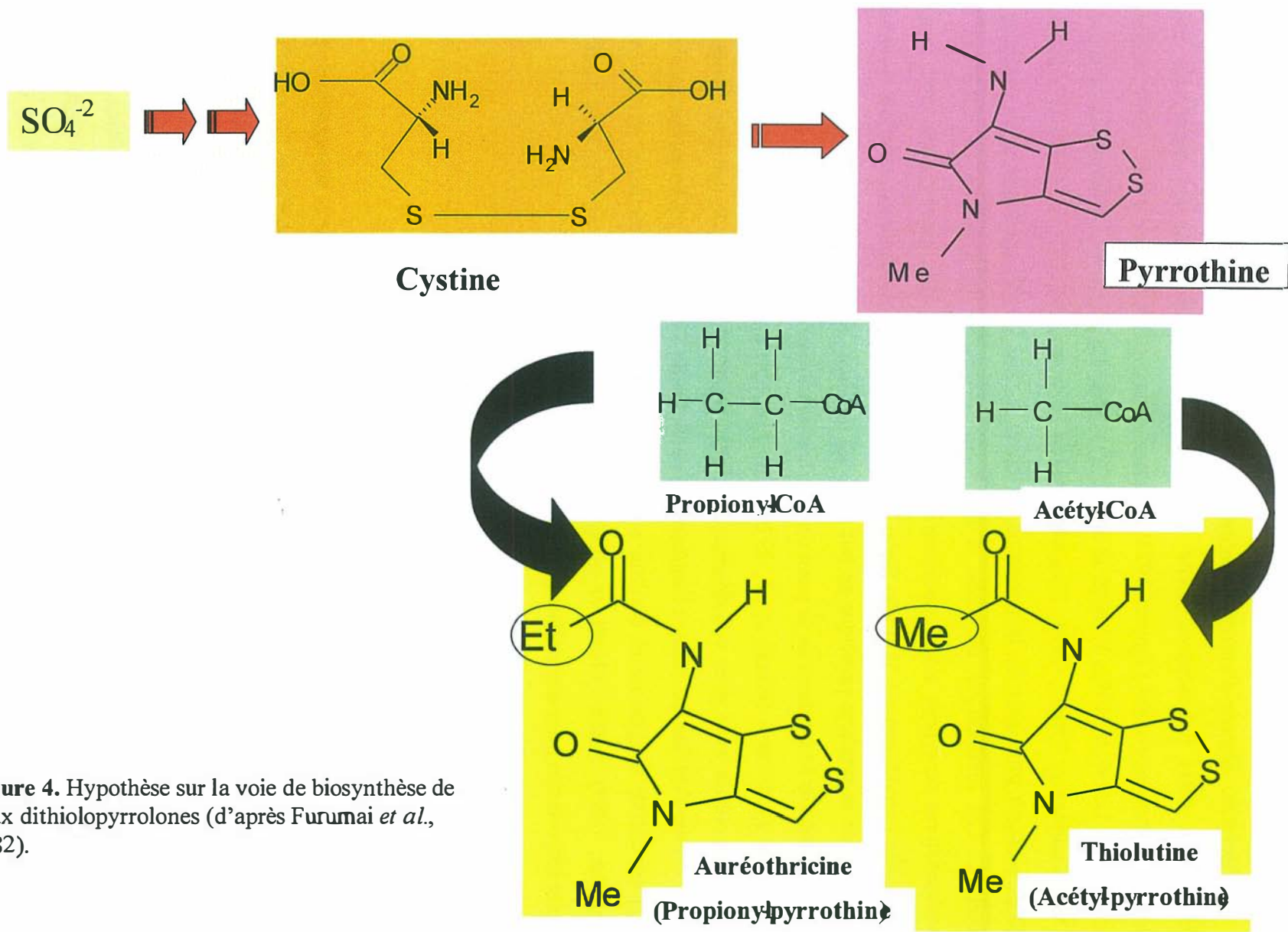
#### 5.- Biosynthèse et synthèse chimique des dithiopyrrolones

##### 5.1.- Biosynthèse des dithiopyrrolones

Furumai *et al.* (1982), étudiant la biosynthèse de l'auréothricine par *S. kasugaensis*, pensent que les gènes responsables de cette biosynthèse sont d'origine chromosomique. Le précurseur de l'auréothricine serait la L-cystine dont l'accumulation nécessite la présence de certains acides gras tels que l'acide palmitique et l'acide oléique. Le noyau de base provient donc de la condensation de deux cystéines (Adelberg et Rabinovitz, 1956; Ettliger *et al.*, 1959). Une fois le noyau pyrrothine formé, une réaction avec le propionyl-CoA aboutirait à la formation de l'auréothricine. Les mêmes auteurs soulignent qu'une acétylation du noyau pyrrothine, à l'aide de l'acétyl CoA, conduirait également à la formation de la thiolutine. Les informations sur la biosynthèse de quelques dithiopyrrolones sont données sous forme d'hypothèse, comme le montre la figure 4, selon Furumai *et al.* (1982). Aucune étude sur la biosynthèse des dithiopyrrolones n'a été entreprise par la suite.



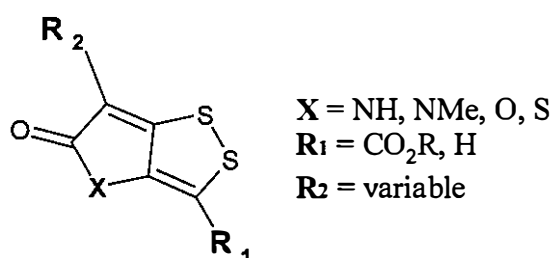




**Figure 4.** Hypothèse sur la voie de biosynthèse de deux dithiopyrrolones (d'après Furumai *et al.*, 1982).

## 5.2.- Synthèse chimique des dithiopyrrolones

En plus des dithiopyrrolones naturelles, d'autres structures ont été obtenues par synthèse chimique, par modification du substituant en position X, en R<sub>1</sub> et/ou en R<sub>2</sub> ou encore par plusieurs autres changements (figure 5) (Khan *et al.*, 1999; Schachtner *et al.*, 1999; Pregnotato *et al.*, 2000; Seepersaud *et al.*, 2002; Elgazwy, 2003; Stachel *et al.*, 2003a,b). De nombreuses recherches sont consacrées à de nouvelles formes de dithiopyrrolones (holothine, butanoyl-holothine, thioaurine acétylène, thioaurine déformylée, etc.) afin d'éviter les difficultés liées à la mauvaise insolubilité dans l'eau (Mizuhara, 1962; Büchi et Lukas, 1964; Hagio et Yoneda, 1974). La thiolutine et plusieurs analogues ont ainsi pu être obtenus par synthèse chimique totale, soit à partir de la L-cystine (Ettliger *et al.*, 1959; Büchi et Lukas, 1964), soit à partir de divers autres composés chimiques comme le S-benzyl-L-cystéine éthyle ester et le dithiazole (Hagio et Yoneda, 1974; Ellis *et al.*, 1977; Dell *et al.*, 1992; Stachel *et al.*, 1992). Cette synthèse chimique, assez complexe, nécessite plusieurs étapes, généralement plus d'une vingtaine de réactions. Par ailleurs, Khan *et al.* (1999) ont synthétisé différents dérivés de thiomarinoles et antibiotiques du groupe des xénorxides.



**Figure 5.** Exemples de dithiopyrrolones issus de la synthèse chimique, (avec R = C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>).

## 6.- Domaines d'utilisation des dithiopyrrolones

### 6.1.- Utilisation dans l'agriculture

Sans être utilisée à grande échelle dans la protection des cultures, la thiolutine a fait l'objet de plusieurs travaux lesquels ont tous aboutit à des résultats assez prometteurs (Leben et Keitt, 1954; Schaffner, 1954; Dell *et al.*, 1992; Merrouche, 2001; Meklat, 2004). Une dose de 60 ppm de thiolutine n'a aucun effet sur la croissance de la tomate et 10 ppm seulement suffisent à protéger totalement cette plante contre la fusariose vasculaire due à *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Gopalkrishnan et Jump (1952). La pulvérisation du pommier par la thiolutine, permet de réduire de 80% la maladie du feu bactérien ou "Fire Blight" due à *Erwinia amylovora*, alors que cette réduction n'est que de 55% avec la streptomycine (puissant antibactérien de la famille des aminosides) (Murneek, 1952; Winter et Young, 1955). Grosso (1954) a constaté que la pulvérisation des feuilles de tabac par des solutions aqueuses de 0,8 à 7,2 ppm de thiolutine, protège totalement la plante contre la moisissure bleue du tabac, *Peronospora tabacina*. Zentmyer (1955) a montré que la thiolutine, à 50 ppm, a une action fongicide totale sur *Phytophthora cinnamomi* dans un sol autoclavé. Dell *et al.* (1992) ont obtenu une activité protectrice de la vigne contre le mildiou, dû à *Plasmopara viticola* et contre la fonte des semis due à *Pythium ultimum*, en utilisant la thiolutine à raison de 3 à 25 ppm. Les mêmes auteurs obtiennent, avec 10 ppm, une action fongicide *in vitro* contre *Phytophthora infestans*, *Cercospora arachidicola*, *Venturia inaequalis*, *Pyricularia oryzae* et *Puccinia recondita*. Merrouche (2001) a montré que l'utilisation de la thiolutine à raison de 5 mg pour 100 g de sol, fait baisser la population des agents pathogènes *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* et *F. o.* f. sp. *lini*, de 113 et de 8,5 fois respectivement, et l'utilisation de la même dose fait diminuer nettement la fusariose vasculaire du lin. Meklat (2004) a constaté que la thiolutine à une concentration de 1 g/L, et à raison de 1,2 mg par plante, fait baisser de 40% la maladie "tache chocolat" de la fève, due à *Botrytis fabae*. En plus, la thiolutine possède une activité larvicide contre les larves des insectes nuisibles, comme *Lucilia sericata* (Cole et Rolinson, 1972). La thiolutine est un inhibiteur de la croissance de certaines plantes (mauvaises herbes) comme *Lemna minor* (Nickell et Finlay, 1954). On peut signaler aussi que la thiolutine possède une activité herbicide et une activité contre les champignons supérieurs (Schaffner, 1954), car les doses élevées de cette substance sont phytotoxiques (Bycroft, 1988).

## 6.2.- Utilisation dans d'autres domaines

La thiolutine possède des propriétés antihistaminiques: brevet 3.434.562 de 1986 (Budavari *et al.*, 1989).

D'après le NCI (*National Cancer Institute*) des Etats Unis d'Amérique, la thiolutine a un rôle préventif contre les effets des substances carcinogènes des cellules épithéliales (Arnold *et al.*, 1995); le même effet est constaté pour les cellules des poumons, du colon, de la prostate, de la peau, des reins et du cerveau (Webster *et al.*, 2000). Ces dernière années, l'équipe japonaise de Masaaki Ishizuka, à l'Institut de Chimiothérapie de Shizuoka, a montré l'activité antiangiogénique de la thiolutine (Minamiguchi *et al.*, 2001). De plus, d'après le même institut, la thiolutine inhibe une protéine appelée l'intégrine  $\alpha\beta3$  alors que des études précédentes avaient prouvé que les

inhibiteurs de l'intégrine  $\alpha\beta 3$  empêchent la croissance des tumeurs (Brooks *et al.*, 1995). Minamiguchi *et al.* (2001) ont également montré que d'autres dithiopyrrolones (auréothricine, holomycine, thioaurine, propiopyrrothine, etc.) possèdent les mêmes propriétés antitumorales.

L'intérêt qu'accordent les chercheurs et les firmes à la thiolutine et ses analogues dans le domaine de l'agriculture et la pharmacologie est illustré par le nombre de dépôts de brevets (depuis 1953 à 2005) qui avoisine la quarantaine, aux U.S.A., en Grande-Bretagne, en Australie et surtout au Japon (9 brevets entre 2000 et 2005) ([www.uspto.gov/patft/](http://www.uspto.gov/patft/)).

## **7.- Toxicité des dithiopyrrolones**

La thiolutine est un antibiotique toxique pour les animaux, au vu de sa  $DL_0$ : 5-10 mg/Kg en sous-cutanée et 10 mg/Kg par voie orale, et de sa  $DL_{50}$  (dose nécessaire pour tuer la moitié des individus testés) qui est de 25 mg/Kg, par voie orale ou sous-cutanée, chez la souris (Seneca *et al.*, 1952). Ceci peut donc l'exclure de toute possibilité d'utilisation dans la thérapeutique. Mais en terme de toxicité aiguë, la thiolutine est environ cent fois moins toxique que certaines toxines algales (phycotoxines).

Malgré cette toxicité relative sur les animaux, la thiolutine, grâce à son spectre d'action intéressant, a vu son utilisation orientée dans le domaine agronomique. Il fallait cependant éviter d'éventuels effets phytotoxiques en utilisant la thiolutine à des doses non toxiques pour les plantes. Ces résultats montrent que l'utilisation de ce composé dans l'agriculture devrait se faire avec une certaine précaution, en tenant compte de la sensibilité de l'agent pathogène, de la toxicité de l'antibiotique sur la plante à traiter, etc. Plusieurs expérimentations préliminaires devraient, dans tous les cas, être effectuées.

## **8.- Résistance aux dithiopyrrolones**

Jusqu'à l'heure actuelle, aucune résistance (acquise) aux dithiopyrrolones n'a été signalée dans le monde.

### III.- REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DES ANTIBIOTIQUES

Les métabolites secondaires, dont les antibiotiques, sont aussi appelés idiolites car ils sont synthétisés pendant l'idiophase, phase de non croissance succédant à la trophophase ou phase de croissance (Walker, 1974). Cette définition n'est pas entièrement satisfaisante. En effet, il est possible d'obtenir un couplage de la production de certains métabolites secondaires et de la croissance contrôlée du microorganisme en faisant varier la composition du milieu (Gray et Bhuwathanapun, 1980; Untrau *et al.*, 1995). La biosynthèse des métabolites secondaires est fortement affectée par les conditions environnementales et nutritionnelles dans lesquelles le microorganisme se développe. Les conditions optimales pour la production d'un métabolite ne sont pas nécessairement les mêmes que pour la croissance maximale. De plus, un microorganisme est capable de produire différents métabolites secondaires à différents niveaux, en fonction des paramètres physico-chimiques et de la composition du milieu de culture (sources de carbone, d'azote et de phosphate).

Les métabolites secondaires sont produits à partir de précurseurs, par des voies métaboliques très spécifiques. Cette synthèse est soumise à tout un ensemble de mécanismes de régulation intervenant aux niveaux anabolique, catabolique et énergétique de la cellule. La régulation peut s'exercer directement et spécifiquement sur les gènes ou les enzymes de synthèse des métabolites secondaires et/ou indirectement sur les voies de biosynthèse des métabolites primaires précurseurs. Les différents mécanismes de régulation de la biosynthèse des métabolites secondaires, en particulier des antibiotiques, ont été abondamment répertoriés (Piret et Demain, 1988; Demain, 1998).

#### 1.- Facteurs physico-chimiques

L'influence des facteurs physico-chimiques (pH, température, agitation et aération) sur l'initiation de la biosynthèse des métabolites secondaires et l'amélioration des rendements n'est pas à négliger. Toutefois, nous avons focalisé ici sur l'inoculum et les facteurs nutritionnels.

#### 2.- Inoculum

L'importance de l'inoculum pour la productivité ultérieure des cultures est depuis longtemps reconnue. Toutefois, peu d'études approfondies ont été consacrées à ce sujet (Calam, 1976).

L'importance quantitative et l'âge de l'inoculum sont généralement les deux seuls paramètres considérés (Brown et Zainudeen, 1978). La qualité de l'inoculum définie par des propriétés physiologiques et biochimiques reste rarement évoquée. Les caractéristiques morphologiques pour les actinomycètes sont également à prendre en compte (Whitaker et Long, 1973). L'influence de l'inoculum peut s'expliquer par une "mémoire biochimique" des cellules acquises au cours de leur croissance, dans le milieu de préculture (Meyrath et Suchanek, 1972). Une étude intéressante a été réalisée par Smith et Calam (1980) concernant les productions de pénicilline et de griséofulvine par des souches de *Penicillium*. D'une part, ils ont montré d'un point de vue morphologique que les pelotes de mycélium denses conduisaient à de plus faibles diffusions de substrats que les pelotes ouvertes. D'autre part, ils ont caractérisé les inocula à fort et faible rendement en antibiotiques, par des activités enzymatiques isocitrate et glucose-6-phosphate déshydrogénases, les meilleurs résultats ayant été obtenus lorsque les deux activités étaient équilibrées. Novikova et Makarevich (1984) ont montré une corrélation entre l'activité respiratoire de l'inoculum et la production ultérieure en tétracycline de *Streptomyces aureofaciens*. La potentialité optimale de l'inoculum correspond ainsi à une activité respiratoire maximale. De même, les inocula les plus performants de *S. antibioticus*, producteur d'oléandomycine, se caractérisent par un taux de croissance élevé, une activité succinate déshydrogénase importante et un niveau d'ATP maximum (Rudakova et Malkov, 1987).

### **3.- Facteurs nutritionnels**

La production des métabolites secondaires peut être réalisée sous trois conditions. Premièrement, il est nécessaire d'avoir des usines cellulaires pour synthétiser la molécule, c'est-à-dire de la biomasse; deuxièmement, les précurseurs doivent être présents; et troisièmement, les enzymes capables de transformer ces précurseurs, doivent être aussi présentes et actives (Voelker et Altaba, 2001). La biosynthèse des antibiotiques est souvent contrôlée par des mécanismes dus au métabolisme des sources de carbone, d'azote et de phosphate: induction et répression de la biosynthèse, rétroinhibition et inactivation enzymatique (Martín and Demain, 1980). Les sels minéraux ont également un rôle de régulation non négligeable (activation ou inhibition des enzymes de synthèse des idiolites), mais leur épuisement ne suffirait pas à initier le métabolisme secondaire.

### **3.1.- La source de carbone**

La disponibilité et le type de la source de carbone influencent fortement le métabolisme secondaire et par conséquent la production d'antibiotiques (Martín et Demain, 1980; Doull et Vining, 1990; Spižek et Tichý, 1995).

#### **3.1.1.- Régulation par les substrats glucidiques**

Les sources de carbone tels que l'amidon, les dextrines, le glucose et le saccharose sont communément utilisées comme substrats de croissance pour produire des enzymes, des antibiotiques et d'autres métabolites secondaires, par fermentation. Cependant, cette production peut être parfois limitée en raison de l'effet négatif exercé par certaines d'entre elles (Sanchez et Demain, 2002). De nombreuses productions d'antibiotiques sont ainsi soumises à la répression catabolique, par le glucose le plus généralement, ou par le glycérol, voire même le citrate (Martín et Demain, 1980; Vu-Trong *et al.*, 1980; Demain, 1982; Bushell, 1989; Martín, 1989; Lounès *et al.*, 1995b,c). Cette répression catabolique semble être due aux intermédiaires cataboliques du glucose. Gallo et Katz (1972) ont observé par exemple que l'enzyme qui catalyse la formation du cycle du phénoxazinone de l'actinomycine a été inhibée par le glucose. Dans le cas de nombreux 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 secondaires est pH dépendant. Il est dû à l'acidification par suite de l'accumulation des acides organiques (Solé *et al.*, 2000).

Les sources de carbone lentement assimilées, tel que l'amidon, permettent de meilleurs rendements de production d'antibiotiques chez les champignons (Basak et Majumdar, 1973). La production de la bacitracine par *Bacillus licheniformis* peut être obtenue pendant la phase de croissance lorsqu'une source de carbone lentement assimilée est utilisée (Haavik, 1974).

Pour contrevenir aux effets négatifs de concentrations trop élevées en sources carbonées aisément utilisables, des procédés de fermentations optimisés utilisent des source de carbone lentement assimilées par la souche, ou un apport contrôlé (progressif) de la source carbonée rapidement métabolisée ainsi que des autres constituants du milieu (procédés semi-continus ou continus). Par exemple, le glucose est sans effet négatif lorsqu'il est en présence d'amidon (Omura et Tanaka, 1986a). Vu-Trong et Gray (1982), ainsi que Gray et Vu-Trong (1987), ont aussi montré



que l'utilisation du glucose associé à d'autres constituants carbonés peut dans certaines conditions d'alimentation, mener à de fortes productions de tylosine. Ainsi, l'alimentation cyclique d'une culture de *Streptomyces fradiae* de 48 h avec un milieu d'alimentation contenant du glucose, du glutamate et du méthyleoléate, a permis de maintenir la production de la tylosine à un taux de biosynthèse élevé, pendant toute la fermentation. Concernant la régulation de la production de la spiramycine par la source de carbone et d'énergie, Lamsaïf (1992) a montré que la capacité des différentes sources de carbone à permettre la production de la spiramycine, par ordre décroissant, est la suivante: dextrines, amidon, glucose, lactose, fructose et galactose. Par contre le maltose ne permet pas de production.

Les mécanismes moléculaires de cette régulation ne sont pas encore totalement élucidés (Marwick *et al.*, 1999). Des effets indirects ont parfois été mis en évidence. Les effets du glucose peuvent être soit: (1) indirects, par l'action inhibitrice des acides organiques produits par le métabolisme du glucose (Haavik, 1974) ou (2) directs, par la répression de la synthèse et inhibition de l'activité des enzymes spécifiques de biosynthèse des métabolites secondaires (Spížek et Tichý, 1995). Ainsi, Vu-Trong *et al.* (1980) ont montré que l'addition de 30 g/L de glucose pendant l'idiophase dans des cultures discontinues, entraînait une inhibition de l'activité de la méthylmalonyl-CoA carboxyltransférerase et propionyl-CoA carboxylase et un arrêt de la biosynthèse de la tylosine.

### **3.1.2.- Régulation par les acides gras**

Les acyl-CoA produits à partir des acides gras sont d'excellents précurseurs de la synthèse des macrolides. La production de la spiramycine en milieu synthétique est facilitée par l'ajout de différents acides gras. Le palmitate, l'oléate et le méthyloléate, à raison de 20 mM, stimulent la biosynthèse de la spiramycine par *Streptomyces ambofaciens* (Khaoua, 1990), alors que l'acétate et le propionate ont besoin d'être couplés au butyrate pour avoir un effet stimulateur (Khaoua *et al.*, 1992). Par ailleurs, l'activation des systèmes enzymatiques, acétate- et propionate-kinase couplés à l'acylphospho-transférerase, par les acides gras correspondants a été observée (Khaoua, 1990). Peroz-Collignon (1993) a montré que l'utilisation de l'hexanoate comme unique substrat carboné ne permettait pas de production de la spiramycine par *S. ambofaciens*. Cette production n'est possible qu'en présence d'autres sources de carbone. Ceci a été expliqué par un manque probable de certaines étapes de la néoglucogénèse à partir de cet acide gras, ce qui limite la formation des sucres aminés de la spiramycine.

L'effet précurseur des acides gras exogènes pour la production d'un grand nombre d'antibiotiques est souvent lié à des changements de la composition lipidique des cellules et à une meilleure utilisation des acides gras (Melchior et Steim, 1977). L'addition d'oléate, de palmitate ou de stéarate modifie souvent la composition de la membrane cellulaire en augmentant la teneur en acides gras suivant les espèces, et stimule ainsi la production de l'antibiotique (David *et al.*, 1992). Mouslim *et al.* (1993) ont noté que l'addition de 1% d'oléate de méthyle dans le milieu producteur améliorerait de plus de 700% la production de nigéricine. Cette action a été expliquée par une modification de la perméabilité cellulaire et par une solubilisation de cet antibiotique hydrophobe.

### **3.2.- La source d'azote**

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). L'action de l'azote peut se situer au niveau du taux de croissance et au niveau plus direct de la formation ou du fonctionnement des enzymes responsables du métabolisme secondaire. Le régulateur principal de ce métabolisme est l'ammonium apporté sous forme de sel ou de composé organique au cours du catabolisme des protéines et des acides aminés ou à partir de nitrate.

L'effet négatif des sources d'azote peut être éliminé par le choix dans le milieu de culture d'un substrat naturel approprié (ex.: farine de soja) ou d'acides aminés lentement métabolisés (cas de la proline pour la production de streptomycine). L'addition d'agents trappeurs des ions ammonium tels que le phosphate de magnésium ou le zéolite permet dans certains cas d'augmenter la production de divers antibiotiques en piégeant l'excès d'ions ammonium présents dans le milieu de culture (Omura, 1986). En effet, les productions de tylosine et de céruléine sont améliorées respectivement de 3 et 7 fois quand la fermentation est additionnée de 1% de zéolite naturel (Omura et Tanaka, 1986b).

Des mécanismes de contrôle très fins régulent les voies du catabolisme et d'assimilation de la source d'azote afin d'assurer un apport de cet élément aussi bien pour la croissance que pour le métabolisme secondaire (Aharonowitz, 1980).

#### **3.2.1.- Régulation par les ions ammonium**

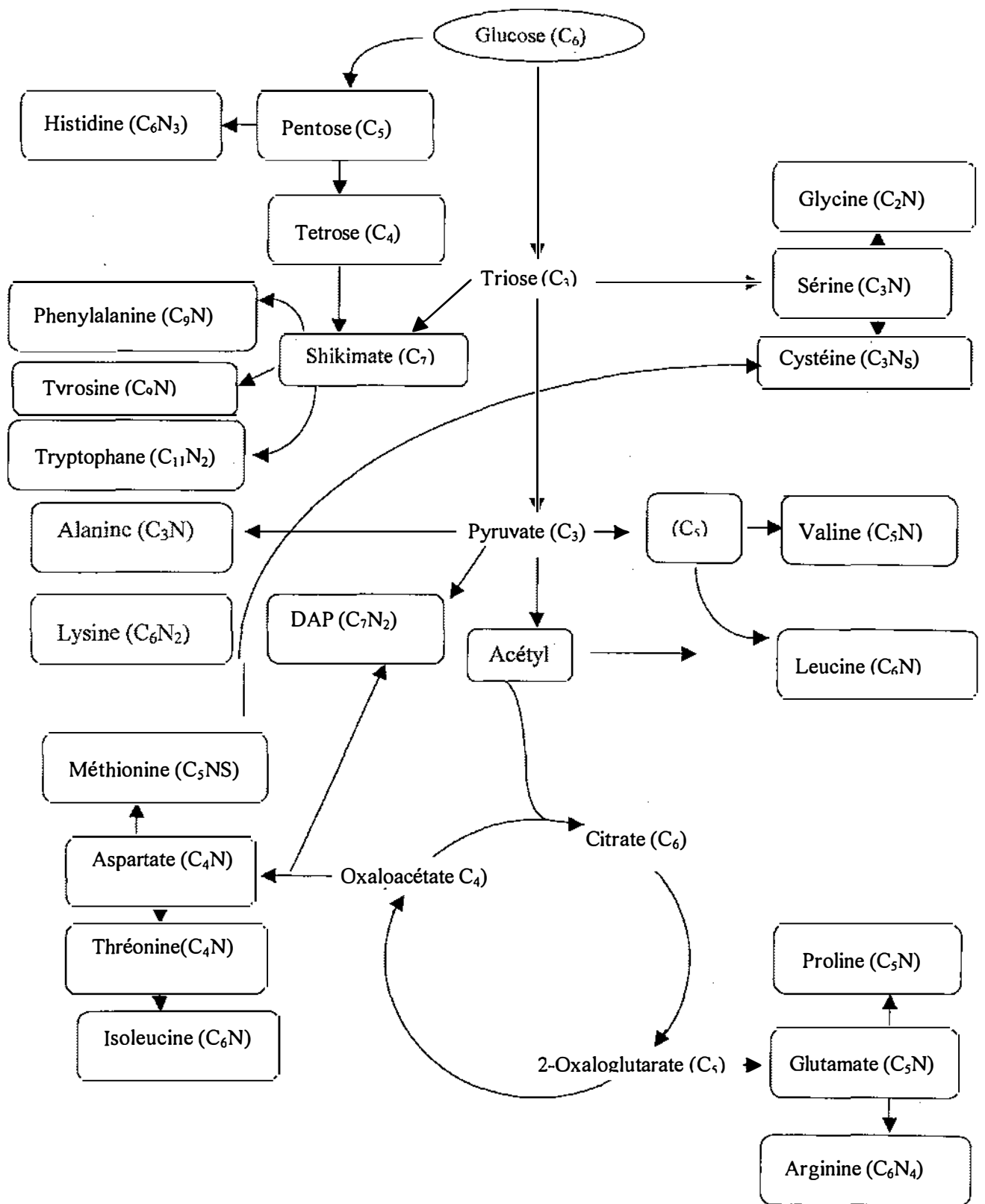
De même que pour la source de carbone, la biosynthèse de la plupart des métabolites secondaires peut être réprimée par les sources d'azote rapidement assimilables, en particulier par

les sels d'ammonium (Aharonowitz, 1980; Okanishi et Hotta, 1980; Demain, 1982; Piret et Demain, 1988). Les niveaux élevés de l'azote répriment la production d'antibiotiques pendant l'idiophase (Ahronowitz, 1980; Doull et Vining, 1990; Spížek et Tichý, 1995). Junker *et al.* (1998) ont trouvé pour leur part que le contrôle de la concentration des ions ammonium était important pour la production de métabolites secondaires. Un des effets de cette régulation est la répression spécifique de la synthèse d'enzymes du métabolisme secondaire. Par exemple, l'ammonium inhibe la formation de deux enzymes de la voie de biosynthèse de la céphalosporine chez *Streptomyces clavuligerus*: la cyclase et l'expandase (Braña *et al.*, 1985). Il inhibe également la biosynthèse de la leucomycine (Omura *et al.*, 1980), de la tylosine (Omura *et al.*, 1984b), de la spiramycine (Lebrihi *et al.*, 1992), ainsi que de l'anhydrotétracycline oxygénase responsable de la biosynthèse de la tétracycline (Behal *et al.*, 1983). L'ajout de l'ammonium lors de la trophophase, exerce un effet négatif sur la production de la tylosine (Vu-Trong et Gray, 1987). Parallèlement à cette chute de la biosynthèse de la tylosine, on note une diminution de l'activité enzymatique de la macrocine 3'-O-methyltransférerase qui catalyse la conversion de la macrocine en tylosine, ainsi qu'une chute de l'activité de la propionyl CoA-carboxylase et de la méthyl CoA-carboxytransférerase, enzymes fournissant des précurseurs pour le protylonolide.

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).

### **3.2.2.- Régulation par les acides aminés**

De nombreuses études ont montré l'importance des acides aminés dans la biosynthèse des antibiotiques. La figure 6 montre les voies générales de biosynthèse des différents acides aminés. L'utilisation des acides aminés comme sources d'azote, peut inhiber fortement ou améliorer la biosynthèse de certains métabolites secondaires (Aharonowitz, 1980; Martín et Demain, 1980). Omura *et al.* (1984a,b) ont observé par utilisation de mutants de cosynthèse de *S. fradiae*, que la valine, la leucine, l'isoleucine, la thréonine ou leur  $\alpha$ -céto acides correspondants, favorisaient la production du protylonolide. Cependant, l'alanine, la sérine, la proline, le pyruvate ou l' $\alpha$ -cétoglutarate présentent un faible effet. La méthionine est bien connue pour son effet stimulateur sur la biosynthèse de la céphalosporine C, quand elle est ajoutée pendant la phase de croissance de *Cephalosporium acremonium* (Martín et Demain, 1980).



**Figure 6.** Voies générales de biosynthèse des différents acides aminés, précurseurs de métabolites secondaires (d'après Martin et Liras, 1981).

Ces effets bénéfiques peuvent être dus à un rôle inducteur joué par l'acide aminé ou simplement par un apport accru en précurseurs.

Le glutamate est le fournisseur de l'azote pour la biosynthèse de 85% des composés azotés de la cellule alors que la glutamine peut représenter la source de 15% des molécules azotées (Gonzalez *et al.*, 1995). Ces deux fournisseurs d'azote peuvent être synthétisés à partir d'ammonium par la glutamate déshydrogénase (GDH) et la glutamine synthétase (GS). Par conséquent, l'ammonium peut être considéré comme étant la troisième molécule du métabolisme central d'azote après le glutamate et la glutamine. Une autre réaction catalysée par la glutamate synthétase (GOGAT) est capable de transformer la glutamine en glutamate (Reitzer, 1996). L'acide glutamique et l'acide aspartique sont considérés comme des sources riches en azote et sont utilisés préférentiellement par la cellule (Da Silva *et al.*, 2001). L'ammonium, le glutamate et la glutamine sont eux utilisés préférentiellement par les champignons (Magasanik, 1992; Ter Schure *et al.*, 2000). Seuls le glutamate et l'histidine favorisent la biosynthèse de la lovastatine (Szakacs *et al.*, 1998; Manzoni *et al.*, 1999).

L'acide glutamique (ou la proline) exerce un effet inducteur sur la biosynthèse de l'ochratoxine A (OTA) chez *Aspergillus ochraceus* et *Penicillium verrucosum* (Ferreira, 1967; Pitt, 1987). La proline est convertie en acide glutamique chez beaucoup de microorganismes (Rodwell, 1969). Cependant, les autres acides aminés sont aussi connus pour être convertis en acide glutamique, mais ils ne favorisent pas la production de mycotoxines (Ferreira, 1968).

La production de la spiramycine par *Streptomyces ambofaciens* dépend aussi de la nature et de la concentration des acides aminés présents dans le milieu de culture (Khaoua, 1990; Lamsaïf, 1992; Lounès *et al.*, 1996). L'utilisation de la lysine et de l'isoleucine (même à de fortes concentrations) assure une bonne production de la spiramycine. Cependant, la thréonine, l'alanine et la valine ne stimulent la biosynthèse de la spiramycine qu'à faible concentration, alors que l'arginine, le glutamate, la proline et la cystéine, à faible ou forte concentration, ne permettent qu'une faible production. Ces résultats ont montré que le niveau de production dépendait à la fois de l'apport des acyl-thioesters et de la concentration des ions ammonium obtenus lors du catabolisme des acides aminés. Ainsi, la relation entre le métabolisme de la lysine et de l'arginine et la production de la spiramycine a été clarifiée (Untrau *et al.*, 1992 et 1994). Contrairement à l'inhibition de la production de la spiramycine par 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*.

Par ailleurs, la source d'azote peut affecter la synthèse des enzymes impliquées dans la production des précurseurs du métabolisme secondaire, d'où une interconnexion des métabolismes primaire et secondaire. Des concentrations importantes en ions ammonium inhibent la production de l'antibiotique en inhibant/réprimant certaines enzymes de dégradation des acides aminés comme la valine déshydrogénase (VDH) (Omura *et al.*, 1983) ou la thréonine déshydrogénase (Vančura *et al.*, 1988). Chez *S. ambofaciens*, la VDH est également régulée par l'ammonium, jusqu'à une inhibition de 65% avec 100 mM de NH<sub>4</sub>Cl (Lebrihi *et al.*, 1992; Lounès *et al.*, 1995a), tout comme l'alanine déshydrogénase et la glutamate déshydrogénase (Lamsaïf, 1992).

### 3.3.- La source de phosphate

La croissance microbienne, la consommation des substrats et 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). Beaucoup de métabolites secondaires nécessitent pour leur formation des concentrations faibles en phosphate (inférieures à 10 mM). Il existe toutefois des exceptions notables: 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). Dans de nombreux cas, la production de l'antibiotique débute lorsque le milieu est carencé en phosphate (ex.: candicidine, tétracycline, tylosine). Omura *et al.* (1980) ont montré que la présence dans le milieu de culture du phosphate de magnésium permet d'améliorer de 2 à 10 fois la production de la leucomycine, de la tylosine ainsi que celle de la spiramycine. Ces auteurs supposent que la limitation en ammonium causée par sa complexation avec le phosphate de magnésium serait à l'origine de l'amélioration de la production de ces trois macrolides.

Pour comprendre l'effet inhibiteur des phosphates sur le métabolisme secondaire, il est nécessaire de considérer en premier lieu le rôle des phosphates en tant qu'effecteur de plusieurs réactions enzymatiques du métabolisme primaire. Ainsi, Hostalek (1964) observa qu'une augmentation de la concentration en phosphates lors de la production d'antibiotiques entraînait une augmentation de la respiration et au même moment l'inhibition de la biosynthèse de chlortétracycline.

Bien que le phosphate soit essentiel pour la croissance, il peut, à certaines concentrations, affecter négativement le métabolisme secondaire, par exemple, les phosphatases et les oxygénases (Behal *et al.*, 1979; Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992; Spížek et Tichý, 1995). Le niveau d'ATP chute fortement avant le démarrage du métabolisme secondaire (Cardova *et al.*, 1976). Le

phosphate inorganique réprime la synthèse de la phosphatase, en augmentant le niveau d'ATP. La stimulation de la phase de la croissance, par addition de phosphate, peut engendrer l'inhibition du métabolisme secondaire. Par contre, la production de phénazine par *Pseudomonas phenazinium* ne semble pas être régulée par le niveau du phosphate (Messenger et Turner, 1983).

### 3.4.- Les sels minéraux et les oligoéléments

La présence de  $MgSO_4$  est indispensable à la croissance des microorganismes. Son effet sur la production de métabolites est rarement mentionné, sauf dans le cas de la synthèse de certains thiopeptides et dans la production de l'antibiotique G-60 (une quinone). Certaines productions, telles que celles de la streptomycine ou de la tétracycline (Küster et Neumeier, 1981), sont améliorées par l'addition respectivement de 0,5% et 1% de NaCl. Des concentrations plus élevées en NaCl conduisent à l'inhibition des productions. Cependant, l'addition de NaCl dans le milieu de culture d'une souche mutante de *Streptomyces fradiae* (non productrice de l'antibiotique) restaure la production de l'antibiotique. Les auteurs pensent que le NaCl augmente la perméabilité de la membrane cellulaire et facilite donc l'approvisionnement de la cellule en précurseurs de l'antibiotique (Okazaki *et al.*, 1973). Certains composés naturels, extraits de viande ou de levure, peuvent contenir des concentrations élevées en NaCl.

L'addition de  $CaCO_3$  est souvent effectuée pour maintenir le pH aux environs de la neutralité. Plusieurs chercheurs utilisent le carbonate de calcium pour favoriser la croissance bactérienne et augmenter la biomasse cellulaire, et par la suite la production des antibiotiques (Yamamoto *et al.*, 1977; Blumauerova *et al.*, 1980; Ikeda *et al.*, 1992; Lamsaïf, 1992).

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  $Fe_2(SO_4)_3$  et le  $MnCl_2$  stimulent la production de la monensine par *Streptomyces cinnamomensis*. Des effets qualitatifs peuvent de plus s'observer: la composition du mélange de gentamicines produites par *Micromonospora purpurea* est dépendante de la concentration en  $Co^{++}$ .

#### 4.- Taux de croissance

Les métabolites secondaires sont généralement formés lorsque le taux de croissance des microorganismes atteint une valeur seuil, le plus souvent faible (Bu'Lock, 1975). En culture continue, la synthèse d'un antibiotique est optimale si le taux de croissance est maintenu entre 50 et 80% du taux de croissance maximal de la cellule (Gray et Bhuwapathanapun, 1980; Trilli *et al.*, 1987). Il est toutefois difficile de déterminer le rôle du taux de croissance per se dans l'initiation du métabolisme secondaire car il n'est pas indépendant du phénomène de limitation nutritionnelle.

Les productions de céphamycine C et de thiénamycine chez *Streptomyces cattleya* sont soumises à deux types de régulation: un faible taux de croissance est l'une des conditions pour la synthèse de la céphamycine indépendamment de la nature du substrat limitant. Par contre, une limitation nutritionnelle spécifique par le phosphate, associée à un faible taux de croissance, est nécessaire pour la production de la thiénamycine (Lilley *et al.*, 1981). De même, le contrôle de la biosynthèse de l'actinorhodine relèverait d'un processus multifonctionnel mettant en jeu, selon les conditions de culture de *Streptomyces coelicolor*, soit le taux de croissance du microorganisme, soit les concentrations en phosphate et en azote du milieu (Doull et Vining, 1990).

#### 5.- Régulation de la production des précurseurs d'antibiotiques

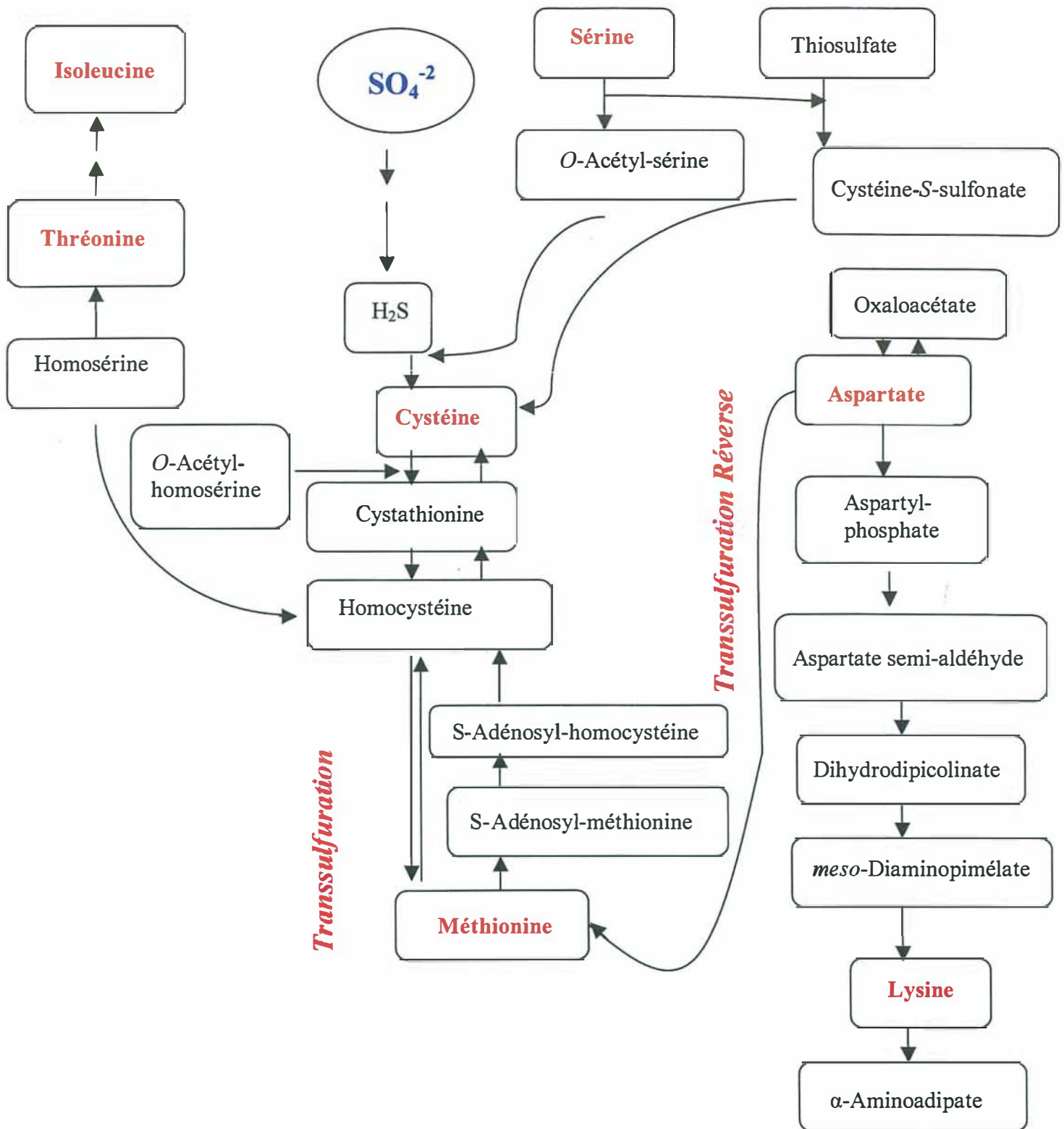
La cystéine et la méthionine peuvent être impliquées dans la biosynthèse de noyau pyrroline. Par ailleurs, les acides organiques permettent la biosynthèse de plusieurs dérivés de dithiolopyrrolones, objets de notre étude. Pour cela, il est intéressant de donner quelques informations sur la biosynthèse et le rôle de la cystéine et les acides organiques sur la synthèse de quelques métabolites secondaires.

##### 5.1.- Cas des acides aminés et métabolisme de soufre

###### 5.1.1.- Biosynthèse et rôle de la cystéine

L'atome de soufre que possèdent les pénicillines et les céphalosporines dérive de la cystéine. La cystéine marquée est incorporée dans la benzylpénicilline chez *Penicillium chrysogenum*, dans la céphalosporine C chez *Cephalosporium acremonium* et dans la céphamycine C chez *Streptomyces clavuligerus* (Demain, 1983). La cystéine peut être synthétisée par deux voies principales (figure 7) (Martín et Aharonowitz, 1983).





**Figure 7.** Voies de biosynthèse de la cystéine et de la méthionine chez les microorganismes (d'après Martín et Aharonowitz, 1983).

La première est une voie de réduction du sulfate en H<sub>2</sub>S qui est incorporé dans l'*O*-acétylsérine en présence de l'enzyme *O*-acétylsérine sulfhydrase. L'autre voie part de la méthionine qui, par transsulfuration réverse, conduit à la cystéine. L'efficacité avec laquelle chacune de ces voies fonctionne chez différents microorganismes est déterminée génétiquement et la coordination entre les différents mécanismes de contrôle régulant le métabolisme du soufre détermine la voie préférentielle.

Ainsi, chez les souches industrielles de *P. chrysogenum*, c'est la voie de réduction de sulfate qui prédomine, alors que chez *C. acremonium* producteur de céphalosporine C, la cystéine provient de la méthionine par la voie de transsulfuration réverse (Suzuki *et al.*, 1980).

Chez les bactéries, dans la majorité des cas, la cystéine provient de la réduction du sulfate. Les *Streptomyces* producteurs de β-lactamines produisent la cystéine par l'intermédiaire des deux voies.

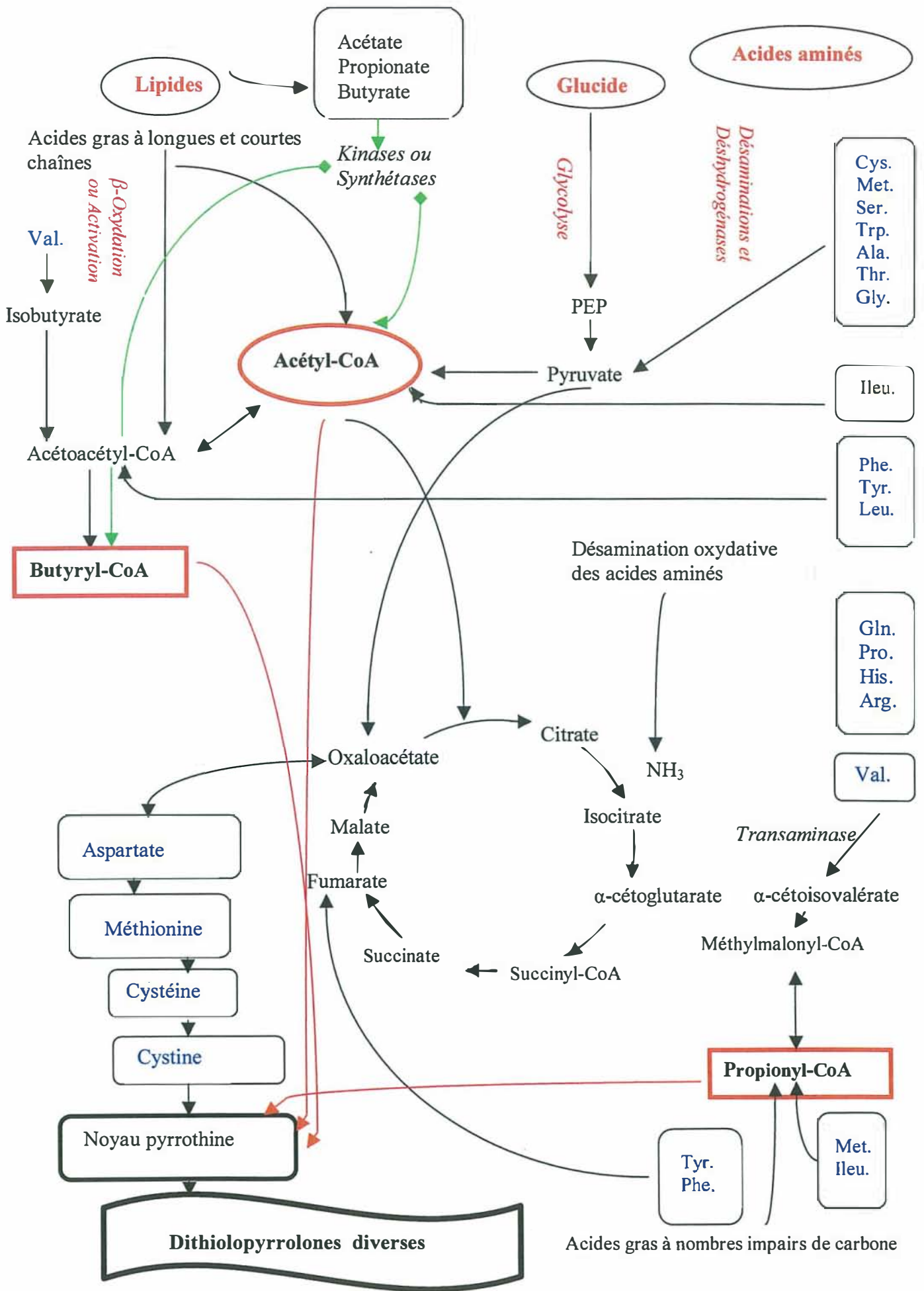
## **5.2.- Cas des acides organiques**

Les acides organiques constituent les chaînes latérales des dithiopyrrolones. Ils permettent ainsi, la biosynthèse de plusieurs dérivés de cette famille, avec différentes activités biologiques.

### **5.2.1- Origine des acides gras à courtes chaînes**

L'identification de l'origine des atomes de carbone de certains antibiotiques montre que ces derniers peuvent avoir comme précurseurs une ou plusieurs unités d'acides gras à courtes chaînes (en C2, C3 et C4): l'acétate, le propionate et le butyrate.

Ces unités proviennent des différentes voies du métabolisme primaire, soit du catabolisme des acides gras à longues chaînes, soit de celui de certains acides aminés, soit de la glycolyse. Ils peuvent aussi dériver de certains intermédiaires du cycle de Krebs. Ils sont donc à la fois des produits finaux de certaines voies du métabolisme primaire et des précurseurs de la biosynthèse des métabolites secondaires. Ils occupent ainsi une position charnière entre les métabolismes primaire et secondaire, dont celui des dithiopyrrolones (figure 8).



**Figure 8.** Relation entre le métabolisme primaire et la voie générale de biosynthèse des dithiopyrrolones.

### 5.2.1.1- $\beta$ -Oxydation des acides gras à longues chaînes

Le catabolisme des acides gras à longues chaînes (saturés ou insaturés) par la  $\beta$ -oxydation est la source principale d'acétyl-CoA. Cet acétyl-CoA peut, par carboxylation, former le malonyl-CoA et par condensation avec un autre malonyl-CoA, donner le butyryl-CoA.

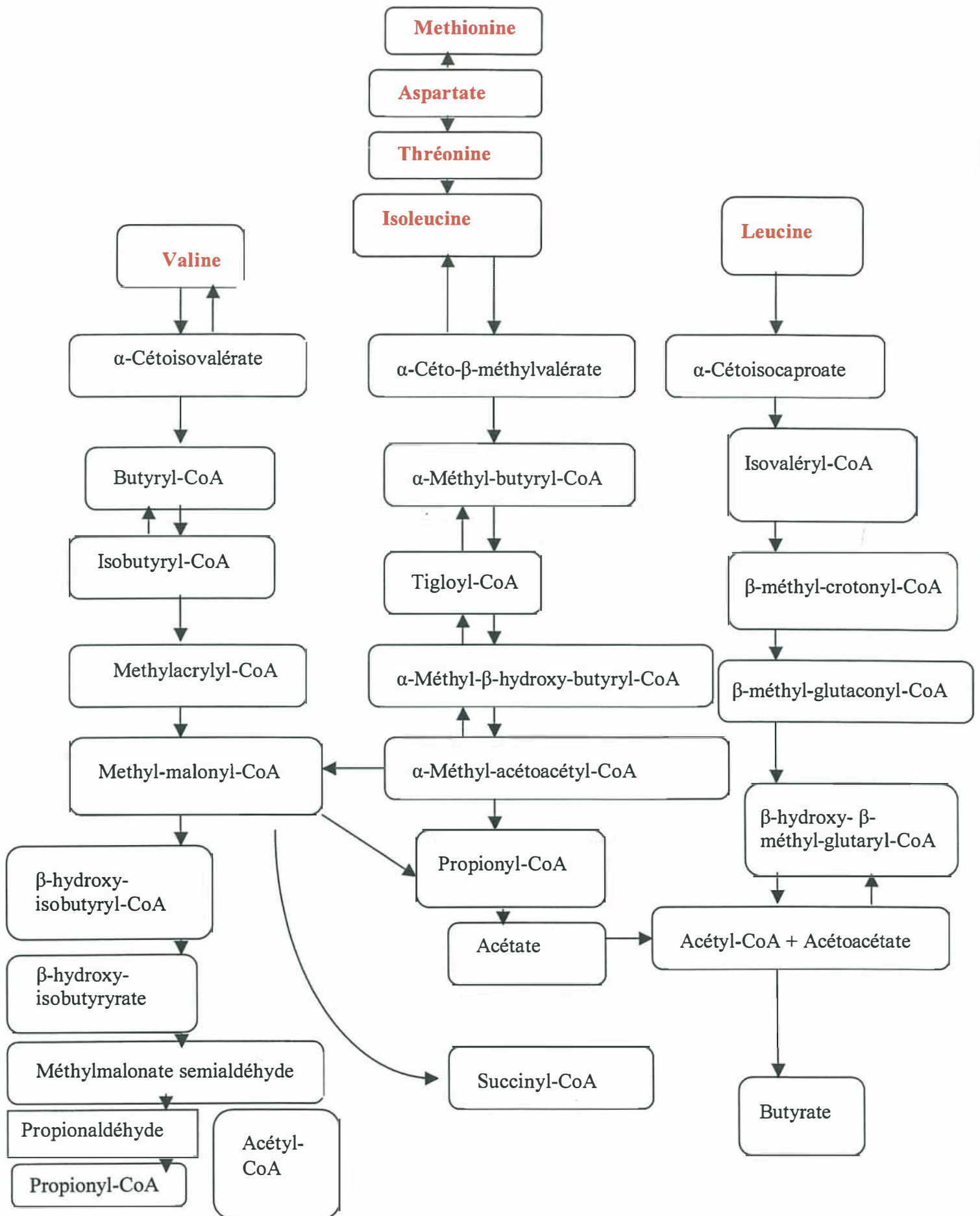
Par ailleurs, les acides gras saturés à nombre impair d'atomes de carbone subissent la  $\beta$ -oxydation, mais l'acyl-CoA obtenu au terme de l'avant dernier tour de l'hélice est à cinq atomes de carbone. Il est donc scindé finalement en acétyl-CoA et en propionyl-CoA. Ces mêmes produits sont obtenus suite à la dégradation des acides gras ramifiés. Le propionate (propionyl-CoA) peut être fourni par la dégradation d'acides gras ramifiés, insaturés ou à nombre impair de carbones.

### 5.2.1.2- Catabolisme des acides aminés et glycolyse

Plusieurs acides aminés (l'alanine, la lysine, la cystéine, la sérine, la thréonine, la phénylalanine, etc.) sont dégradés jusqu'au stade final pour aboutir à l'acétyl-CoA, comme par exemple l'implication de la thréonine comme donneur d'acétyl-CoA nécessaire à la formation de la tylosine (Vančura *et al.*, 1988).

Ainsi la proline favorise la production de l'aflatoxine produite par condensation d'unités d'acétyl-CoA par *Aspergillus flavus* (Dutton, 1988). L'utilisation de certains acides aminés marqués dans le milieu de culture de *Streptomyces antibioticus*, montre l'incorporation des unités de carbone dérivant de la tyrosine, la phénylalanine et la leucine dans un macrolide, la chlorothricine (Floss et Chang, 1981). L'alanine marquée permet l'enrichissement isotopique du carbone de la tétracycline dont l'unité de base est l'acétyl-CoA (Behal *et al.*, 1983). Les résultats obtenus par Vančura *et al.* (1988) indiquent l'intervention du catabolisme de la thréonine comme source d'acétyl-CoA dans la biosynthèse de la tylosine.

Le propionate (propionyl-CoA) peut être fourni par la dégradation de certains acides aminés tels que la méthionine, la thréonine, l'aspartate, la valine, la thréonine et l'isoleucine (Massey *et al.*, 1976) (figure 9). Il peut aussi dériver du succinate fourni par le cycle de Krebs (Corcoran, 1981). Dans le cas de la tylosine, l'utilisation de certains acides aminés marqués au  $^{14}\text{C}$  tels que la valine, l'isoleucine et la méthionine a montré leur participation dans la formation de la tyloactone via le propionyl-CoA ou le méthylmalonyl-CoA (Dotzlaf *et al.*, 1984).



**Figure 9.** Voies de catabolisme des acides aminés à chaînes ramifiées et d'autres composés menant à des acyl-CoA, chez les bactéries (D'après Willecke et Pardee, 1971; Massey *et al.*, 1976; Martín et Liras, 1981; Vančura *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1999).

La leucine et la phénylalanine sont intégrées dans la tylosine *via* l'acéto-acétyl-CoA produit. Cette molécule peut être scindée en deux acétyl-CoA ou réduite pour former du butyryl-CoA. Le butyrate pourrait aussi avoir comme origine la condensation de deux unités acétate. Cette voie est suggérée être une source de butyrate pour la biosynthèse de plusieurs polyéthers (Westley, 1981). Le catabolisme de la valine permet aussi de conduire à l'isobutyryl-CoA qui pourrait être converti (isomérisé) en butyryl-CoA (Omura *et al.*, 1983, 1984b). Ainsi, l'addition de valine dans le milieu de culture de *Streptomyces paulus* permet d'améliorer la production de la paulomycine B, un ester isobutyrique de la paulomycine (Marshall *et al.*, 1984, 1987). Ce même acide aminé s'est montré être l'origine du butyrate précurseur du polyéther, le lasolacide A (Sherman *et al.*, 1988) et des macrolides, leucomycine et tylosine (Omura *et al.*, 1984c). La valine, outre le propionyl-CoA, fournit auparavant de l'isobutyryl-CoA incorporé dans l'aglycone sous forme de butyrate (Omura *et al.*, 1983 et 1984c).

Par ailleurs, le catabolisme des glucides par la voie de la glycolyse est aussi une source d'acétyl-CoA. Les travaux de Hseih et Matele (1970), montrent que le glucose est dégradé en pyruvate qui donne après l'action de la pyruvate-déshydrogénase, l'acétyl-CoA précurseur de l'aflatoxine.

### **5.2.1.3- Activation des acides acétique et propionique**

Une activation de ces acides gras libres endogènes ou exogènes peut aussi avoir lieu. Chez les *Streptomyces* elle se fait par deux systèmes enzymatiques (Raczynska-Bojanowska *et al.*, 1973). Le premier système fait intervenir deux étapes:

La première étape est une phosphorylation catalysée par une acyl-kinase, conduisant à la formation de l'acétyl-phosphate ou du propionyl-phosphate. La deuxième étape consiste en la transformation de l'acyl-phosphate en acyl-CoA sous l'action d'une acyl-phosphotransférase (PTA). Le deuxième système d'activation fait intervenir des acyl-CoA synthétases, conduisant à l'acétyl-, au propionyl- et butyryl-CoA, carboxylases ou carboxytransférases conduisant respectivement ces acyl-CoA au malonyl-, méthylmalonyl- et éthylmalonyl-CoA. Chez *Streptomyces ambofaciens*, le premier système est actif durant la phase de croissance et durant la phase de production de la spiramycine, alors que le deuxième système n'est actif que durant la phase exponentielle (Khaoua, 1990). La biosynthèse du premier système chez *Streptomyces ambofaciens*, est stimulée par l'addition d'acides gras (acétate, propionate et butyrate) en début de phase de croissance et début de phase stationnaire. Parallèlement, la production de spiramycine est augmentée (Khaoua *et al.*, 1992). Ces derniers ont montré la présence chez *S. erythreus* de

l'activité enzymatique catalysant la première étape de l'activation du propionate. Ils ont indiqué que cette propionate kinase est liée à la biosynthèse de l'érythromycine. La présence de l'acétylphosphate a été montrée chez *S. aureofaciens* producteur de tétracycline qui est synthétisée suite à la condensation des unités acétate (Ruczaj *et al.*, 1969). Les auteurs suggèrent l'intervention de ces kinases dans l'activation des unités acétate et propionate destinées à la biosynthèse des antibiotiques polykétides.

## 6.- Signaux régulateurs

### 6.1.- Facteurs d'induction

Différents facteurs d'induction (facteurs spécifiques) stimulant le processus de différenciation cellulaire conjointement à l'induction des enzymes de la biosynthèse des métabolites secondaires ont été mis en évidence chez les actinomycètes producteurs d'antibiotiques ou de pigments, mais leurs mécanismes d'action dans la plupart des cas restent encore inconnus. Les inducteurs se différencient des précurseurs par leur pouvoir d'action à très faibles concentrations, lorsqu'ils sont ajoutés exclusivement pendant la trophopase, et par leur capacité à être remplacés par des analogues structuraux non métabolisables. Les différents inducteurs de la biosynthèse des antibiotiques décrits dans la littérature peuvent être classés en deux groupes:

- Les inducteurs non spécifiques, de structure chimique commune, comme les acides aminés qui sont également des précurseurs. Chez *Cephalosporium acremonium*, en plus du rôle de la méthionine en tant que précurseur de la production de la céphalosporine C, un autre rôle inducteur de cet acide aminé, a été confirmé par l'utilisation de la norleucine, un analogue non soufré de la méthionine (Drew et Demain, 1973; Martín et Demain, 1980). La méthionine induirait trois enzymes de la voie de biosynthèse de la céphalosporine: l'isopénicilline N et la désacétoxycéphalosporine C synthétases (Sawada *et al.*, 1980), ainsi que la delta-(L-alpha-aminoadipyl)-L-cystéinyl-D-valine synthétase ou ACV synthétase (Zhang *et al.*, 1987). Enfin, conjointement à l'induction de la synthèse de la céphalosporine, la méthionine induit des changements morphologiques de l'organisme producteur et particulièrement une fragmentation du mycélium (Drew *et al.*, 1976).
- Les inducteurs spécifiques, non précurseurs, de structure chimique originale. Parmi ces facteurs, 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). L'analyse des principales caractéristiques des différents inducteurs, révèle une distribution relativement restreinte

de ces facteurs aux actinomycètes, en particulier au genre *Streptomyces*. Les différents facteurs autorégulateurs peuvent induire la production des métabolites et/ou des phénomènes de différenciation cellulaire. La mise en évidence pour certains inducteurs des deux effets conjoints conforte l'hypothèse d'une étroite relation entre métabolisme secondaire et différenciation. 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 ainsi dénommé par Khokhlov et Tovarova (1979). Ce facteur a été trouvé chez toutes les souches de *Streptomyces griseus* productrices de streptomycine. Il est par contre absent chez les mutants non producteurs qui retrouvent la capacité de synthétiser l'antibiotique et de sporuler lorsque ce facteur est ajouté au milieu de culture (Khokhlov et Tovarova, 1979). 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.

## **6.2.- 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.

### **6.2.1- AMPc**

Le rôle de l'AMPc en tant qu'effecteur de la régulation par les facteurs nutritionnels (sources de carbone ou de phosphate) n'a pas été complètement élucidé. Dans aucun cas, le rôle de l'AMPc n'a pu être clairement mis en évidence comme cela a été démontré pour la répression catabolique du métabolisme primaire chez les entérobactéries principalement. L'addition de l'AMPc à des cultures de *Streptomyces 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* et l'inhibition des phosphates sur la production de la streptomycine chez *S. griseus* (Terry et Springham, 1981; Brown *et al.*, 1983). Le rôle de la glucokinase ou d'un produit de cette enzyme (glucose phosphorylé) dans le mécanisme de régulation du métabolisme secondaire par la source



de carbone a été proposé (Piret et Demain, 1988; Vining et Doull, 1988). La biosynthèse de la plupart des aminoglycosides (dérivés du glucose) et celle du chloramphénicol ne sont pas bloquées par un excès de ce substrat (Malik, 1982).

### 6.2.1- ppGpp et pppGpp

Le rôle d'autres messagers tels que ppGpp (guanosine 5'-disphosphate, 3-diphosphate) et pppGpp (guanosine 5'-triphosphate, 3'-diphosphate) a été exprimé chez les streptomycètes. En relation avec le métabolisme de l'azote des acides aminés et la synthèse de protéines, ces messagers nucléotidiques polyphosphorylés ont retenu l'attention des spécialistes du métabolisme secondaire. En effet, ces molécules sont des facteurs très importants de régulation du métabolisme général des bactéries chez lesquelles elles ont été mises en évidence dans des conditions de limitation en acides aminés. Ces facteurs ont pour effet de moduler la synthèse de l'ARN et par suite celle des protéines en fonction de la disponibilité en acides aminés dans le milieu (Cashel, 1975; Ingraham *et al.*, 1983). Leur rôle dans l'initiation du métabolisme secondaire a été proposé chez *B. subtilis*. Ochi et Ohsawa (1984) ont montré que le démarrage de la production d'antibiotique était conditionné par un épuisement du milieu en aspartate et s'accompagnait d'une augmentation des concentrations en ppGpp et pppGpp. Quant aux *Streptomyces*, la mise en évidence de la présence de ppGpp et de pppGpp chez de nombreuses espèces laissait déjà supposer que ces molécules avaient également une fonction importante pour ces microorganismes dans le métabolisme secondaire (An et Vining, 1978). 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 guanosine tétraphosphate 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 guanosines polyphosphorylées 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 *Streptomyces antibioticus* et *S. griseoflavus*, producteurs d'actinomycine et de bicozamycine, respectivement (Ochi, 1987 et 1988). Ces différents travaux ont également mis en évidence le rôle des nucléotides polyphosphorylés dans la régulation de la différenciation cellulaire de ces microorganismes.

## **CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES**

## I.- MICROORGANISME

*Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 (= DSM 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 souche est productrice d'antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones (Lamari *et al.*, 2002a,b).

## II.- APPAREILS ET PRODUITS CHIMIQUES

### 1.- Appareillage

Les principaux appareils utilisés (HPLC et fermenteurs) sont décrits ci-dessous. Les autres appareils utilisés sont indiqués en annexe 1).

- Système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC): Bio-Tek Instruments, équipé de:

- Injecteur automatique (auto-sampler 465 BIO-TEK, Milan, Italie) relié à une boucle d'injection de 80  $\mu$ L.
- Système de pompe 525.
- Détecteur (UV-Vis 545V à barrette de diode à longueur d'onde UV-visible variable).
- Colonne thermostatée 582.
- Colonne analytique en phase inverse ( $C_{18}$ ) ODB, Zorbax SB, Uptisphere, de 5  $\mu$ m granulométrie, de 150 mm de longueur et 4,6 mm de diamètre intérieur (DI). Cette colonne est précédée d'une pré-colonne de garde de 10 x 4 mm.
- PC Pentium II 300 MHz (moniteur LG), YAMAHA.
- Le contrôle du gradient de solvant d'élution, la collection des données et l'intégration des pics sont assurés par un ordinateur de type IBM personal system/2 modèle 70 386 équipé d'un logiciel (PC) d'exploitation et d'analyse (Kroma 3000, BIO-TEK).
- Ce système HPLC est utilisé pour doser les antibiotiques (différentes dithiopyrrolones).

- Système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC): Thermo Separation Products, équipé de:

- Un injecteur automatique Thermo Separation Products® Spectra Series Autosampler AS100<sup>TM</sup>, avec une boucle d'injection de 20  $\mu$ L.
- Une pompe Spectra System P1000XR (Thermo Separation Products).

- Un détecteur réfractométrique différentiel Spectra Physics Refracto Monitor IV de Thermo Separation Products SP 8430™.
  - Une colonne de résine cationique (garnissage résine cationique H<sup>+</sup>) Bio rad® Aminex HPX-87H™, de dimension 300 x 7,8 mm utilisée à 40 °C, précédée d'une colonne de garde Bio rad (H<sup>+</sup>).
  - Un logiciel, Borwin V 1,2 (t-SP V 1.21™, PC A000®.) qui permet de calculer la surface des pics détectés.
  - Ce système HPLC est utilisé pour doser le glucose et les acides organiques.
- Fermenteur de 2 litres, modèle: New Brunswick Scientific Co., Inc. Edison, N.J., U.S.A., Q 290100 est utilisé. Ce fermenteur est équipé de:
- Une ensemble d'agitation pour assurer l'homogénéité du milieu de culture, comprenant un système dont la vitesse d'agitation est réglable par un moteur d'agitation: Magmator.
  - Un mode de régulation de la température qui est assuré par un système qui dispose d'un capteur métallique permettant des acquisitions très précises. Ce système est relié à une sonde placée dans le milieu de culture ainsi qu'une bande chauffante autour du fermenteur et une circulation d'eau thermostatée dans un serpentin plongeant dans le bioréacteur.
  - Un dispositif d'aération qui comporte un débitmètre massique à air (Bronkhorst Hi-tec, série F100/200).
  - Un filtre à air stérilisable à l'entrée, un diffuseur d'air situé dans la partie inférieure de la cuve et un condenseur d'eau pour éviter la perte de milieu par évaporation.
  - Une sonde de prélèvement (échantillonneur) plongeant dans le milieu de culture. Cette sonde est reliée à l'extérieur à une seringue pour effectuer des prélèvements stériles.
  - Un équipement (de *septa*) permettant d'inoculer le fermenteur ou pour diverses alimentations.
  - Une sonde pH à immersion stérilisable (Ingold Infit, type 764.50 B/BH), reliée à un ensemble de régulation par acide (HCl, 2 N) ou par base (KOH, 2 N).
  - Une sonde de mesure de pO<sub>2</sub> à pression partielle pour mesurer l'oxygène dissous polarographique (sonde O<sub>2</sub> Ingold, Biolafitte, model 34-10-3003; Mettler Toledo, Zurich, Switzerland) avec leur système de régulation.
- Le logiciel utilisé est: Bio Flo 110 Fermentor/Bioreactor, Bio-Command Plus, NBS Bio Command, version 3,3 plus (BioProcessing Software).
- La liste détaillée de tout l'appareillage est donnée en annexe 1.

## 2.- Produits chimiques

Divers produits chimiques ont été utilisés durant nos expérimentations: solvants, acides organiques, acides aminés, sucres, sels minéraux, etc. A titre indicatif, l'effet de différents acides organiques et de différents acides aminés a été étudié sur la production des dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis*.

\* La liste détaillée de tous les produits chimiques est donnée en annexe 1.

## III.- MILIEUX DE CULTURE ET STERILISATION

### 1.- Milieu de conservation et de sporulation

La souche de *Sa. algeriensis* a été conservée à 4 °C sur milieu ISP 2 (International *Streptomyces* Project 2) préconisé par Shirling et Gottlieb (1966) pour la croissance et la sporulation des actinomycètes. Sa composition est la suivante:

- Extrait de levure	:	4 g
- Extrait de malt	:	10 g
- D Glucose (anhydre)	:	4 g
- Agar	:	18 g
- Eau distillée	:	1000 mL q.s.p.

Le pH est ajusté à 7 avec du NaOH (2N).

- Le microorganisme est maintenu sur le milieu de sporulation (ISP 2) coulé en boîtes de Pétri ( $\phi = 90$  mm).

### 2.- Méthode de conservation dans du glycérol

Le microorganisme est ensemencé en strie serrée de façon à obtenir un tapis bactérien dense. Les boîtes sont incubées pendant 6 à 8 jours à 30 °C. Après 8 jours d'incubation, 5 à 10 mL de solution de Tween (Tween, type 80, pur, Fisher) à 0,1% stérile (100  $\mu$ L de Tween 80 pur dans 100 mL d'eau distillée, autoclavée pendant 20 min à 120 °C) est déposée sur chaque boîte de Pétri. A l'aide d'un râteau stérile, le tapis bactérien est gratté afin de remettre les spores en solution (suspension) et les 5 à 10 mL de La solution de Tween est pipetée.

La solution de glycérol 50% à une concentration finale de 25% (50 mL de glycérol pur dans 50 mL d'eau distillée et autoclavée pendant 20 min à 120 °C) est utilisée pour la conservation de la souche dans des tubes cryogéniques 1,8 mL Nalgene (Fisher).

- Les solutions de spores ainsi obtenues seront conservées dans le congélateur à – 20 °C (stock de spores).

### 3.- Milieu de pré-culture et de culture

La composition du milieu de production a été élaborée au sein de notre laboratoire. Ce milieu, dit MSS (Milieu Semi-Synthétique) est composé de (quantité pour 1000 mL):

\* Solution A:

- D(+) Glucose (anhydre)	:	10 / 25 g
- Eau distillée	:	100 mL q.s.p.

\* Solution B:

- (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	:	2 g (15,13 mM)
- Na Cl	:	2 g
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	:	0,5 g
- K <sub>2</sub> H PO <sub>4</sub>	:	1 g
- Mg SO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	:	0,2 g (0,81 mM)
- Extrait de levure	:	2 g
- Ca CO <sub>3</sub>	:	5 g
- Eau distillée	:	900 mL q.s.p.

Le pH est ajusté à 7 avec du NaOH (2N).

Remarque: dans certaines expériences, la composition du milieu de culture peut être modifiée selon le but de l'expérience. Les concentrations utilisées sont précisées dans la partie "résultats".

Pour les pré-cultures, la préparation des *inocula* est effectuée en fioles Erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de MSS. Ces fioles sont ensemencées avec un inoculum de spores provenant d'une culture de *Sa. algeriensis* âgée de 10 jours. Le milieu de culture est de la même composition que le milieu basal (MSS).

#### **4.- Stérilisation des milieux de culture**

Elle s'effectue à 120 °C dans un autoclave. Selon le milieu à stériliser et le volume, le temps de stérilisation varie légèrement. Les fioles Erlenmeyer de 500 ou de 250 mL et contenant respectivement 100 ou 50 mL de milieu, sont stérilisées pendant 20 min à 120 °C (sous 1 bar), alors que le fermenteur de 2,5 L contenant jusqu'à 2 L de milieu est stérilisé pendant 25 min à 120 °C.

En général, le milieu semi-synthétique (MSS) est stérilisé en deux parties séparées afin d'éviter la réaction de Maillard (entre les sources de carbone et les sources d'azote) qui peut changer la composition du milieu de culture. Le glucose (solution A) est autoclavé séparément puis mélangé avec l'autre partie du milieu de culture (solution B) seulement après stérilisation et juste avant l'inoculation.

De même les produits ajoutés au milieu MSS (acides aminés, acides organique, ...) sont autoclavés séparément et ajoutés au milieu de culture juste avant l'inoculation.

### **IV.- CONDITIONS DE FERMENTATION**

Toutes les cultures liquides de fermentation discontinue (batch) sont réalisées dans des fioles Erlenmeyers de 250 et de 500 mL contenant respectivement 50 et 100 mL, soit 20% de leurs volumes totaux. La température d'incubation est de 30 °C et l'agitation, de 240 r.p.m.

#### **1.- Pré-cultures**

Les spores et les fragments mycéliens sont raclés à partir de milieu de sporulation, avec un fil à boucle en platine et inoculés dans une fiole Erlenmeyer de 250 mL (contenant 50 mL) ou de 500 mL (contenant 100 mL). Le contenu des fioles est utilisé comme pré-culture.

#### **2.- Cultures en Erlenmeyers**

Chaque Erlenmeyer de 500 mL contient 100 mL de milieu. L'ensemencement est effectué à partir d'un inoculum en phase exponentielle de croissance (âgé de 48 h). Le volume de l'inoculation est de 5 mL (5% du volume utile). Cette concentration permet d'obtenir une biomasse initiale en Erlenmeyer d'environ 0,1 à 0,3 g/L. Des prélèvements sont effectués en cours de fermentation, à des intervalles de temps variables (généralement de 24 h), dans des conditions

aseptiques, La durée d'une fermentation est variable en fonction du but de l'expérience; généralement, elle est de 96 h.

- Le volume prélevé dépend du type d'analyses à effectuer; il est généralement de 4 mL.

### **3.- Cultures en fermenteur**

Les précultures sont réalisées dans des Erlenmeyers de 500 mL contenant 100 mL de milieu de culture. Le volume utile est fixé à 2 L. L'ensemencement est effectué à partir d'un inoculum en phase exponentielle de croissance (âgé de 48 h). Après 48 heures d'incubation, une estimation du poids sec permet de fixer le volume de préculture nécessaire pour ensemer le fermenteur de manière à avoir 0,2 g/L de biomasse. Les conditions opératoires pour les cultures en fermenteur (batch) sont les suivantes:

- pH maintenu à une valeur de  $7 \pm 0,05$  au début de la fermentation.
- Température maintenue à  $30 \pm 0,1$  °C.
- Agitation de 200 r.p.m.
- Débit d'air fixé à 1 v/v/m.
- Pourcentage d'oxygène dissous (pression partielle) maintenu à  $30 \pm 5\%$  de la saturation par modification de la vitesse d'agitation (réglable de 200 à 300 r.p.m).
- Utilisation d'un agent anti-mousse: le Polyglycol P-2000 E.

Des échantillons sont prélevés tous les 4 h afin d'établir les cinétiques de fermentation. Un volume de 20 mL, destiné au dosage des antibiotiques et des substrats, est centrifugé ( $10\,000 \times g$  pendant 10 min), puis stocké à  $-20$  °C jusqu'à la fin de la fermentation. Le poids sec du mycélium est immédiatement mesuré. La durée d'une fermentation est de 5 jours (120 h).

## **V.- METHODES ANALYTIQUES**

### **1.- Mesure du poids sec**

Elle consiste à peser la biomasse cellulaire contenue dans un volume de culture connu. Pour mesurer le poids sec, nous avons utilisé la méthode de Pfefferle *et al.* (2000) avec quelques modifications. Pour chaque échantillon, 4 mL de culture sont prélevés et mis dans 2 tubes Eppendorf (2 mL par tube) préalablement desséchés et tarés. Les tubes sont ensuite centrifugés à  $16\,000 \times g$  pendant 10 min. Le culot est lavé trois fois par centrifugation en utilisant 800 µL de HCl (0,35 M) afin d'éliminer le  $\text{CaCO}_3$ , et une dernière fois avec 800 µL d'eau distillée.



Par la suite, les cellules sont récupérées par centrifugation. Les Eppendorfs sont ensuite placés dans une étuve à 105 °C pendant 24 heures, puis pesés après refroidissement dans un dessiccateur. Le poids sec ainsi déterminé est ensuite rapporté au litre de volume de fermentation (exprimé en gramme de matière sèche par litre de milieu de culture). Les pesées sont effectuées sur une balance analytique Sartorius.

## **2.- Mesure du pH**

Lors de la centrifugation pour la mesure du poids sec, le surnageant obtenu est utilisé immédiatement pour enregistrer les variations de pH au cours du temps et le dosage des antibiotiques (ci-dessous).

## **3.- Extraction des dithiopyrrolones**

Pendant la période de fermentation, le volume prélevé est centrifugé. Quatre mL (pour les cultures en Erlenmeyers) ou 20 mL (pour les cultures en fermenteurs) de surnageant sont extraits avec 4 ou 20 mL de dichlorométhane dans une ampoule à décanter de 60 mL. Le dichlorométhane est le meilleur solvant d'extraction des dithiopyrrolones (Lamari *et al.*, 2002a). La phase organique est récupérée et filtrée sur papier filtre (Whatman n° 1) plissé contenant du sulfate de sodium anhydre, pour éliminer les traces d'eau résiduelles et d'autres contaminants hydrophiles. Les extraits au dichlorométhane sont ensuite concentrés et évaporés à sec à l'aide d'un rotavapor ( $T^{\circ} = 40^{\circ} \text{ max}$ ), sous vide dans un ballon de 50 mL. Les résidus obtenus sont dissous chacun dans 1 mL de méthanol (pour HPLC), dans des ampoules HPLC, puis analysés.

## **4.- Dosage des dithiopyrrolones par HPLC**

La technique HPLC est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinité des composés à l'égard de la phase stationnaire et de la phase mobile. On utilise ici le principe de la chromatographie d'adsorption en phase inverse: la phase mobile est polaire et la phase stationnaire apolaire.

Les dithiopyrrolones produites lors de la fermentation par *Sa. algeriensis* sont ainsi dosées par HPLC. Cette technique permet de déterminer précisément la concentration des antibiotiques. L'équipement chromatographique utilisé pour ce dosage a été fourni par la Société Bio-Tek Instruments.

La phase mobile pour la séparation est constituée par un éluant dégazé de deux solvants, l'acétonitrile (solvant B) et de l'eau bidistillée (solvant C). La détection se fait à 390 nm. Cette longueur d'onde ne permet de détecter dans l'extrait au dichlorométhane que les dithiopyrrolones (Lamari *et al.*, 2002a). Les conditions de séparation optimisées sont reportées dans le tableau 5. Le débit d'éluion utilisé est fixé à 0,8 mL/min et la température de la colonne, à 30 °C. Avant l'injection des échantillons, la phase stationnaire (colonne) est conditionnée et équilibrée (conditions initiales) pendant 7 min. Lorsque la colonne est équilibrée, 60 µL de l'échantillon sont injectés et analysés.

Les différentes dithiopyrrolones ne différant qu'au niveau d'un groupement (radicaux CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, etc.), elles se séparent souvent dans l'ordre de leur degré d'hydrophobicité. Dans les conditions utilisées, les temps de rétention respectifs de la thiolutine, de l'isobutyryl-pyrrothine, de butanoyl-pyrrothine, de tigloyl-pyrrothine et de sénéciol-pyrrothine sont respectivement de 11,03, 13,42, 14,02, 15,39 et 16,32 min. Ces temps de rétention ont été déterminés après injection de chacun (et aussi de l'ensemble) de ces antibiotiques (purs) disponibles dans notre laboratoire et étudiés précédemment par Lamari *et al.* (2002a). Pour évaluer la concentration des dithiopyrrolones, nous avons établi une courbe d'étalonnage en fonction de l'aire du pic correspondant (figure 10). La courbe d'étalonnage est réalisée avec une série de concentrations de la thiolutine comprise entre 1 et 40 µg. A partir de la concentration de la thiolutine et de la surface du pic correspondant, une courbe d'étalonnage (droite) du type  $Y = ax$ , a été établie.

Comme la thiolutine et les autres dithiopyrrolones ont un coefficient moléculaire d'extinction très proche ( $\epsilon_{390} = 8317-9333 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Lamari *et al.*, 2002b), cette même courbe est utilisée pour les autres dithiopyrrolones. Les échantillons sont injectés deux fois de manière à limiter les erreurs. Les concentrations en dithiopyrrolone des échantillons sont ainsi calculées à partir de cette droite.

**Tableau 5.** Conditions d'éluion des dithiopyrrolones par HPLC

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

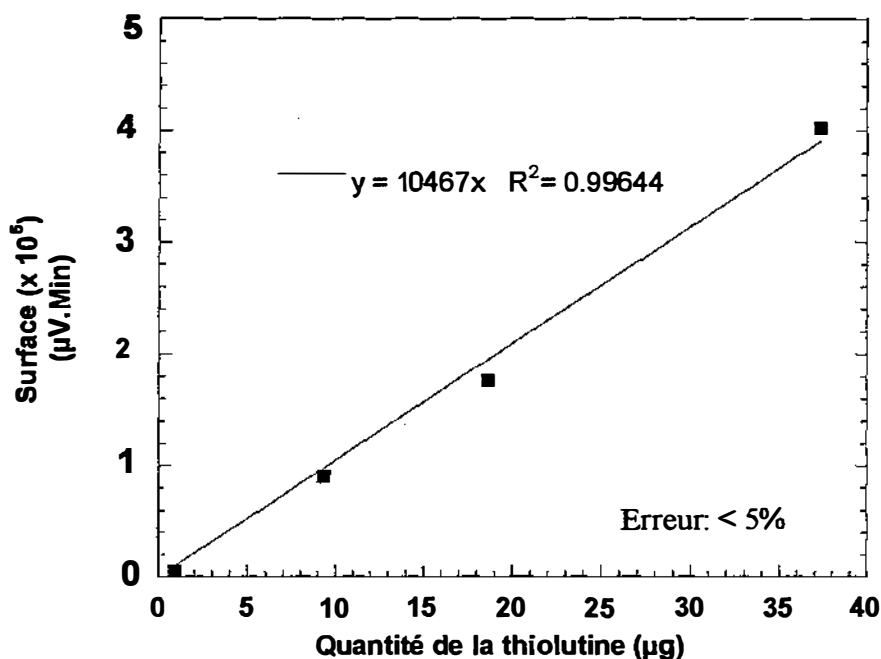


Figure 10. Courbe d'étalonnage pour le dosage de la thiolutine par HPLC (à 390 nm) déterminée en considérant l'aire du pic de la pyrrothine en fonction de sa concentration.

##### 5.- Dosage du glucose et des acides organiques par HPLC

Les dosages chimiques ont été réalisés après les fermentations. Les échantillons prélevés en vue d'une analyse chromatographique ont été centrifugés (10 000 x g, à 4 °C et pendant 10 min) et le surnageant est directement congelé à -20 °C dans des tubes à essais en verre fermés. Au moment de l'analyse, l'échantillon a été décongelé à température ambiante, puis il a été convenablement dilué avec un dilueur automatique (voir ci-dessous).

Les concentrations en glucose, acide acétique, acide citrique, acide malique, acide propionique, acide benzoïque, acide butyrique, acide pyruvique, acide succinique, acide tiglique et acide méthacrylique ont été analysés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), après filtration à l'aide d'une seringue et d'un filtre (Minisart Sartorius, 0,2 μm).

La phase mobile est une solution d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 5.10<sup>-3</sup> mM (dégazé à l'hélium) élué à un débit isocratique de 0,4 mL/min par une pompe. Le temps d'acquisition est de 40 min.

La courbe d'étalonnage est réalisée avec 5 concentrations pour chaque composé. Nous avons utilisé les concentrations suivantes: 0, 2,5, 5, 15 et 25 g/L pour le glucose et 0, 0,25, 1,25 et 5 mM

pour les acides organiques (benzoïque, tiglique, méthacrylique). Les surfaces des pics ont été traitées par ordinateur équipé du logiciel Borwin. Cette surface est corrélée à une valeur en concentration par l'intermédiaire d'une courbe de calibration pour le glucose (figure 11) et pour l'acide méthacrylique (figure 12). Ainsi, les surnageants de nos échantillons sont dilués de manière à obtenir des concentrations inférieures ou égales à 25 g/L pour les sucres et à 4 g/L pour les acides organiques.

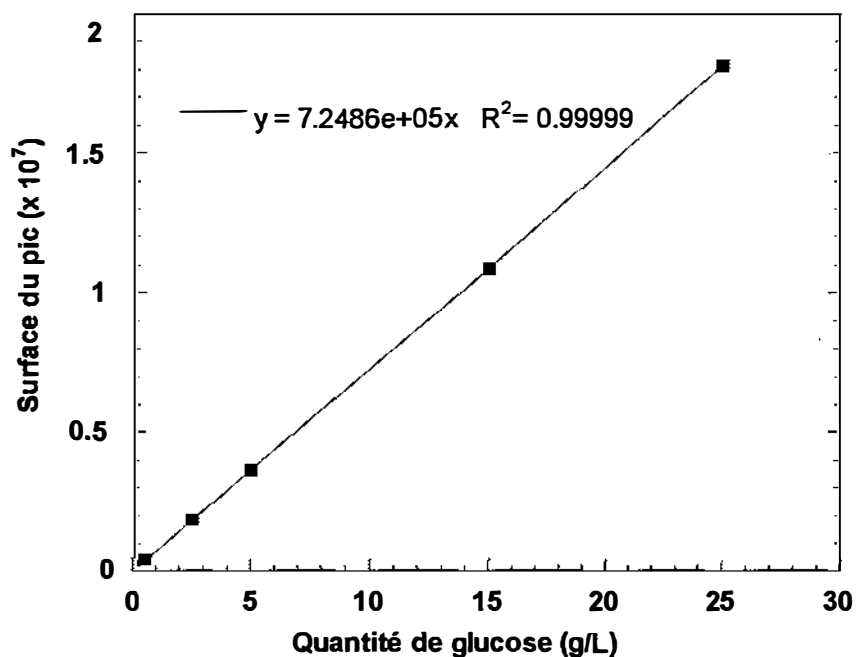


Figure 11. Courbe d'étalonnage pour le dosage du glucose par HPLC.

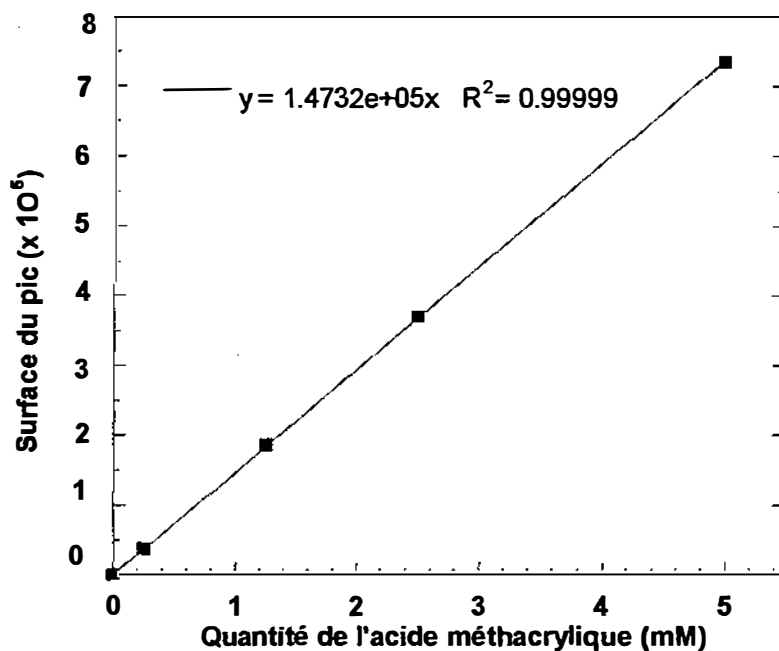


Figure 12. Courbe d'étalonnage pour le dosage de l'acide méthacrylique par HPLC.

#### 6.- Dosage du glucose par la méthode enzymatique YSI

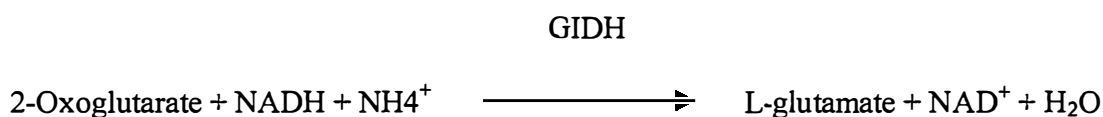
Le glucose est dosé également par une méthode enzymatique (*enzymatic glucose analyzer*) grâce à un appareil automatique YSI. L'appareil utilise une enzyme immobilisée (glucose-oxydase) sur une membrane, elle-même couplée à une sonde électrochimique. L'enzyme réagit avec le glucose et produit du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Celui-ci est ensuite électrochimiquement oxydé par une anode de platine. Cette réaction produit un signal électronique proportionnel à la concentration en glucose de la solution dosée. La réponse de l'appareil est linéaire entre 0,002 et 25 g/L de glucose, avec une erreur maximale tolérée de  $\pm 5\%$  par rapport à une solution standard à 25 g/L de glucose (CAS 50997).

#### 7.- Dosage de l'azote ammoniacal

L'azote ammoniacal est dosé par une méthode enzymatique proposée en kit par Boehringer-Mannheim (kit Diagnostics Ammonia, Enzymatic BioAnalysis/Food Analysis, UV-test, approx. 50 assays). Référence: R-Biopharm, K-Amia, AG, D-64293, E 1112732, Darmstadt Roche).

### 7.1.- Principe

En présence de la glutamate déshydrogénase (GIDH) et du dinucléotide nicotinamide-adénine réduit (NADH), l'ammoniaque réagit avec 2-oxoglutarate pour donner le L-glutamate. Le NADH s'oxyde en NAD<sup>+</sup>.



La quantité de NADH oxydée dans la réaction ci-dessus est stoechiométrique à la quantité d'ammoniaque. La quantité de NADH est déterminée grâce à son absorbance à 334, à 340 ou à 365 nm.

### 7.2.- Protocole

\* L'appareil utilisé est le Mascot Plus, qui est composé de trois parties:

- Le distributeur sur lequel sont placés les réactifs et les échantillons et qui assure la partie préparation (prélèvement des réactifs, des échantillons, pré dilutions, post-dilutions),
- Le banc optique où sont transférés les prélèvements et où est assuré le suivi des réactifs,
- L'interface utilisateur par l'intermédiaire de laquelle sont programmés les paramètres de fonctionnement de l'analyseur.

\* Le consommable est le suivant:

- Echantillons à une dilution adaptée.
- La solution standard d'ammoniac à concentration connue pour test.
  
- Réactifs R1\* et R2\*.
- Solution de mouillant.
- Cuves PMMA (540 barrettes de 8 cuves).

- Cuves polystyrènes (540 barrettes de 8cuves).
- Godets de 0,5 mL (1000).
- Godets pour antisérum (25).
- Flacons réactifs complets (16).
- Essuyeurs (32).

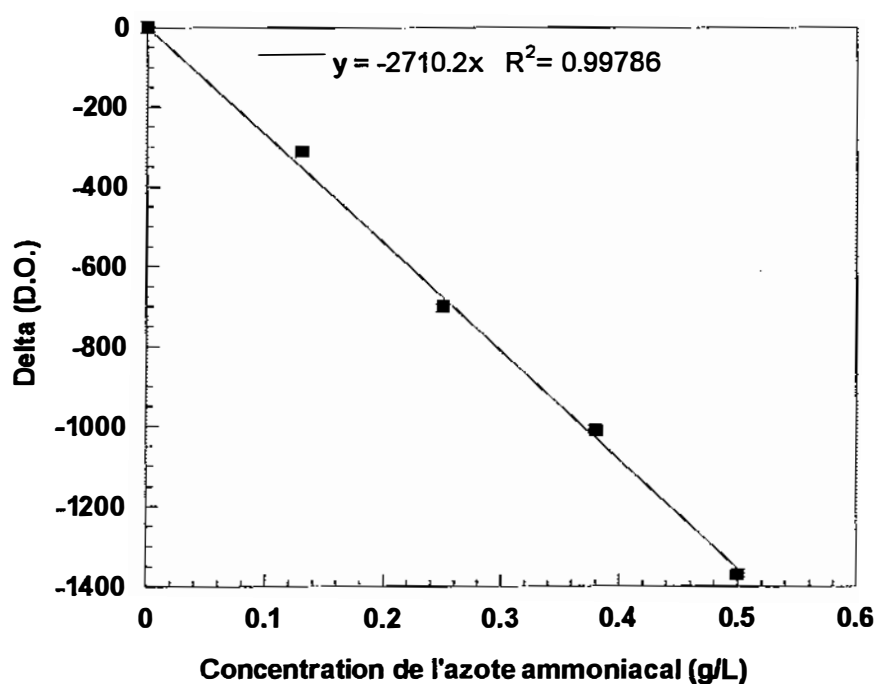
**\*Réactif R1:**

- 1 mL de 2-oxoglutarate.
- 1 mL d'eau déionisée.
- 1 tablette du flacon 2 (flacon contenant des tablettes de NADH).

**\*Réactif R2:**

- 0,1 mL de GIDH.
- 0,9 mL d'eau déionisée.

**7.3.- Expression des résultats**



**Figure 13.** Courbe d'étalonnage pour le dosage de l'azote ammoniacal par le Mascot Plus.

La courbe d'étalonnage est réalisée avec une série de concentrations de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de 0 à 0,50 mg/L (figure 13).

Au cours du dosage et aussitôt qu'une analyse est terminée, le résultat s'affiche sur la partie droite de l'écran du synoptique de travail. Le numéro de la cuve de mesure utilisée, le numéro du godet et le nom du paramètre traité sont suivis du résultat calculé.

L'équation générale pour calculer la concentration est la suivante:

$$C = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \quad (\text{g} / \text{L})$$

V = volume finale [mL]

v = volume de l'échantillon [mL]

MW = poids moléculaire de la substance à tester [g/mol]

d = trajet de la lumière [cm]

$\varepsilon$  = coefficient d'extinction de NADH: 6,3 [ $\text{l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ] à 340 nm; 6,18 [ $\text{l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ] à 334 nm et 3,4 [ $\text{l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ] à 365 nm.

Pour l'ammonium, on a:

$$C = \frac{3,020 \times 17,03}{\varepsilon \times 1,00 \times 0,100 \times 1000} \times \Delta A = \frac{0,514}{\varepsilon} \times \Delta A_{[\text{g ammoniac} / \text{L échantillon}]}$$

Si l'échantillon a été dilué sur la préparation, le résultat doit être multiplié par le facteur F de dilution. En analysant les échantillons solides et semi solides qui sont pesés pour la préparation témoin, le résultat doit être calculé à partir de la quantité pesée.

Pour L'azote ammoniacal:

$$\text{content ammonia} = \frac{C_{\text{ammonia}} (\text{g} / \text{L sample})}{\text{weight sample} (\text{g} / \text{L})} \times 100 (\text{g} / 100 \text{ g})$$



## 8.- Dosage de l'azote total

L'azote total est dosé par une méthode proposée en kit par Odyssey / Fisher (kit Odyssey DR / 2500, Test N Tube™ Vials, LR (10-150 mg/L N). Référence: kit 26722-45.

### 8.1.- Principe

La méthode utilisée pour est la digestion par le persulfate.

### 8.2.- Protocole

Réacteur: COD, *Analyzer and COD heating Reactor*, Hach. Company., USA.

Spectrophotomètre Spectro-Hach Odyssey.

#### \* Préparation de réactif:

- Réactif n° 1: 0,5 mL de l'échantillon (à une dilution adaptée) + le réactif (*Hydroxyde Reagent* composé d'*hydroxyde de sodium*) + un sachet de persulfate de potassium.
- Chauffer le réactif n° 1 pendant 30 minutes dans un réacteur COD, Hach (à une température de 105 °C).
- Laisser refroidir à la température ambiante.
- Ajouter au réactif n° 1, un sachet de réactif A (métabisulfite de sodium) et mélanger pendant 2 minutes.
- Ajouter au réactif n° 1, un sachet de réactif B (acide chromatopique, sel disodium, quartz blanc, urée et métabisulfite de sodium) et mélanger pendant 5 minutes.
- Un blanc (0,0 mg/L) est préparé avec dans les mêmes conditions, avec 0,5 mL d'eau déionisée présente dans le kit.
- Mettre 2 mL de réactif n° 1 dans le réactif C (acide sulfurique) et mélanger pendant 5 minutes.
- Effectuer la lecture à 410 nm dans un spectrophotomètre spectro-Hach, Touch (Hach Programs), Select Program (350N, Total TNT/ n° 395). Les résultats sont exprimés en mg d'azote total/L.

## 9.- Détermination des spectres UV-visible

Les spectres UV-visibles (un balayage de 190 à 500 nm) ont été effectués par un détecteur à barrette de diode incorporé dans l'HPLC.

## 10.- Spectrométrie de masse par impact électronique direct des dithiopyrrolones

Cette technique permet de déterminer le poids moléculaire des molécules ainsi que ceux des fragments qui en résultent après le bombardement des molécules par des électrons. Une petite quantité ( $\approx 0,2$  mg) du produit pur est dissout dans un minimum de solvant (dichlorométhane) pour être analysé par impact électronique direct. L'échantillon à analyser est en phase gazeuse. L'appareil utilisé est un spectromètre de masse Nermag R1010C avec un intervalle de scannage de 0 à 400  $m/z$ . Les spectres de masse ont été réalisés à l'unité de spectroscopie de masse de l'Université Paul Sabatier (Toulouse).

## VI- DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES MICROBIENS ET DES RENDEMENTS DES FERMENTATIONS

### 1.- Fermentations en fioles Erlenmeyer

Lors des cultures en fioles Erlenmeyer, le calcul des vitesses instantanées (point par point) n'a pas été réalisé. Vu la fréquence des prélèvements, les paramètres cinétiques déterminés correspondront à des valeurs globales maximales. Il est difficile d'apprécier la précision de ces paramètres; cependant l'estimation de ces paramètres est faite de la même manière pour toutes les expériences. La comparaison des résultats est donc possible.

La vitesse spécifique de croissance, de production et de consommation des différents métabolites ainsi que les rendements de production des dithiopyrrolones sont réalisés comme suit:

Vitesse spécifique de croissance:  $\mu (h^{-1}) = \Delta X / \Delta t$

Production spécifique (mg/g de PS) = production volumétrique (mg/L) / poids sec (g/L).

## 2.- Fermentations en réacteur

La détermination des paramètres, se fait comme suit:

### 2.1.- Calcul des vitesses globales

Production de biomasse ( $Q_x$ ):  $Q_x$  (g de cellules formées/L/h) =  $dX/dt$

Consommation de substrat ( $Q_s$ ):  $Q_s$  (g de substrat consommé/L/h) =  $dS/dt$

Production de produit ( $Q_p$ ):  $Q_p$  (mg de produit formé/L/h) =  $-dP/dt$

### 2.2.- Calcul des vitesses spécifiques

Croissance ( $\mu$ ):  $\mu$  ( $h^{-1}$ ) =  $1/X \cdot dX/dt$

Consommation ( $q_s$ ):  $q_s$  (g de substrat consommé/h/g de cellules) =  $1/X \cdot dS/dt$

Production ( $q_p$ ):  $q_p$  (mg de produit formé/h/g de cellules) =  $1/X \cdot dP/dt$

Avec: V: volume du milieu de culture (L).

X: biomasse présente dans le milieu de culture (en poids sec) (g/L).

S: concentration d'un substrat dans le milieu de culture (g/L).

P: concentration de l'antibiotique dans le milieu de culture (mg/L).

t: temps de la fermentation (h).

## **CHAPITRE III.**

### **REGULATION DE LA PRODUCTION DES DITHIOLOPYRROLONES CHEZ *SACCHAROTHRIX ALGERIENSIS* NRRL B- 241347 PAR LES ACIDES AMINES ET LES ACIDES ORGANIQUES**

## I.- INTRODUCTION

*Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 sécrète cinq antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones (un sixième est produit parfois à l'état de traces). Ceux-ci sont des dérivés d'un hétérocycle caractérisé par la présence de deux cycles accolés de cinq membres, un cycle dithiol (contenant deux atomes de soufre) et un cycle pyrrole.

Peu d'études ont été réalisées sur la production des antibiotiques dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis*. Une étude approfondie des grandes caractéristiques de la nutrition et de la croissance de ce microorganisme en milieu liquide, permettra ainsi de dégager l'importance des différents facteurs nutritionnels du milieu de culture dans la régulation de la production des dithiopyrrolones. Les métabolites secondaires, dont les antibiotiques synthétisés par les microorganismes, sont produits par les souches sauvages en faible quantité. Pour augmenter leurs productions, différentes approches sont considérées telles que l'optimisation du procédé de fermentation (composition du milieu de culture, conditions physico-chimiques,...).

Les acides aminés soufrés, tels que la cystéine et la cystine, semblent être selon la littérature, les précurseurs de l'hétérocycle soufré et azoté. De même, les dithiopyrrolones connues actuellement diffèrent entre elles, en général, par le radical R attaché à l'hétérocycle et qui proviendrait vraisemblablement d'un acide organique.

Nous présentons dans cette première partie, l'effet des acides aminés (soufrés et autres) et des acides organiques (aliphatiques et cycliques) sur la biosynthèse des cinq dithiopyrrolones sécrétés par *Sa. algeriensis*: la thiolutine, l'isobutyryl-pyrrothine (ISP), la butanoyl-pyrrothine (BUP), la sénéciol-pyrrothine (SEP) et la tigloyl-pyrrothine (TIP).

## II.- RESULTATS

### 1.- Mise au point d'un milieu de culture semi-synthétique

Dans le cadre de notre étude sur la production des dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis* NRRL B-24137, il était nécessaire de mettre au point un milieu de base qui permet une bonne croissance et une production significative des dithiopyrrolones. Ainsi, nous avons utilisé un milieu semi-synthétique (MSS) élaboré au sein de notre laboratoire. La composition complète de ce milieu est

indiquée dans le paragraphe III-2 de la partie "matériel et méthodes". Ce milieu va nous servir pour les études de régulation de la production des antibiotiques par *Sa. algeriensis*.

Les microorganismes ont souvent besoin de facteurs de croissance, tels que certains acides aminés et les vitamines. C'est le cas de *Sa. algeriensis* qui exige pour sa croissance la présence de d'extrait de levure. Ce dernier a été ajouté à raison de 2 g/L dans le milieu synthétique. L'extrait de levure est un mélange complexe riche en acides aminés libres, en oligopeptides, en vitamines et en bases puriques et pyrimidiques. Le glucose, source de carbone et d'énergie, est utilisé à raison de 10 à 25 g/L et le  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , comme source d'azote minéral à raison de 15,13 mM. Pour éviter une variation brutale du pH, il est nécessaire que le milieu de culture soit tamponné. Nous avons donc utilisé à cet effet le  $\text{CaCO}_3$ . La souche de *Sa. algeriensis* croît très bien dans le milieu MSS (glucose,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , extrait de levure,  $\text{CaCO}_3$  et autres éléments minéraux), moins bien dans MSS sans  $\text{CaCO}_3$  et pas du tout dans MSS sans extrait de levure.

## **2.- Cinétique de croissance et de production des dithiopyrrolones chez *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 dans le milieu MSS**

Nous avons étudié la croissance de la souche de *Sa. algeriensis* dans le milieu MSS contenant 10 g/L de glucose, ainsi que la production des dithiopyrrolones. Les résultats obtenus montrent que la croissance de *Sa. algeriensis* est rapide pendant les premières 24 h de culture. La vitesse spécifique moyenne de croissance estimée entre 0 et 24 h est de  $0,091 \text{ h}^{-1}$ . La valeur de la biomasse maximale (0,360 g/L) est enregistrée après 24 h de fermentation. La phase stationnaire est observée entre 24 h et 36 h de fermentation. Après 36 h, la culture subit une lyse cellulaire partielle.

La production des dithiopyrrolones débute après 24 h de culture, pour atteindre un maximum de production spécifique à 72 h pour tous les antibiotiques étudiés. Les valeurs de la production spécifique maximale (14,07, 1,93, 2,19, 0,18 et 0,13 mg/g PS) ont été mesurées respectivement, pour la thiolutine, la SEP, la TIP, l'ISP et la BUP. La production des antibiotiques chute au-delà de 72 h de fermentation. La production des dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis* est dissociée de la croissance. En général, le pH tend vers une valeur alcaline (8,5), puis se stabilise jusqu'à la fin de la culture.

### **3.- Effet de l'addition des acides aminés soufrés à différents temps d'addition sur la croissance et la production des dithiopyrrolones chez *Sa. algeriensis***

Afin de connaître le moment critique pendant lequel les acides aminés soufrés exercent leur effet, 10 mM de L-cystéine, L-cystine, L-méthionine et DL-éthionine ont été ajoutés au milieu de fermentation, à deux stades de la culture (à 0 h et à 12 h de fermentation).

Nos résultats montrent que seule la cystéine (ajoutée à 0 h et à 12 h), a un effet négatif sur la croissance de *Sa. algeriensis*. Les valeurs maximales de la biomasse (1,125, 0,850 et 0,850 g/L) ont été enregistrées en présence de 10 mM d'éthionine, de cystine et de méthionine ajoutés respectivement à 12 h, 0 h et à 12 h de fermentation. La valeur de biomasse maximale la moins importante est observée en présence de la méthionine ajoutée à 0 h (0,375 g/L).

Lors de la culture en présence de ces acides aminés, on constate une diminution de la production spécifique de la thiolutine. En général, l'addition de la cystéine et de la cystine a un effet positif sur la production spécifique de l'ISP et de la BUP. Pour cette dernière, la production est considérablement augmentée (10,25 mg/g PS) en présence de la cystine ajoutée à 0 h. De même, cet acide aminé (à 0 h) permet une augmentation de la production spécifique de 4 et de 9 fois pour la SEP et la TIP, respectivement, comparativement au témoin sans cystine. L'ajout de la méthionine et de l'éthionine diminue considérablement la production de toutes les dithiopyrrolones avec une stimulation de la biomasse.

L'addition des acides aminés soufrés a peu d'effet sur le pH final, la valeur tend toujours vers un pH alcalin compris entre 8 et 9.

### **4.- Effet de différentes concentrations de la cystéine et de la cystine sur la production des dithiopyrrolones chez *Sa. algeriensis***

L'effet de la cystéine et de la cystine sur la croissance et la production des dithiopyrrolone par *Sa. algeriensis* ayant été étudié précédemment à une concentration de 10 mM, il est intéressant d'analyser le comportement de cette souche en présence de différentes concentrations (2, 5, 10, 20 et 40 mM) de ces deux acides aminés. Les expérimentations ont été effectuées en fioles Erlenmeyer.

Pour une concentration de cystine comprise entre 0 et 5 mM, la production de la thiolutine augmente d'une façon linéaire pour atteindre une valeur de 325.09 mg/g PS à 5 mM. Au-delà de cette concentration, la cystine exerce un effet négatif très fort sur la production de la thiolutine. Par contre, nous constatons que la production de la thiolutine est inhibée par l'addition de cystéine,

même à faible concentration, pour devenir pratiquement nulle à une concentration supérieure à 10 mM. L'utilisation de la cystéine à 5 mM et de la cystine à 10 mM a augmenté d'une façon remarquable la production spécifique de la SEP, la TIP, l'ISP et la BUP. Par ailleurs, la cystéine favorise la production de l'ISP plus que la cystine. Cependant, le contraire est noté pour les autres dithiopyrrolones.

De fortes concentrations de cystine (supérieure à 10 mM) et de cystéine (supérieure à 5 mM) entraînent un effet négatif sur la production de l'ISP, la BUP, la SEP et la TIP.

En général, le pH final en présence des différents acides aminés soufrés tend vers une valeur alcaline.

## **5.- Effet de la nature et de la concentration de différents acides aminés et de l'acide humique sur la croissance et la production des dithiopyrrolones chez *Sa. algeriensis***

Cette partie du travail concernera l'étude, en fioles Erlenmeyer, de l'effet de 20 acides aminés et dérivés sur la production des dithiopyrrolones ainsi que la biomasse.

### **5.1.- Effet de différents acides aminés et de l'acide humique sur la croissance et la production des dithiopyrrolones chez *Sa. algeriensis***

Nous avons utilisé une concentration de 5 mM pour chaque acide aminé et 1 g/L pour l'acide humique pour une durée de fermentation de 72 h.

Les résultats montrent que la valeur la plus élevée de biomasse (2,345 g/L) a été enregistrée en présence de L-sérine et de L-glutamine. Les L-tryptophane, DL-valine, L-asparagine et L-arginine stimulent également la biomasse.

Les valeurs les plus élevées de production spécifique de la thiolutine ont été enregistrées en présence de l'acide humique (336,04 mg/g PS) et de L-cystine (309,12 mg/g PS) en comparaison avec le témoin (18,52 mg/g PS). En outre, la présence de L-proline, acide L-glutamique et DL-histidine mène à une augmentation de la production spécifique de la thiolutine de 6, 4 et de 3 fois, respectivement. En revanche, l'ajout de L-méthionine, DL-éthionine ou L-glutamine diminue considérablement la production spécifique de la thiolutine (de 6 à 70 fois). Les valeurs les plus élevées de la production de l'ISP ont été observées en présence de l'acide 2,6-diaminopimélique (DAP) et de la L-lysine (7,77 et 1,03 mg/g PS, respectivement). Les valeurs les plus élevées de la production de la BUP ont été obtenues quant à elles en présence d'acide humique, de L-cystéine et de L-proline (6,62, 3,55 et 3,15 mg/g PS, respectivement). Les productions spécifiques maximales



de la SEP (28,80 mg/g PS) et de la TIP (21,12 mg/g PS) ont été observées en présence d'acide humique. En outre, la présence du DAP, de L-proline et d'acide L-glutamique a favorisé la production de la SEP (20,86, 16,16 et 5,55 mg/g PS) et de la TIP (18,27, 6,51 et 6,50 mg/g PS, respectivement). La production de la SEP et de la TIP est nettement favorisée par la DL-thréonine (3,33 et 4,50 mg/g PS, respectivement).

### ***5.2.- Effet de différentes concentrations de L-méthionine, DL-éthionine, L-proline et d'acide humique sur la croissance et la production des dithiopyrrolones chez Sa. algeriensis***

Les cultures ont été menées en présence de différentes concentrations de quatre composés choisis: L-méthionine, DL-éthionine, L-proline et acide humique, pris un à un. Nous avons choisi deux des composés qui favorisent fortement la production spécifique des dithiopyrrolones (L-proline et l'acide humique), ainsi que les deux composés qui inhibent fortement la production des dithiopyrrolones (L-méthionine, DL-éthionine). Nous avons utilisé les concentrations suivantes: 1,25, 2,5, 5 et 7,5 mM, pour étudier l'effet de ces composés sur les productions spécifiques des dithiopyrrolones et sur les biomasses.

Lorsque la concentration de la L-proline dans le milieu de culture s'élève de 0 à 5 mM, la biomasse augmente et passe de 0,525 à 2 g/L. La vitesse spécifique maximale de croissance ( $0,159 \text{ h}^{-1}$ ) est obtenue en présence de 1,25 mM de L-proline. Les résultats montrent que la production de toutes les dithiopyrrolones (à l'exception de l'ISP) a été stimulée par la L-proline. La production spécifique maximale est enregistrée en présence de 2,50 mM de L-proline pour la thiolutine (133,12 mg/g PS) et en présence de 1,25 mM pour la production de la SEP, la TIP et la BUP (29,34, 23,32 et 3,90 mg/g PS, respectivement).

La biomasse est stimulée en présence de différentes concentrations de L-méthionine et de DL-éthionine. La vitesse spécifique maximale de croissance ( $0,137 \text{ h}^{-1}$ ) est obtenue en présence de 7,50 mM de DL-éthionine. En revanche, l'addition de L-méthionine a un effet négatif sur la vitesse spécifique de croissance. Nos résultats montrent que la production de toutes les dithiopyrrolones est fortement réduite en présence de L-méthionine ou de DL-éthionine.

Nous avons entrepris de vérifier le niveau de production des dithiopyrrolones en présence de quatre concentrations d'acide humique (0,25, 0,5, 1 et 1,5 g/L). La valeur la plus élevée de biomasse (0,89 g/L) a été enregistrée en présence de 1 g/L d'acide humique. Par ailleurs, la vitesse spécifique de croissance est réduite en présence de toutes les concentrations de cet acide. L'addition d'acide humique à des concentrations égales ou inférieures à 1 g/L stimule fortement la production de toutes les dithiopyrrolones. Les productions spécifiques de la thiolutine, de la SEP

et de la TIP (447,40, 38,69 et 35,90 mg/g PS, respectivement) sont fortement favorisées en présence de 0,25 g/L de l'acide humique. De plus, la meilleure production spécifique de la BUP (4,71-4,81 mg/g PS) est observée en présence de 0,5 et 1 g/L d'acide humique. En revanche, les différentes concentrations de cet acide ne permettent pas d'augmenter significativement la production de l'ISP.

## **6.- Effet de la nature et de la concentration de différents acides organiques sur la croissance et la production des dithiopyrrolones chez *Sa. algeriensis***

L'effet de 83 acides organiques (aliphatique et cycliques) sur la production des dithiopyrrolones ainsi que la biomasse, est étudiée en fioles Erlenmeyer.

### **6.1.- Effet des acides organiques à une concentration de 5 mM sur la croissance et la production des dithiopyrrolones chez *Sa. algeriensis***

Chaque acide organique est ajouté au milieu MSS à une concentration de 5 mM. La durée de la fermentation est de 72 h.

Les résultats obtenus lors de cette étude ont montré que les valeurs les plus élevées de biomasse (1,305-1,895 g/L) ont été enregistrées avec les acides pimélique, tiglique, 4-bromobenzoïque et cinnamique. Les acides pivalique, pantothénique, crotonique, 3,5-dihydroxybenzoïque et oxalique stimulent également la biomasse. En revanche, les acides 2,4-dihydroxybenzoïque, oléique, pamoïque et benzensulfonique diminuent la biomasse.

Nos résultats montrent peu ou pas de production de dithiopyrrolones en présence de quelques acides organiques comme le pamoïque, le benzensulfonique, le syringique et l'oléique. Nous avons remarqué que l'augmentation de la production spécifique de la thiolutine est de 5 fois plus élevée en présence des acides maléique, 4-hydroxybenzoïque, benzentétracarboxylique, pantothénique, pivalique et pyruvique. Par ailleurs, sept acides organiques (malonique, crotonique, 4-chlorobenzoïque, benzoïque, pimélique, orotique et 4-bromobenzoïque) ont favorisé de 3 fois la production de la thiolutine. La production de la SEP (58,69 mg/g PS) est nettement meilleure avec l'acide 4-bromobenzoïque. L'addition des acides organiques valérique, méthacrylique, tartrique, 4-hydroxybenzoïque et pimélique augmentent aussi considérablement la production de la SEP (de 6 à 9 fois). Par ailleurs, les acides vétratrique, fumarique, crotonique, pantothénique, maléique, succinique, pélargonique et adipique augmentent la production de la SEP de 3 à 6 fois.

La meilleure valeur de la production spécifique de la TIP (22,15 mg/g PS) est observée en présence de l'acide tiglique. De plus, la production de la TIP est augmentée de 3 à 6 fois en présence des acides tartrique, pimélique, maléique et 4-bromobenzoïque.

La meilleure valeur de la production spécifique de la TIP (7,56 mg/g PS) est enregistrée avec l'acide crotonique. De plus, la production de la TIP a été augmentée de 3 à 5 fois par l'addition des acides tartrique, maléique, adipique, 3,4-dihydroxybenzoïque et sorbique. La présence de l'acide sorbique stimule fortement la production de la BUP (26 mg/g PS). En outre, les acides méthacrylique, butyrique, pyruvique et 4-bromobenzoïque stimulent également la production de la BUP (de 11 à 27 fois).

### ***6.2.- Effet de différentes concentrations des acides acétique, butyrique, pimélique, tiglique, méthacrylique, pamoïque et férulique sur la croissance et la production des dithiopyrrolones chez *Sa. algeriensis****

Nous avons étudié l'effet de la concentration de quelques acides organiques sélectionnés: acétique, butyrique, pimélique, tiglique, méthacrylique, pamoïque et férulique sur la production des dithiopyrrolones en fioles Erlenmeyer. Nous avons choisi un des acides organiques qui favorisent fortement la production des dithiopyrrolones (acide pimélique), ainsi que ceux considérés comme des précurseurs de différents dérivés de dithiopyrrolones (acides acétique, butyrique, tiglique et méthacrylique), ainsi que les acides organiques qui inhibent fortement la production des dithiopyrrolones (pamoïque et férulique). Nous avons utilisé les concentrations suivantes: 1,25, 2,5, 5 et 7,5 mM. Les résultats obtenus ont montré que la vitesse spécifique maximale ( $0,136 \text{ h}^{-1}$  et  $0,124 \text{ h}^{-1}$ , respectivement) est obtenue en présence de 2,50 mM des acides pyruvique et férulique et en présence de 5 mM d'acide pimélique ( $0,143 \text{ h}^{-1}$ ).

La biomasse est légèrement stimulée par les différentes concentrations d'acide acétique. La valeur maximale de la biomasse est enregistrée par l'addition de 5 mM d'acide tiglique (3,50 g/L), 2,5 mM d'acide méthacrylique (3,90 g/L) et 2,5 mM d'acide pamoïque (4,35 g/L).

La meilleure production de la thiolutine (90,87 mg/g PS) est observée en présence de 7,5 mM d'acide pimélique. En outre, les meilleures productions de la SEP (10,62 mg/g PS), de la TIP (9,23 mg/g PS) et de la BUP (3,47 mg/g PS) sont observées en présence de 5 mM d'acide pimélique. La production de l'ISP est par contre diminuée en présence de différentes concentrations d'acide pimélique. La production spécifique de la thiolutine a été favorisée en présence de 5 mM d'acide pyruvique (52,74 mg/g PS) et d'acide méthacrylique (22,03 mg/g PS). L'addition d'acide

pyruvique à 1,25 mM a stimulé la production de la SEP (4,29 mg/g PS). La production spécifique maximale de la TIP (18,56 mg/g PS) a été obtenue en présence d'acide tiglique à 2,50 mM. Elle chute à 12,73 mg/g PS avec 5 et 7,5 mM. La production de l'ISP a été augmentée de plus de 3 fois en présence de 7,5 mM d'acide tiglique. L'addition d'acide méthacrylique à 5 mM et d'acide butyrique à 2,5 mM a augmenté la production de la BUP de 26 et de 20 fois, respectivement. Les différentes concentrations des acides acétique, pamoïque et férulique, ont un effet négatif sur la production de toutes les dithiopyrrolones.

### III.- DISCUSSION

Les cinétiques de croissance et de production des dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis*, en cultures en «batch» montrent que celles-ci sont découplées comme dans le cas classique des deux phases successives, trophophase (phase de croissance) et idiophase (phase de production). Ce même résultat a été signalé également chez d'autres espèces d'actinomycètes, comme *Streptomyces clavuligerus* (Aharonowitz et Demain, 1979), *S. fradiae* (Gray et Bhuwapathanapum, 1980) et *S. ambofaciens* (Khaoua *et al.*, 1992). La faible production en phase logarithmique pourrait être due à la limitation en précurseurs pendant cette phase. La production des métabolites secondaires (dont les dithiopyrrolones) est sous l'influence du métabolisme primaire (Drew et Demain, 1977).

L'atome de soufre que possède plusieurs antibiotiques comme les pénicillines, les céphalosporines et les dithiopyrrolones, dérive de la cystéine. La cystéine peut être synthétisée par deux voies différentes (Martin et Aharonowitz, 1983). La première est une voie de réduction du sulfate en H<sub>2</sub>S qui est incorporé dans l'*O*-acétyl-sérine en présence de l'enzyme *O*-acétylsérine sulfhydrase. L'autre voie part de la méthionine qui, par transsulfuration réverse, conduit à la cystéine. L'efficacité avec laquelle chacune de ces voies fonctionne chez différents microorganismes est déterminée génétiquement et la coordination entre les différents mécanismes de contrôle régulant le métabolisme du soufre détermine la voie préférentielle.

Selon la nature de l'acide aminé sulfuré utilisé, la production des dithiopyrrolones est plus ou moins importante. L'addition de la cystéine (à 5 mM) et de la cystine (à 10 mM) a augmenté d'une façon remarquable la production spécifique de la SEP, de la TIP, de l'ISP et de la BUP. En revanche, la production spécifique maximale de la thiolutine est enregistrée en présence de la cystine (5 mM) et sans addition de la cystéine. Furumai *et al.* (1982) ont rapporté que la cystine comme précurseur peut être transformée en pyrrothine (le noyau de base des dithiopyrrolones)

chez *S. kasugaensis*. Slininger et Jackson (1992) ont rapporté que l'addition de la cystine stimule fortement la production de la phénazine-1-acide carboxylique chez *Pseudomonas fluorescens*.

Les résultats obtenus ont montré qu'à des concentrations optimales (inférieures ou égales à 5 mM), certains acides aminés comme la L-proline, l'acide L-glutamique, la DL-histidine et l'acide diaminopimélique stimulent fortement la production des dithiolopyrrolones. Plusieurs auteurs ont signalé l'effet positif de l'addition de certains acides aminés. Omura *et al.* (1984) ont montré l'effet stimulateur des acides aminés sur la production de la tylosine chez *S. fradiae*. La L-proline peut être transformée en noyau pyrrol. Ce résultat est observé dans le cas de la coumermycine A<sub>1</sub>, la chlorobiocine et la pyoluteorine (Michael et Christopher, 2002; Thomas *et al.*, 2002). Certains acides aminés stimulent la production des enzymes du métabolisme secondaire (Laakel *et al.*, 1994; McIntyre *et al.*, 1996; Balakrishnan *et al.*, 1997).

En outre, un effet très positif de l'acide humique a été observé sur la production des dithiolopyrrolones. L'acide humique est un complexe de composés aromatiques et de composés non cycliques dont plusieurs acides aminés (Stevenson, 1985). L'effet positif de l'acide humique serait dû à sa capacité à fournir des précurseurs nécessaires à la biosynthèse du noyau pyrrothine, mais également à la biosynthèse de dérivés de dithiolopyrrolones tant du point de vue quantitatif que qualitatif.

L'acide tiglique et l'acide butyrique (à 2,5 mM) favorisent fortement la production de la TIP et de la BUP, respectivement. Ces résultats coïncident avec les résultats cités pour la production de la monensines A et B chez *Streptomyces cinnamomensis*, de APHE-1 et APHE-2 chez *S. griseocarneus*, de l'érythromycine chez *S. erythreus* et de la spiramycine chez *S. ambofaciens* qui ont été favorisés par le propionate et le butyrate comme précurseurs (Raczynska-Bojanowska *et al.*, 1973; Pospíšil *et al.*, 1985; Khaoua *et al.*, 1991; Cruz *et al.*, 1999). Les acides organiques à chaîne courte (propionate, butyrate, méthacrylate, tiglite, etc.) stimulent fortement la production des dithiolopyrrolones, ce qui est compréhensible puisqu'ils peuvent mener directement à la formation d'acyl-thioesters précurseurs directs dans la biosynthèse de différents dérivés de dithiolopyrrolones. Par ailleurs, les résultats ont montré que l'addition de l'acide acétique ne favorise pas la production de la thiolutine (acétyl-pyrrothine). Cette observation témoigne de la complexité des systèmes enzymatiques employés pour la production des métabolites secondaires.

Il en est de même pour les acides organiques à chaîne moyenne tels que le valérate qui est vraisemblablement  $\beta$ -oxydé pour mener à des acides gras à chaîne courte cités précédemment. Il est à noter que ces acides ne doit être généralement utilisés qu'à des concentrations égales ou inférieures à 5 mM.

De même, certains acides organiques comme les acides maléique, 4-hydroxybenzoïque, benzenotétracarboxylique, pantothénique et pivalique, employés à des concentrations appropriées augmentent considérablement la production des dithiopyrrolones. Ceci pourrait être le résultat direct d'une disponibilité de précurseurs ou une stimulation des enzymes responsables de la biosynthèse de ces antibiotiques. L'acide syringique, par exemple, stimule l'enzyme mangénase peroxidase chez *Ceriporiopsis subvermispora* (Sethuraman *et al.*, 1998).

D'une manière générale, cette production est diminuée lorsque la concentration de n'importe quel substrat (acide aminé ou acide organique) est augmentée. Plusieurs auteurs ont constaté l'effet négatif des fortes concentrations de sources d'azote (acides aminés ou sels d'ammonium) sur la production des antibiotiques comme la céphamycine C chez *Streptomyces clavuligerus* (Romero *et al.*, 1984; Lebrihi, 1986) et chez *S. lactamdurans* (Castro *et al.*, 1985), la thiénamycine chez *S. cattleya* (Lilley *et al.*, 1981), le chloramphénicol chez *S. venezuelae* (Shapiro et Vining, 1981), la céphalosporine C chez *Cephalosporium acremonium* (Shen *et al.*, 1984), l'érythromycine chez *S. erythreus* (Flores *et al.*, 1985) et la tylosine chez *S. fradiae* (Tanaka *et al.*, 1986).

Cet effet négatif sur la production des antibiotiques en présence de concentrations élevées des substrats ajoutés peut être dû à la répression ou à l'inhibition d'une ou de plusieurs enzymes responsables de la biosynthèse des dithiopyrrolones. Dans ce cas, l'effet de l'ammonium pourrait être mis en cause (Drew et Demain, 1977; Shapiro, 1989). Plusieurs chercheurs ont rapporté des exemples de l'effet négatif sur la répression d'une ou plusieurs enzymes de la voie de biosynthèse des antibiotiques comme la répression de l'expandase (déacétoxycephalosporine C synthétase) et de la cyclase (isopénicilline N synthétase) par l'ammonium chez *S. clavuligerus* producteur de la céphamycine C (Brana *et al.*, 1985; Lebrihi, 1986), de la glutamate déshydrogénase, de la glutamine synthétase, de la valine déshydrogénase (VDH), de la thréonine déshydratase et de l'alanine déshydrogénase (Aharonowitz et Demain, 1979; Lebrihi *et al.*, 1992; Lounès *et al.*, 1995a). Cette répression est d'autant plus grande que la concentration d'ammonium est plus élevée. De même, l'excès de la source employée pourrait entraîner une répression de la transcription ou de la traduction des gènes codant pour la biosynthèse d'une ou de plusieurs enzymes de la voie de biosynthèse. Cependant, les mécanismes de cette répression restent peu connus jusqu'à maintenant.

La production des dithiopyrrolones est stimulée ou réprimée/inhibée selon la nature et la concentration des acides aminés ou organiques utilisés. Par ailleurs, nous avons montré que l'utilisation d'autres acides aminés et organiques, même à faibles concentrations, a un effet négatif sur la biosynthèse des dithiopyrrolones.

L'addition de la méthionine et de l'éthionine diminue considérablement la production des dithiopyrrolones avec une stimulation de la biomasse. Ce même résultat a été observé également

avec d'autres espèces d'actinomycètes. Šturdíková *et al.* (1990) ont montré un effet semblable par l'addition de la méthionine et de l'éthionine sur la production de la thiolutine et de l'aurothricine chez *S. kasugaensis*. Plusieurs chercheurs ont signalé que la méthionine réprime sévèrement la production d'un certain nombre de métabolites secondaires (Lisker et Paster, 1983; Uyeda et Demain, 1988; Kim *et al.*, 2000).

Les nutriments menant à une croissance rapide, ne permettent qu'une production moindre d'antibiotiques. Cette diminution de la production pourrait être due à la répression ou à l'inhibition catabolique de la biosynthèse des antibiotiques ou encore à la canalisation des flux métaboliques vers la biosynthèse des constituants cellulaires, ce qui entraîne un défaut de précurseurs pour la biosynthèse des métabolites secondaires. Eventuellement, dans ces conditions, la faible concentration intracellulaire de certains de ces précurseurs (acyl-CoA par exemple) ne permettrait pas une bonne induction de biosynthèse des enzymes nécessaires pour la production des dithiopyrrolones. En outre, ces différents substrats exerceraient une régulation négative sur l'expression des gènes ou sur la biosynthèse des enzymes nécessaires à la biosynthèse des métabolites secondaires.

L'addition de certains acides organiques (oléique, férulique, pamoïque, benzensulfonique, syringique, etc.) défavorise fortement la production des dithiopyrrolones. Cet effet négatif peut être dû à l'inhibition et/ou à la répression des enzymes du catabolisme de ces acides organiques ou à l'inhibition et/ou la répression directes des enzymes de la biosynthèse des dithiopyrrolones (ces enzymes n'étant pas encore connues jusqu'à l'heure actuelle) ou encore à un effet toxique de ces acides organiques contre le microorganisme (Hsiao et Siebert, 1999; Knarreborg *et al.*, 2002). Ces acides organiques ne permettent pas une croissance optimale du microorganisme.

La production des dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis* est sous l'influence de la nature des acides aminés et des acides organiques, tant du point de vue quantitatif que qualitatif. En outre, le temps d'ajout de ces nutriments et la concentration employée jouent un rôle majeur dans la détermination de la quantité produite et le rapport entre les différents dérivés de dithiopyrrolone.

**Article 1:**

**Effect of amino acids containing sulfur on dithiopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137**

*Journal of Applied Microbiology: En Presse.*

**Projet Article 2:**

**Regulation of dithiopyrrolone antibiotic productions by amino acids and humic acid in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137**

**Soumis à: *Enzyme and Microbial Technology.***

**Projet Article 3:**

**Control of dithiopyrrolone antibiotic productions by organic acids in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137**

**Soumis à: *Journal of Biotechnology.***



## Article 1:

**Effect of amino acids containing sulfur on dithiopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137**

***Journal of Applied Microbiology. En Presse.***

**N. Bouras<sup>1</sup>, F. Mathieu<sup>1</sup>, N. Sabaou<sup>2</sup> and A. Lebrihi<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*École Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, INPT, Laboratoire de Génie chimique, Équipe Génie des Systèmes Microbiens, UMR 5503 (CNRS/INPT/UPS). 1, avenue de l'agrobiopôle, B.P. 107, F-31 326 Castanet-Tolosan Cedex 1, Toulouse, France, and*  
<sup>2</sup>*École Normale Supérieure de Kouba, Laboratoire de Recherche sur les Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse, B.P. 92, 16 050 Vieux-Kouba, Alger, Algérie*

---

*Correspondence to: A. Lebrihi, Laboratoire de Génie Chimique, 1, avenue de l'agrobiopôle, B.P. 107, Auzeville-Tolosane, Toulouse, France (e-mail: lebrihi@ensat.fr).  
Tel.: (+33)-5-62-19-39-44; Fax: (+33)-5-62-19-39-01.*

## **Abstract**

**Aims:** To study the effect of sulfur-containing amino acids (L-cysteine, L-cystine, L-methionine and DL-ethionine) on the production of dithiopyrrolone antibiotics by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137.

**Methods and Results:** The production levels of dithiopyrrolones were investigated by using high performance liquid chromatography (HPLC) in a chemically semi-synthetic medium. The production of the studied antibiotics depends upon the nature, concentration and the time of addition of these sources in the culture medium. Both cysteine and cystine favoured the specific productions of dithiopyrrolones; iso-butyryl-pyrrothine by cysteine, however butanoyl-pyrrothine, senecioid-pyrrothine and tigloyl-pyrrothine by cystine, when added initially to the culture medium. The maximum specific productions of dithiopyrrolones were observed in the presence of 5 mmol l<sup>-1</sup> cystine for thiolutin, 5 mmol l<sup>-1</sup> cysteine for iso-butyryl-pyrrothine, and 10 mmol l<sup>-1</sup> cystine for others studied dithiopyrrolones as shown in Fig. 3. The production of these antibiotics was decreased when the concentrations of cysteine and cystine were in excess. All dithiopyrrolone specific productions were strongly inhibited by addition of methionine and ethionine, without inhibition of mycelial growth.

**Conclusions:** Among all studied amino acids, cystine and cysteine can be used as supplements for improvement the production of dithiopyrrolone antibiotics by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137.

**Significance and Impact of the Study:** Dithiopyrrolone antibiotics have many important applications for employing them as medicaments, particularly in the treatment of human and animal cancers. In the present work, the influence of containing-sulfur amino acids on dithiopyrrolone antibiotic productions was studied. The obtained results can be employed for the optimisation of the culture medium for the dithiopyrrolone productions in higher quantities.

**Keywords:** *Saccharothrix algeriensis*, dithiopyrrolone antibiotics, regulation, precursors, amino acids containing sulfur.

---

## INTRODUCTION

Dithiopyrrolones are members of the pyrrothine class of naturally occurring antibiotics that are characterized by the possession of a unique pyrrolinodithiole nucleus (Celmer and Solomons 1955). They are the first recognized examples of microbiologically active unsaturated lactams (Mizuhara. 1962). This group of antibiotics included thiolutin, aureothricin, iso-butyryl-pyrrothine, butanoyl-pyrrothine, senecioyl-pyrrothine, tigloyl-pyrrothine, propionyl-holothin, holomycin, xenorhabdins and thiomarinols (Yamagishi *et al.* 1971; Okamura *et al.* 1977; McInerney *et al.* 1991; Shiozawa *et al.* 1997; Lamari *et al.* 2002b). Dithiopyrrolone derivatives were previously identified from the culture broth of several actinomycetes belonging to genus *Streptomyces* (*S. thioluteus*, *S. albus*, *S. cyanoflavus*, *S. celluloflavus*, *S. kasugaensis*, *S. luteoreticuli* and *S. pimprina*) (Yamagishi *et al.* 1971), and from other microorganisms such as symbiotic bacterium *Xenorhabdus* (*X. bovienii* and *X. nematophilus*) (McInerney *et al.* 1991; Paik *et al.* 2001), and marine bacterium *Alteromonas rava* (Shiozawa *et al.* 1997). Recently, *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 isolated from a south Algerian soil sample has been found 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: thiolutin, senecioyl-pyrrothine (SEP), tigloyl-pyrrothine (TIP), iso-butyryl-pyrrothine (ISP) and butanoyl-pyrrothine (BUP) (Lamari *et al.* 2002a; Zitouni *et al.* 2004) as in Fig. 1. Among actinomycetes, only *Saccharothrix algeriensis* and *Streptomyces* spp. produced these antibiotics. Senecioyl-pyrrothine and tigloyl-pyrrothine antibiotics are produced only by *Sa. algeriensis* (Lamari *et al.* 2002b). Many authors reported that thiolutin and holomycin can be synthesized chemically (Stachel *et al.* 2003).

Dithiopyrrolone class of antibiotics has a broad-spectrum activity against a variety of microorganisms including Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeasts, ameboid parasites and phytopathogenic fungi (Celmer and Solomons 1955; Šturdíková *et al.* 1990; Lamari *et al.* 2002a). This class of antibiotic also exhibited protozoicidal, larvicidal and insecticidal activities which suppressed the growth of *Coccidioides mitis* (Seneca *et al.* 1952; Šturdíková *et al.* 1990; Webster *et al.* 2002). Arnold *et al.* (1995) of the US National Cancer Institute postulated that dithiopyrrolone derivatives have a chemopreventive activity in preventing the initiation of cell transformation from pre-malignant to malignant cancer in the rat tracheal epithelial cells. Dithiopyrrolones have also strong anticancer activity against several human organs (colon, breast and cervical cancers) (Webster *et al.* 2000; Minamiguchi *et al.* 2001), and possess outstanding anti-allergic action (Stahl *et al.* 1988).

Nitrogen and sulfur sources play a major role in the biosynthesis of many secondary metabolites (Piret and Demain 1988). The biochemical steps involved in dithiopyrrolones biosyntheses have not been completely elucidated yet.

The present study has been carried out with the objective of increasing the production of dithiopyrrolones in *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 using various amino acids containing sulfur. This is the first report on the use of amino acids as supplements to investigate dithiopyrrolone productions by *Sa. algeriensis*.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Microorganism**

*Sa. algeriensis* NRRL B-24137 (= DSM 44581 = SA 233) was used throughout this study. It was maintained at 4 °C on ISP 2 (International *Streptomyces* Project 2) medium slant composed of: 4 g glucose D(+) (Fisher Labosi), 10 g malt extract (Difco), 4 g yeast extract (Difco) and 18 g agar (Difco), in 1 l distilled water. The pH of the medium was adjusted to 7 using 2 mol l<sup>-1</sup> NaOH before autoclaving for 20 min at 121 °C.

## **Culture medium**

The basal semi-synthetic medium (SSM), developed in our laboratory, was used for both pre-culture and production of antibiotics. This medium consisted of: 10 g glucose D(+) (Fisher Labosi), 2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Prolabo), 2 g NaCl (Fisher Labosi), 0.5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Acros), 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Acros), 0.2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Acros), 5 g CaCO<sub>3</sub> (Prolabo) and 2 g yeast extract (Difco), in 1 l distilled water. The initial pH of the medium was adjusted to 7 using 2 mol l<sup>-1</sup> NaOH prior to autoclaving. The glucose was autoclaved separately and added aseptically to the medium before inoculation. Amino acids used [L-cysteine (Sigma), L-cystine (Fluka), L-methionine (Sigma) and DL-ethionine (Sigma)], were also autoclaved separately and added at the required concentrations for each experiment. The various concentrations of amino acids added to SSM, are as described subsequently in the text.

## **Culture conditions**

The pre-culture (250-ml Erlenmeyer flask containing 50 ml of the medium) was incubated for 48 h on a rotary shaker (New Brunswick Scientific Co. NJ) at 260 rpm and 30 °C. The pre-culture was then homogenized and 5 ml was used to inoculate 100 ml of the same medium in 500-ml Erlenmeyer flask, under the same conditions. Each experiment was performed in triplicate.

## **Measurement of DCW and pH**

Culture broth samples were taken every 24 h of fermentation. The pH value of fermentation broth was measured with a pH meter (Consort C 832, Consort, NY). For the dry cell weights (DCWs), we used the method of Pfefferle *et al.* (2000) with slight modifications. The DCWs were determined by centrifuging (Microlitre Centrifuges, Heraeus instruments, Biofuge) 4 ml of homogenized culture broth in pre-weighed Eppendorf tubes for 10 min at 16 000 g. The pellet was washed three times with HCl (0.35 mol l<sup>-1</sup>), followed by distilled water. The Eppendorf tubes containing pellet were dried at 105 °C for 24 h, cooled in a desiccator, and weighed. The results were expressed as g l<sup>-1</sup>.

### **High performance liquid chromatography (HPLC) analysis**

After centrifuging the samples, the supernatant was kept for further analysis. Four ml of the supernatant were extracted with an equal volume of dichloromethane. The organic phase (containing antibiotics) was collected and dried with anhydrous sodium sulfate. The extracts were concentrated to dryness under vacuum on Rotavapor (Laborata 4000, Heidolph), dissolved in 1 ml of MeOH as crude extract. The analysis of dithiolopyrrolone antibiotics was carried out by HPLC, Bio-Tek Instruments. The equipment consisted of variable wavelength detector (u.v.-vis 545V diode detector array), pump system 525, column thermostat 582 and auto-sampler 465. The acquisition was carried out by computer system (Kroma 3000). The stationary phase consisted of C<sub>18</sub> reverse phase column (Zorbax SB, 150 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m particles). The samples were analysed by linear gradient elution using acetonitrile as solvent A and water as solvent B. The separation gradient starting with 0% solvent A and 100% solvent B, reaching 30% solvent A and 70% solvent B in 5 min, continuing from 30% to 100% solvent A in 25 min, using a flow rate of 0.8 ml min<sup>-1</sup>. The injection volume was 60  $\mu$ l. The detection of these antibiotics was carried out at 390 nm. The retention times were recorded at 11.03, 13.42, 14.02, 15.39 and 16.32 min for thiolutin, iso-butyryl-pyrrothine, butanoyl-pyrrothine, tigloyl-pyrrothine and senecioid-pyrrothine, respectively. Quantification of antibiotic was performed using thiolutin standard calibration curve. The  $\epsilon$  of thiolutin is nearly the same for all others dithiolopyrrolones ( $\epsilon_{390} = 8317\text{-}9333 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) as described by Lamari *et al.* (2002b).

### **Statistical analysis**

Analysis of variance was performed using SPSS, version 11.5.1, for windows. Significant differences in the mean values were reported at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### **Kinetics of growth and dithiopyrrolone productions in *Sa. algeriensis***

The samples were taken for pH, biomass, and antibiotic analysis at different time intervals every 12 h during 96 h (Fig. 2). The microorganism revealed a good specific growth rate ( $0.091 \text{ h}^{-1}$ ). In SSM broth, the DCW reached a maximum at 24 h ( $0.360 \text{ g l}^{-1}$ ) and then decreased after 36 h of fermentation to reach a value of  $0.250 \text{ g l}^{-1}$  at 96 h. All antibiotic productions started after 24 h, and continued to increase to 72 h. After this period of fermentation, the specific productions were reduced. The production of thiolutin was the highest one among the other studied antibiotics. The maximum thiolutin specific production ( $14.07 \text{ mg g}^{-1} \text{ DCW}$ ) was reached at 72 h and then reduced to  $9.14 \text{ mg g}^{-1} \text{ DCW}$  at the end of fermentation (96 h). Furthermore, the maximal SEP and TIP specific productions ( $1.93$  and  $2.19 \text{ mg g}^{-1} \text{ DCW}$ , respectively) were nearly the same, and reached a maximum at 72 h. The two later antibiotics represented percentage ranged from 13% to 16% of the specific production of thiolutin. ISP and BUP specific productions ( $0.18$  and  $0.13 \text{ mg g}^{-1} \text{ DCW}$ , respectively) were poor (lower than 2% of the thiolutin specific production). Moreover, the final pH of the culture medium was slightly changed during the fermentation; it varied between 7 and 8.5.

### **Effect of amino acids containing sulfur at different times of addition on growth and dithiopyrrolone productions in *Sa. algeriensis***

Amino acids containing sulfur (L-cysteine, L-cystine, L-methionine and DL-ethionine) at a concentration of  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  were added at 0 h and during the exponential phase (at 12 h) to the SSM. The effects of these amino acids on growth and dithiopyrrolone specific productions were summarized in Table 1. The growth of *Sa. algeriensis* was influenced by sulfur-containing amino acids. Among all the amino acids tested, only cysteine (0 h and 12 h) exhibited significant negative effect on the growth of *Sa. algeriensis*. While, in the other conditions, slightly effects were observed. The higher value of  $\text{DCW}_{\text{max}}$  was observed in the

presence of 10 mmol l<sup>-1</sup> of ethionine added at 12 h (1.125 g l<sup>-1</sup>), the second higher value was 0.850 g l<sup>-1</sup> with cystine added at 0 h and methionine added at 12 h. The minimum DCW<sub>max</sub> was 0.375 g l<sup>-1</sup> with addition of methionine at 0 h as compared to 0.525 g l<sup>-1</sup> with control. The lower value of DCW<sub>f</sub> (at the end of fermentation) was observed in the presence of methionine (0.200-0.275 g l<sup>-1</sup>) and ethionine (0.200 g l<sup>-1</sup>) added at 12 h as compared to the control (0.400 g l<sup>-1</sup>). The production of thiolutin was reduced by addition of all sulfur-containing amino acids whatever the addition time. The specific production of thiolutin was decreased 3-5 fold when the cysteine and cystine were supplemented at the two different stages of addition. The specific productions of ISP and BUP were increased by addition of cysteine and cystine, specially, by the addition of cystine (at 0 h) for BUP production. Our results showed that only the addition of cystine at 0 h, stimulated the SEP and TIP productions (4-fold and 9-fold, respectively). The specific production of all studied antibiotics were strongly inhibited by addition of methionine and ethionine whatever the time of addition. We observed that the final pH (from 8 to 9) did not change during different fermentations.

#### **Effect of different concentrations of cysteine and cystine on dithiopyrrolone productions by *Sa. algeriensis***

Cysteine and cystine were added independently at concentrations of 2, 5, 10, 20 and 40 mmol l<sup>-1</sup> at 0 h to SSM in order to study their influences on the dithiopyrrolone productions. The specific production of thiolutin was increased proportionally with the concentration of cystine to reach a maximum at 5 mmol l<sup>-1</sup> (325.09 mg g<sup>-1</sup> DCW) and then reduced sharply at 10 mmol l<sup>-1</sup> (10.91 mg g<sup>-1</sup> DCW) (Fig. 3A). In contrast, when the concentration of cysteine ranged from 0 to 40 mmol l<sup>-1</sup>, a significant decrease was shown in the thiolutin production from 19.84 to 0.34 mg g<sup>-1</sup> DCW. We noticed that cysteine at 5 mmol l<sup>-1</sup> and cystine at 10 mmol l<sup>-1</sup> exhibited the best specific productions of SEP and TIP (Fig. 3B, Fig. 3C), ISP and BUP (Fig. 3D, Fig. 3E). Furthermore, cysteine yielded more production of ISP than cystine (Fig. 3D). In contrast, the maximum specific productions of thiolutin, SEP, TIP and BUP



were higher with cystine than with cysteine. In general, specific productions of antibiotics were strongly reduced in the presence of excess of cysteine or cystine.

## DISCUSSION

The production levels of dithiolopyrrolone derivatives varied from species of microorganisms to another and according to the culture conditions. In the present study, we observed that *Sa. algeriensis* produced about 75% of thiolutin, 9% of SEP, 9% of TIP, 1% of ISP and 1% of BUP in SSM. On the other hand, it was reported that about 70% of aureothricin, 15% of thiolutin and 10% of ISP were produced by *Streptovercillium thioluteum* (*Streptomyces thioluteus*) (Stahl *et al.* 1988). The production of the studied dithiolopyrrolones started during the idiophase (between 24 and 36 h). Additionally, the growth and the antibiotic productions were dissociated. The same results were obtained by many species such as *S. clavuligerus* (Aharonowitz and Demain 1979) and *S. fradiae* (Gray and Bhuwapathanapum 1980) in the case of  $\beta$ -lactam and tylosin productions, respectively.

The biosynthetic pathways leading to the production of secondary metabolites such as antibiotics are often connected to and influenced by the pathways of primary metabolism (Drew and Demain 1977). For example, an end product or an intermediate of a primary pathway frequently serves as a precursor for the antibiotic molecule.

In the strains producing  $\beta$ -lactam antibiotics, the cysteine may be synthesized by two different pathways (Martín and Aharonowitz 1983). The first one, the reduction of sulfate ( $\text{SO}_4$ ) to hydrogen sulfide ( $\text{H}_2\text{S}$ ) which was incorporated to *O*-acetyl-serine using *O*-acetylserine sulfhydrylase enzyme. The second way, the conversion of methionine to cysteine by reverse transsulfuration (Suzuki *et al.* 1980). The use of one of the two pathways depended upon the genetic characteristics of different microorganisms and the regulated sulfur metabolism which controlled the desired way.

In our experiments, we found that the most studied dithiolopyrrolones antibiotics were induced by addition of cysteine and cystine. These probably account for the relationship

between amino acids containing sulfur (as precursors) and the dithiopyrrolone biosyntheses. Cystine may be transformed to the studied dithiopyrrolones through an intermediate (pyrrothine) by a sequence of dehydrogenation, decarboxylation and cyclization. These are in agreement with Furumai *et al.* (1982) which reported that cystine may be the precursor of aureothricin biosynthesis in *S. kasugaensis*.

We found that the addition of 10 mmol l<sup>-1</sup> cysteine or cystine exhibited a negative effect on thiolutin production. Šturdíková *et al.* (1990) conducted a similar study on thiolutin and aureothricin productions using *S. kasugaensis*. They showed that the addition of cysteine to the culture medium at 0.1% (equivalent of 8.25 mmol l<sup>-1</sup>) did not affect the yield of thiolutin and aureothricin. Cysteine and cystine can be used as precursors for the formation of pyrrothine nucleus (Furumai *et al.* 1982; Šturdíková *et al.* 1990), although these amino acids have not the same effect on different dithiopyrrolone productions. These are probably due to an inhibitory or inducing effect of these amino acids on the enzyme system necessary for the dithiopyrrolone biosyntheses after the formation of pyrrothine nucleus.

The maximum specific productions were observed in the presence of 5 mmol l<sup>-1</sup> cysteine for ISP, and 10 mmol l<sup>-1</sup> cystine for SEP, TIP and BUP. While, thiolutin specific production was maximum by addition of 5 mmol l<sup>-1</sup> cystine and without any addition of cysteine. The antibiotic productions were favoured at low concentrations of sulfur-containing amino acids. Wherever, if their concentrations increased in the culture medium, the productions of these antibiotics were significantly reduced, probably, due to the excretion of excess ammonium ions in the medium (Drew and Demain 1977) or direct inhibition of some enzymatic systems. The higher concentrations of ammonium ions affected the antibiotic productions by inhibition or repression of certain enzymes of amino acid catabolism such as glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase, valine deshydrogenase (VDH), threonin deshydratase and alanine deshydrogenase (Aharonowitz and Demain 1979; Lebrihi *et al.* 1992; Lounès *et al.* 1995a). Secondary metabolites in actinomycetes were usually delayed or reduced by an excess of

readily available nitrogen (Shapiro *et al.* 1989). The ammonium ions suppressed many antibiotic productions such as tylosin by *S. fradiae* (Tanaka *et al.* 1986) and cephamycin by *S. clavuligerus* (Aharonowitz and Demain 1979). Omura *et al.* (1984) reported that the ammonium ions reduced considerably the production of protylonolide, precursor produced by amino acids catabolism and responsible for tylosin production, and the conversion of protylonolide to tylosin antibiotic in *S. fradiae*.

The addition of methionine or ethionine at 10 mmol l<sup>-1</sup> to a culture medium, appeared to exert a catabolite repression or inhibition. The later amino acids supported the growth rate but not antibiotic productions. These coincide with Šturdíková *et al.* (1990) which reported that the effect of methionine and ethionine on thiolutin and aureothricin productions by *S. kasugaensis* showed the same inhibitory effects. Many authors observed the negative effect of methionine on secondary metabolites biosynthesis such as ochratoxin A (Lisker and Paster 1983). The significant negative effect of methionine on the biosynthesis of antibiotics containing methyl group derived from methionine has been observed for many years, but has remained unexplained (Kim *et al.* 2000). These effects have been postulated to be due to either an interaction of the thiol group of methionine (or its reactive metabolites) with the antibiotic intermediates (Gairola and Hurley 1976) or due to an inhibition of a methyltransferase (Uyeda and Demain 1988). The similar inhibitory effect was observed with ethionine. In the case of methionine and ethionine, an increase of growth rate could repress key enzymes of antibiotic biosyntheses (Gray and Bhuvapathanapum 1980).

In conclusion, it is suggested that sulfur-containing amino acids can serve as a tool for studying the mechanism of dithiopyrrolones biosynthesis in *Sa. algeriensis*. Further studies on the regulation of dithiopyrrolone productions by *Sa. algeriensis* on different culture conditions are further investigated.

## REFERENCES

- Aharonowitz, Y. and Demain, A.L. (1979) Nitrogen nutrition and regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Can J Microbiol* **25**, 61-67.
- Arnold, J.T., Wikinson, B.P., Sharma, S. and Steele, V.E. (1995) Evaluation of chemopreventive agents in different mechanistic classes using a rat tracheal epithelial cell culture transformation assay. *Cancer Res* **55**, 537-543.
- Celmer, W.D. and Solomons, I.A. (1955) The structures of thiolutin and aureothricin, antibiotics containing a unique pyrrolinodithiole nucleus. *J Am Chem Soc* **77**, 2861-2865.
- Drew, S.X. and Demain, A.L. (1977) Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Annu Rev Microbiol* **31**, 343-356.
- Furumai, T., Takeda, K. and Okanishi, M. (1982) Function of plasmids in the production of aureothricin. I. Elimination of plasmids and alteration of phenotypes caused by protoplast regeneration in *Streptomyces kasugaensis*. *J Antibiot (Tokyo)* **35**, 1367-1373.
- Gairola, C. and Hurley, L. (1976) The mechanism for the methionine mediated reduction in anthramycin yields in *Streptomyces refuincus* fermentations. *Eur J App Microbiol* **2**, 95-101.
- Gray, P.P. and Bhuwathanapum, S. (1980) Production of the macrolide antibiotic tylosin in batch and chemostat culture. *Biotechnol Bioeng* **23**, 1785-1804.
- Kim, W.S., Wang, Y., Fang, A. and Demain, A.L. (2000) Methionine interference in rapamycin production involves repression of demethylrapamycin methyltransferase and S-adenosylmethionine synthetase. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 2908-2910.
- Lamari, L., Zitouni, A., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Lebrihi, A., Lefebvre, G., Seguin, E. and Tillequin, F. (2002a) New dithiolopyrrolone antibiotics from

- Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)* **55**, 696-701.
- Lamari, L., Zitouni, A., Dob, T., Sabaou, N., Lebrihi, A., Germain, P., Seguin, E. and Tillequin, F. (2002b) New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. II. Physicochemical properties and structure elucidation. *J Antibiot (Tokyo)* **55**, 702-706.
- Lebrihi, A., Lamsaïf, D., Lefebvre, G. and Germain, P. (1992) Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**, 382-387.
- Lisker, N. and Paster, N. (1983) Ochratoxin production by *Aspergillus ochraceus* as affected by methionine and structurally related compounds. *Can J Microbiol* **29**, 536-540.
- Lounès, A., Lebrihi, A., Benslimane, C., Lefebvre, G. and Germain, P. (1995a) Regulation of valine catabolism by ammonium in *Streptomyces ambofaciens*, producer of spiramycin. *Can J Microbiol* **41**, 800-804.
- Martín, J.F. and Aharonowitz, Y. Regulation of biosynthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics, in: Demain, A.L. and Solomon, N.A. (edn.), *Antibiotics containing the  $\beta$ -lactam structure*, Springer, New York, N.Y., 1983, pp. 229-254.
- McInerney, B.V., Gregson, R.P., Lacey, M.J., Akhurst, R.J., Lyons, G.R., Rhodes, S.H., Smith, D.R.J., Engelhardt, L.M. and White, A.H. (1991) Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part I. Dithiolopyrrolone derivatives with antibiotic activity. *J Nat Prod* **54**, 774-784.
- Minamiguchi, K., Kumagai, H., Masuda, T., Kawada, M., Ishizuka, M. and Takeuchi, T. (2001) Thiolutin, an inhibitor of huvec adhesion to vitronectin, reduces paxillin in huvecs and suppresses tumor cell-induced angiogenesis. *Int J Cancer* **93**, 307-316.

- Mizuhara, Y. (1962) Synthesis of 5-substituted derivatives of 3-acetamido-1-methyl-2,4-dioxopyrrolidine, 11<sup>th</sup> Annual Meeting of the Chemical Society of Japan, Tokyo. 2085-2088.
- Okamura, K., Soga, K., Shimauchi, Y., Ishikura, T. and Lein, J. (1977) Holomycin and n-propionyl-holothin, antibiotics produced by a cephamycin C producer. *J Antibiot (Tokyo)* **30**, 334-336.
- Omura, S., Tanaka, Y., Hamada, H. and Masuma, R. (1984) Effect of ammonium ion, inorganic phosphate and amino acids of the biosynthesis of protylonolide, a precursor of tylosin aglycone. *J Antibiot (Tokyo)* **37**, 494-502.
- Paik, S., Park, Y.H., Suh, S.I., Kim, H.S., Lee, I.S., Park, M.K., Lee, C.S. and Park, S.H. (2001) Unusual cytotoxic phenethylamides from *Xenorhabdus nematophilus*. *Bull Korean Chem Soc* **22**, 372-374.
- Pfefferle, C., Theobald, U., Gürtler, H. and Fiedler, H-P. (2000) Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *J Biotechnol* **80**, 135-142.
- Piret, J.M. and Demain, A.L. (1988) Actinomycetes in biotechnology: an overview in: Goodfellow, M., Mordarski, M and Williams S.T. (Edn.) *Actinomycetes in biotechnology*. Academic Press, London, pp 461-482.
- Seneca, H., Kane, J.H. and Rockenbach, J. (1952) Bactericidal, protozoicidal and fungicidal properties of thiolutin. *Antibiot Chemother* **2**, 357-360.
- Shapiro, S. Nitrogen assimilation in actinomycetes and the influence of nitrogen nutrition on actinomycete secondary metabolism in: Shapiro, S. (Edn.), *Regulation of secondary metabolism in actinomycetes*, CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida, 1989, pp. 135-211.

- Shiozawa, H., Shimada, A. and Takahashi, S. (1997) Thiomarinols D, E, F and G, new hybrid antimicrobial antibiotics produced by a marine bacterium; isolation, structure, and antimicrobial activity. *J Antibiot (Tokyo)* **50**, 449-452.
- Stahl, P., Seidel, H., Von der Eltz, H., Wilhelms, O.H. and Roesch, A. Pyrrothine derivatives and pharmaceutical use thereof, U. S. Patent 4,760,077, 1988.
- Stachel, H-D., Immerz-Winkler, E., Poschenrieder H., Windt, A., Weigand W., Drescher, N. and Wünsch, R. (2003) Metal complexes of functionalized sulfur-containing ligands, Part XIX, Synthesis and reactions of new pyrroloisothiazoles. *Helv Chim Acta* **86**, 2471-2480.
- Šturdíková, M., Proska, B., Uhrín, D. and Fuska, J. (1990) Regulation of biosynthesis of thiolutin and aureothricin in *Streptomyces kasugaensis*. *Folia Microbiol (Praha)* **35**, 278-283.
- Suzuki, M., Fujisawa, Y. and Uchida, M. (1980) S-sulfocysteine as a source of the sulfur atom of cephalosporin C. *Agric Biol Chem* **44**, 1995-1997.
- Tanaka, Y., Taki, A., Masuma, R. and Omura, S. (1986) Mechanism of nitrogen regulation of protylonolide biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *J Antibiot (Tokyo)* **39**, 813-821.
- Uyeda, M. and Demain, A.L. (1988) Methionine inhibition of thienamycin formation. *J Ind Microbiol* **3**, 57-59.
- Webster, J.M., Chen, G., Hu, K. and Li, J. (2002) Bacterial metabolites, in: *Entomopathogenic Nematology*, R. Gaugler (ed.). CAB International. p 99-114.
- Webster, J.M., Li, J. and Chen, G. Anticancer property of dithiolopyrrolones, U.S. Patent 6,020,360, 2000.
- Yamagishi, S., koyama, Y., Fukakusa, Y., Kyomura, N., Ohishi, J.I., hamamichi, N. and Arai, T. (1971) On the metabolites of *Streptomyces luteoreticuliti* Katoh et Arai. Isolation of the metabolites. *Yakugaku Zasshi* **91**, 351-357.

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

### Legends of figures

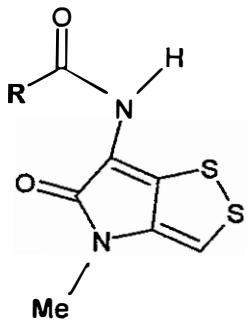
Fig. 1. Structure of dithiolopyrrolone antibiotics.

Fig. 2. kinetic evolutions of specific productions of thiolutin (■), senecieryl-pyrrothine (□), tigloyl-pyrrothine (▲), iso-butyryl-pyrrothine (▼) and butanoyl-pyrrothine (Δ), dry cell weight; DCW (o) and pH value (+), in *Sa. algeriensis* on the basal culture medium (SSM) containing 10 g l<sup>-1</sup> glucose as sole carbon source at 30 °C.

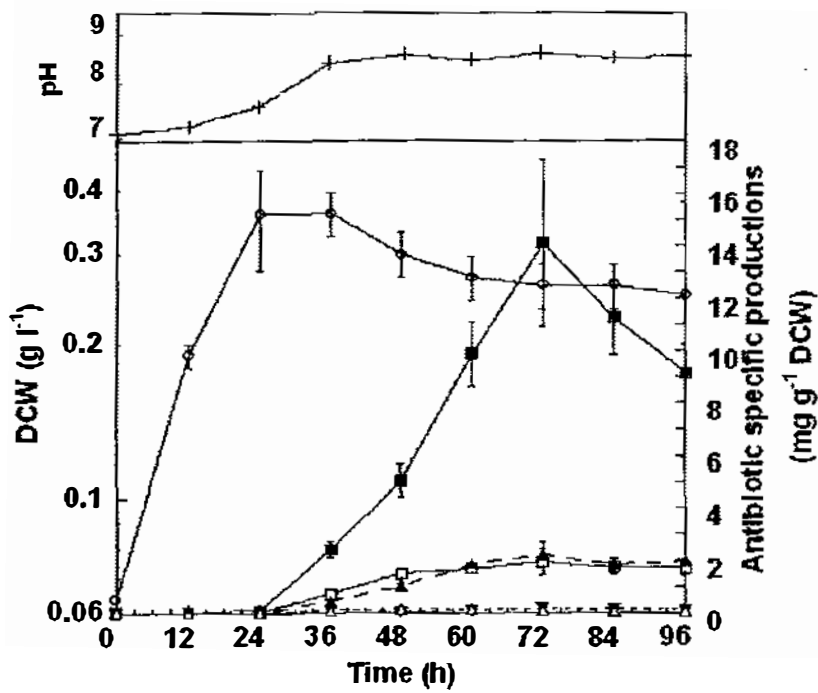
Fig. 3. Effect of cysteine (□) and cystine (■) addition at different concentrations on specific production of thiolutin (A), senecieryl-pyrrothine (SEP) (B), tigloyl-pyrrothine (TIP) (C), iso-butyryl-pyrrothine (ISP) (D) and butanoyl-pyrrothine (BUP) (E). Specific dithiolopyrrolone productions are given as mg per g of biomass at the time of maximal productions during 96 h of fermentation.

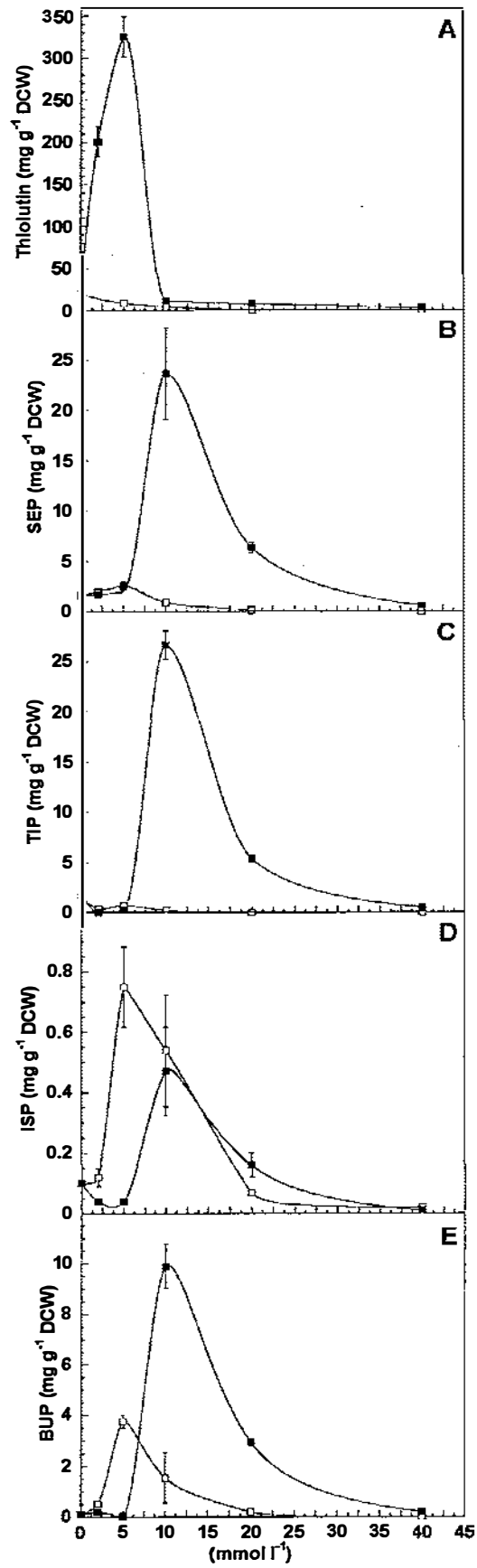
Table 1. Effect of amino acids containing sulfur at different times of addition on mycelial growth, pH and dithiolopyrrolone specific productions by *Sa. algeriensis* NRRL B-24137.





- R :** CH<sub>3</sub>                      Thiolutin  
**R:** CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>                Iso-butyryl-pyrrothine (ISP)  
**R:** (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>                Butanoyl-pyrrothine (BUP)  
**R :** CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>                Senecioyl-pyrrothine (SEP)  
**R:** C(CH<sub>3</sub>)=CH(CH<sub>3</sub>)        Tigloyl-pyrrothine (TIP)





Amino acids*	Biomass† (g l <sup>-1</sup> )	Final biomass† (g l <sup>-1</sup> )	Final pH	$\mu_{\max}‡$ (h <sup>-1</sup> )	Dithiolopyrrolone specific productions (mg g <sup>-1</sup> DCW)§				
					Thiolutin	ISP	BUP	SEP	TIP
Control	0.525 ±0.143	0.400 ±0.130	8.12 ± 0.01	0.088 ± 0.013	19.92 ± 5.89	0.25 ± 0.19	0.19 ± 0.11	2.74 ± 1.66	2.87 ± 1.73
L-Cysteine at 0 h	0.525 ± 0.045	0.525 ±0.047	8.45 ± 0.03	0.050 ± 0.002	4.76 ± 0.39	1.08 ± 0.47	2.70 ± 0.99	0.55 ± 0.21	0.20 ± 0.05
L-Cysteine at 12 h	0.475 ± 0.045	0.475 ±0.043	8.57 ± 0.01	0.038 ± 0.004	4.87 ± 0.22	0.65 ± 0.03	1.15 ± 0.05	0.74 ± 0.03	0.29 ± 0.03
L-Cystine at 0 h	0.850 ± 0.070	0.850 ±0.078	8.66 ± 0.02	0.091 ± 0.006	6.53 ± 1.27	0.30 ± 0.14	10.25 ± 0.53	11.44 ± 4.58	27.13 ± 2.43
L-Cystine at 12 h	0.525 ± 0.035	0.525 ±0.039	8.73 ± 0.02	0.076 ± 0.004	7.36 ± 0.36	1.04 ± 0.05	2.22 ± 0.09	1.79 ± 0.09	0.53 ± 0.03
L-Methionine at 0 h	0.375 ± 0.035	0.200 ±0.020	8.71 ± 0.02	0.074 ± 0.004	3.56 ± 0.14	0.03 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.47 ± 0.01	0.13 ± 0.01
L-Methionine at 12 h	0.850 ± 0.078	0.275 ±0.025	8.74 ± 0.03	0.108 ± 0.008	0.12 ± 0.01	0 ± 0.01	0 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.07 ± 0.01
DL-Ethionine at 0 h	0.650 ± 0.046	0.400 ±0.036	8.77 ± 0.07	0.097 ± 0.007	0.89 ± 0.04	0 ± 0.01	0 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.26 ± 0.04
DL-Ethionine at 12 h	1.125 ± 0.105	0.200 ±0.020	8.65 ± 0.05	0.119 ± 0.019	0.66 ± 0.02	0.01 ± 0.00	0 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.05 ± 0.01
LSD	0.129	0.101	0.0664	0.0154	3.463	0.305	0.652	2.795	1.711

\*Each amino acid containing sulfur was added to the medium at a final concentration of 10 mmol l<sup>-1</sup>. †Mycelial biomass is given as g of dry weight per liter of culture broth at the time of maximal value during 96 h of fermentation. ‡ $\mu_{\max}$  is the maximum growth rate. §Specific dithiolopyrrolone productions are given as mg per g of biomass at the time of maximal productions during 96 h of fermentation. Each value represents the average of three measurements ± SD. LSD: Fisher's Least Significantly Difference at probability level ( $P < 0.05$ ).

## Article 2:

### Regulation of dithiopyrrolone antibiotic productions by amino acids and humic acid in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137

Soumis à: *Enzyme and Microbial Technology*

Noureddine Bouras<sup>a</sup>, Florence Mathieu<sup>a</sup>, Nasserline Sabaou<sup>b</sup>, Ahmed Lebrihi<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Département Bioprocédés et Systèmes Microbiens. Laboratoire de Génie Chimique, UMR 5503 (CNRS/INPT/UPS). École Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse. Institut National Polytechnique de Toulouse. 1, avenue de l'Agrobiopôle, B.P. 107, F-31 326 Castanet-Tolosan Cedex 1, France

<sup>b</sup> Laboratoire de Recherche sur les Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse. École Normale Supérieure d'Alger. B.P. 92, 16 050 Vieux-Kouba, Alger, Algérie

\* Corresponding author.

E-mail address: [lebrihi@ensat.fr](mailto:lebrihi@ensat.fr) (A. Lebrihi).

## Abstract

The amino acids requirements of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 for growth and production of the dithiopyrrolone antibiotics were studied in semi-synthetic medium (SSM). Amino acids strongly influenced the growth and dithiopyrrolone specific productions. The production of these antibiotics depends upon the nature and the concentration of the used amino acids in the culture medium.

The higher value of thiolutin specific production was obtained in the presence of 1 g/l humic acid (336.04 mg/g DCW), and in the presence of 5 mM L-cystine (309.12 mg/g DCW) as compared to 18.52 mg/g DCW obtained with control. Furthermore, the thiolutin production was increased about 6-fold, 4-fold and 3-fold in the presence of L-proline, L-glutamic acid and DL-histidine, respectively. In contrast, the production of thiolutin was reduced by addition of other amino acids such as L-glutamine, DL-ethionine, L-methionine and L-arginine. The higher value of isobutyryl-pyrrothine production was obtained in the presence of 2,6-diaminopimelic acid and L-lysine (7.77 and 1.03 mg/g DCW, respectively). However, the higher value of butanoyl-pyrrothine production was obtained in the presence of humic acid (6.62 mg/g DCW), followed by L-cysteine and L-proline (3.55 and 3.15 mg/g DCW, respectively). In addition, the maximum specific production of senecieryl-pyrrothine (28.80 mg/g DCW) and tigloyl-pyrrothine (21.12 mg/g DCW) were obtained in the presence of humic acid. We showed that except for isobutyryl-pyrrothine production, all other dithiopyrrolone productions were favoured by addition of L-proline. The maximum specific productions were observed in the presence of 2.50 mM L-proline for thiolutin (133.12 mg/g DCW), and in the presence of 1.25 mM for senecieryl-pyrrothine, tigloyl-pyrrothine and butanoyl-pyrrothine productions (29.34, 23.32 and 3.90 mg/g DCW, respectively). In contrast, all dithiopyrrolone productions strongly decreased as the L-methionine or DL-ethionine concentrations increased in the culture medium.

---

## 1- Introduction

Dithiopyrrolones are members of the pyrrothine class of naturally occurring antibiotics. This class of compounds includes thiolutin (acetyl-pyrrothine), aureothricin (propionyl-pyrrothine), isobutyryl-pyrrothine (2-methylpropanoyl-pyrrothine), butanoyl-pyrrothine (xenorhabdin VII), senecioid-pyrrothine (3-methyl-2-butenoyl-pyrrothine), tigloyl-pyrrothine, propionyl-holothin, holomycin, xenorhabdins, xenorxides and thiomarinols (Celmer and Solomons 1955; Okamura *et al.*, 1977; Mc Inerney *et al.*, 1991; Shiozawa *et al.*, 1997; Lamari *et al.*, 2002b; Webster *et al.*, 2000). Dithiopyrrolones were initially isolated from different species of *Streptomyces* in the 1940s and from other microorganisms such as *Alteromonas rava*, *Xenorhabdus bovienii* and *X. nematophilus* (Yamagishi *et al.*, 1971, Mc Inerney *et al.*, 1991; Shiozawa *et al.*, 1997; Paik *et al.*, 2001). In addition, *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 has been found to produce at least five dithiopyrrolone antibiotics: thiolutin, senecioid-pyrrothine (SEP), tigloyl-pyrrothine (TIP), isobutyryl-pyrrothine (ISP) and butanoyl-pyrrothine (BUP) (Lamari *et al.*, 2002a) as in Fig. 1.

Dithiopyrrolone derivatives have very strong activities against a variety of Gram-positive and Gram-negative bacteria and eukaryotic microorganisms (yeasts, fungi and parasites) (Celmer and Solomons 1955; Šturdíková *et al.*, 1990; Oliva *et al.*, 2001; Lamari *et al.*, 2002a; Webster *et al.*, 2000). Furthermore, they have strong anticancer activity against several human cancer cell lines and especially in the treatment of malignant mammary cells (Arnold *et al.*, 1995; Minamiguchi *et al.*, 2000; Webster *et al.*, 2000). Consequently, these compounds may be of pharmaceutical interest as new anticancer agents (Xu, 1998).

The selection of appropriate carbon and nitrogen sources can have a great effect on the production levels of secondary metabolites (Junker *et al.*, 1998). Nutrients such as amino acids can often supply both carbon and nitrogen sources. Amino acids, as precursor, stimulated the production of secondary metabolites either by increasing the amount of a limiting precursor, or by inducing a biosynthetic enzyme (synthase) or both (Demain 1998). *Saccharothrix algeriensis* is Gram-positive mycelial bacterium with a complex life cycle. However, little is known about this microorganism. In *Streptomyces* spp., the catabolic products of amino acids can be incorporated into the carbon skeleton of some antibiotics (Omura *et al.*, 1984). Precursors (from amino acid catabolism) are incorporated into the

pyrrothine nucleus in the form of activated substrates (acetyl-, propionyl-, and butyryl-CoA) to led to the different dithiopyrrolones.

This study was initiated to develop a simple defined medium and to identify the key nutritional parameters regulating dithiopyrrolone productions. Also, the potential use of amino acids and humic acid was tested in order to get a suitable fermentation medium for dithiopyrrolone productions by *Sa. algeriensis*. The results presented here which should be useful for future studies on dithiopyrrolone biosyntheses and manufacture.

## **2- Materials and methods**

### **2.1- Producing strain**

*Sa. algeriensis* NRRL B-24137 (= DSM 44581) was used in all investigations. Stock cultures were maintained at 4 °C on ISP 2 (International *Streptomyces* Project 2) medium slant composed of (in litre of distilled water): 4 g glucose D(+) (Fisher Labosi), 10 g malt extract (Difco), 4 g yeast extract (Difco) and 18 g agar (Difco). The pH of the medium was adjusted to 7 using 2 N NaOH before autoclaving for 20 min at 121 °C.

### **2.2- Culture medium**

The basal semi-synthetic medium (SSM), developed in our laboratory, was used for both pre-culture and production of antibiotics. This medium contained the following components (per litre of distilled water): 10 g glucose D(+) (Fisher Labosi), 2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Prolabo), 2 g NaCl (Fisher Labosi), 0.5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Acros), 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Acros), 0.2 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Acros), 5 g CaCO<sub>3</sub>, (Prolabo) and 2 g yeast extract (Difco). The pH of the medium was adjusted to 7 using 2 N NaOH prior to autoclaving. The glucose was autoclaved separately, and added aseptically to the culture medium before inoculation. Humic acid and all used amino acids (Table 1) were also autoclaved separately and added at the required concentrations to the medium before inoculation.

### ***2.3- Culture conditions***

The effect of amino acids and their related compounds (at a concentration of 5 mM) and humic acid (at a concentration of 1 g/l) were investigated in SSM for dithiolopyrrolone antibiotic productions during 72 h of fermentation, which is the optimal time for antibiotic productions (Bouras *et al.*, 2005). The selected amino acids (including the best one for antibiotic productions and two amino acids which have a negative effect on antibiotic productions at 5 mM) and humic acid were investigated for antibiotic productions at different concentrations: 0.25, 0.5, 1 and 1.5 g/l for humic acid, and 1.25, 2.5, 5 and 7.5 mM for the selected amino acids. The pre-culture (500-ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of the medium) was incubated for 48 h at 30 °C and 260 rpm on a rotary shaker (New Brunswick Scientific Company, New Jersey, USA). The pre-culture was then homogenized and 5 ml were used to inoculate 100 ml of the same medium in 500-ml Erlenmeyer flasks, under the same conditions. Control flasks (basal SSM medium without amino acids) were also included for comparison. All data shown represent the average of triplicate flasks.

### ***2.4- Measurement of DCW and pH***

Culture broth samples were taken every 24 h of fermentation. The pH value of fermentation broth was measured with a pH meter (Consort C 832, Consort, NY). For the dry cell weights (DCWs), we used the method of Pfefferle *et al.* (2000) with slight modifications. The DCWs were determined by centrifuging (Microlitre Centrifuges, Heraeus instruments, Biofuge) 4 ml of homogenized culture broth in pre-weighed Eppendorf tubes for 10 min at 16 000 x g. The pellet was washed three times with HCl (0.35 N) in order to eliminate CaCO<sub>3</sub>, followed by distilled water. The Eppendorf tubes containing pellet were dried at 105 °C for 24 h, cooled in a desiccator, and weighed. The results were expressed as g/l.



## **2.5- Dithiopyrrolone extractions and high performance liquid chromatography (HPLC) analysis**

After centrifuging the samples, the supernatant was kept for further analysis. Four ml of the supernatant were extracted with an equal volume of dichloromethane. The organic phase (containing antibiotics) was collected and dried with anhydrous sodium sulfate. The extracts were concentrated to dryness under vacuum on Rotavapor (Laborata 4000, Heidolph), dissolved in 1 ml of MeOH as crude extract. The analysis of dithiopyrrolone antibiotics was carried out by HPLC, Bio-Tek Instruments. The equipment consisted of variable wavelength detector (UV-Vis 545V diode detector array), pump system 525, column thermostat 582 and auto-injector 465. The acquisition was carried out by computer system Kroma 3000 (Bio-Tek, Milan, Italy). The analytical column used was a Zorbax SB, 150 mm x 4.6 mm Uptisphere 5  $\mu\text{m}$  C-18 ODB fitted with a guard column of 10 mm x 4 mm. The samples were analyzed by linear gradient elution using acetonitrile as solvent A and double-distilled water as solvent B. The separation gradient starting with 0% solvent A and 100% solvent B, reaching 30% solvent A and 70% solvent B in 5 min, continuing from 30% to 100% solvent A in 25 min, using a flow rate of 0.8 ml/min. The column temperature was 30 °C. The injection volume was 60  $\mu\text{l}$ . The detection of these antibiotics was carried out at 390 nm. In these conditions, the retention times were recorded at 11.03, 13.42, 14.02, 15.39 and 16.32 min for thiolutin, isobutyryl-pyrrothine, butanoyl-pyrrothine, tigloyl-pyrrothine and seneciroyl-pyrrothine, respectively (Bouras *et al.*, 2005). Quantification of antibiotics was performed using thiolutin standard calibration curve. The molar extinction coefficient ( $\epsilon$ ) of thiolutin is nearly the same for all fractions ( $\epsilon_{390} = 8317\text{-}9333 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) as described by Lamari *et al.* (2002b). All results presented are the mean values of three independent experiments. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and checked for significant probability ( $p \leq 0.05$ ) level using Sigmastat® 2.03 Statistical Software. The difference between the means was determined using LSD (Fisher's Last Significant Difference) at a probability ( $p \leq 0.05$ ).

### 3- Results

#### *3.1-Effect of different amino acids and humic acid on growth and dithiolopyrrolone specific productions*

The effect of amino acids and humic acid on the dithiolopyrrolone biosyntheses was studied during batch cultivation. Fifteen common amino acids and five of its related compounds were used. All amino acids were tested at 5 mM, but humic acid was tested at 1 g/l, and added initially to the chemically defined medium (SSM) and incubated for 72 h.

The growth and the production of antibiotics by *Sa. algeriensis* were influenced by various amino acids and some of their analogues. The effects of these amino acids on growth and dithiolopyrrolone specific productions were summarized in Table 1. Among the various studied amino acids, the higher value of DCW (2.345 g/l) was obtained in the presence of L-serine and L-glutamine. Furthermore, L-tryptophan, DL-valine, L-asparagine and L-arginine had also been observed to stimulate cell production.

Addition of amino acids and humic acid had a strong influence on dithiolopyrrolone specific productions by *Sa. algeriensis* (Table 1). The higher values of thiolutin specific production were obtained in the presence of humic acid (336.04 mg/g DCW) and L-cystine (309.12 mg/g DCW) as compared to 18.52 mg/g DCW with control. Furthermore, the thiolutin specific production was increased about 6-fold, 4-fold and 3-fold when L-proline, L-glutamic acid and DL-histidine, respectively, were supplemented to the medium. L-hydroxyproline acid, L-alanine and L-tryptophane did not exhibit a marked effect on thiolutin specific production. In contrast, the production of thiolutin was reduced by addition of the other amino acids. Furthermore, in the presence of L-methionine, DL-ethionine or L-glutamine, the thiolutin production was strongly reduced (6-70 fold). ISP and BUP were not detected in cultures supplemented with DL-ethionine, L-methionine and L-glutamine, and only trace amounts were detected in media containing L-serine, 3,4 di hydroxyphenylalanine, L-phenylalanine, L-arginine and tryptophane. The higher value of ISP specific production was obtained in the presence of DAP (2,6-diaminopimelic acid) and L-lysine (7.77 and 1.03 mg/g DCW, respectively), but all other amino acids had a negative effect on this production. However, the higher value of BUP specific production was obtained in the presence of humic acid (6.62

mg/g DCW), followed by L-cysteine and L-proline (3.55 and 3.15 mg/g DCW, respectively). The maximum specific productions of SEP (28.80 mg/g DCW) and TIP (21.12 mg/g DCW) were obtained with humic acid. Furthermore, we observed that the presence of DAP, L-proline and L-glutamic acid in the culture medium, also favoured the productions of SEP (20.86, 16.16 and 5.55 mg/g DCW) and TIP (18.27, 6.51 and 6.50 mg/g DCW), respectively. In addition, SEP and TIP were favoured by addition of DL-threonine (3.33 and 4.50 mg/g DCW, respectively).

### ***3.2- Effect of L-proline, L-methionine and DL-ethionine concentrations on growth and dithiolopyrrolone specific productions***

To study the effect of amino acid concentrations, we selected from the previous experiment, L-proline, which was among the amino acids yielded the higher dithiolopyrrolone productions; as well as L-methionine and DL-ethionine, which exhibited the most negative effect on antibiotic productions. The concentrations tested were 1.25, 2.5, 5 and 7.5 mM during 96 h of fermentation.

We observed that when the concentration of L-proline ranged from 0 to 5 mM, a significant increase was observed in  $DCW_{max}$  from 0.525 to 2 g/l (Fig. 2a). The maximum specific growth rate was obtained in the presence of 1.25 mM for L-proline ( $0.159\text{ h}^{-1}$ ) (Fig. 2b).

The present study showed that except for ISP production, all other dithiolopyrrolone productions were favoured by addition of L-proline (Fig. 2c, 2d, 2e). The maximum specific productions were observed in the presence of 2.50 mM L-proline for thiolutin (133.12 mg/g DCW), and in the presence of 1.25 mM for SEP, TIP and BUP productions (29.34, 23.32 and 3.90 mg/g DCW, respectively).

We noticed that the  $DCW_{max}$  was slightly favoured by addition of different concentrations of L-methionine. However,  $DCW_{max}$  was more favoured in the case of DL-ethionine (1.250 g/l) (Fig. 3a). The maximum specific growth rate was obtained in the presence of 7.50 mM for DL-ethionine ( $0.137\text{ h}^{-1}$ ). However, the addition of L-methionine have a negative effect on the specific growth rate value (Fig. 3b). Moreover, there was still an increasing effect in specific growth rate when concentration of DL-ethionine was increased up to 7 mM (Fig. 3b).

We showed that all dithiopyrrolone productions strongly decreased while amino acid (L-methionine or DL-ethionine) concentrations increased in the culture medium (Fig. 3c, 3d, 3e).

### ***3.3- Effect of humic acid concentrations on growth and dithiopyrrolone specific productions***

To study the effect of humic acid concentrations on growth and dithiopyrrolone specific productions, we tested the concentrations of 0.25, 0.5, 1 and 1.5 g/l during 96 h of fermentation.

The  $DCW_{max}$  was enhanced by different concentrations of humic acid and the higher value (0.89 g/l) was obtained at 1 g/l (Fig. 4a). On the other hand, the maximum specific growth rate was reduced whatever the concentration of humic acid was used (Fig. 4b). The results indicated that initial humic acid concentration from 0 to 1,25 g/l stimulated the dithiopyrrolone productions. Specific productions of thiolutin, SEP and TIP were strongly enhanced in the presence of 0.25 g/l humic acid (447.40, 38.69 and 35.90 mg/g DCW) (Fig. 4c, 4d). However, the maximum specific production of BUP was obtained with 0.5 to 1 g/l humic acid (4.71-4.81 mg/g DCW) (Fig. 4e). In contrast, different concentrations of humic acid did not affect the ISP specific production (Fig. 4e). The obtained results represented the first report about the use of humic acid for inducing the dithiopyrrolone productions in microorganism.

## **4- Discussion**

Amino acids exhibited different patterns on growth of *Sa. algeriensis* and on the dithiopyrrolone antibiotic productions. This production was depended upon the nutritional content of the culture medium and its concentrations. We observed that certain amino acids may be inhibited, while others can be stimulated the dithiopyrrolone biosyntheses. Humic acid, L-cystine, L-proline and DAP exerted a major stimulatory effect on earlier steps of pyrrothine biosynthesis. Furumai *et al.* (1982) reported that L-cystine may be a metabolite precursor of dithiopyrrolone biosyntheses. We showed that the effect of L-cystine on dithiopyrrolone productions was due to a regulatory effect, rather than to its role as a

precursor. Accordingly, the L-cystine plays an important role in controlling the rate of dithiopyrrolone biosyntheses. The addition of L-cystine, for example, increases the phenazine-1-carboxylic acid yield in *Pseudomonas fluorescens* (Slininger and Jackson, 1992).

Several natural products that have a wide range of biological activities contain pyrrole moieties. Precursor labelling studies of some of these natural products have shown that L-proline can serve as the biosynthetic precursor for these moieties, including those found in coumestrolin A<sub>1</sub>, chlorobiocin and pyoluteorin (Michael and Christopher, 2002; Thomas *et al.*, 2002). Many studies showed that the possible mechanism for the conversion of the pyrrolidine ring of L-proline to a pyrrole by an enzymatic system (Nowak-Thompson *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000). Accordingly, L-proline may play an important role in controlling the rate of dithiopyrrolone biosyntheses.

We observed that L-glutamic acid, DL-histidine, L-phenylalanine and L-lysine were suitable for the production of dithiopyrrolones. These data show possible links between these amino acids and dithiopyrrolone biosyntheses. The DL-histidine is known to be a good source of nitrogen and/or carbon for different actinomycete strains (Pen-Chaur *et al.*, 1992). Thiolutin and SEP productions were enhanced by the addition of L-phenylalanine. This result is in agreement with previous observation that L-phenylalanine stimulates gramicidin biosynthesis (Demain and Matteo, 1976), vancomycin production (Mc Intyre *et al.*, 1996) and benzodiazapene alkaloid production by unknown mechanisms (Luckner *et al.*, 1977).

We showed that DAP was the most suitable for the production of ISP, SEP and TIP, and as shown here, could be applied for increasing dithiopyrrolone yields in *Sa. algeriensis*. DAP was reported to be a cell wall component of *Sa. algeriensis* (Zitouni *et al.*, 2004) and identified as the *meso*-DAP isomer. The DAP could probably controlled the cell composition of microorganism and may be have a positive effect on dithiopyrrolone productions. The amino acids and their analogs had been known for their stimulatory effect on the production of a number of enzymes (Laakel *et al.*, 1994; Mc Intyre *et al.*, 1996; Balakrishnan *et al.*, 1997).

The addition of L-glutamine, L-arginine or L-serine to SSM inhibited the dithiopyrrolone specific productions, even though growth was not affected. This negative effect was thought to be due to intermediates generated from the catabolism of these amino acids sources

interfering with enzymes in the secondary metabolism process (Marwick *et al.*, 1999), or by direct negative effect of these sources. Arginine, which catabolism led to an important excretion of ammonium, gave a slight spiramycin production (Untrau *et al.*, 1994). A high rate of oxidative deamination of amino acids caused an accumulation of  $\text{NH}_4^+$  (Gräfe *et al.*, 1980). By consequence, the negative effect of some amino acids may be caused by the strong ammonium release from its catabolism. On the other hand, an excess of different amino acids (more than 5 mM) led to increase in ammonium excretion and concurrently to a drop in antibiotic yield. Secondary metabolites in actinomycetes were usually delayed or reduced by an excess of readily available nitrogen (Shapiro 1989). The ammonium effect might be explained by inhibition of antibiotic synthetases or, alternatively, by an effect at some other step(s) in the biosynthesis of antibiotics (Demain *et al.*, 1983).

L-methionine and DL-ethionine appeared to exert catabolite repression or inhibition, they supported the growth but not the dithiopyrrolone productions. Perhaps it was due to poor uptake (the intracellular pool of L-methionine was not altered by its exogenous supply) or to competition with L-methionine catabolism (Gastaldo and Marinelli, 2003). Many studies showed that an increase of the specific growth rate repressed the synthesis of certain enzymes that were necessary for the formation of precursors of secondary metabolites in *S. fradiae* and *S. clavuligerus* (Lebrihi *et al.*, 1988). In fact, it had been reported that an increase of growth rate (fast-growing) could repress key enzymes of antibiotic biosynthesis (switched off) (Liao *et al.*, 1995). Completed inhibition occurred only on L-methionine and its analog, DL-ethionine. Moreover, the similar inhibitory effect of DL-ethionine may indicate that the L-methionine probably did not play a role as a functioning amino acid, and inhibition might be attributed to a mechanism of repression or inhibition.

Our results showed that humic acid revealed the maximum production for all dithiopyrrolones. Humic acid was a complex macromolecules consisting of an array of aromatic and aliphatic structures with, sulfur-containing amino acids, amino sugars, other amino acids, peptides, fatty acids and other organic compounds (Stevenson 1985). Humic acid supported the best dithiopyrrolone specific productions; this, presumably due to the continuous hydrolysis and lower rate of assimilation of this complex compound. Furthermore, in the presence of humic acid, the maintained biomass level might be related to assimilation of excreted fatty acids from humic acid biodegradation. Mc Carthy *et al.* (2003) cited that

during the stages of microbial decomposition, many organic compounds in humic acid were transformed by  $\beta$ -oxidation. Previous studies of the effect of humic acid on plant growth consistently showed the positive effects on plant biomass as stimulation of root growth, germination, seedling growth and activation of enzymes (McCarthy *et al.*, 2003). Thus, the humic acid may be a considerable source of precursors for dithiopyrrolone biosynthesis in microorganisms.

In conclusion, it was suggested that humic acid, L-cystine, L-proline and DAP could serve as a source for enhancing the production of dithiopyrrolones in *Sa. algeriensis*. Additionally, we observed that *Sa. algeriensis* produced the novel dithiopyrrolones when supplied with some amino acids (data not shown). Further studies on the regulation of dithiopyrrolone productions by *Sa. algeriensis* on different culture conditions and the characterization of the novel dithiopyrrolones are currently underway in our laboratory.

## 5- References

- Arnold, J.T., Wikinson, B.P., Sharma, S. and Steele, V.E. (1995). Evaluation of chemopreventive agents in different mechanistic classes using a rat tracheal epithelial cell culture transformation assay. *Cancer Res.*, 55, 537-543.
- Balakrishnan, I., Johnson, M.A., Kibbler, C.C. and Gillespie, S.H. (1997). Cryptococcal cholangitis: a novel presentation of disseminated cryptococcosis in AIDS. *Int. J. Std. AIDS.*, 8(12), 785-788.
- Bouras, N., Mathieu, F., Sabaou, N. and Lebrihi, A. (2005). Effect of amino acids containing sulfur on dithiopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *J. Appl. Microbiol.*, In Press.
- Celmer, W.D. and Solomons, I.A (1955). The structures of thiolutin and aureothricin, antibiotics containing a unique pyrrolinonodithiole nucleus. *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 2861-2865.
- Demain, A.L., Aharonowitz, Y. and Martín, J.F. (1983). Metabolic control of secondary biosynthetic pathways. *In*: "Biochemistry and genetic regulation of commercially important antibiotics". Vining, L.C., Ed, Addison Wesley, London. pp. 49-72.

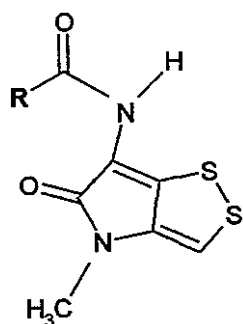
- Demain, A.L. (1998). Induction of microbial secondary metabolism. *Internat. Microbiol.*, 1, 259-264.
- Demain, A.L., and Matteo, C.C. (1976). Phenylalanine stimulation of gramicidin S formation. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 9(6), 1000-1003.
- Furumai, T., Takeda, K. and Okanishi, M. (1982). Function of plasmids in the production of aureothricin. I. Elimination of plasmids and alteration of phenotypes caused by protoplast regeneration in *Streptomyces kasugaensis*. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 35, 1367-1373.
- Gastaldo, L. and Marinelli, F. (2003). Changes in GE2270 antibiotic production in *Planobispora rosea* through modulation of methylation metabolism. *Microbiology*, 149, 1523-1532.
- Gräfe, U., Fleck, W.F., Schade, W., Reinhardt, G., Tresselt, D. and Thrun, H. (1980). The platenolides I and II as precursors of turimycin. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 33(6), 663-664.
- Junker, B., Mann, Z., Galliot, P., Byrne, K. and Wilson, S. (1998). Use of soya bean oil and ammonium sulphate to optimize secondary metabolite production. *Biotech. Bioeng.*, 60, 580-588.
- Laakel, M., Lebrihi, A., Khaoua, S., Schneider, F., Lefebvre, G. and Germain, P. (1994). A link between primary and secondary metabolism: malonyl-CoA formation in *Streptomyces ambofaciens* on ammonium ion or valine. *Microbiology*, 140, 1451-1456.
- Lamari, L., Zitouni, A., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Lebrihi, A., Lefebvre, G., Seguin, E. and Tillequin, F. (2002a). New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 55, 696-701.
- Lamari, L., Zitouni, A., Dob, T., Sabaou, N., Lebrihi, A., Germain, P., Seguin, E. and Tillequin, F. (2002b). New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. II. Physicochemical properties and structure elucidation. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 55, 702-706.
- Lebrihi, A., Lefebvre, G. and Germain, P. (1988). Carbon catabolite regulation of cephalosporin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 44-51.
- Liao, X., Vining, L.C., and Doull, J.D. (1995). Physiological control of trophophase and idiophase separation on *Streptomyces* cultures producing secondary metabolites. *Can. J. Microbiol.*, 41, 309-315.



- Luckner, M., Nover, I. and Bohn, H. (1977). Secondary metabolism and cell differentiation. New York: Springer-Verlag, p. 57.
- Marwick, J.D., Wright, P.C. and Burgess, J.G. (1999). Bioprocess intensification of production of novel marine bacterial antibiotics through bioreactor operation and design. *Mar. Biotechnol.*, 1, 495-507.
- Mc Carthy, P., Malcolm, R.L., Clapp, C.E., Bloom, P.R. (2003). Humic substances in soil and crop sciences. Editors, American Society of Agronomy, Madison.
- Mc Intyre, J.J., Bull, A.T., Bunch, A.W. (1996). Vancomycin production in batch and continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 412-420.
- Mc Inemey, B.V., Gregson, R.P., Lacey, M.J., Akhurst, R.J., Lyons, G.R., Rhodes, S.H., Smith, D.R.J., Engelhardt, L.M. and White and A.H. (1991). Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part I. Dithiopyrrolone derivatives with antibiotic activity. *J. Nat. Prod.*, 54, 774-784.
- Michael, T. and Christopher, W. (2002). New Mechanism for Pyrrole Synthesis: Proline to Pyrrole Conversion During Undecylprodigiosin and Pyoluteorin Biosynthesis. *Chem. and Biol.*, 9, 171-184.
- Minamiguchi, K., Kumagai, H., Masuda, T., Kawada, M., Ishizuka, M. and Takeuchi, T. (2001). Thiolutin, an inhibitor of huvec adhesion to vitronectin, reduces paxillin in huvecs and suppresses tumor cell-induced angiogenesis. *Int. J. Cancer*, 93, 307-316.
- Nowak-Thompson, B., Chaney, N., Wing, J.S., Gould, S.J. and Loper, J.E. (1999). Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.*, 181(7), 2166-2174.
- Okamura, K., Soga, K., Shimauchi, Y., Ishikura, T. and Lein, J. (1977). Holomycin and n-propionyl-holothin, antibiotics produced by a cephamycin C producer. *J. Antibiot. (Tokyo)* 30, 334-336.
- Oliva, B., O'Neill, A., Wilson, J.M., O'Hanlon, P.J. and Chopra, I. (2001). Antimicrobial Properties and Mode of Action of the Pyrrothine Holomycin. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 45, 532-539.

- Omura, S., Tanaka, Y., Hamada, H. and Masuma, R. (1984). Effect of ammonium ion, inorganic phosphate and amino acids of the biosynthesis of protylonolide, a precursor of tylosin aglycone. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 37, 494-502.
- Paik, S., Park, Y.H., Suh, S.I., Kim, H.S., Lee, I.S., Park, M.K., Lee, C.S. and Park, S.H. (2001). Unusual cytotoxic phenethylamides from *Xenorhabdus nematophilus*. *Bull. Korean. Chem. Soc.*, 22, 372-374.
- Pen-Chaur, W., Kroening, T.A., White, P.J. and Kendrick, K.E. (1992). His-tidine ammonia-lyase from *Streptomyces griseus*. *Gene*, 115, 19-25.
- Pfefferle, C., Theobald, U., Gürtler, H. and Fiedler, H-P. (2000). Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *J. Biotechnol.*, 80, 135-142.
- Shapiro, S. Nitrogen assimilation in actinomycetes and the influence of nitrogen nutrition on actinomycete secondary metabolism in: Shapiro, S. (Edn.), *Regulation of secondary metabolism in actinomycetes*, CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida, 1989, pp. 135-211.
- Shiozawa, H., Shimada, A. and Takahashi, S. (1997). Thiomarinols D, E, F and G, new hybrid antimicrobial antibiotics produced by a marine bacterium; isolation, structure, and antimicrobial activity. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 50, 449-452.
- Slininger, P.J. and Jackson, M.A. (1992). Nutritional factors regulating growth and accumulation of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 388-392.
- Stevenson, F.J. (1985). Geochemistry of soil humic substances. p. 13-52. *In: Aiken, G.R. et al. (Ed.). Humic substances in soil, sediment, and water*. John Wiley & Sons, New York.
- Šturdíková, M., Proška, B., Uhrín, D. and Fůska, J. (1990). Regulation of biosynthesis of thiolutin and aureothricin in *Streptomyces kasugaensis*. *Folia Microbiol. (Praha)*, 35, 278-283.
- Thomas, M.G., Burkart, M.D. and Walsh, C.T. (2002). Conversion of L-proline to pyrrolyl-2-carboxyl-S-PCP during undecylprodigiosin and pyoluteorin biosynthesis. *Chemistry and Biology*, 9, 171-184.
- Untrau, S., Lebríhi, A., Lefebvre, G. and Germain, P. (1994). Nitrogen catabolite regulation of spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens*. *Curr. Microbiol.*, 28, 111-118.

- Wang, Z.X., Li, S.M. and Heide, L. (2000). Identification of the coumermycin A, biosynthetic gene cluster of *Streptomyces rishiriensis* and biochemical SSM 40489. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44, 3040-3048.
- Webster, J.M., Li, J. and Chen, G. Anticancer property of dithiopyrrolones, U.S. Patent 6,020,360, 2000.
- 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.
- Yamagishi, S., koyama, Y., Fukakusa, Y., Kyomura, N., Ohishi, J.I., hamamichi, N. and Arai, T. (1971). On the metabolites of *Streptomyces luteoreticuliti* Katoh et Arai. Isolation of the metabolites. *Yakugaku Zasshi*, 91, 351-357.
- Zitouni, A., Lamari, L., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Gaouar, A., Mathieu, F., Lebrihi, A. and Labeda, D.P. (2004) *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., isolated from a saharan soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 1377-1381.



<b>R =</b> CH <sub>3</sub>	Thiolutin.
<b>R =</b> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Isobutyryl-pyrrothine (ISP).
<b>R =</b> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	Butanoyl-pyrrothine (BUP).
<b>R =</b> CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Senecioyl-pyrrothine (SEP).
<b>R =</b> C(CH <sub>3</sub> )=CH(CH <sub>3</sub> )	Tigloyl-pyrrothine (TIP).

**Table 1.** Effect of 5 mM of different amino acids sources on growth (DCW), pH and dithiopyrrolone specific productions by *Sa. algeriensis* in batch culture. Specific dithiopyrrolone productions are given as mg per g of biomass at 72 h of fermentation.

Amino acids <sup>a</sup>	Dithiopyrrolone specific productions (mg/g DCW) <sup>c</sup>						
	DCW <sup>b</sup> (g/l) at 72 h	PH at 72 h	Thiolutin	ISP	BUP	SEP	TIP
Control	0.455	7.98	18.52	0.21	0.17	2.54	2.65
	± 0.100	± 0.15	± 4.284	± 0.09	± 0.02	± 0.48	± 0.42
Humic acid (Fluka)	0.625	7.42	336.04	0.16	6.62	28.80	21.12
	± 0.253	± 0.59	± 11.91	± 0.09	± 1.65	± 5.86	± 6.20
L-Cystine (Fluka)	0.675	8.60	309.12	0.04	0.02	1.33	0.25
	± 0.156	± 0.40	± 18.131	± 0.02	± 0.01	± 0.10	± 0.15
L-Proline (Fluka)	1.150	7.92	110.57	0.08	3.20	16.16	6.51
	0.786	± 0.88	± 23.15	± 0.01	± 0.08	± 4.52	± 3.14
L- Glutamic acid (Acros)	1.146	7.95	64.71	0.06	1.06	5.55	6.50
	± 0.333	± 0.14	± 8.16	± 0.03	± 0.22	± 0.98	± 1.30
DL-Histidine (Acros)	1.173	7.45	57.50	0.06	0.47	4.49	1.21
	± 0.064	± 0.13	± 18.432	± 0.02	± 0.25	± 0.49	± 0.43
L-Phenylalanine (Acros)	0.872	7.03	38.92	0.01	0.05	5.75	2.68
	± 0.217	± 0.06	± 2.10	± 0.01	± 0.01	± 0.65	± 1.07
L-Lysin monohydrochlorid (Merck)	1.136	7.98	37.86	1.03	0.89	3.43	4.10
	± 0.057	± 0.09	± 4.54	± 0.15	± 0.16	± 0.39	± 0.56
3,4-Dihydroxy-L-phenylalanin (Merck)	1.181	8.00	26.93	ND <sup>e</sup>	0.03	0.11	0.05
	± 0.027	± 0.05	± 7.381		± 0.02	± 0.08	± 0.03
DAP (Riedel-de-Haën) <sup>d</sup>	0.914	7.88	26.85	7.77	0.99	20.86	18.27
	± 0.079	± 0.37	± 4.26	± 0.68	± 0.18	± 4.01	± 3.60
L-Hydroxy-proline (Merck)	0.904	7.45	16.57	0.02	0.34	1.23	1.49
	± 0.056	± 0.05	± 4.33	± 0.01	± 0.08	± 0.42	± 0.50
L-Alanine (Fluka)	1.212	8.07	16.53	0.04	0.18	2.04	2.64
	± 0.102	± 0.06	± 0.612	± 0.02	± 0.04	± 0.26	± 0.55
L(-)-Tryptophan (Acros)	1.987	7.85	15.65	0.01	0.02	0.71	0.52
	± 0.181	± 0.39	± 3.48	± 0.01	± 0.01	± 0.185	± 0.24
DL-Valine (Roche)	1.973	7.68	11.59	0.03	0.19	0.83	1.10±
	± 0.219	± 0.03	± 0.60	± 0.01	± 0.07	± 0.29	0.265
DL-Threonine (Roche)	1.143	7.56	8.47	0.02	0.10	3.33	4.50
	± 0.389	± 0.37	± 1.753	± 0.01	± 0.01	± 0.286	± 0.62
L- Cysteine (Sigma-Aldrich)	0.578	8.54	11.70	0.65	3.55	2.40	0.55
	± 0.204	± 0.47	± 2.14	± 0.18	± 0.51	± 0.79	± 0.39
L-Asparagine monohydrate (Fluka)	1.783	8.02	7.70	ND <sup>e</sup>	0.23	1.03	1.56
	± 0.125	± 0.03	± 2.14		± 0.01	± 0.15	± 0.38
L-Scrine (Acros Organics)	2.345	7.65±	4.13	0.02	0.05	0.97	0.70±
	± 0.641	0.05	± 0.23	± 0.01	± 0.01	± 0.16	0.36
L-Methionine (Sigma-Aldrich)	0.550	8.65	2.93	0.02	0.2	0.51	0.347
	± 0.182	± 0.06	± 0.55	± 0.02	± 0.02	± 0.13	± 0.30
DL-Ethionine (Sigma-Aldrich)	1.100	8.69	2.77	ND <sup>e</sup>	0.03	0.16	0.12
	± 0.444	± 0.20	± 1.09		± 0.01	± 0.02	± 0.05
L-Glutamin (Fluka)	2.345	7.82	0.26	ND <sup>e</sup>	0.01	0.09	0.08
	± 0.485	± 0.45	± 0.06		± 0.00	± 0.04	± 0.01
L-(+)-Arginin (Prolabo)	1.583	8.06	ND <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>	0.02	0.28	0.32
	± 0.520	± 0.20			± 0.01	± 0.01	± 0.10
LSD	0.559	0.649	14.330	0.260	0.708	3.040	2.859

<sup>a</sup> Each amino acid was added to the medium at a final concentration of 5 mM. <sup>b</sup> Mycelial biomass is given as g of dry weight per liter of culture broth at 72 h of fermentation. <sup>c</sup> Dithiopyrrolone specific productions were determined at 72 h fermentation. <sup>d</sup> 2,6-diaminopimelic acid. <sup>e</sup> Not detected. The amino acids are ranked in order of thiolutin production. Values are averages ± SD of triplicate experiments. LSD: Fisher's Least Significantly Difference at probability level ( $P < 0.05$ ).

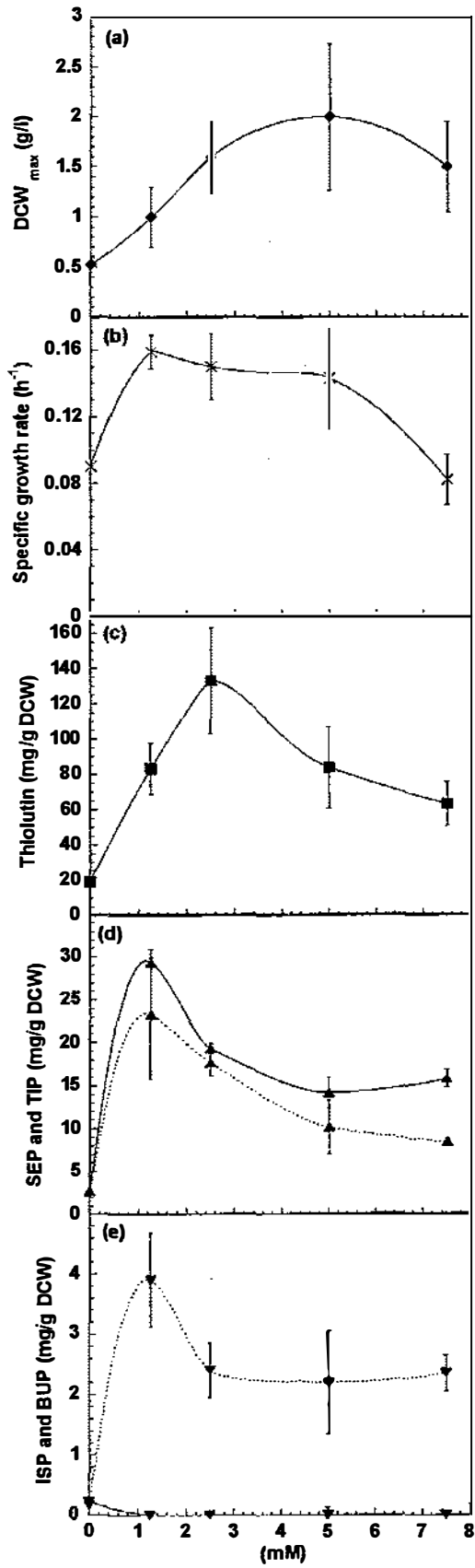


Fig. 2

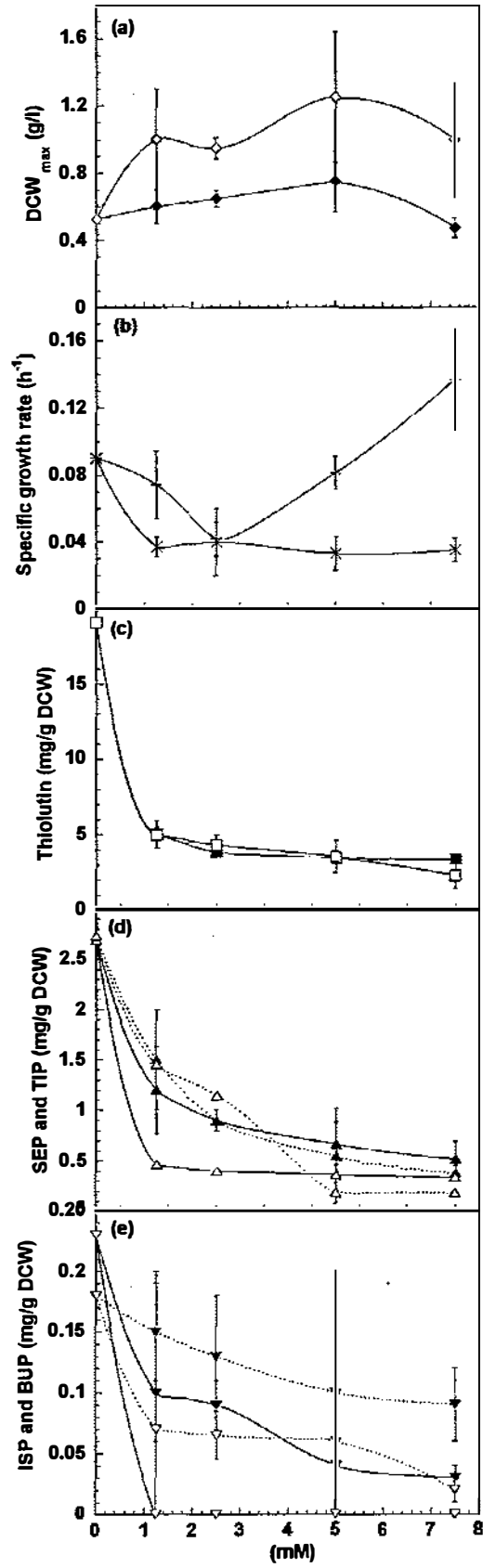


Fig. 3

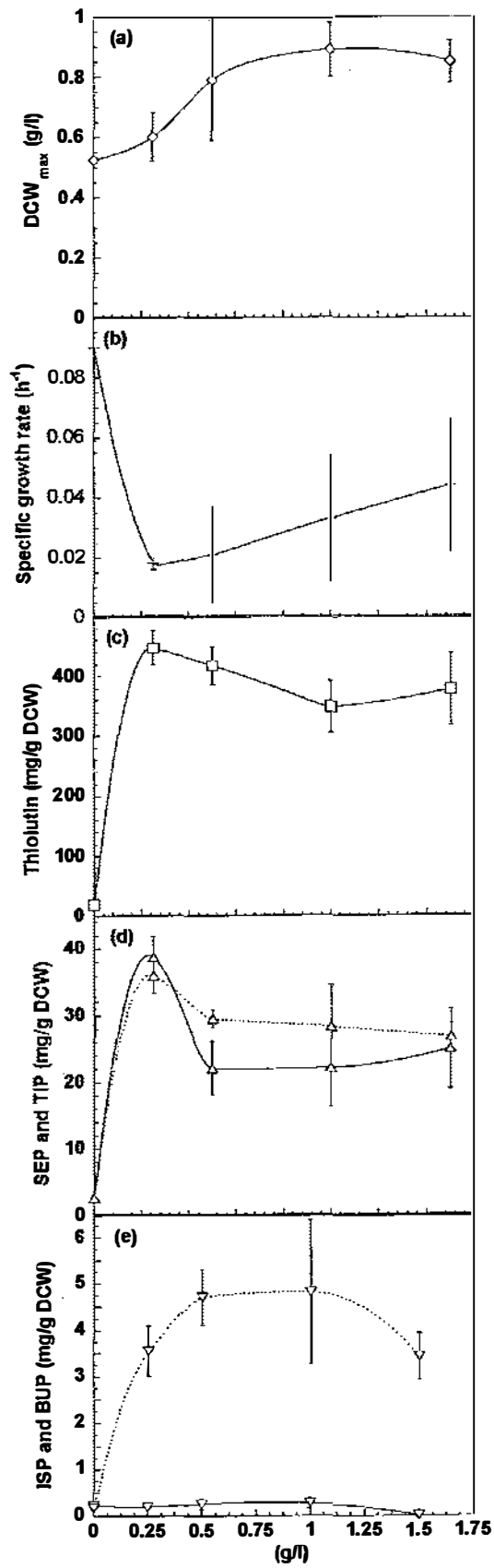


Fig. 4

## LEGENDS OF FIGURES

**Fig. 1.** Structure of dithiopyrrolone antibiotics produced by *Saccharothrix algeriensis*.

**Fig. 2.** Effect of increased initial concentration of L-proline addition at different concentrations on (a): maximal dry cell weight ( $\blacklozenge$ ), (b): specific growth rate ( $\times$ ), (c): specific production of thiolutin ( $\blacksquare$ ), (d): SEP ( $\blacktriangle$ , continuous lines) and TIP ( $\blacktriangle$ , dotted lines), (e): ISP ( $\blacktriangledown$ , continuous lines) and BUP ( $\blacktriangledown$ , dotted lines). Specific dithiopyrrolone productions are given as mg per g of biomass at the time of maximal productions during 96 h of fermentation. Vertical bars denote standard deviations.

**Fig. 3.** Effect of increased initial concentrations of L-methionine (closed symbols) and DL-methionine (open symbols) addition at different concentrations on (a): maximal dry cell weight ( $\blacklozenge$ ,  $\diamond$ ), (b): specific growth rate ( $\times$ ,  $+$ ), (c): specific production of thiolutin ( $\blacksquare$ ,  $\square$ ), (d): specific productions of SEP ( $\blacktriangle$ ,  $\Delta$ , continuous lines) and TIP ( $\blacktriangle$ ,  $\Delta$ , dotted lines), (e): specific productions of ISP ( $\blacktriangledown$ ,  $\triangledown$ , continuous lines) and BUP ( $\blacktriangledown$ ,  $\triangledown$ , dotted lines). Specific dithiopyrrolone productions are given as mg per g of biomass at the time of maximal productions during 96 h of fermentation. Vertical bars denote standard deviations.

**Fig. 4.** Effect of increased initial concentration of humic acid addition at different concentrations on (a): maximal dry cell weight ( $\diamond$ ), (b): specific growth rate ( $+$ ), (c): specific production of thiolutin ( $\square$ ), (d): SEP ( $\Delta$ , continuous lines) and TIP ( $\Delta$ , dotted lines), (e): ISP ( $\triangledown$ , continuous lines) and BUP ( $\triangledown$ , dotted lines). Specific dithiopyrrolone productions are given as mg per g of biomass at the time of maximal productions during 96 h of fermentation. Vertical bars denote standard deviations.

### Article 3:

## Control of dithiopyrrolone antibiotic productions by organic acids in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137

Soumis à: *Journal of Biotechnology*

Noureddine Bouras<sup>a</sup>, Florence Mathieu<sup>a</sup>, Nasserddine Sabaou<sup>b</sup>, Ahmed Lebrihi<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Département Bioprocédés et Systèmes Microbiens. Laboratoire de Génie Chimique, UMR 5503 (CNRS/INPT/UPS). École Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse. Institut National Polytechnique de Toulouse. 1, avenue de l'Agrobiopôle, B.P. 107, F-31 326 Castanet-Tolosan Cedex 1, France

<sup>b</sup> Laboratoire de Recherche sur les Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse. École Normale Supérieure d'Alger. B.P. 92, 16 050 Vieux-Kouba, Alger, Algérie

\* Corresponding author.

E-mail address: [lebrihi@ensat.fr](mailto:lebrihi@ensat.fr) (A. Lebrihi).



## Abstract

In the present work, the influence of organic acids on growth and dithiopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 was studied. The production of dithiopyrrolones depends upon the nature and the concentration of the used organic acids in the culture medium.

The best used organic acids for thiolutin specific production were maleic, 4-hydroxybenzoic, benzenetetracarboxylic, pantothenic, pivalic and pyruvic acids, which yielded almost 5-fold, over the starting medium. Furthermore, 4-bromobenzoic acid showed the best production of senecieryl-pyrrothine (58.69 mg/g DCW). Tiglic acid showed the best production of tigloyl-pyrrothine (22.15 mg/g DCW). The highest yield of isobutyryl-pyrrothine (7.56 mg/g DCW) was observed in the presence of crotonic acid. We noticed that sorbic acid also showed the best production of butanoyl-pyrrothine (26 mg/g DCW). Furthermore, methacrylic, butyric, pyruvic and 4-bromobenzoic acids also exhibited the best production of butanoyl-pyrrothine (27 and 11-fold). However, no or very weak productions of dithiopyrrolones were noticed during cultivation in the presence pamoic, benzenesulfonic, syringic and oleic acids.

The effect of organic acid concentrations showed that among the selected organic acids, pimelic acid revealed the highest specific productions of thiolutin (90.87 mg/g DCW), senecieryl-pyrrothine (10.62 mg/g DCW), tigloyl-pyrrothine (9.23 mg/g DCW) and butanoyl-pyrrothine (3.47 mg/g DCW). The pyruvic acid at 1.25 mM enhanced the production of senecieryl-pyrrothine (4.29 mg/g DCW). The maximum production of tigloyl-pyrrothine (18.56 mg/g DCW) was observed in the presence of tiglic acid at 2.5 mM. Furthermore, the maximum production of isobutyryl-pyrrothine was observed in the presence of 7.5 mM tiglic acid. While, all other organic acids showed negatively effect on the production of isobutyryl-pyrrothine. In addition, methacrylic acid (at 5 mM) and butyric acid (at 2.5 mM) enhanced the production of butanoyl-pyrrothine (26 times and 20 times, respectively). When *Sa. algeriensis* was supplemented with pamoic or ferulic acids, dithiopyrrolone productions decreased dramatically.

The obtained results can be employed for the optimisation of the culture medium for the dithiopyrrolone productions in higher quantities.

---

## 1- Introduction

Dithiopyrrolones are members of the pyrrothine class of naturally occurring antibiotics that are characterized by the possession of a unique pyrrolinodithiole nucleus. Many antibiotics (thiolutin, aureothricin, isobutyryl-pyrrothine, butanoyl-pyrrothine, senecioid-pyrrothine, tigloyl-pyrrothine, propionyl-holothin, holomycin, xenorhabdins, xenorxides and thiomarinols) belonging to this class were reported (Okamura *et al.*, 1977; Mc Inerney *et al.*, 1991; Shiozawa *et al.*, 1997; Lamari *et al.*, 2002b; Webster *et al.*, 2002). Among these compounds, thiolutin is the one that has been studied most extensively. Dithiopyrrolone derivatives were previously identified from the culture medium of certain *Streptomyces* species (Okamura *et al.*, 1977), and from other microorganisms such as symbiotic bacterium *Xenorhabdus* spp. (Mc Inerney *et al.*, 1991), and marine bacterium *Alteromonas rava* (Shiozawa *et al.*, 1997). *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 produces thiolutin, senecioid-pyrrothine (SEP), tigloyl-pyrrothine (TIP), isobutyryl-pyrrothine (ISP) and butanoyl-pyrrothine (BUP) (Lamari *et al.*, 2002b) as in Fig. 1.

The dithiopyrrolones are effective against various microorganisms including Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeasts, fungi and ameboid parasites (Šturdíková *et al.*, 1990; Webster *et al.*, 2002). This class of antibiotic also exhibited protozoicidal, larvicidal and insecticidal activities (Deb and Dutta, 1984; Šturdíková *et al.*, 1990; Webster *et al.*, 2002). Dithiopyrrolones have also been reported to have anticancer activity (Xu, 1998). Importantly, dithiopyrrolones inhibit the growth of HT29 human colon cancer lines, the growth of cervical cancer cell line Hela and the MCF-7 breast cancer cell line (Webster *et al.*, 2000).

Little information is known for the regulation of production of thiolutin and other dithiopyrrolones up till now. Therefore, optimal fermentation conditions need to be developed for production of these antibiotics. This research focused on the use of variety of organic acids to adequately control higher and lower levels of dithiopyrrolone productions in *Sa. algeriensis*. This is the first report on the use of organic acids as nutrients to control dithiopyrrolone productions by *Sa. algeriensis*.

## 2- Materials and methods

### 2.1- Producing strain

*Sa. algeriensis* NRRL B-24137 (= DSM 44581) was used throughout this study. It was grown and maintained on slants of ISP 2 (International *Streptomyces* Project 2) solid medium containing (per litre of distilled water): 4 g glucose D(+) (Fisher Labosi), 10 g malt extract (Difco), 4 g yeast extract

(Difco) and 18 g agar (Difco). The pH of the medium was adjusted to 7 with 2 M NaOH solution before autoclaving at 121 °C for 20 min.

### ***2.2- Culture medium***

The basal semi-synthetic medium (SSM), developed in our laboratory, was used for both pre-culture and production of antibiotics. This medium consisted of (in g per litre of distilled water): glucose D(+) (Fisher Labosi), 10.0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Prolabo), 2.0; NaCl (Fisher Labosi), 2.0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Acros), 0.5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Acros), 1.0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Acros), 0.2; CaCO<sub>3</sub> (Prolabo), 5.0 and yeast extract (Difco), 2.0. The pH of the medium was adjusted to 7 using 2 M NaOH solution prior to autoclaving. The glucose was autoclaved separately, to avoid the Maillard reaction, and added aseptically to the culture medium before inoculation. All organic acids used were prepared as separate solutions. These organic acids were adjusted to a pH of 7 with NaOH solution before to autoclaving. pH adjustment were made with 0.1 M, 1 M or 4 M, as appropriate. The organic acids were supplied at the required concentrations to the medium at time of inoculation.

### ***2.3- Culture conditions***

The effect of 83 organic acids at a concentration of 5 mM were investigated in SSM for biomass and dithiolopyrrolone productions. The incubation temperature was kept at 30 °C throughout the fermentation period of 72 h of fermentation (in general, all dithiolopyrrolone antibiotic productions reached a maximum at 72 h after inoculation). Eight selected organic acids were investigated at different concentrations: 1.25, 2.5, 5 and 7.5 mM. The pre-culture (250-ml Erlenmeyer flask containing 50 ml of the medium) was incubated with shaking at 260 rpm for 48 h at 30 °C on a model G25 gyrotary shaker (New Brunswick Scientific Co. N.J., USA). The pre-culture was then homogenized and 5 ml were used to inoculate 100 ml of the same medium in 500-ml Erlenmeyer flask, under the same conditions. All results presented are mean values of two independent experiments. Control flasks (basal SSM medium without organic acids) were also included for comparison.

### ***2.4- Measurement of DCW and pH***

Culture broth samples were taken every 24 h of fermentation. The pH value of fermentation broth was measured with a pH meter (Consort C 832, Consort, NY). For the dry cell weights (DCWs), we

used the method of Pfefferle *et al.* (2000) with slight modifications. The Dry cell weights (DCWs) were determined by centrifuging (Microlitre Centrifuges, Heraeus instruments, Biofuge) 4 ml of homogenized culture broth in pre-weighed Eppendorf tubes at 16 000 x g for 10 min. The pellet was washed three times with HCl (0.35 M), followed by distilled water. The Eppendorf tubes containing pellet were dried at 105 °C for 24 h, cooled in a desiccator, and weighed. The results were expressed as g/l.

### **2.5- High performance liquid chromatography (HPLC) analysis**

After centrifuging the samples, the supernatant was kept for further analysis. Four ml of the supernatant were extracted with an equal volume of dichloromethane. The organic phase was collected and dried with anhydrous sodium sulfate. The extracts were concentrated to dryness under vacuum on Rotavapor (Laborata 4000, Heidolph), dissolved in 1 ml of MeOH and kept as crude extract. The analysis of dithiopyrrolone antibiotics was carried out by HPLC, Bio-Tek Instruments. The equipment consisted of variable wavelength detector (UV-Vis 545V diode detector array), pump system 525, column thermostat 582 and auto-sampler 465. The acquisition was carried out by computer system (Kroma 3000). The stationary phase consisted of C<sub>18</sub> reverse phase column (Zorbax SB, 150 x 4.6 mm, 5 µm particles). The samples were analyzed by linear gradient elution using acetonitrile as solvent A and ultra pure water as solvent B. The separation gradient starting with 0% solvent A and 100% solvent B, reaching 30% solvent A and 70% solvent B in 5 min, continuing from 30% to 100% solvent A in 25 min, using a flow rate of 0.8 ml/min. The injection volume was 60 µl. The detection of these antibiotics was carried out at 390 nm. In these conditions, the retention times were recorded at 11.03, 13.42, 14.02, 15.39 and 16.32 min for thiolutin, ISP, BUP, TIP and SEP, respectively (Bouras *et al.*, 2005). Quantification of antibiotics was performed using thiolutin standard calibration curve. The molar extinction coefficient of thiolutin ( $\epsilon$ ) is nearly the same for all fractions ( $\epsilon_{390} = 8317\text{-}9333 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) as described by Lamari *et al.* (2002). All results presented are mean values of two independent experiments. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and checked for significant probability ( $p \leq 0.05$ ) level using Sigmastat® 2.03 Statistical Software. The difference between the means was determined using LSD (Fisher's Last Significant Difference) at a probability ( $p \leq 0.05$ ).

### 3- Results

#### 3.1- Effect of different organic acids on growth and dithiopyrrolone specific productions

The influence of organic acids was studied during batch cultivation. Eighty-three organic and fatty acids were examined, including aliphatic and aromatic acids. All were tested at a final concentration of 5 mM and added initially to the chemically defined medium (SSM) and incubated for 72 h.

The effects of these organic acids on growth and dithiopyrrolone specific productions were summarized in Table 1. We observed that the growth of *Sa. algeriensis* was influenced by various organic acids. Among the wide variety of studied organic acids, the higher value of dry cell weight (DCW) (1.305-1.895 g/l) was obtained in the presence of pimelic, tiglic, 4-bromobenzoic and cinnamic acids. In addition, other organic acids (pivalic, pantothenic, crotonic, 3,5-dihydroxybenzoic and oxalic acids) stimulated significantly the growth of the studied microorganism (Table 1). However, 2,4-dihydroxybenzoic, oleic, pamoic, benzenesulfonic and 2,4-dihydroxybenzoic acids had been observed to inhibit DCW.

Analysis of the results indicated that the addition of organic acids had a strong influence on dithiopyrrolone specific productions (Table 1). We observed that about half of the assayed organic acids produced titers of dithiopyrrolone antibiotics lower than that of the control. No or very weak productions of dithiopyrrolones were noticed during cultivation in the presence of some organic acids such as pamoic, benzenesulfonic, syringic and oleic acids. Whereas, the other organic acids supported higher dithiopyrrolone productions than that found in the control. Among the various organic acids tested, thirty-nine organic acids supported thiolutin specific production as compared to the control. It appears from Table 1 that the best used organic acids for thiolutin specific production were maleic, 4-hydroxybenzoic, benzenetetracarboxylic, pantothenic, pivalic and pyruvic acids, which yielded almost 5-fold, over the starting medium. Seven organic acids (malonic, crotonic, 4-chlorobenzoic, benzoic, pimelic, orotic and 4-bromobenzoic acids) were favoured the production of thiolutin by more than 3-fold. Furthermore, 4-bromobenzoic acid showed the best production (more than 20-fold) of SEP (58.69 mg/g DCW). Among all organic acids studied, valeric, methacrylic, tartaric, 4-hydroxybenzoic and pimelic acids revealed the highest SEP production levels (6 to 9-fold). Eight organic acids (veratric, fumaric, crotonic, pantothenic, maleic, succinic, pelargonic and adipic acids) were yielded SEP production ranged from 3 to 6 times. Tiglic acid showed the best production of TIP (22.15 mg/g DCW), yielded almost 8-fold production, followed by tartaric, pimelic, maleic and 4-bromobenzoic acids (about 4-6 fold production). The highest yield of ISP (7.56 mg/g DCW) was observed in the presence of crotonic acid (about 21-fold). Furthermore,

tartaric, maleic, adipic, 3,4-dihydroxybenzoic and sorbic acids enhanced the ISP production by 3-5 fold. Sorbic acid also showed the best production of BUP (26 mg/g DCW). We noticed that methacrylic, butyric, pyruvic and 4-bromobenzoic acids also exhibited the best production of BUP (27 and 11-fold). Some organic acids showed coloration during the batch culture. For example, the coloured compounds (a dark colour) were rapidly formed during incubation in the presence of gallic acid.

### **3.2- Effect of organic acids concentrations on growth and dithiolopyrrolone specific productions**

To study the effect of organic acid concentrations on growth and dithiolopyrrolone specific productions by *Sa. algeriensis*, We selected from the previous experiment the organic acids which considered as precursors or yielded the best dithiolopyrrolone productions (acetic, butyric, tiglic, pimelic and methacrylic acids), and those which exhibited the most negative effect on antibiotic productions (pamoic and ferulic acids). For all assays, to study the effect of the selected organic acids on dithiolopyrrolone specific productions, their concentrations were tested at 1.25, 2.5, 5 and 7.5 mM during 96 h of fermentation.

We observed that the maximum specific growth rate was obtained in the presence of 2.50 mM for pyruvic and ferulic acids ( $0.136\text{ h}^{-1}$  and  $0.124\text{ h}^{-1}$ , respectively) (Fig. 2a, 2b), and in the presence of 5 mM for pimelic acid ( $0.143\text{ h}^{-1}$ ) (Fig. 2b). While, in the case of tiglic, acetic, butyric, methacrylic and pamoic acids, the maximum specific growth rate was  $0.09\text{ h}^{-1}$  (without any addition).

We observed that the  $DCW_{max}$  was slightly favoured by addition of different concentrations of acetic acid (Fig. 3a). The higher values of  $DCW_{max}$  was noticed in the presence of 5 mM tiglic acid (3.50 g/l), 2.5 mM methacrylic acid (3.90 g/l) (Fig. 3a) and 2.5 mM pamoic acid (4.35 g/l) (Fig. 3b). However,  $DCW_{max}$  was more favoured at 1.25 mM pimelic acid (2.72 g/l), 2.50 mM ferulic acid (1.67 g/l) and 7.50 mM for both pyruvic and butyric acids (1.92 and 1.45 g/l, respectively).

In our results, among the selected organic acids, pimelic acid revealed the highest specific productions of thiolutin ( $90.87\text{ mg/g DCW}$ ) at 7.5 mM (Fig. 4a), but at 5 mM for SEP ( $10.62\text{ mg/g DCW}$ ), TIP ( $9.23\text{ mg/g DCW}$ ), and BUP ( $3.47\text{ mg/g DCW}$ ) (Fig. 4b, 4c). Furthermore, We found that with different concentrations of pimelic acid, ISP production was reduced (Fig. 4c).

The assays performed to study the effect of probable precursors on the productions of dithiolopyrrolone derivatives. Our experiment on the effect of possible precursors indicated that the specific production of thiolutin was enhanced at 5 mM by both pyruvic ( $52.74\text{ mg/g DCW}$ ) and methacrylic acids ( $22.03\text{ mg/g DCW}$ ) (Fig. 5a), but a concentration of pyruvic acid more than 5 mM reduced sharply the production. No significant growth or production of thiolutin was observed in the

presence of butyric or tiglic acids whatever the used concentrations (Fig. 5a). We observed that pyruvic acid at 1.25 mM enhanced the production of SEP (4.29 mg/g DCW), but the production decreased after 1.25 mM (Fig. 5b). Maximum production of TIP (18.56 mg/g DCW) was observed in the presence of tiglic acid at 2.5 mM, then decreased to about (12.73 mg/g DCW) at 5 and 7.5 mM (Fig. 5c). Maximum production of ISP (more than 3-fold) was observed in medium containing tiglic acid at 7.5 mM. While, all other organic acids showed negatively effect on the production of ISP (Fig. 5d). Methacrylic acid (at 5 mM) and butyric acid (at 2.5 mM) enhanced the production of BUP (26 times and 20 times, respectively) (Fig. 5e). As shown in Fig. 5, the acetic acid decreased negatively the production of all dithiolopyrrolone derivatives, whatever the used concentrations. Many batch assays were performed with different initial concentrations of pamoic and ferulic acids. The obtained results showed that all dithiolopyrrolone productions decreased as the organic acids (ferulic and pamoic acids) concentrations increased in the culture medium (SSM) (Fig. 6a, 6b, 6c). When *Sa. algeriensis* was supplemented with 5 mM pamoic or ferulic acids, dithiolopyrrolone productions decreased dramatically.

#### 4- Discussion

The production levels of dithiolopyrrolone antibiotics were strongly influenced by addition of organic acids. In bacteria, two enzyme systems could activate short-chain fatty acids to acyl-CoA: the acyl-CoA synthetase system and the acyl-kinase system coupled with acylphosphotransferase. The synthesis of these two enzymatic systems was induced by short-chain fatty acids (Khaoua *et al.*, 1991). These acids are then decarboxylated and converted to their coenzyme A thioesters. The formation of acyl-CoA (acetyl-, isobutyryl-, butanoyl- seneciroyl- and tigloyl-CoA) can then be considered as one of the end steps of dithiolopyrrolone cycle biosynthesis. Consequently, the nature and adequate concentration supply of organic acid, can be key factors affecting the levels of dithiolopyrrolone antibiotic productions.

We showed that some organic acids such as maleic, 4-hydroxybenzoic, benzenetetracarboxylic, pyruvic and pimelic acids revealed maximum dithiolopyrrolone productions. These organic acids may be a considerable source of precursors for dithiolopyrrolone biosynthesis in the microorganism. A variety of unusual carboxylic acids were utilized here as precursors for branched chain fatty acids. Many authors reported that some organic acids can induced the production of the enzymes by microorganisms. For example, syringic acid induced manganase peroxidase in *Ceriporiopsis subvermispota* (Sethuraman *et al.*, 1998).

Some dithiopyrrolones were slightly favoured by addition of some organic acids such as citric and succinic acids for SEP production. Goupil *et al.* (1996) reported that *Lactococcus lactis* efficiently convert citrate to pyruvate. Tanaka *et al.* (1985) showed that succinate is as effective supplier of lower fatty acid precursors. Pyruvate may be further oxidized to acetyl-CoA and serve directly for thiolutin (acetyl-pyrrothine) biosynthesis, but acetic acid does not have a positive effect on thiolutin production. These coincide with Cruz *et al.* (1999), which reported the same effect of acetic acid on pyrazoloisoquinone antibiotic's production by *Streptomyces griseocarneus*. This result suggesting that the type of this organic acid does not affect the specific production of any of the antibiotics.

In addition, tiglic and butyric acids (at 2.5 mM) have strongly positive effect on the production of TIP and BUP, respectively. The presence of different concentrations of these precursors in SSM demonstrated distinct requirements for the optimal production of dithiopyrrolones. Tiglic and butyric acids are decarboxylated and converted to their coenzyme A thioesters; tigloyl-CoA and butanoyl-CoA, respectively (Massey *et al.*, 1976). These organic acids were used directly as precursors in the biosynthesis of dithiopyrrolones and it is reasonable that they are formed selectively in the presence of these organic acids. These results are similar to those found by many authors which reported that the productions of monensins A and B by *S. cinnamonensis*, APHE-1 and APHE-2 by *S. griseocarneus*, erythromycin by *S. erythreus* and spiramycin by *S. ambofaciens* were induced by propionate and butyrate as precursors (Raczynska-Bojanowska *et al.*, 1973; Pospíšil *et al.*, 1985; Khaoua *et al.*, 1991; Cruz *et al.*, 1999).

Tiglic acid was the most suitable for the production of ISP, although there is not a direct relationship between tiglic:  $\text{CH}_3\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOH}$  and isobutyric:  $(\text{CH}_3)_2\text{CHCOOH}$  structures. We propose here an indirect metabolic relationship between these two organic acids (Fig. 7). Furthermore, methacrylic acid has strongly positive effect on BUP production more than that found in the presence of butyric acid. The results, suggest that methacrylic acid is first activated to methacrylyl-CoA by an acyl-CoA synthetase, followed by conversion to isobutyryl-CoA, than to butyryl-CoA in order to give BUP biosynthesis (Fig. 8). This result showed that butyric acid is an important but not exclusive source of organic acid precursors for BUP.

The addition of valeric acid have a positive effect on the production of SEP. Valerate was of additional interest as we predicted that its degradative pathway would occur *via*  $\beta$ -oxidation to propionate (James *et al.*, 1998). Previous studies with *Streptomyces fradiae* showed that methyloleate was considered to be the precursor supplier for the tylosin biosynthesis (Vu-Trang and Gray, 1982). In addition, methyloleate increased the production of polyene H-85 and nigericin by *S. hygroscopicus*, potentially by causing a change in cell membrane permeability (Junker *et al.*, 1998). Although there is a common consensus of opinion on the positive effect of some fatty acids on the



production of antibiotics, the impact of different oils vary greatly in the production of antibiotics (Eiki *et al.*, 1998). Oils are among essential components of industrial fermentation media and have been routinely supplemented into media for the production of secondary metabolites (Hamedi *et al.*, 2004). They have been used as auxiliary carbon sources (Davies *et al.*, 2000) or to provide precursors for antibiotic biosyntheses (Choi *et al.*, 1998). The presence of fatty acid precursors in the medium certainly also influenced the cellular composition of the fatty acids in microorganism (Kaneda 1963).

However, oleic acid has a strongly negative effect on all dithiopyrrolone productions and on growth of *Sa. algeriensis*. The target of the inhibition by free fatty acids is generally considered to be the cytoplasmic membrane, leading to disturbances in cell permeability (Boyaval *et al.*, 1995). Depending upon the specific cultivation, certain fatty acids may be inhibitory, while other can be stimulatory (Junker *et al.*, 1998). The presence of organic acids (as short fatty acids) in the culture medium, can be influenced the cellular composition of the fatty acids in the microorganism (Kaneda 1963), or can be used as a precursors for the secondary metabolite productions.

Various organic acids such as ferulic, pamoic and benzenesulfonic acids have a negative effect on dithiopyrrolone productions. The capacity of microorganisms to assimilate organic acids depends on their ability to produce the enzymes needed for degradation of the substrate. The interference of certain organic acids, or its catabolites, with the synthesis of precursors of dithiopyrrolones is proposed as an important mechanism of depression of dithiopyrrolone biosyntheses. Addition of certain organic acids reduced the growth of the microorganism and causing a decline in viability of bacteria. These organic acids inhibited the production of the antibiotics during batch fermentation primarily by inhibiting the growth of the bacterium rather than by directly inhibiting the pathway for dithiopyrrolone biosyntheses. Moreover, organic acids are believed to inhibit microorganisms by entering the cell in the undissociated form and dissociating in the more alkaline cell interior causing acidification of the cytoplasm and inhibition of cell metabolism (Lueck 1980). Some organic acids, especially benzoic and sorbic acids, are very effective inhibitors of microbial growth and are intentionally added to many foods as preservatives (Hsiao and Siebert, 1999). A strong anti-microbial effect of fumaric acid was found on lactic acid bacteria (Knarreborg *et al.*, 2002). The toxicity of some of the organic acids examined in our study with *Sa. algeriensis* have been previously investigated in other microorganisms. Zemek *et al.* (1979) showed that 0.375 g/l (1.93 mM) of ferulic acid inhibited 100 % the growth of *Bacillus liqueniformis*, *Candida albicans*, *Micrococcus luteus* and *E. coli*. Less inhibition was observed with acetic, caproic, syringic and gallic acids (Zaldivar and Ingram, 1999). Furthermore, it was showed that gallic acid inhibited the production of nigerloxin in *Aspergillus niger* (Rao *et al.*, 2005).

The culture medium in the presence of gallic acid was transformed to the black colour. It is possible that the coloration is due to the oxidation of these organic acids to the other compounds. These coincide with Zaldivar and Ingram (1999), which reported the same remark, gallic acid was particularly unstable and rapidly formed dark compounds during incubation. The HPLC profile showed the apparition of many products (data not shown), it is possible that the apparent colour results were in part from these reaction products.

Ferulic and pamoic acids appeared to exert catabolite repression or inhibition, they supported growth (in the case of pamoic acid at 2.50 mM) but not dithiopyrrolone productions. These observations probably reflect repression of secondary metabolism by these organic acids, presumably due to a lower rate of assimilation of these organic acids for the biosynthesis of secondary metabolites. The addition of these organic acids would lead to repression of certain genes, provoking an important diminution of antibiotic productions. This finding was in accordance to observations by Sethuraman *et al.* (1998), who had previously reported that 5 mM ferulic acid was considerably toxic to *Ceriporiopsis subvermispora*. Brunati *et al.* (2004) reported that ferulic acid was degraded with transient accumulation of vanillic acid.

The conditions used in this study were considered satisfactory for the production of dithiopyrrolone derivatives. Moreover, they are important information batch process when choosing the best industrial fermentation conditions if the aim is to produce dithiopyrrolones from *Sa. algeriensis*. It is now possible, in our case, to improve antibiotic titer and alter product profiles by direct metabolic manipulation of metabolite-producing microorganisms. Additionally, we observed that *Sa. algeriensis* produced the novel dithiopyrrolones when supplied with some organic acids (data not shown). Further studies on the characterization of these novel dithiopyrrolones are currently underway in our laboratory.

## 5- References

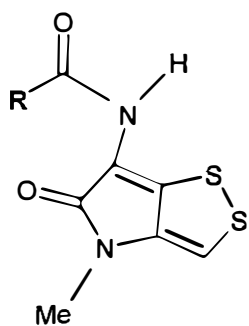
- Bouras, N., Mathieu, F., Sabaou, N. and Lebrihi, A. (2005). Effect of amino acids containing sulfur on dithiopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. J. Appl. Microbiol., In Press.
- Boyaval, P., Corre, C., Dupuis, C. and Roussel, E. (1995). Effects of free fatty acids on propionic acid bacteria. *Lait*, 75, 17–29.
- Brunati, M., Marinelli F., Bertolini, C., Gandolfi, R., Daffonchio, D. and Molinari, F. (2004). Biotransformations of cinnamic and ferulic acid with actinomycetes. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(1), 3-9.
- Choi, K.I., Cha, J.H., Pae, A.N., Kim, Y., Chang, M.H., Park, S.Y., Kim, D., Jeong, D.Y., Kim, Y.H., Kong, J.Y. and Koh, H.Y. (1998). Studies on novel 3-isoxazolylvinyl-cephalosporins: II. Synthesis and biological activity of 7-[2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-hydroxy-iminoacetamido] derivatives. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 51(12),1122-5.
- Cruz, R., Arias, M.E. and Soliveri, J. (1999). Nutritional requirements for the production of pyrazoloisoquinolinone antibiotics by *Streptomyces griseocarrneus* NCIMB 40447, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 115-119.
- Davies, J.L., Baganz, F., Ison, A.P., Lye, G.J. (2000). Studies on the interaction of fermentation and microfiltration operations: erythromycin recovery from *Saccharopolyspora erythraea* fermentation broths. *Biotechnol. Bioeng.*, 69, 429-439.
- Deb, P.R., Dutta, B.K. (1984). – Activity of thiolutin against certain soil-borne plant pathogen. *Curr. Sci.*, 53, 659-660.
- Eiki, H., Gushima, H., Saito, T., Ishida, H., Oka, Y. and Osono, T. (1998). Product inhibition and its removal on josamycin fermentation by *Streptomyces narbonensis* var. *josamyceticus*. *J. Ferment. Technol.*, 66, 559-565.
- Goupil, N., Corthier, G., Ehrlich, S.D and Renault, P. (1996). Imbalance of leucine flux in *Lactococcus lactis* and its use for the isolation of diacetyl-overproducing strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(7), 2636-40.
- James, A.G., Watson-Craik, I.A. and Senior, E. (1998). The effect of organic acids on the methanogenic degradation of the landfill leachate molecules butyrate and valerate. *Water Research*, 32, 792-800.

- Junker, B.; Mann, Z.; Galliot, P.; Byrne, K. and Wilson, S. (1998). Use of soya bean oil and ammonium sulphate to optimize secondary metabolite production. *Biotech Bioeng* 60, 580-588.
- Hamed, J., Malekzadeh, F. and Saghafi, A.E. (2004). Enhancing of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* with common and uncommon oils. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31(10), 447-56.
- Hsiao, C-P., and Siebert, K.J. (1999). Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 189-201.
- Kaneda, T. (1963). Biosynthesis of branched chain fatty acids. II. Microbial synthesis of branched long chain fatty acids from certain short chain fatty acid substrates. *J. Biol. Chem.*, 4, 1229-1235.
- Khaoua, S., Lebrihi, A., Germain, P. and Lefebvre, G. (1991). Cephamycin C biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 253-257.
- Knarreborg, A., Engberg, RM, Jensen, SK, and Jensen, B.B. (2002). Tative determination of bile salt hydrolase activity in bacteria isolated from the small intestine of chickens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(12), 6425-8.
- Lamari, L., Zitouni, A., Dob, T., Sabaou, N., Lebrihi, A., Germain, P., Seguin, E. and Tillequin, F. (2002). New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. II. Physicochemical properties and structure elucidation. *J. Antibiot. (Tokyo)* 55, 702-706.
- Lueck, E. (1980). *Antimicrobial food additives: characteristics, uses, effects.* Springer, Berlin, p. 280.
- Massey, L.K., Sokatch, J.R. and Conard, S.R. (1976). Branched-chain amino acid catabolism in bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 40, 42-54.
- McInerney, B.V., Gregson, R.P., Lacey, M.J., Akhurst, R.J., Lyons, G.R., Rhodes, S.H., Smith, D.R.J., Engelhardt, L.M. and White, A.H. (1991). Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part I. Dithiolopyrrolone derivatives with antibiotic activity. *J. Nat. Prod.* 54, 774-784.
- Okamura, K., Soga, K., Shimauchi, Y., Ishikura, T. and Lein, J. (1977) Holomycin and n-propionyl-holothin, antibiotics produced by a cephamycin C producer. *J. Antibiot. (Tokyo)* 30, 334-336.
- Pfefferle, C., Theobald, U., Gürtler, H. and Fiedler, H-P. (2000). Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *J. Biotechnol.*, 80, 135-142.

- Pospíšil, S., Cimburkova, E., Krumphanzl, V. and Vanek, Z. (1985). Effect of precursors on biosynthesis of monensins A and B. *Folia Microbiol. (Praha)*, 30(1), 30-3.
- Raczynska-Bojanowska, K., Ruczaj, Z., Sawnor-Korszynska, D. and Rafalski, A. (1973). Limiting reactions in activation of acyl units in biosynthesis of macrolide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 3, 162-167.
- Rao, K.C.S., Karanth, N.G., Sattur, A.P. (2005). Production of nigerloxin, an enzyme inhibitor and a free radical scavenger, by *Aspergillus niger* using solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 40, 2517-2522.
- Sethuraman, A., Akin, D.E., Eisele, J.G. and Eriksson, K-E.L. (1998). Effect of aromatic compounds on growth and ligninolytic enzyme production of two white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispora* and *Cyathus stercoreus*. *Can. J. Microbiol.*, 44, 872-885.
- Shiozawa, H., Shimada, A. and Takahashi, S. (1997). Thiomarinols D, E, F and G, new hybrid antimicrobial antibiotics produced by a marine bacterium; isolation, structure, and antimicrobial activity. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 50, 449-452.
- Šturdíková, M., Proška, B., Uhrín, D. and Fůska, J. (1990). Regulation of biosynthesis of thiolutin and aureothricin in *Streptomyces kasugaensis*. *Folia Microbiol. (Praha)*, 35, 278-283.
- Tanaka, Y., Taki, A., Masuma, R. and Omura, S. (1985). – Mechanism of nitrogen regulation of protylonolide biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *J. Antibiot.*, 39, 813-821
- Vu-Trang, K. and Gray, P.P. (1982). Continuous culture studies on the regulation of tylosin biosynthesis. *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 1093-1103.
- Webster, J.M., Chen, G., Hu, K. and Li, J. (2002) Bacterial metabolites, *in: Entomopathogenic Nematology*, R. Gaugler (ed.). CAB International. p 99-114.
- Webster, J.M., Li, J. and Chen, G. - Anticancer property of dithiolopyrrolones, U.S. Patent 6,020,360, 2000.
- 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.

- Zaldivar, J. and Ingram, L.O. (1999). - Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnol. Bioeng.*, 66(4), 203-210.

- Zemek, J., Kosikova, B., Augustin, J. and Joniak, D. (1979). - Antibiotic properties of lignin components. *Folia Microbiol. (Praha)*, 24(6), 483-486.



$R = \text{CH}_3$	Thiolutin.
$R = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$	Isobutyryl-pyrrothine (ISP).
$R = (\text{CH}_2)_2\text{-CH}_3$	Butanoyl-pyrrothine (BUP).
$R = \text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$	Senecioyl-pyrrothine (SEP).
$R = \text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}(\text{CH}_3)$	Tigloyl-pyrrothine (TIP).

**Fig. 1**

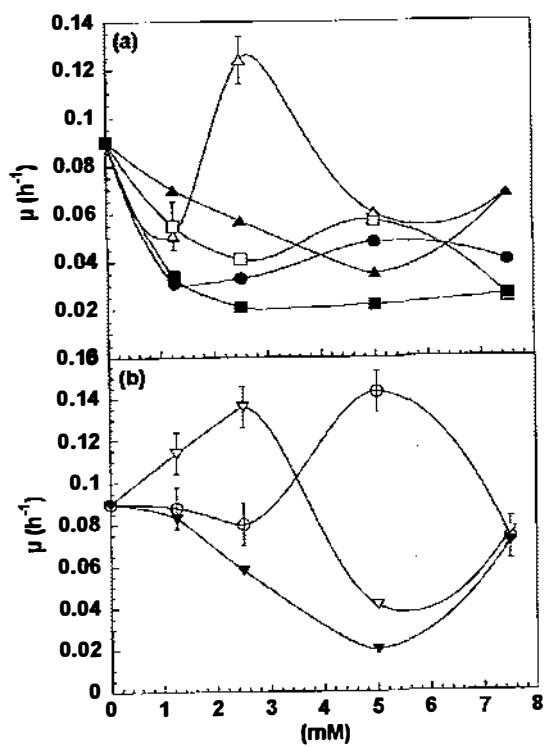


Fig. 2

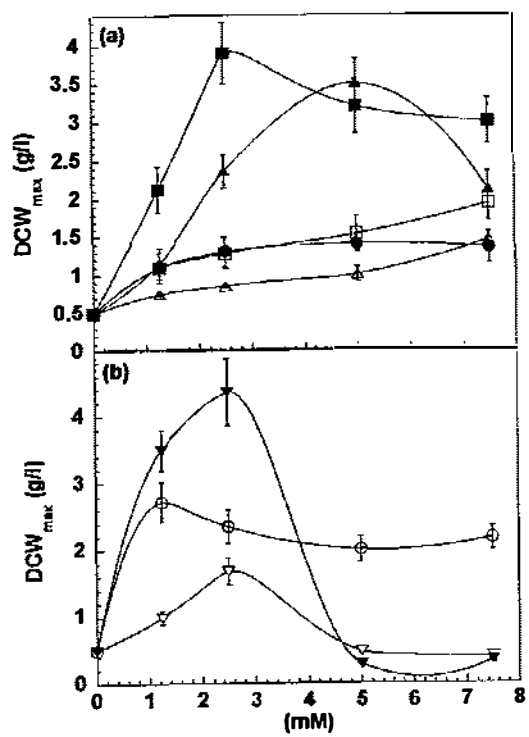


Fig. 3

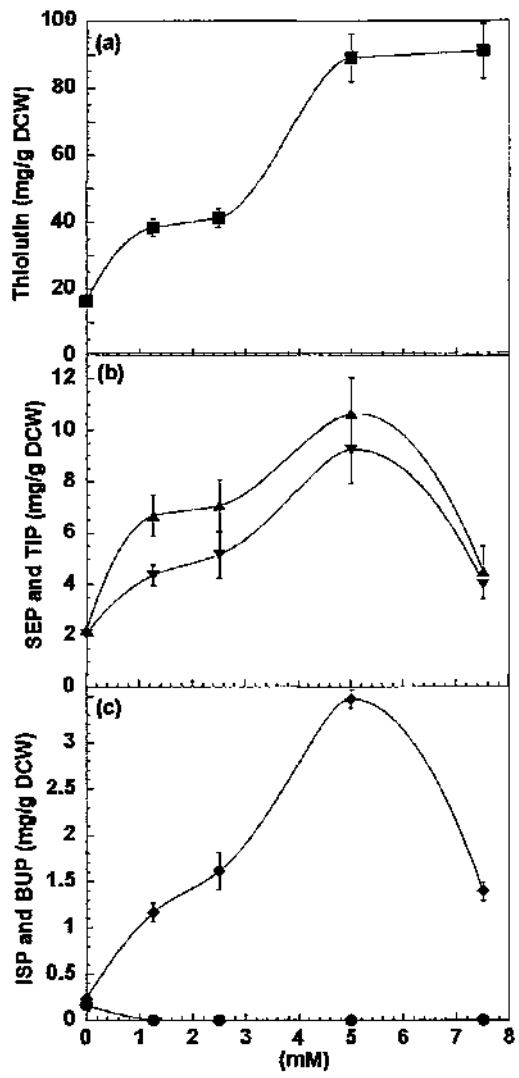


Fig. 4



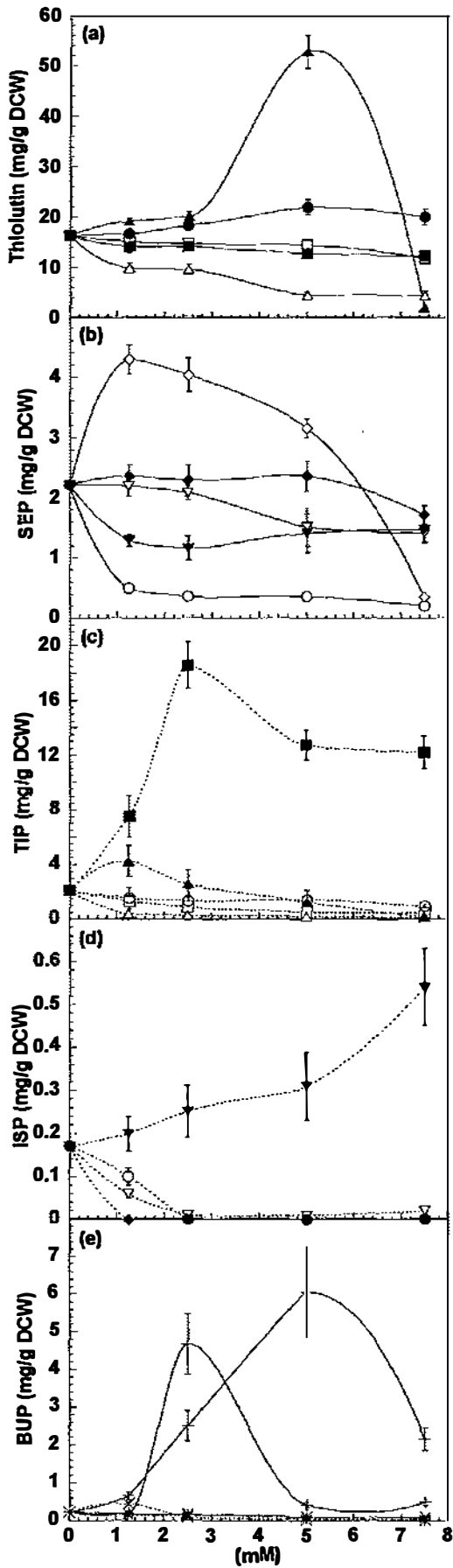


Fig. 5

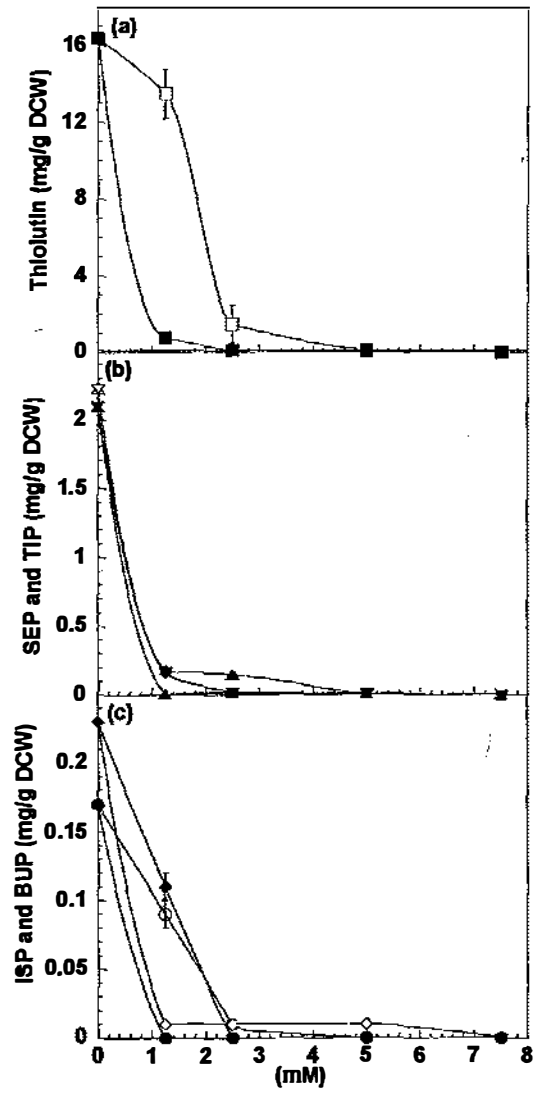
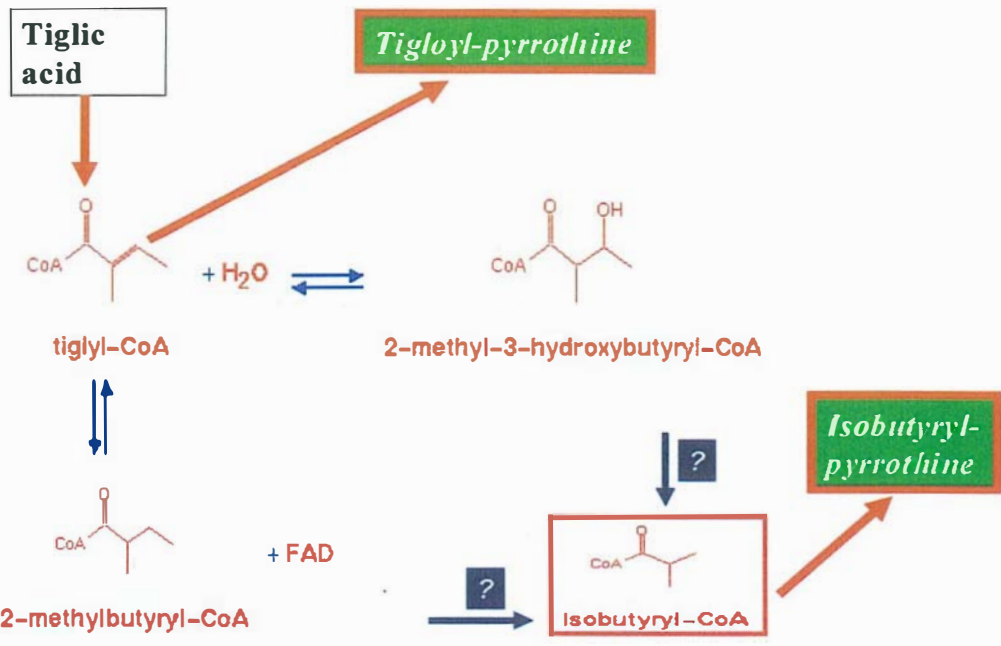
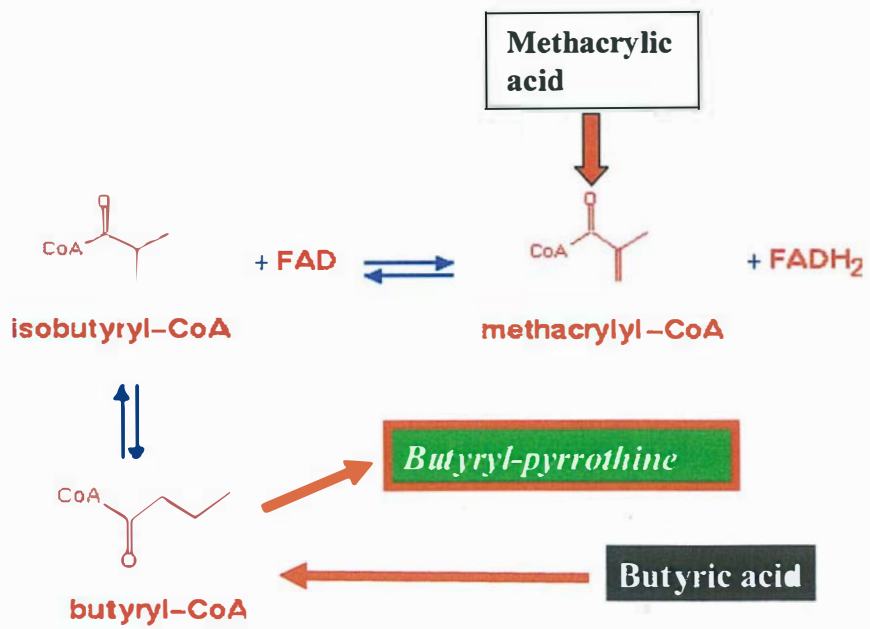


Fig. 6



**Fig. 7**



**Fig. 8**

**Table 1.** Effect of 5 mM of different organic acids sources on growth (DCW), pH and dithiolopyrrolone specific productions by *Sa. algeriensis* in batch culture. Specific dithiolopyrrolone productions are given as mg per g of biomass at 72 h of fermentation.

Organic acids <sup>a</sup>	DCW (g/l) <sup>b</sup>	PH at 72 h	Dithiolopyrrolone specific productions (mg/g DCW) <sup>c</sup>				
			Thiolutin	ISP	BUP	SEP	TIP
Control	0.615	8.18	16.17	0.35	0.22	2.84	2.99
Oleic	0.355	8.30	0.02	ND <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>	0.14	0.08
Pamoic	0.250	8.27	0.05	ND <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>	0.02	0.02
Na-Benzenesulfonate	0.225	8.33	0.08	ND <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>
Trifluoroacetic	0.755	8.14	0.09	0.52	0.07	7.15	0.90
Syringic	0.425	8.25	0.11	ND <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>
Calconcarboxylic	0.412	8.15	0.14	ND <sup>f</sup>	0.24	0.21	0.02
Trichloroacetic	0.745	8.34	0.29	ND <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>	0.21	0.02
Ferulic	0.450	8.59	0.31	ND <sup>f</sup>	1.51	1.22	0.11
3,5-Dinitrosalicylic	0.745	7.98	0.38	ND <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>
Phenylacetic	0.805	8.07	0.45	0.45	ND <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>	0.07
Deoxycholic	0.432	8.27	0.50	ND <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>
Caffeic	0.685	8.09	0.62	ND <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>	0.05	1.22
Na-Oxalate	1.115	8.65	0.73	ND <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>	0.46	0.06
PAB <sup>d</sup>	0.795	8.19	0.81	0.03	ND <sup>f</sup>	0.23	1.24
2,4-Dihydroxybenzoic	0.325	8.39	0.83	ND <sup>f</sup>	ND <sup>f</sup>	0.49	ND <sup>f</sup>
Ellagic	0.575	8.21	1.42	ND <sup>f</sup>	0.01	0.64	0.19
Galacturonic	0.600	7.93	2.16	0.01	ND <sup>f</sup>	0.66	0.13
Chlorogenic	0.612	7.67	3.00	ND <sup>f</sup>	0.01	0.75	ND <sup>f</sup>
3-Hydroxy-4-methoxymandelic	0.675	8.26	3.03	0.02	0.07	3.05	0.66
Mandelic	0.915	8.42	3.42	0.01	0.05	0.26	0.25
Salicylic	0.715	8.02	3.55	0.05	ND <sup>f</sup>	0.64	0.27
Na-Propionate	0.935	8.12	3.66	0.16	0.08	3.64	3.05
Mucic	0.695	7.86	3.79	0.02	0.07	1.82	0.77
Hippuric	0.725	8.28	4.31	0.01	0.06	0.33	0.31
2,5-Dihydroxybenzoic	0.625	8.16	4.72	0.04	ND <sup>f</sup>	0.36	0.91
<i>m</i> -Coumaric	0.815	8.10	5.23	0.01	0.06	0.28	0.39
Acetylsalicylic	0.590	7.98	6.25	0.08	0.01	0.84	0.28
4-Hydroxy-3methoxymandelic	0.610	8.32	6.59	0.03	0.01	0.42	0.98
Citramalic	0.585	8.03	6.99	0.01	0.03	0.82	0.37
Sorbic	1.275	8.05	7.02	1.00	26	1.86	1.15
Valeric	0.885	8.31	7.14	ND <sup>f</sup>	0.07	26.27	0.21
Succinic	0.955	8.53	9.23	0.08	0.18	9.23	1.82
Na-Acetate	0.995	8.09	9.92	0.26	0.15	0.53	0.23
Phenylactic	0.650	7.80	10.01	0.04	0.13	2.87	1.30
Tiglic	1.450	7.99	10.61	0.52	0.15	1.90	22.15
3,4-Dihydroxybenzoic	0.885	7.99	10.84	1.31	ND <sup>f</sup>	3.58	2.18
Phthalic	0.725	7.83	10.97	0.05	0.22	2.12	1.86
Citric	0.835	8.78	11.60	0.04	0.10	4.10	1.01
2,3-Dihydroxybenzoic	0.605	8.02	11.73	0.11	0.08	2.87	1.88
Ascorbic	0.810	8.11	12.20	0.07	0.04	3.18	1.69
3-Hydroxybenzoic	0.955	8.32	12.77	0.06	0.06	0.29	1.21
Nicotinic	0.895	8.35	13.18	0.01	0.08	2.44	1.69
Na-Butyrate	0.985	8.26	14.23	0.02	3.27	2.44	0.69
4-Sulfamoylbenzoic	0.895	8.17	14.29	0.16	0.20	5.10	1.51
Vanillic	0.985	8.16	16.03	0.07	0.20	2.27	3.78
<i>p</i> -Coumaric	0.725	7.77	16.81	0.02	0.08	3.06	0.57
Shikimic	0.700	7.97	17.12	0.08	0.24	0.14	1.57
2,6-Dihydroxybenzoic	0.875	8.01	18.06	0.13	0.18	7.17	3.16
<i>o</i> -Coumaric	0.795	7.89	18.31	ND <sup>f</sup>	0.02	0.06	0.08
3,5-Dihydroxybenzoic	1.015	8.30	18.78	0.20	0.20	0.50	2.14
Gallic	0.615	7.73	19.69	0.08	0.19	1.12	1.73
Pelargonic	0.855	8.15	24.19	ND <sup>f</sup>	0.14	12.80	4.38
Adipic	0.955	8.30	24.51	1.36	0.82	10.99	6.63

Aurine tricarboxylic	0.815	7.95	25.05	0.41	0.09	4.35	1.22
Tartaric (dihydrate)	0.995	8.28	29.21	1.64	0.69	19.09	16.65
Glucuronic	0.605	7.76	29.85	0.04	0.24	3.45	2.46
Malic	0.945	7.93	32.57	ND <sup>f</sup>	0.19	2.32	2.23
Lactic	0.885	8.16	33.84	0.65	0.23	6.63	1.51
Isonicotinic	0.635	8.05	33.95	ND <sup>f</sup>	0.15	3.30	1.22
Methacrylic	0.990	8.16	35.02	0.21	6.03	21.76	2.29
Sebacic	0.875	8.20	35.20	0.09	0.80	6.48	9.56
Homovanillic	0.650	7.78	35.53	0.10	0.13	1.81	1.18
EDTA <sup>c</sup>	0.625	7.94	35.90	0.03	0.17	0.91	0.84
Na-3 Sulfobenzoic	0.915	8.27	35.92	0.32	0.54	6.42	3.02
5-Sulfosalicylic	0.905	7.78	39.43	ND <sup>f</sup>	0.13	0.54	0.75
Formic	0.630	7.98	40.26	0.25	0.15	4.82	2.03
Cinnamic	1.895	8.39	40.94	0.08	0.27	1.75	1.77
Veratric	0.955	8.28	42.30	0.51	0.51	9.37	4.59
Terephthalic	0.695	8.20	42.93	0.20	0.66	6.76	4.53
Fumaric	0.975	8.46	44.45	0.75	0.56	12.00	7.50
Malonic	0.980	8.27	54.26	ND <sup>f</sup>	0.41	8.23	8.40
Crotonic	1.120	8.13	57.33	7.56	0.52	5.74	1.61
4-Chlorobenzoic	0.885	8.42	57.54	0.03	0.25	4.19	1.44
Benzoic	1.290	8.15	58.24	0.03	0.29	0.50	0.71
Pimelic	1.305	8.22	59.02	0.33	0.55	16.97	13.14
Orotic	0.875	8.11	61.68	0.24	0.77	6.48	6.14
4-Bromobenzoic	1.555	8.33	68.97	0.16	2.60	58.69	10.98
Na-Pyruvate	0.995	8.25	70.05	0.35	3.07	4.67	3.56
Pivalic	1.025	8.18	70.14	0.41	0.44	7.42	3.60
Pantothenic, Ca salt	1.100	8.18	70.75	0.44	1.61	9.54	6.03
1,2,4,5-Benzenetetracarboxylic	0.825	7.56	71.12	0.23	0.72	6.90	5.55
4-Hydroxybenzoic	0.975	7.96	72.24	0.45	0.73	19.86	6.28
Maleic	0.975	8.33	73.61	1.62	0.63	15.06	14.09
LSD	0.639	0.579	16.330	0.370	0.668	3.027	3.123

<sup>a</sup> Each organic acid was added to the medium at a final concentration of 5 mM. <sup>b</sup> Mycelial biomass is given as g of dry weight per liter of culture broth at 72 h of fermentation. <sup>c</sup> Dithiolopyrrolone specific productions were determined at 72 h fermentation. <sup>d</sup> Ethylenediaminetetraacetic acid. <sup>e</sup> Paraaminobenzoic acid. <sup>f</sup> Dithiolopyrroone not detectable. The organic acids are ranked in order of thiolutin production. Values are averages  $\pm$  SD of two experiments. LSD: Fisher's Least Significantly Difference at probability level ( $P < 0.05$ ).

## Legends of figures

**Fig. 1.** Structure of dithiopyrrolone antibiotics.

**Fig. 2.** Effect on specific growth rate by increased initial concentration of (a): acetic (□), butyric (■), pyruvic (Δ), methacrylic (▲) and tiglic (●) acids, (b): pimelic (○), ferulic (∇) and pamoic (▼) acids. Specific growth rate are given at the time of maximal growth rate during 96 h of fermentation. Vertical bars denote standard deviations.

**Fig. 3.** Effect on maximal dry cell weight by increased initial concentration of (a): pyruvic (□), methacrylic (■), butyric (Δ), tiglic (▲) and acetic (●) acids, (b): pimelic (○), ferulic (∇) and pamoic (▼) acids. Maximal dry cell weight are given at the time of maximal dry cell weight during 96 h of fermentation. Vertical bars denote standard deviations.

**Fig. 4.** Effect of increased initial concentration of pimelic acid addition at different concentrations on (a): specific production of thiolutin (■), (b): specific productions of SEP (▲) and TIP (▼), (c): specific productions of ISP (●) and BUP (◆). Specific dithiopyrrolone productions are given as mg per g of biomass at the time of maximal productions during 96 h of fermentation. Vertical bars denote standard deviations.

**Fig. 5.** Effect of increased initial concentration of butyric, tiglic, acetic, pyruvic and methacrylic acids addition at different concentrations on (a): specific production of thiolutin (□, ■, Δ, ▲, ●, continuous lines), (b): specific productions of SEP (∇, ▼, ○, ◇, ◆, continuous lines), (c): specific productions of TIP (□, ■, Δ, ▲, ○, dotted lines), (d): specific productions of ISP (∇, ▼, ○, ◇, ◆, dotted lines), (e): specific productions of BUP (+ continuous lines, + dotted lines, x continuous lines, x dotted lines, - continuous lines). Specific dithiopyrrolone productions are given as mg per g of biomass at the time of maximal productions during 96 h of fermentation. Vertical bars denote standard deviations.

**Fig. 6.** Effect of increased initial concentration of ferulic acid and pamoic acid addition at different concentrations on (a): specific production of thiolutin (□, ■), (b): specific productions of SEP (Δ, ∇) and TIP (▲, ▼), (c): specific productions of ISP (○, ●) and BUP (◇, ◆). Specific dithiopyrrolone productions are given as mg per g of biomass at the time of maximal productions during 96 h of fermentation. Vertical bars denote standard deviations.

**Fig. 7.** Tiglic acid metabolism in *Sa. algeriensis*.

**Fig. 8.** Methacrylic acid metabolism in *Sa. algeriensis*.

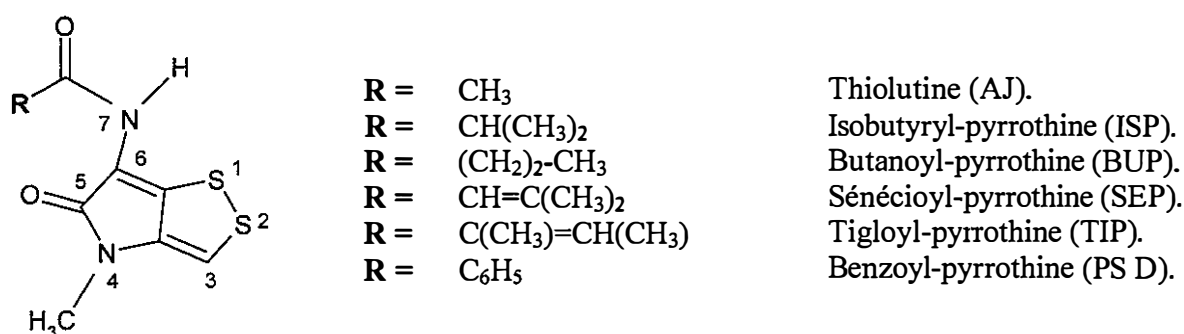
## **CHAPITRE IV.**

# **REGULATION DE LA PRODUCTION DES NOUVELLES DITHIOLOPYRROLONES CHEZ *SACCHAROTHRIX ALGERIENSIS* NRRL B-24137 PAR LES ACIDES ORGANIKUES ET LES ACIDES AMINES**

## I.- INTRODUCTION

Les dithiopyrrolones sont formées d'un noyau pyrrothine sur lequel est fixé un radical carboxylé (CO-R). L'acide organique est transformé en acyl-CoA; par la suite, la réaction avec le noyau pyrrothine ( $C_6H_4NOS_2-NH_2$ ) aboutirait à la formation de différents dérivés selon le type de radical greffé. C'est le cas des acides acétique, isobutyrique, butyrique, sénéciolique, tiglique et benzoïque, pour la thiolutine, l'isobutyryl-pyrrothine (ISP), la butanoyl-pyrrothine (BUP), la sénécioloyl-pyrrothine (SEP), la tigloyl-pyrrothine (TIP) et la benzoyl-pyrrothine, respectivement, lesquelles sont produites par *Sa. algeriensis* (figure 14). De même, certains acides aminés, comme la cystéine et la cystine, peuvent se révéler être des précurseurs du noyau pyrrothine. En considérant donc toutes ces données, nous avons essayé, dans la présente étude, d'induire la biosynthèse de nouvelles dithiopyrrolones chez *Sa. algeriensis* en ajoutant au milieu MSS des acides organiques et des acides aminés. Les molécules nouvellement sécrétées ont été caractérisées par leur temps de rétention en HPLC et leur spectre UV-visible, ainsi que pour certaines, par leur spectre de masse.

Nous signalons que l'appellation "nouvelles dithiopyrrolones" désigne dans notre cas les dithiopyrrolones non connues pour être produites par *Sa. algeriensis* et pouvant être originales ou déjà décrites chez d'autres espèces microbiennes, ainsi que des molécules apparentées pouvant être des intermédiaires dans la biosynthèse de ces antibiotiques. La liste détaillée des structures de tous les acides organiques et aminés induisant la production de nouvelles molécules est donnée en annexe 2.



**Figure 14.** Dithiopyrrolones produites par *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137.

## II.- RESULTATS

### 1.- Induction de nouvelles dithiopyrrolones par l'addition de certains acides organiques et acides aminés

Le profil d'élution en HPLC des dithiopyrrolones sécrétées par *Sa. algeriensis* dans le milieu semi-synthétique MSS (considéré comme témoin), ainsi que les spectres UV-visible de ces molécules, sont présentés dans la figure 15. Dans ce profil, nous distinguons la thiolutine (temps de rétention = TR = 11,02 min), l'isobutyryl-pyrroline ou ISP (TR = 13,42 min), la butanoyl-pyrroline ou BUP (TR = 14,02 min), la tigloyl-pyrroline ou TIP (TR = 15,39 min) et la sénéciol-pyrroline ou SEP (TR = 16,32 min). La benzoyl-pyrroline a, selon Lamari *et al.* (2002b) un temps de rétention de 16,64 min et un spectre UV-visible avec des maxima d'absorption de 234, 310 et 399 nm. Cette molécule, nommée PS D par ces auteurs, est produite à l'état de traces seulement sur milieu complexe ISP 2 (à base d'extrait de malt, d'extrait de levure et de glucose) et est pratiquement absente sur milieu MSS comme c'est le cas dans nos expérimentations. De ce fait, l'apparition en quantité appréciable de PS D est considéré dans notre cas comme apparition d'une nouvelle molécule chez *Sa. algeriensis*.

Nous avons testé 83 acides organiques et 20 acides aminés (initialement, à une concentration de 5 mM) ajoutés dans le milieu de culture MSS. En plus, nous avons testé l'acide humique (initialement, à une concentration de 1 g/L). Les prélèvements ont été effectués après 72 h de fermentation. Nos résultats montrent qu'un certain nombre de ces acides organiques et acides aminés favorise effectivement la production de nouvelles molécules. Nous avons obtenu au total dix-huit principales nouvelles dithiopyrrolones. Les résultats obtenus ont montré que la majorité des molécules nouvellement apparues possèdent un spectre d'absorbance UV-visible très proche de celui des dithiopyrrolones déjà caractérisées telles que la thiolutine, l'ISP, la BUP, etc. Les similarités observées dans les spectres UV-visible (maxima d'absorption caractéristique entre 387 à 420 nm) indiquent qu'on est en présence de molécules appartenant au même groupe des dithiopyrrolones. Parmi les nouvelles molécules induites, seize ont une couleur jaune pâle, jaune vif à jaune orangé et deux autres (PR 1 et PR 2), rose pâle.

Parmi les 18 molécules, six possèdent un spectre UV-visible un peu particulier: PR 1 et PR 2 (maximum caractéristique à 302 nm), PR 17,65 (maximum caractéristique à 307 nm) et PR 10,55, PR 10,93 et PR 11,02 (maxima à 220, 258-260 et un double maximum entre 340 et 390 nm).



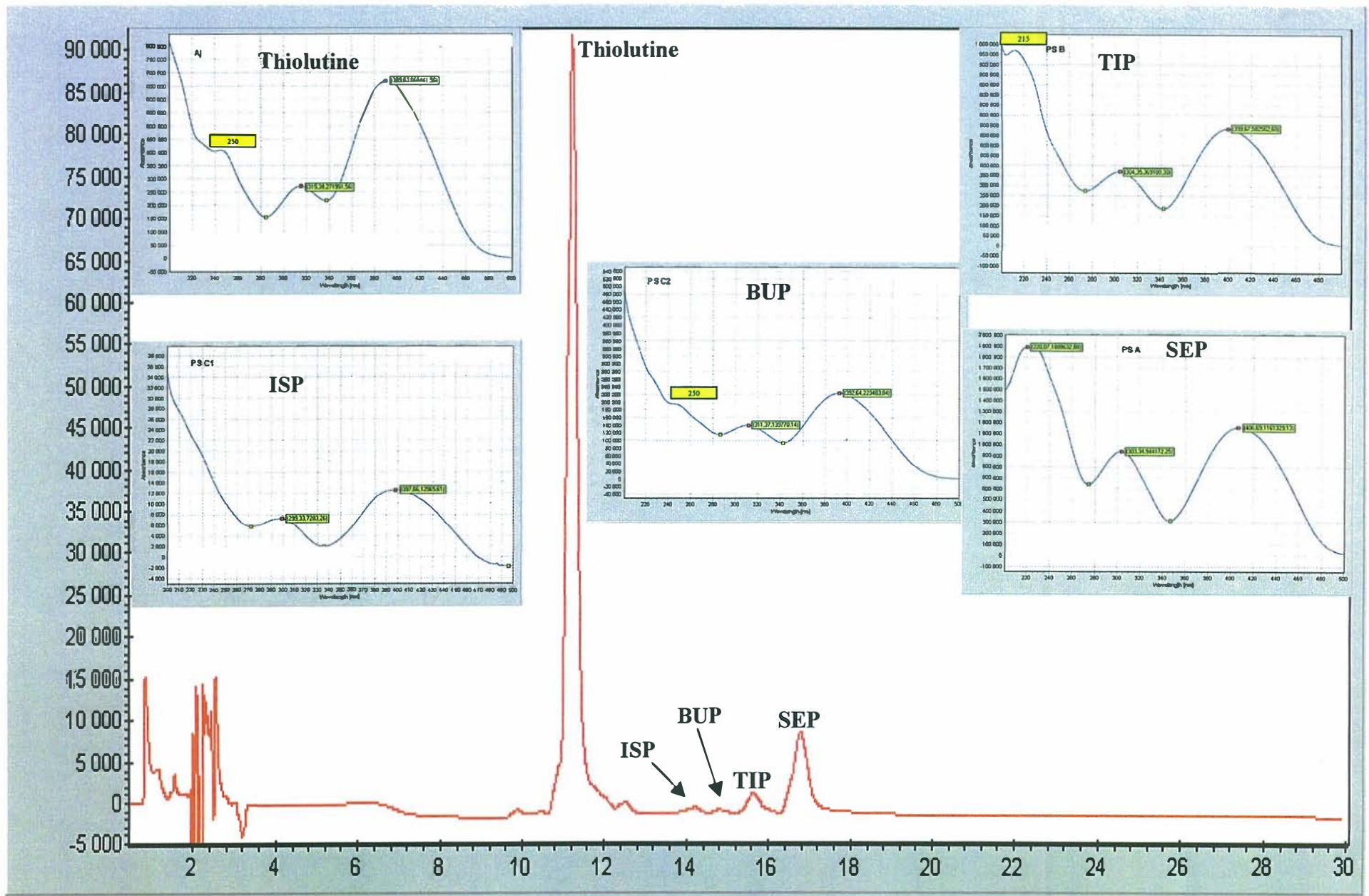


Figure 15. Profil d'éluion en HPLC et les dithiopyrrolones synthésées par *Saccharothrix algeriensis* avec les spectres d'absorption dans l'UV-visible.

Ces molécules pourraient être des dithiopyrrolones particulières ou encore des précurseurs ou des intermédiaires de biosynthèse. La liste des nouvelles molécules induites, les maxima d'absorbance dans l'UV-visible et les temps de rétention sont donnés dans le tableau 6.

**Tableau 6.** Liste de nouvelles molécules induites par l'addition de certains acides organiques et aminés, ainsi que leurs maxima d'absorbance dans l'UV-visible et leurs temps de rétention.

Nouvelles molécules	Spectres d'absorption UV-visible (en nm)	Temps de rétention
AJ 00	242, 306, 387	9,72
AJ 0	250, 306, 387	10,02
PR 10,29	242, 287, 391	10,29
PR 10,55	220, 259, 347, 390	10,55
AJ 1	236, 310, 389	10,80
PR 10,93	220, 260, 350, 388	10,93
PR 11,02	220, 258, 320, 390	11,02
PR 1	230, 302, 390	11,74
PR 2	230, 302, 368	11,96
PR 3	250, 312, 391	12,34
PR 14,60	230, 304, 398	14,60
PR 16,16	250, 314, 392	16,16
PR 16,64 (PS D)	234, 310, 399	16,64
PR 16,85	285, 325, 420	16,85
PR 17,65	250, 307, 392	17,65
PR 17,90	226, 304, 407	17,90
PR 19,57	241, 312, 404	19,57
PR 20,10	250, 317, 405	20,10

Après analyse des résultats, nous avons classé les acides organiques et aminés qui ont favorisé l'apparition de nouvelles molécules en trois groupes distincts: les acides organiques cycliques, les acides organiques aliphatiques et les acides aminés. Il est à rappeler que les autres acides organiques et aminés qui n'ont pas favorisé la production de nouvelles dithiopyrrolones ont fait l'objet de l'article 1 et des projets d'articles 2 et 3.

### ***1.1- Acides organiques cycliques induisant la production de nouvelles dithiopyrrolones***

Ce groupe a été subdivisé en deux sous-groupes: celui des acides qui induisent la formation de AJ 1 et/ou de PR 16,64 et celui des acides qui favorisent diverses autres dithiopyrrolones.

### 1.1.1- Acides organiques cycliques induisant la formation de AJ 1 et/ou PR 16,64

Les résultats sont présentés dans le tableau 7.

**Tableau 7.** Acides organiques cycliques induisant AJ 1, PR 16,64 et autres dithiopyrrolones.

Acides organiques cycliques	Productions spécifiques des dithiopyrrolones (mg/g PS)						
	Thiolutine	AJ 1	PR 14,60	PR 16,64	PR 17,65	PR 19,57	PR 20,10
Témoin	16,17	0	0	0	0	0	0
Benzoïque	58,24	0,2	2,12	8,66	0,1	0	0
3-Hydroxybenzoïque	12,77	0,40	0	1,53	0	0	0
3,5-Dihydroxybenzoïque	18,78	0,61	0	0,76	0	0	0
4-Bromobenzoïque	68,97	0,3	0	0	0	0	6,05
4-Chlorobenzoïque	57,54	1,27	0	0,53	0	3,95	0
5-Sulfosalicylique	39,43	2,11	0	0,07	0	0	0
<i>p</i> -Aminobenzoïque	0,81	0,61	0	0,12	0	0	0
Mandélique	3,42	0,05	0	12,56	0	0	0
Cinnamique	40,94	4,03	0	18,34	0,6	0	0
<i>o</i> -Coumarique	18,31	0,12	0	0,03	0	0	0
<i>m</i> -Coumarique	5,23	0,06	0	0,09	0	0	0
Hippurique	4,31	0,35	0	14,80	0	0	0

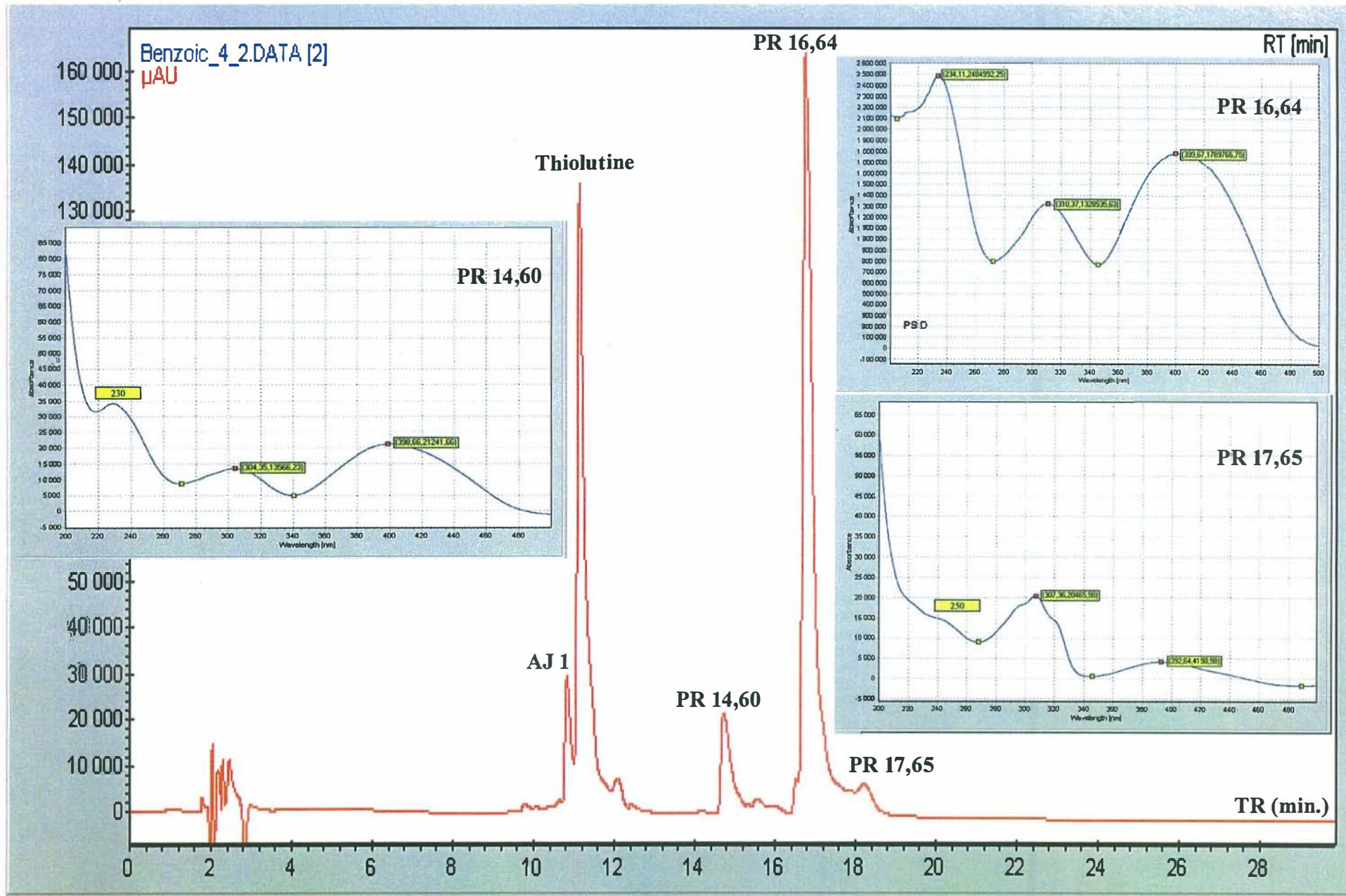
Ces acides sont des composés dérivés du benzène et de la coumarine.

Ils ont tous la particularité d'induire la formation de deux dithiopyrrolones: AJ 1 et PR 16,64 à l'exception de l'acide 4-bromobenzoïque qui induit uniquement la dithiopyrrolone AJ 1. La quantité de AJ 1 peut être très faible (0,05 mg/g PS dans le cas de l'acide mandélique) à appréciable (4,03 mg/g PS dans le cas de l'acide cinnamique). La production de PR 16,64 peut être très faible (0,03 mg/g PS pour l'acide *o*-coumarique) ou importante (18,34, 14,80, 12,56 et 8,66 mg/g PS pour les acides cinnamique, hippurique, mandélique et benzoïque, respectivement). L'acide 4-bromobenzoïque est la seule exception, dans le sens qu'il induit AJ 1 (0,3 mg/g PS) mais pas PR 16,64 qui est par contre remplacée par une production appréciable de la SEP (58,69 mg/g PS, figure 17).

Sur les 12 acides organiques de ce sous-groupe, quatre d'entre eux ont induit, en plus de AJ 1 et/ou de PR 16,64, la formation d'autres dithiopyrrolones: l'acide benzoïque (dithiopyrrolones PR 14,60 et PR 17,65), l'acide 4-bromobenzoïque (PR 20,20 en quantité appréciable), l'acide 4-chlorobenzoïque (PR 19,57 en quantité appréciable aussi) et l'acide cinnamique (PR 17,65).

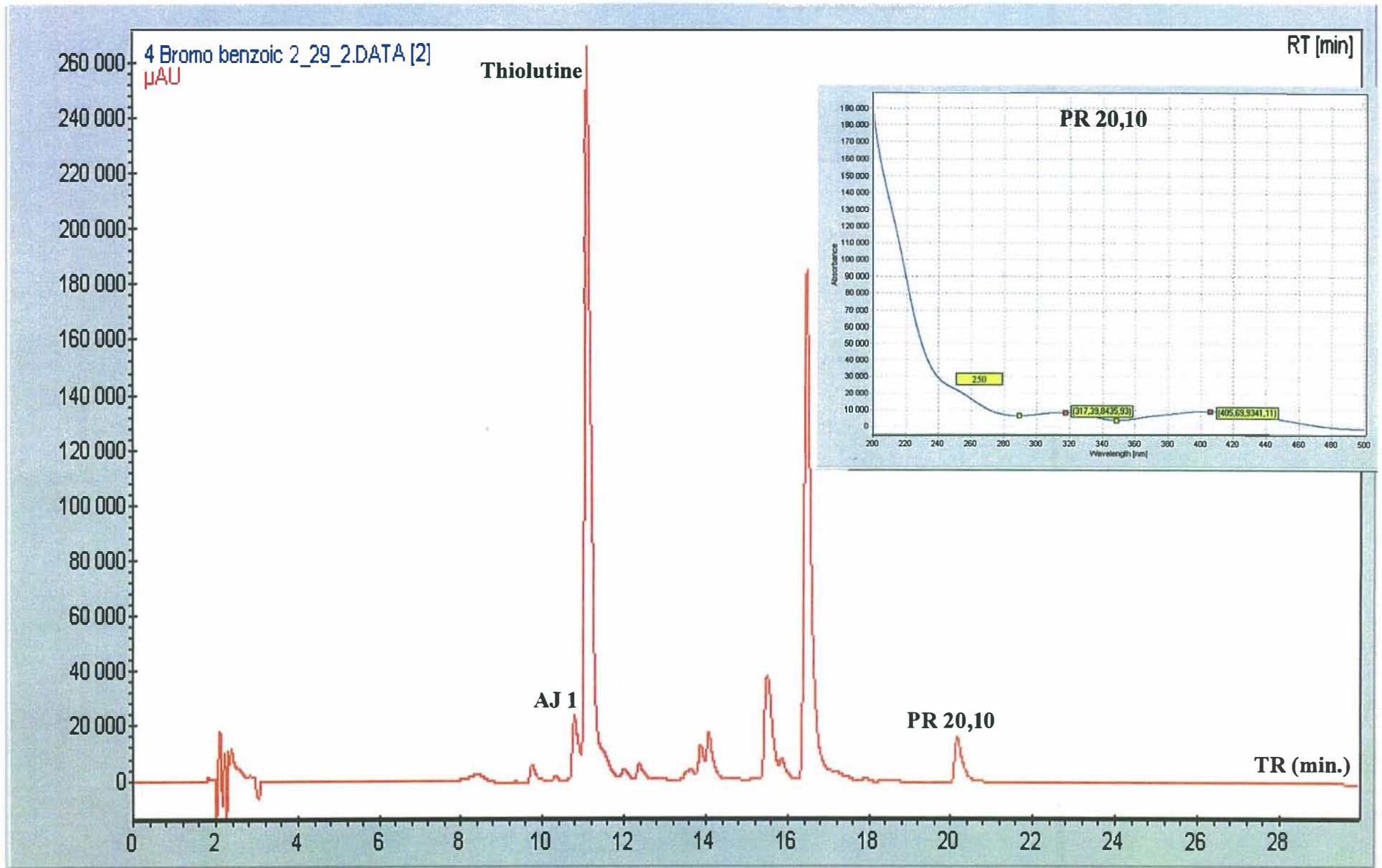
Enfin, nous notons que les acides benzoïque, 4-bromobenzoïque, 4-chlorobenzoïque, cinnamique et 5-sulfosalicylique, favorisent nettement la production de la thiolutine chez *Sa. algeriensis*.

Le profil d'élution en HPLC des nouvelles dithiopyrrolones, ainsi que les spectres UV-visible de ces molécules obtenues en présence des acides benzoïque, 4-bromobenzoïque, 4-chlorobenzoïque et cinnamique, sont présentés dans les figures 16, 17, 18 et 19, respectivement.

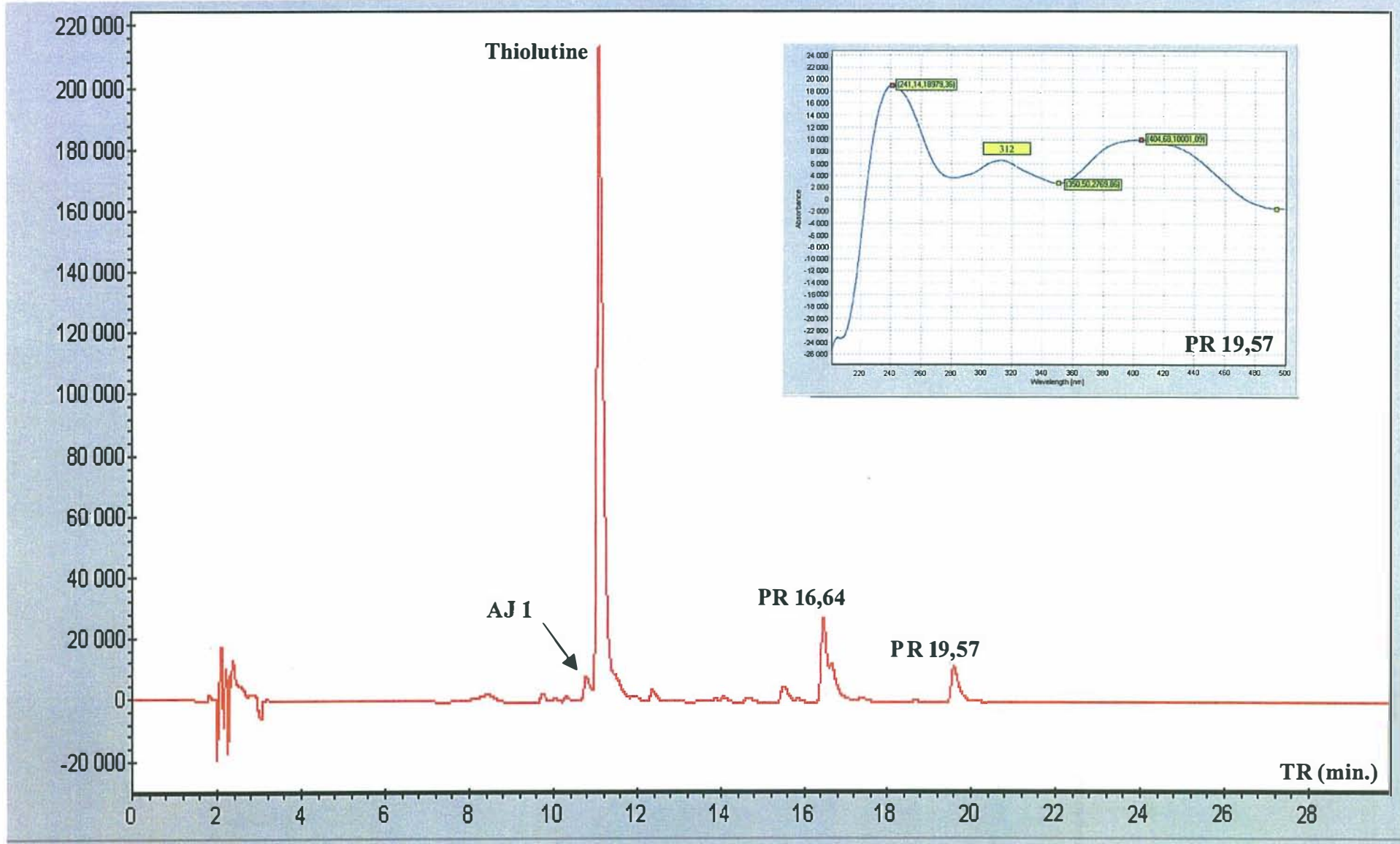


**Figure 16.** Profil du chromatogramme d'éluion en HPLC ( $\lambda = 390 \text{ nm}$ ) et les principales nouvelles molécules (PR 14,60, PR 16,64 et PR 17,65) induites par l'addition de l'acide benzoïque avec les spectres d'absorption dans l'UV-visible chez *Sa. algeriensis*.





**Figure 17.** Profil du chromatogramme d'éluion en HPLC ( $\lambda = 390 \text{ nm}$ ) et la principale nouvelle molécule (PR 20,10) induite par l'addition de l'acide 4-bromobenzoïque avec le spectre d'absorption dans l'UV-visible chez *Sa. algeriensis*.



**Figure n° 18.** Profil du chromatogramme d'éluion en HPLC ( $\lambda = 390 \text{ nm}$ ) et la principale nouvelle molécule (PR 19,57) induite par l'addition de l'acide 4-chlorobenzoïque avec le spectres d'absorption dans l'UV-visible chez *Sa. algeriensis*.

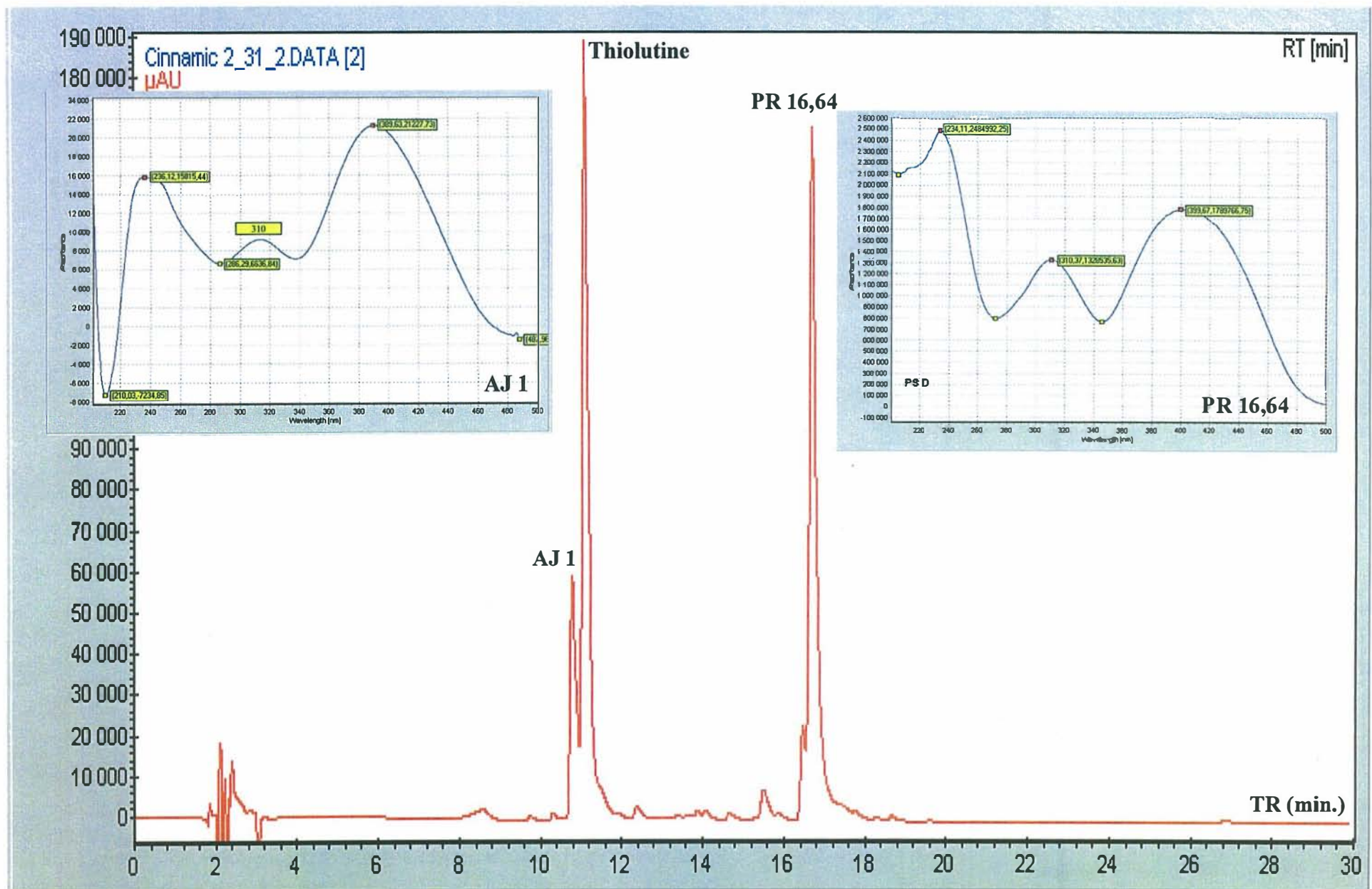


Figure 19. Profil du chromatogramme d'éluion en HPLC ( $\lambda = 390 \text{ nm}$ ) et les principales nouvelles molécules (AJ 1 et PR 16,65) induites par l'addition de l'acide cinnamique avec les spectres d'absorption dans l'UV-visible chez *Sa. algeriensis*.



Tous les antibiotiques nouvellement apparus présentent dans l'UV-visible des maxima à 230~250, 304~317 et 389~405 nm.

### 1.1.2.- Acides organiques cycliques induisant la formation de diverses autres dithiopyrrolones

Ils sont au nombre de quatre: les acides aurine tricarboxylique, 3-5-dinitrosalicylique, férulique et 3-hydroxy-4-méthoxymandélique (tableau 8).

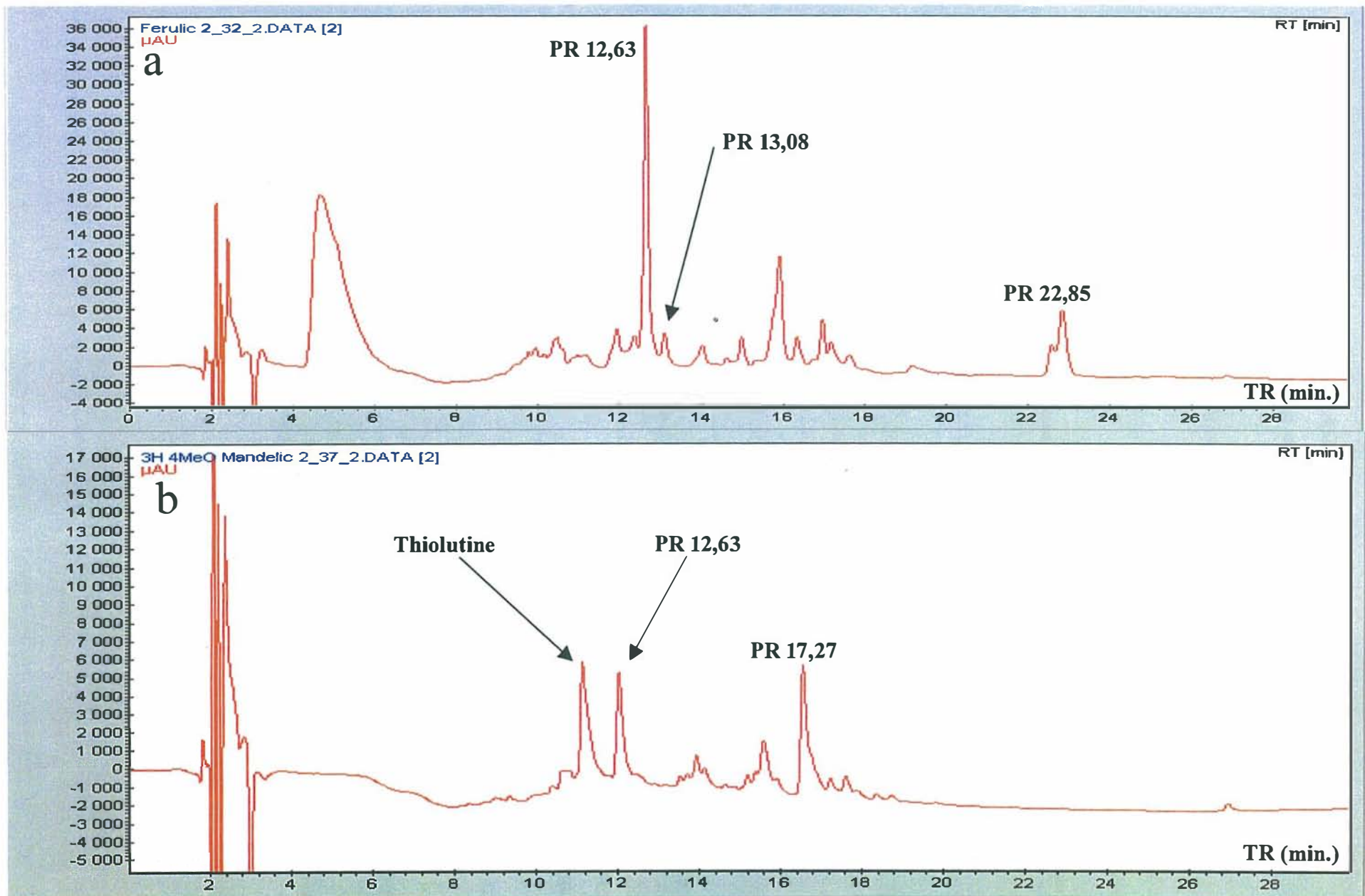
**Tableau 8.** Acides organiques cycliques induisant la formation de diverses autres dithiopyrrolones.

Acides organiques cycliques	Thiolutine	Productions spécifiques des dithiopyrrolones (mg/g PS)									
		PR 8,03	AJ 00	AJ 0	PR 10,55	PR 11,85	PR 12,63	PR 13,08	PR 16,85	PR 17,27	PR 22,85
Témoin	16,17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aurine tricarboxylique	25,05	0	0,42	2,39	0	0	0	0	0	0	0
Férulique	0,31	0	0	0	0	0	13,97	1,20	0	0	3,15
3-Hydroxy-4-méthoxymandélique	3,03	0	0	0	0	0	2,88	0	0	2,03	0
3-5-Dinitrosalicylique	0,38	0,22	0	0	0,05	0,72	0	0	0,18	0	0

- L'acide férulique induit fortement PR 12,63, moyennement PR 22,85 et faiblement PR 13,08.
- L'acide 3-hydroxy-4-méthoxymandélique induit également PR 12,63 (mais moyennement), ainsi qu'une autre molécule, PR 17,27.
- L'acide aurine tricarboxylique induit la formation de AJ 0 (moyennement) et AJ 00 (faiblement).
- L'acide 3,5-dinitrosalicylique induit faiblement les dithiopyrrolones PR 8,03, PR 10,55, PR 11,85 et PR 16,85.

Enfin, à l'exception de l'acide aurine tricarboxylique, les autres acides inhibent la biosynthèse de la thiolutine.

Les profils d'éluion en HPLC des nouvelles dithiopyrrolones, ainsi que les spectres UV-visible de ces molécules obtenues en présence des acides férulique et 3-hydroxy-4-méthoxymandélique, sont présentés dans les figures 20a et 20b, respectivement.



**Figure 20.** Profils du chromatogramme d'éluion en HPLC ( $\lambda = 390$  nm) et les molécules induites par l'addition de l'acide férulique (a) et de l'acide 3-hydroxy-4-méthoxy-mandélique (b), avec les spectres d'absorption dans l'UV-visible chez *Sa. algeriensis*.

## 1.2.- Acides organiques aliphatiques induisant la production de nouvelles dithiopyrrolones

Sept acides organiques aliphatiques (acides gras et autres) favorisant la production de nouvelles dithiopyrrolones ont été classés dans le deuxième groupe. Les résultats obtenus ont été présentés dans le tableau 9.

**Tableau 9.** Nouvelles dithiopyrrolones induites par les acides organiques aliphatiques

Acides organiques aliphatiques	Productions spécifiques des dithiopyrrolones (mg/g PS)										
	Thiolutine	PR 10,55	PR 10,93	PR 1	PR 2	PR 3	PR 16,16	PR 16,64	PR 16,85	PR 17,90	
Témoin	16,17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Trifluoroacétique	21,24	0,91	0	0	1,2	0	0	0	0	0	
Trichloroacétique	0,09	1,03	0	0,2	0,3	0	0	0	0	0	
Oxalique	0,73	0,49	0,58	0	0	0	0	0	0	0	
Propionique	3,66	0	0	0	0	1,9	0	0	0	0	
Valérique	7,14	0	0	0	0	3,13	8,23	0	0	0	
Sorbique	7,02	0	0	0	0	0	0	0,08	0,56	0,2	
Oléique	0,02	1,57	0,14	0	0	0	0	0	0	0	

- Le résultat le plus intéressant est celui obtenu avec l'acide valérique qui a permis la production d'une quantité importante de la nouvelle dithiopyrrolone PR 16,16 (8,23 mg/g PS) et d'une quantité moyenne de PR3 (3,13 mg/f PS). Celle-ci est également obtenue (en moindre quantité) avec l'acide propionique.

- La dithiopyrrolone PR 10,55 est induite par quatre (sur sept) acides organiques.

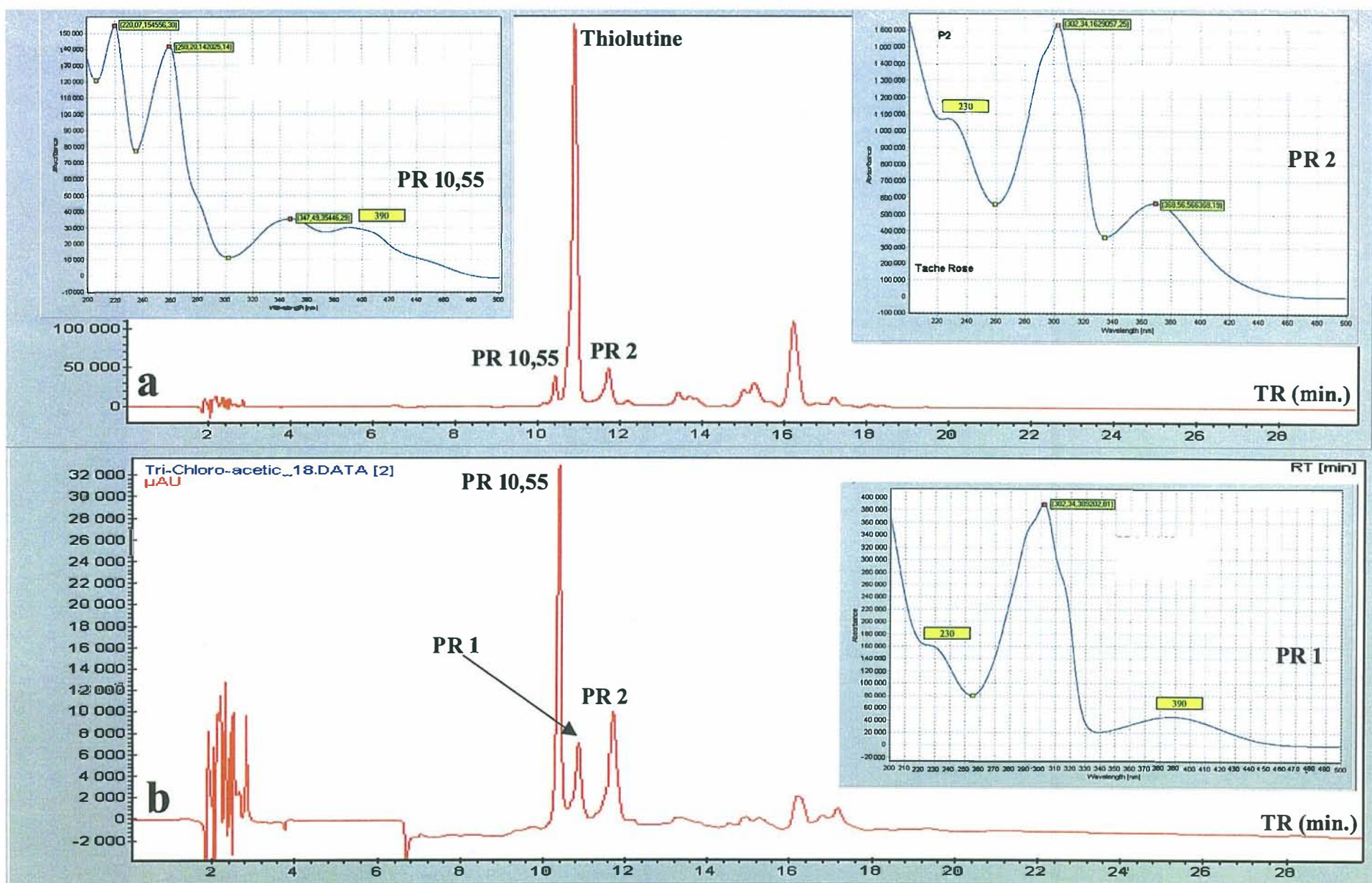
- Les acides trifluoroacétique et trichloroacétique induisent la formation de PR 1, pour le premier, et de PR 1 et PR 2, pour le second. Ces deux molécules, contrairement à toutes les autres dithiopyrrolones, sont de couleur rose et très caractéristique par leur spectre UV-visible (maximum à 302 nm).

- Les acides oxalique et oléique induisent la biosynthèse de PR 10,55 et PR 10,93 et l'acide sorbique PR 16,85 et PR 17,90.

- La dithiopyrrolone PR 16,64 est induite en très faible quantité en présence de l'acide sorbique.

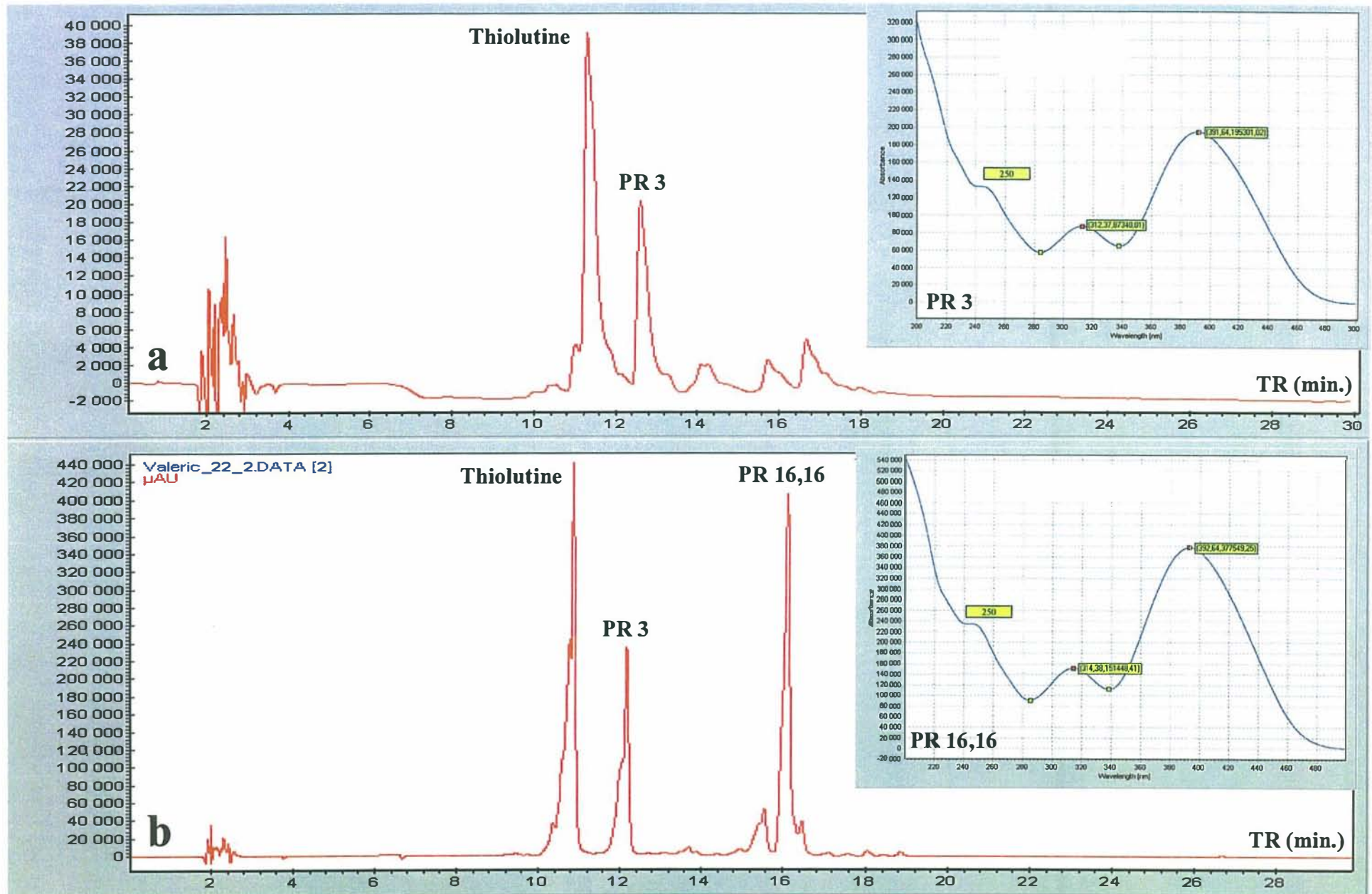
- Enfin, il est à noter qu'à l'exception de l'acide trifluoroacétique, tous les autres acides inhibent, parfois très fortement, la biosynthèse de la thiolutine (par rapport au témoin).

Les profils en HPLC et les spectres UV-visible des dithiopyrrolones nouvellement apparues et obtenues après addition des acides trifluoroacétique, trichloroacétique, propionique, valérique et sorbique, sont illustrés par les figures 21a, 21b, 22a, 22b et 23, respectivement.

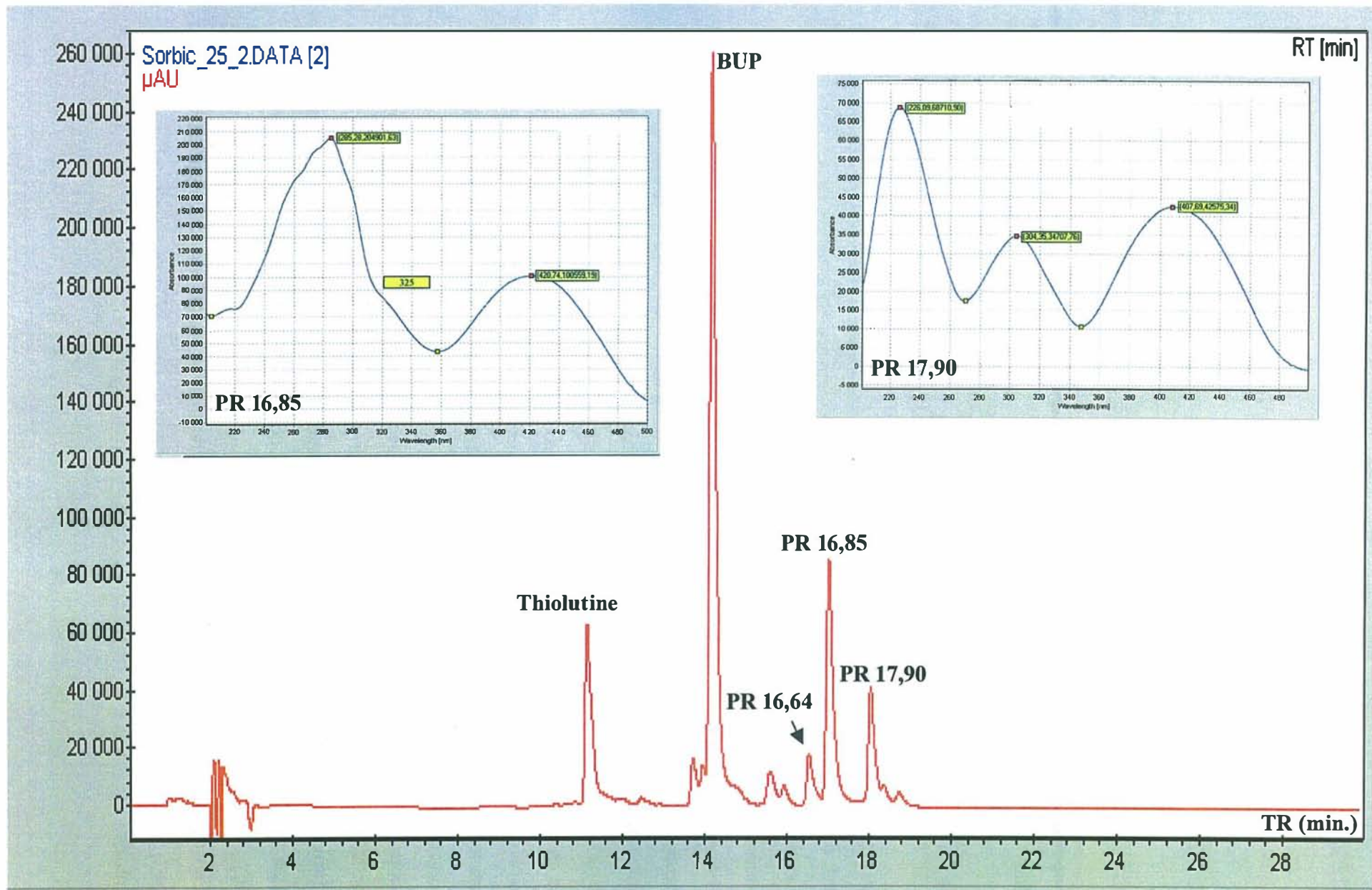


**Figure 21.** Profils du chromatogramme d'élution en HPLC ( $\lambda = 390$  nm) et les principale nouvelles molécules (PR 10,55, PR 10,74 et PR 10,96) induites par l'addition de l'acide trifluoroacétique (a) et de l'acide trichloroacétique (b), avec les spectres d'absorption dans l'UV-visible chez *Sa. algeriensis*.





**Figure 22.** Profils du chromatogramme d'éluion en HPLC ( $\lambda = 390 \text{ nm}$ ) et les principales nouvelles molécules (PR 3 et PR 16,16) induites par l'addition de l'acide propionique (a) et de l'acide valérique (b), avec les spectres d'absorption dans l'UV-visible chez *Sa. algeriensis*.



**Figure 23.** Profil du chromatogramme d'éluion en HPLC ( $\lambda = 390 \text{ nm}$ ) et les principales nouvelles molécules (PR 16,85 et PR 17,90) induites par l'addition de l'acide sorbique avec les spectres d'absorption dans l'UV-visible chez *Sa. algeriensis*.

### 1.3.- Acides aminés induisant la production de nouvelles dithiopyrrolones

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 10.

**Tableau 10.** Nouvelles dithiopyrrolones induites par les acides aminés

Acides aminés	Thiolutine	Productions spécifiques des dithiopyrrolones (mg/g PS)											
		AJ 00	AJ 0	PR 10,29	PR 10,55	AJ 1	PR 10,93	PR 11,02	PR 12,63	PR 16,64	PR 16,85	PR 17,27	PR 19,33
Témoin	16,17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cystéine	11,70	0,58	2,00	0	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0
Cystine	309,12	0,50	4,08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Méthionine	2,93	0	0	0	0,14	0	0	0	0	0	0,34	0,43	0
Ethionine	2,77	0	0	0	0	0	0	0	0,08	0	0,10	0,08	0,11
Arginine	0	0	0	0,84	0	0,19	0,82	3,15	0	0	0	0	0
Glutamine	0,26	0	0	0,01	0,09	0	0,08	0	0	0,40	0	0	0

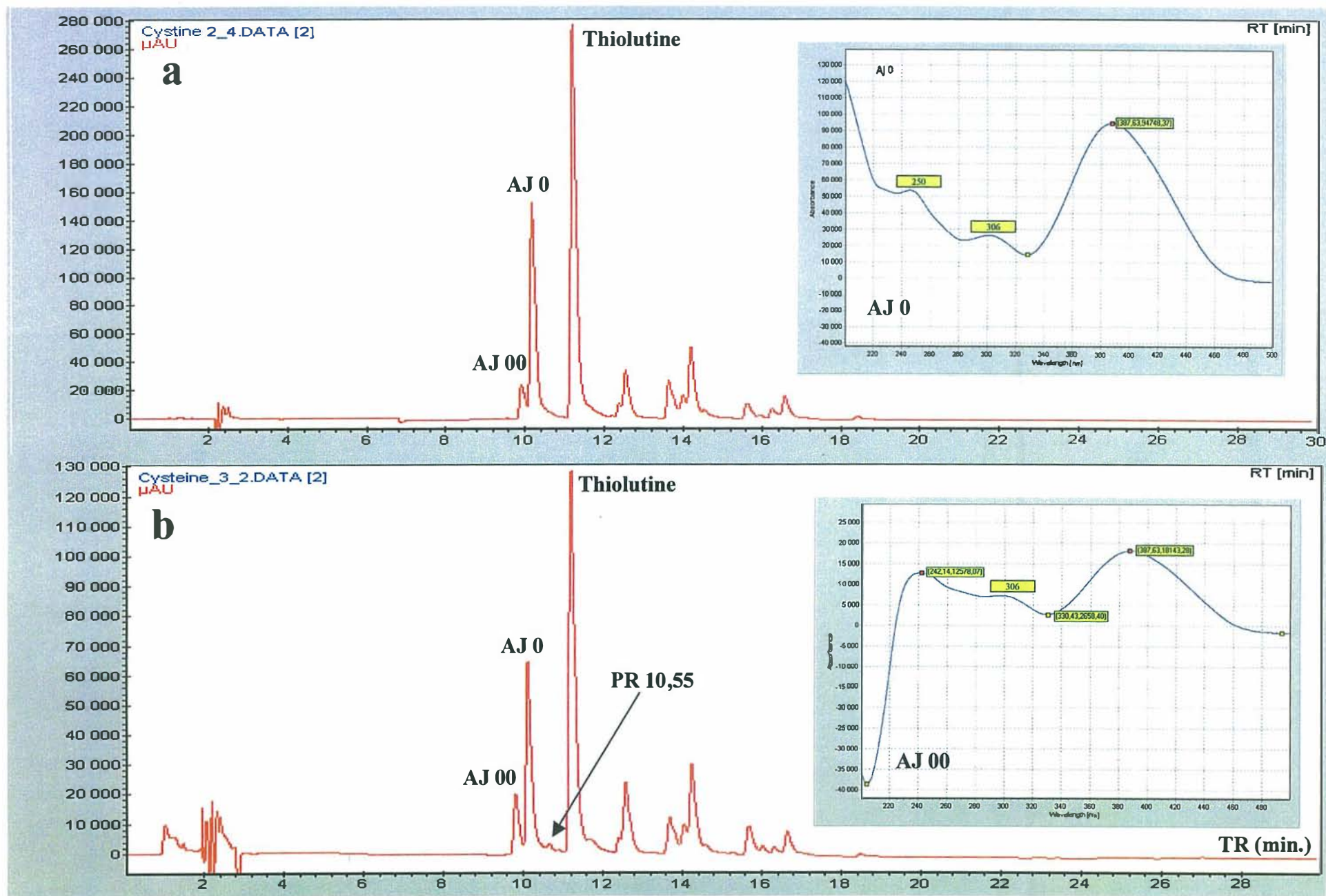
Nous remarquons que:

- Au total, douze dithiopyrrolones sont nouvellement produites par *Sa. algeriensis*.
- La cystéine et la cystine sont les seuls acides aminés à induire la biosynthèse de AJ 00 et AJ 0, cette dernière étant produite de manière appréciable (surtout en présence de cystine). Ces deux molécules ont également été induites par l'acide aurine tricarboxylique comme nous l'avons vu précédemment dans le tableau 8.
- L'arginine permet la production en quantité appréciable de PR 11,02, en plus de AJ 1, PR 10,29 et PR 10,93 (en petites quantités). Il est à noter que la molécule PR 11,02 a le même temps de rétention en HPLC que la thiolutine (absente dans ce cas) mais diffère par son spectre UV-visible.
- La molécule PR 10,55 obtenue en présence de quatre acides organiques aliphatiques (trifluoroacétique, trichloroacétique, oxalique et oléique), est également induite par la cystéine, la méthionine et la glutamine (mais en faibles quantités).
- De même, la molécule PR 10,93 sécrétée en présence de deux acides organiques aliphatiques (oxalique et oléique), est aussi produite en présence d'arginine et de glutamine.
- Les dithiopyrrolones PR 16,85 et PR 17,27 sont obtenues uniquement en présence de méthionine et d'éthionine. En outre, la dithiopyrrolone PR 16,85 a été aussi induite par l'acide sorbique.
- Enfin, à l'exception de la cystine qui favorise très nettement la biosynthèse de la thiolutine (plus de 19 fois), les autres acides aminés inhibent la production de cette molécule (surtout l'arginine et la glutamine).

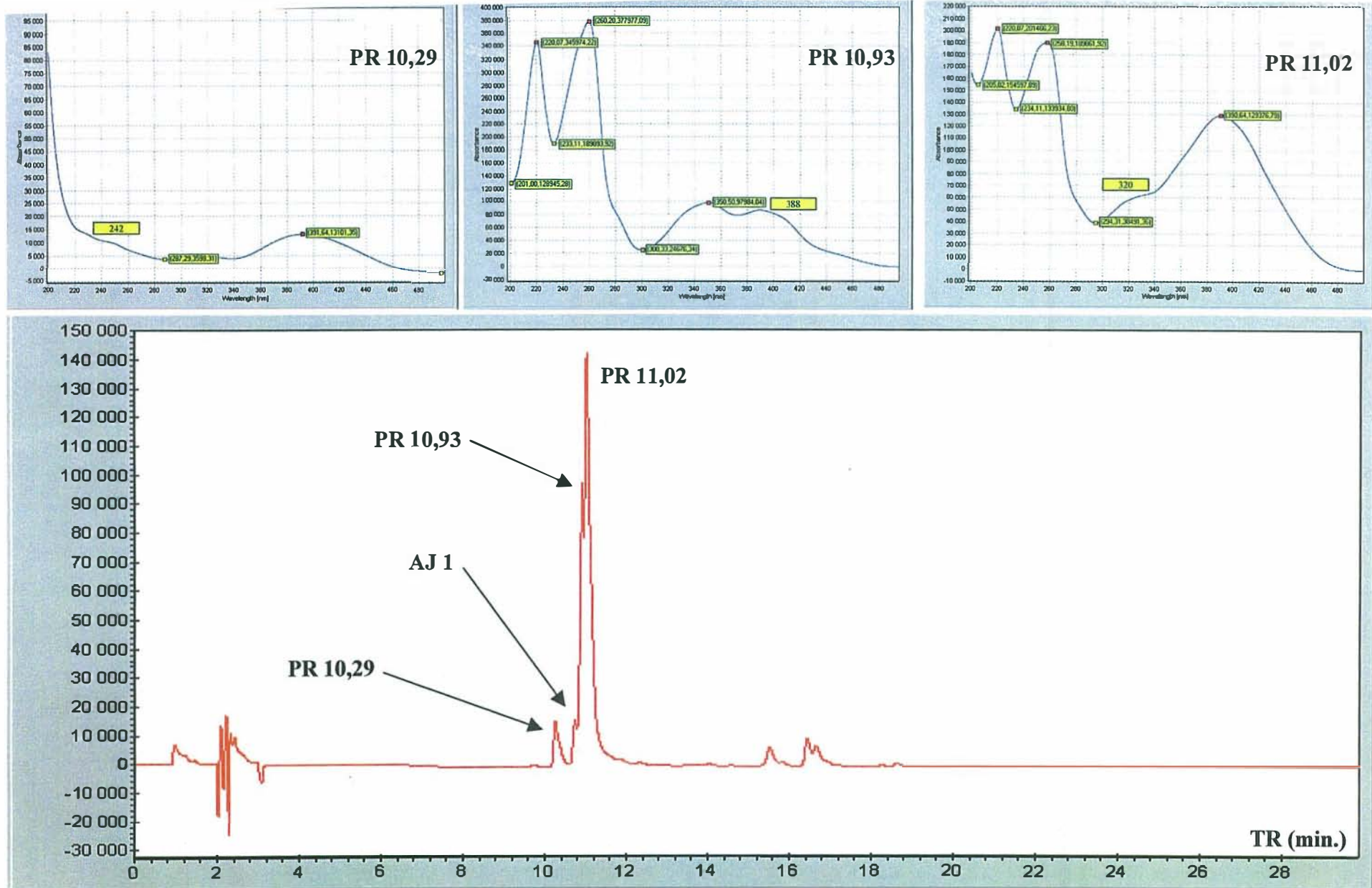


Les profils en HPLC et les spectres UV-visible des molécules nouvellement apparues en présence des acides aminés cystine, cystéine, arginine, méthionine et éthionine et sont illustrés par les figures 24a, 24b, 25, 26a et 26b, respectivement.

La présente étude est préliminaire, car nous avons testé tous les acides organiques et les acides aminés uniquement à une concentration de 5 mM et pour une durée de 72 heures, et ce, pour vérifier la possibilité d'induire la production de nouvelles molécules. Pour approfondir notre étude, nous avons choisi quelques acides organiques et acides aminés pour tester l'effet de différentes concentrations (1,25, 2,50, 5 et 7,5 mM) sur la production spécifique de certaines nouvelles dithiopyrrolones.

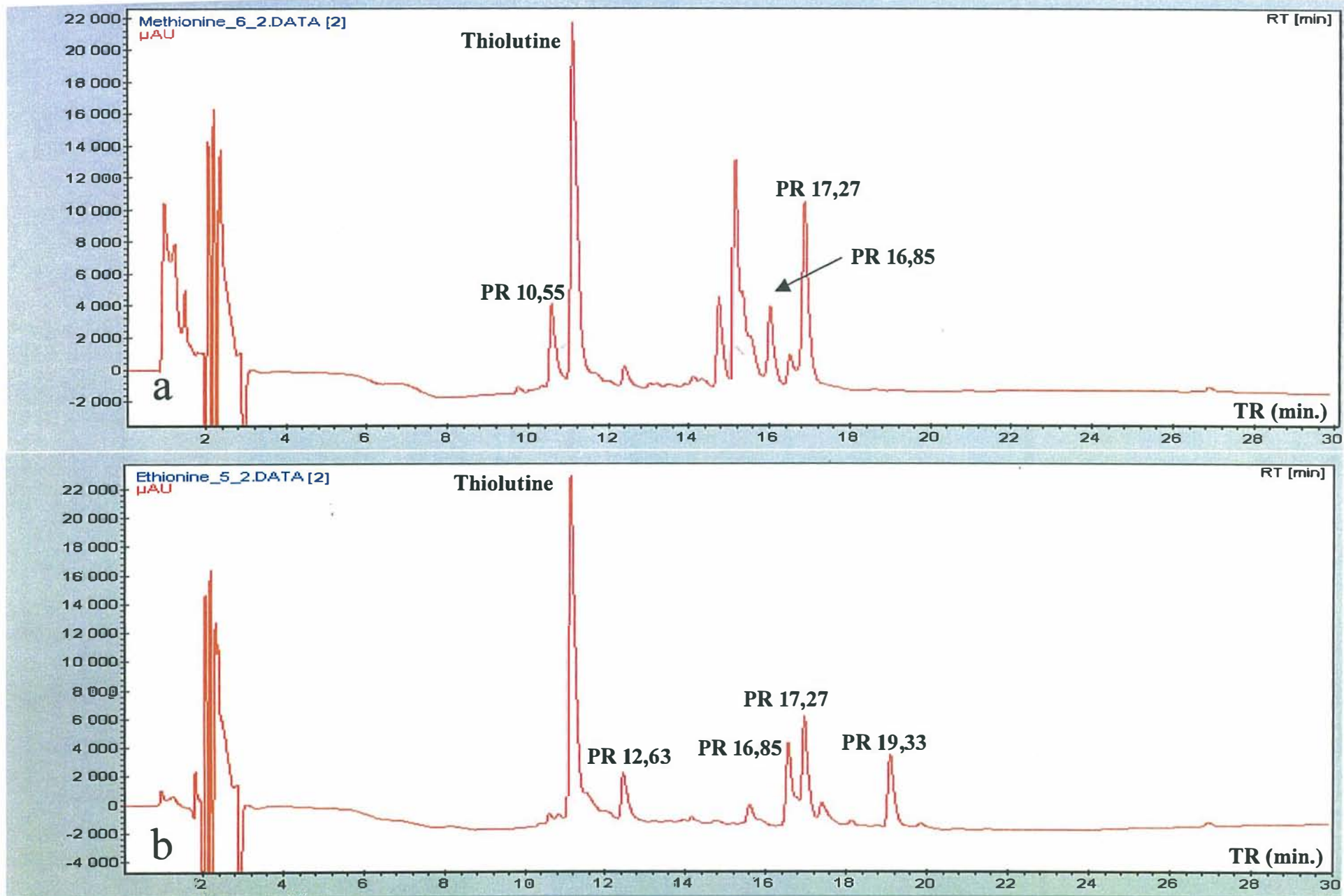


**Figure 24.** Profils du chromatogramme d'élution en HPLC ( $\lambda = 390 \text{ nm}$ ) et les principales nouvelles molécules (AJ 00 et AJ 0) induites par l'addition de la cystine (a) et de la cystéine (b), avec les spectres d'absorption dans l'UV-visible chez *Sa. algeriensis*.



**Figure 25.** Profil du chromatogramme d'éluion en HPLC ( $\lambda = 390 \text{ nm}$ ) et les principales nouvelles molécules (PR 10,29, PR 10,93 et PR 11,02) induites par l'addition de l'acide aminé arginine avec les spectres d'absorption dans l'UV-visible chez *Sa. algeriensis*.





**Figure 26.** Profils du chromatogramme d'éluion en HPLC ( $\lambda = 390$  nm) et les principale nouvelles molécules induites par l'addition de la méthionine (a) et de l'éthionine (b) chez *Sa. algeriensis*.

## 2.- Effet de différentes concentrations de quelques acides organiques et acides aminés sélectionnés sur la production de nouvelles dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis*

### 2.1.- Effet des acides benzoïque, sorbique, cinnamique et 4-bromobenzoïque sur la biomasse et la production spécifique de quelques nouvelles dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis*

Nous avons entrepris de vérifier le niveau de production des nouvelles dithiopyrrolones en présence de différentes concentrations des acides organiques suivants: acides benzoïque, 4-bromobenzoïque, cinnamique et sorbique. Ces acides sont ajoutés au milieu MSS aux concentrations suivantes: 1,25, 2,5, 5 et 7,5 mM.

Dans le tableau 11, nous rappelons les dithiopyrrolones induites à une concentration de 5 mM par les acides cités ci dessus et que nous avons déjà évoqués précédemment.

**Tableau 11.** Nouvelles dithiopyrrolones favorisées par l'addition de quatre acides organiques

Acide organique	Nouvelles dithiopyrrolones
Acide benzoïque	AJ 1, PR 14,60, PR 16,64 et PR 17,65.
Acide cinnamique	AJ 1, PR 16,64 et PR 17,65.
Acide sorbique	PR 14,60, PR 16,64, PR 16,85 et PR 17,90.
Acide 4-bromobenzoïque	AJ 1 et PR 20,10.

Dans ce cadre, les différentes cultures ont été menées en présence de ces quatre acides organiques (pris un à un) pour étudier leur effet sur les productions spécifiques maximales des nouvelles dithiopyrrolones ainsi que sur les biomasses maximales. Les résultats obtenus sont présentés pour chaque concentration, dans les figures 27, 28a, 28b, 28c, 28d, 29, 30 et 31.

#### 2.1.1.- Effet sur la production de biomasse maximale

Les résultats obtenus montrent que tous les acides organiques stimulent fortement la biomasse quel que soit les concentrations utilisées. En général, les valeurs les plus élevées de biomasse ont été enregistrées en présence d'une concentration de 1,25 mM de chaque acide organique (figure 27). La biomasse maximale est nettement supérieure avec l'acide 4-bromobenzoïque par rapport aux trois autres acides qui sont équivalents.

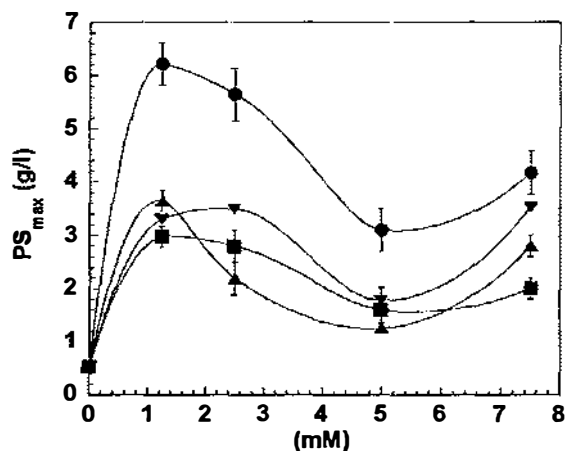


Figure 27. Effet de différentes concentrations des acides benzoïque (■), sorbique (▲), cinnamique (▼) et 4-bromobenzoïque (●) sur la production de la biomasse maximale.

### 2.1.2.- Effet sur les productions spécifiques de quelques nouvelles dithiopyrrolones

Les résultats sont illustrés par les figures 28a,b,c et d. Nous constatons que la production des antibiotiques est influencée par la nature et la concentration de l'acide organique ajouté dans le milieu MSS.

La dithiopyrrolone PR 16,64 est nettement favorisée par l'acide cinnamique (max.: 17,20 mg/g PS à 5 mM) par rapport à l'acide benzoïque (max.: 8,38 mg/g PS à 1,25 mM). Les différentes concentrations de l'acide sorbique ne permettent pas d'augmenter significativement la production de PR 16,64 qui reste ainsi extrêmement faible (max.: 0,30 mg/g PS à 0,51 mM) (figure 28a).

Comme pour PR 16,64, la production de la dithiopyrrolone PR 17,65 est nettement meilleure avec l'acide cinnamique par rapport à l'acide benzoïque. Pour le premier, la production maximale est obtenue à 7,5 mM (0,71 mg/g PS) et pour le second, à 1,25 mM (0,17 mg/g PS) (figure 28b).

De même, la production de AJ1 est nettement meilleure avec l'acide cinnamique. Cette production croît graduellement en fonction de la concentration, avec un maximum (4,02 mg/g PS) obtenu à 7,5 mM. La production est faible avec les acides benzoïque et 4-bromobenzoïque: seulement 0,37 mg/g PS à 2,5 mM qui reste la meilleure concentration (figure 28c).

Par ailleurs, Les résultats obtenus montrent qu'une concentration de 5 mM de l'acide benzoïque ou de l'acide 4-bromobenzoïque est optimale pour une meilleure production spécifique des dithiopyrrolones PR 14,60 (2,08 mg/g PS) et PR 20,10 (2,20 mg/g PS), respectivement.

Alors que, les meilleures valeurs de la production spécifique des dithiopyrrolones PR 16,85 et PR 17,90 sont observées en présence de 7,50 mM de l'acide sorbique (figure 28d).

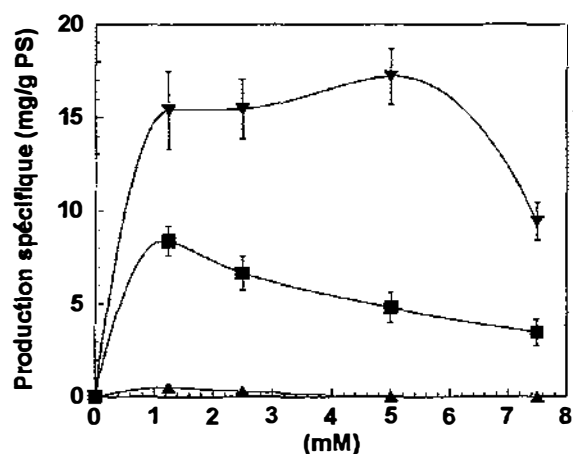


Figure 28a. Effet de différentes concentrations des acides benzoïque (■), sorbique (▲) et cinnamique (▼) sur la production spécifique de la nouvelle dithiopyrrolone (PR 16,64).

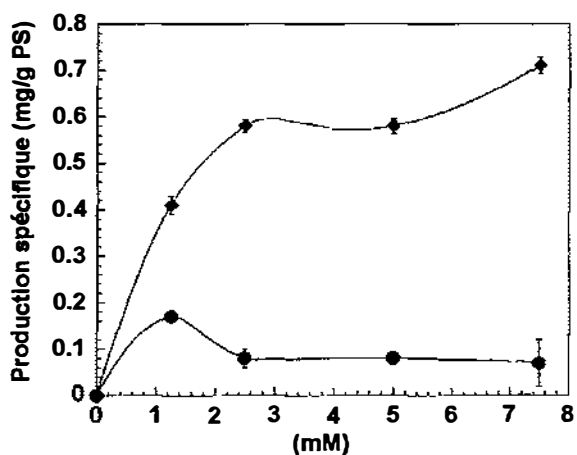
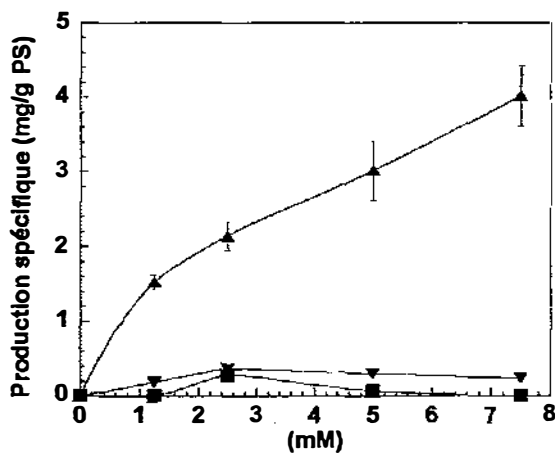
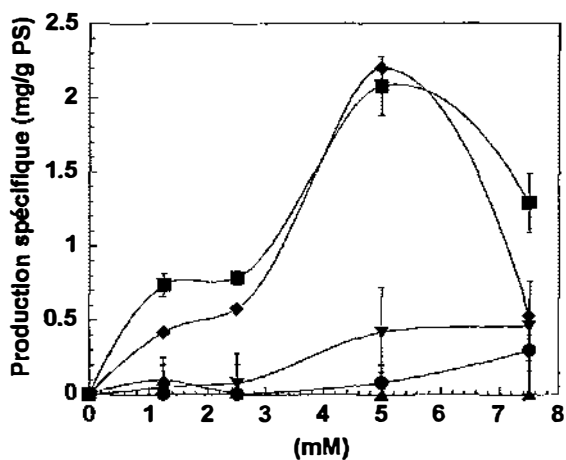


Figure 28b. Effet de différentes concentrations des acides benzoïque (●) et cinnamique (◆) sur la production spécifique de la nouvelle dithiopyrrolone (PR 17,65).



**Figure 28c.** Effet de différentes concentrations des acides benzoïque (■), cinnamique (▲) et 4-bromobenzoïque (▼) sur la production spécifique de la nouvelle dithiopyrrolone (AJ 1).



**Figure 28d.** Effet de différentes concentrations des acides benzoïque (■) et sorbique (▲) sur la production spécifique de la nouvelle dithiopyrrolone (PR 14,60), de l'acide 4-bromobenzoïque (◆) sur la production spécifique de PR 20,10 et de l'acide sorbique (▼, ●) sur la production spécifique (PR 16,85 et PR 17,90), respectivement.



## 2.2.- Effet de différentes concentrations des acides propionique et valérique sur la biomasse et la production spécifique de la nouvelle dithiopyrrolone PR 3 par *Sa. algeriensis*

### 2.2.1.- Effet sur la production de la biomasse maximale

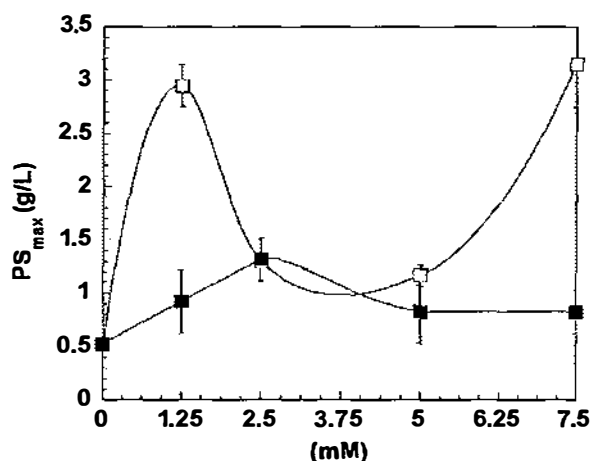


Figure 29. Effet de différentes concentrations des acides propionique (□), valérique (■) sur la production de la biomasse maximale.

Les résultats montrent que les différentes concentrations des acides organiques testés (l'acide propionique et l'acide valérique) stimulent la production de la biomasse de *Sa. algeriensis*. Les valeurs les plus élevées de biomasse ont été enregistrées en présence d'une concentration de 2,50 mM pour l'acide valérique. En revanche les valeurs les plus élevées de biomasse en présence de l'acide propionique ont été observées à 7,50 mM (figure 29).

### 2.2.2.- Effet sur la production spécifique de la nouvelle dithiopyrrolone PR 3

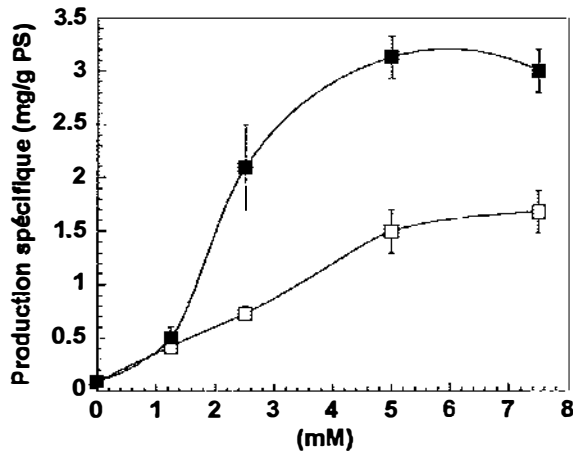


Figure 30. Effet de différentes concentrations des acides propionique (□), valérique (■) sur la production spécifique de la nouvelle dithiopyrrolone (PR 3).

Nous avons entrepris de vérifier le niveau de production de la dithiopyrrolone PR 3 en présence de différentes concentrations des acides organiques: valérique et propionique (figure 30). Nous avons constaté que la présence de l'acide valérique dans le milieu de culture à une concentration de 5 mM stimule fortement la production spécifique de PR 3 (3,13 mg/g PS). En plus, les résultats obtenus montrent que les différentes concentrations de l'acide propionique augmentent considérablement la production de la dithiopyrrolone PR 3; la production maximale de PR 3 (1,68 mg/g PS) est enregistrée en présence de 7,5 mM. Nous avons constaté que l'augmentation de la production spécifique de PR 3 est de 19 fois plus élevée, lorsque la concentration de l'acide propionique dans le milieu de culture passe de 0 à 7,50 mM. Cependant, cette production reste en deçà de celles obtenues pour l'acide valérique.

### 2.3.- Effet de différentes concentrations de cystéine et de cystine sur la biomasse et la production spécifique de la nouvelle dithiopyrrolone AJ 0 par *Sa. algeriensis*

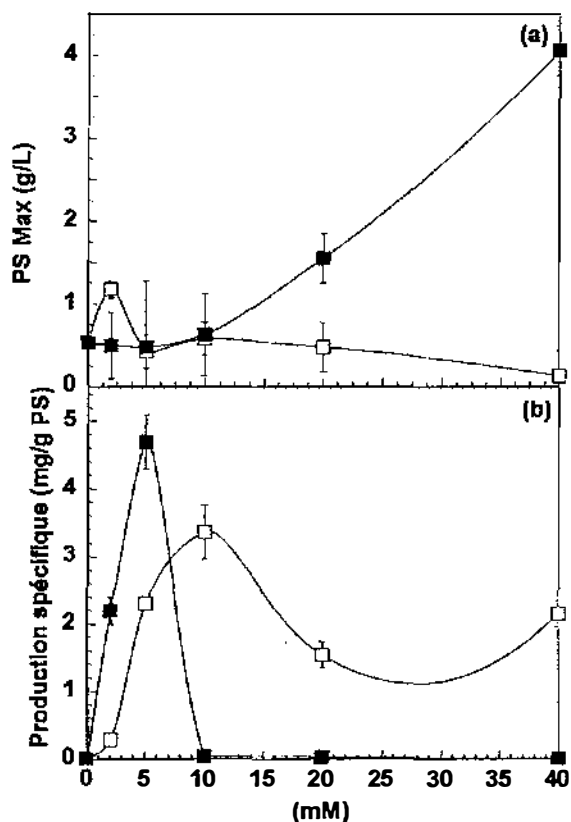


Figure 31. Effet de différentes concentrations de cystéine (□) et de cystine (■) sur la biomasse maximale (a) et la production spécifique de la nouvelle dithiopyrrolone AJ 0 (b).

La biomasse maximale est obtenue après addition de 40 mM de cystine (4,05 g/L). Pour la cystéine, la biomasse est assez faible: seulement 1,17 g/L à une concentration de 2 mM, qui est pourtant la concentration optimale (figure 31a).

Dans nos précédents résultats, nous avons remarqué l'induction d'une nouvelle dithiopyrrolone nommée AJ 0, après addition de cystéine ou de cystine. La production de AJ 0 est plus ou moins prononcée selon la concentration de l'acide aminé sulfuré utilisé. Pour la cystine, nous avons constaté qu'une concentration de 5 mM est optimale pour une meilleure production spécifique de AJ 0 (4,70 mg/g PS). Par contre, dans le cas de la cystéine c'est une concentration de 10 mM qui est avérée meilleure (3,36 mg/g PS) (figure 31b), mais elle reste moindre que celle obtenue après addition de cystine.

### 3.- Analyses spectrométriques de masse par impact électronique direct de quelques dithiopyrrolones nouvellement apparues

Dans cette partie de notre étude, nous avons purifié par HPLC 9 nouvelles molécules (sur 18) induites par les acides benzoïque, cinnamique, valérique et trichloroacétique et par la cystine, pour effectuer les analyses spectrométriques de masse par impact électronique direct. Nous avons effectué la même analyse pour la thiolutine, dans un but de comparaison. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 12.

**Tableau 12.** Spectre de masse des dithiopyrrolones analysées par impact électronique direct.

Nouvelles molécules induites par l'addition de (l'acide organique ou l'acide aminé)	Poids moléculaire	Principaux fragments de masse
Thiolutine	228	35, 43, 47, 49, 51, 70, 86, 186
AJ 00 (cystine)	154	35, 39, 41, 42, 47, 43, 49, 51, 57, 70, 86, 125
AJ 0 (cystine)	172	30, 35, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 47, 49, 51, 55, 57, 69, 70, 86, 97, 118, 125, 154, 167
AJ 1 (ac. cinnamique)	214	35, 37, 41, 42, 43, 47, 48, 49, 51, 57, 70, 86, 125, 139, 149, 154, 167, 186
PR 1 (ac. trichloroacétique)	167	35, 36, 37, 41, 43, 44, 47, 49, 51, 69, 86, 121, 149
PR 2 (ac. trichloroacétique)	218	35, 43, 47, 48, 49, 51, 86, 133, 149, 167
PR 14,60 (ac. benzoïque)	276	35, 41, 42, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 51, 55, 57, 77, 105, 121, 149
PR 16,16 (ac. valérique)	270	35, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 47, 49, 51, 55, 57, 69, 86, 97, 149, 167, 186
PR 16,64 (ac. benzoïque)	290	35, 41, 42, 43, 44, 45, 49, 51, 55, 77, 105, 185
PR 16,64 (ac. cinnamique)	290	35, 41, 42, 43, 47, 49, 51, 77, 86, 105, 149, 185

L'analyse détaillée du spectre de masse de dix molécules permet d'apporter plusieurs éléments intéressants. Les résultats ont montré que toutes les molécules analysées ont les fragments 35, 43, 49. En outre, la majorité de ces molécules possèdent les fragments (69~70, 85~86, 185~186, 149 et 167). Le poids moléculaire assez proche de ces molécules et surtout les grandes ressemblances observées au niveau des fragments confirment les résultats obtenus sur les spectres UV-visible selon lesquelles toutes ces molécules appartiennent au groupe des dithiopyrrolones ou, pour certaines, probablement à des intermédiaires de biosynthèse. Nous avons remarqué que la molécule

PR 16,64 (PM = 290) obtenue avec les acides benzoïque et cinnamique sont pratiquement identiques entre elles (tableau 12).

Les analyses de masse des deux molécules de couleur rose (PR 1 et PR 2) qui possèdent les poids moléculaires, respectivement de 167 et de 218 ont montré plusieurs analogies dans les fragments de masse (35, 43, 47, 49, 51, 86 et 149). Nous pouvons dire que la molécule PR 2 possède un groupement supplémentaire par rapport à la molécule PR 1.

Nous avons remarqué que l'addition de l'acide benzoïque a favorisé la production de deux nouvelles dithiopyrrolones PR 14,60 et PR 16,64. Ces deux molécules se présentent sous forme de poudre jaune et possèdent un poids moléculaire de 276 et 290, respectivement (figures 32 et 33). Cette différence de 14 correspond à un groupement méthyle substitué (15-1).

Par ailleurs, une très grande ressemblance dans les fragments existe entre les deux molécules, avec notamment la présence du fragment 77 qui correspondrait à un noyau benzénique substitué ( $C_6H_5$ ).

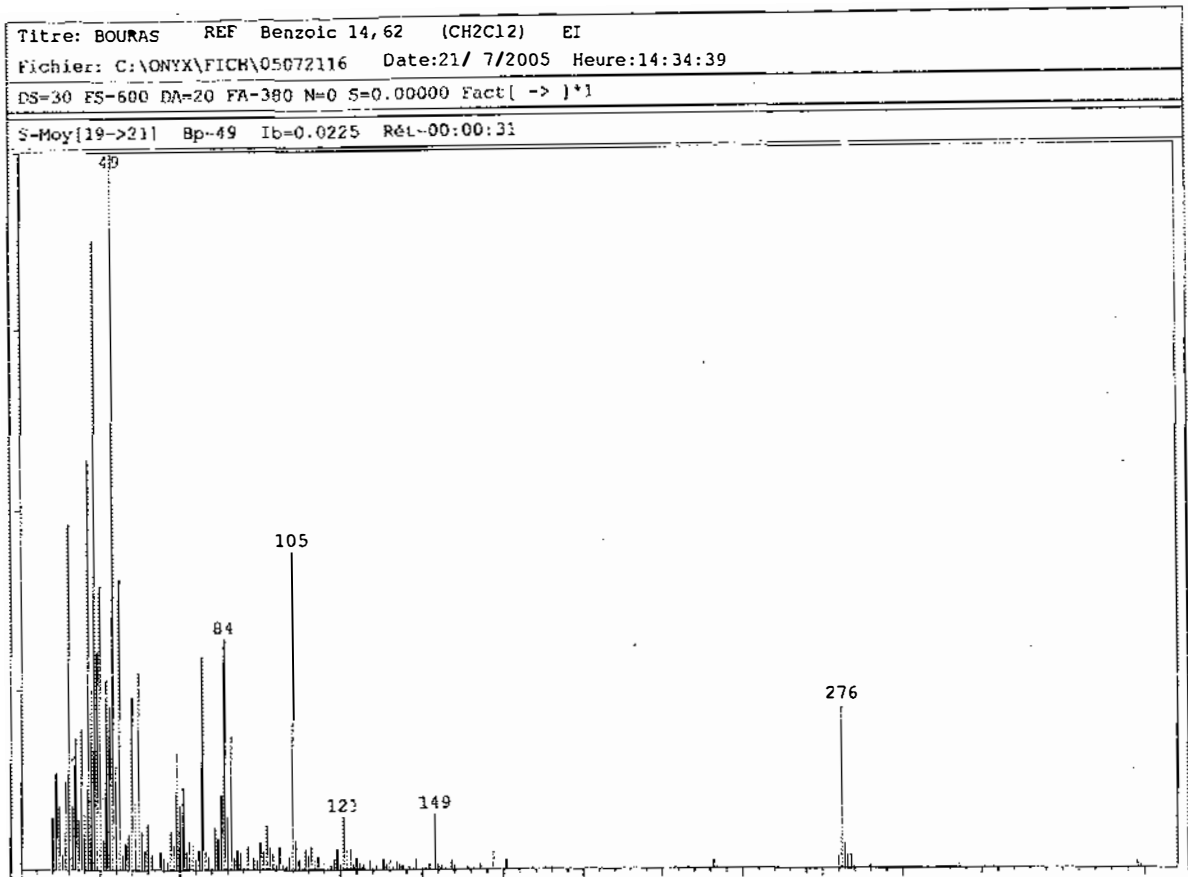


Figure 32. Spectre de masse de la molécule PR 14,60 (par impact électronique direct).

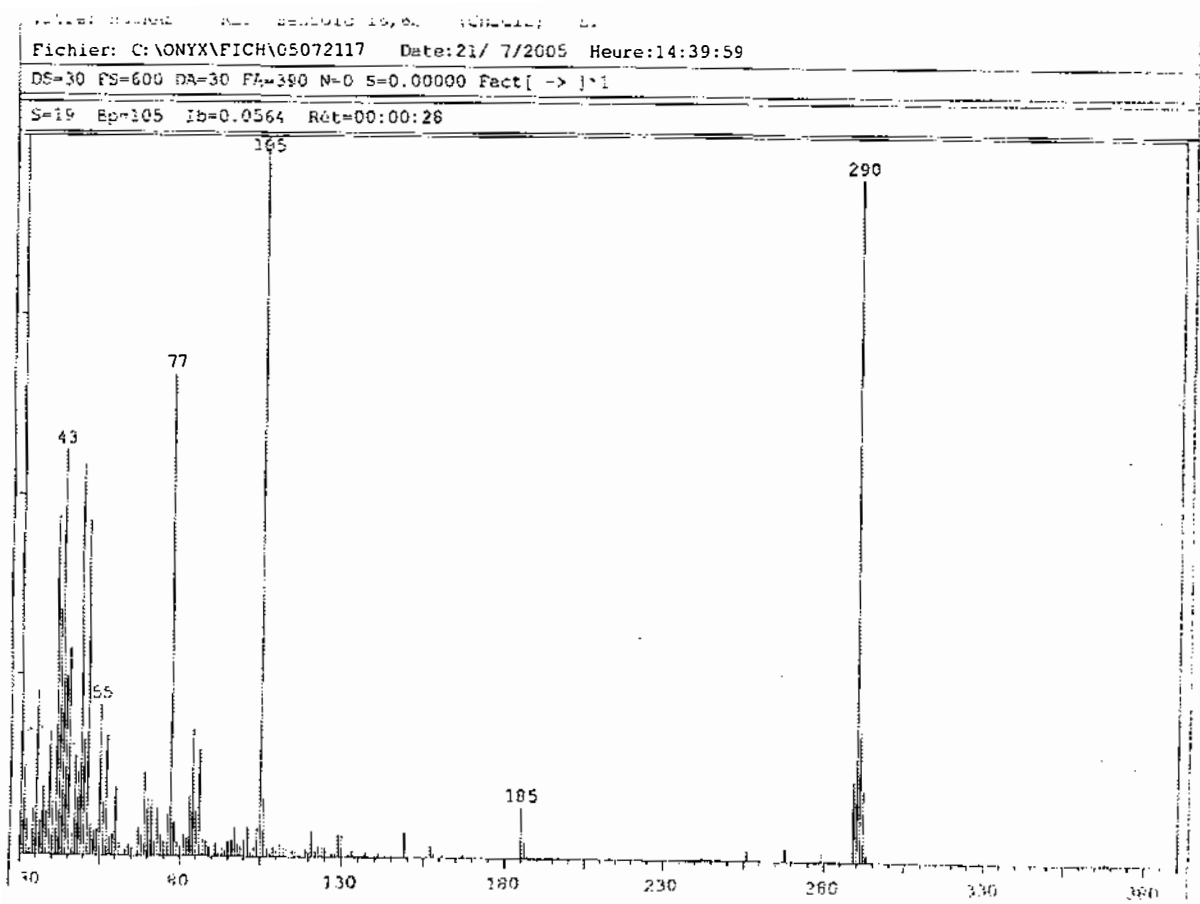


Figure 33. Spectre de masse de la molécule PR 16,64 (par impact électronique direct).

### III.- DISCUSSION

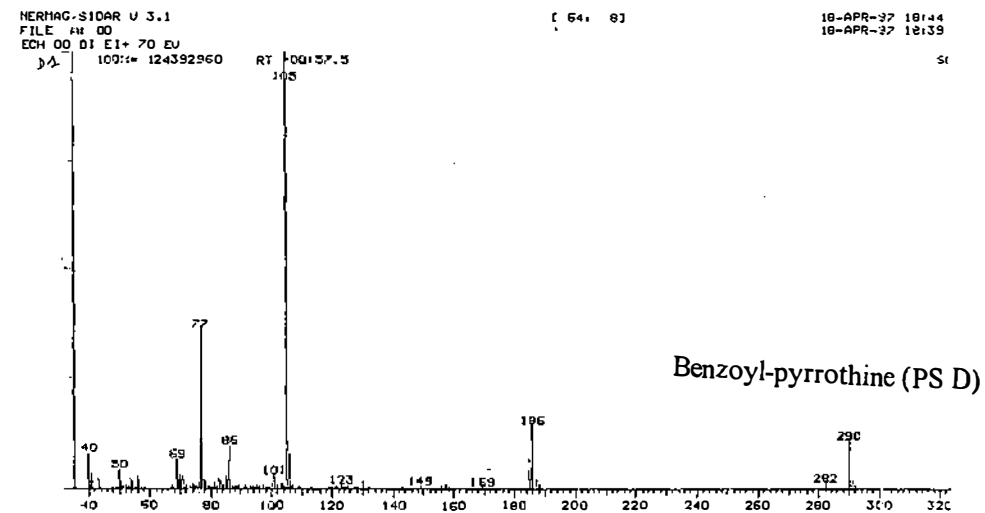
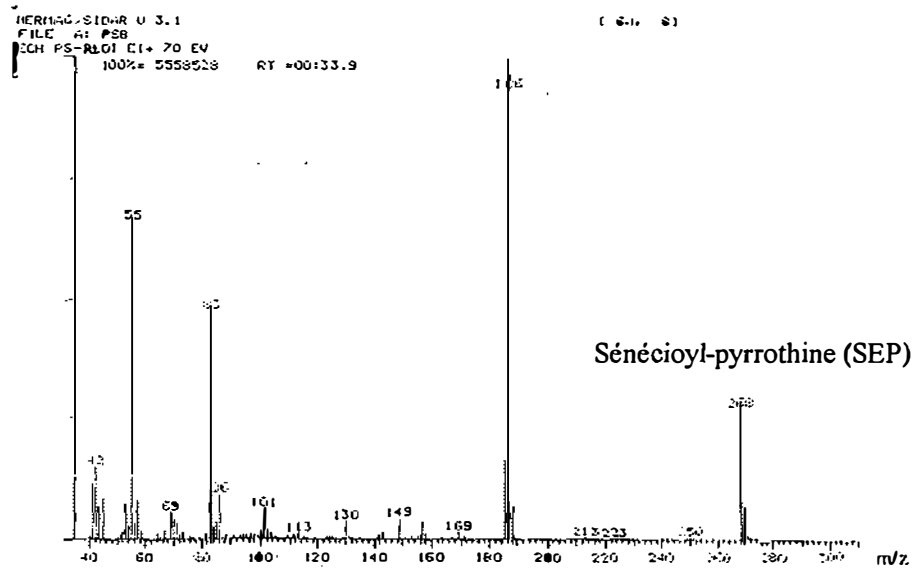
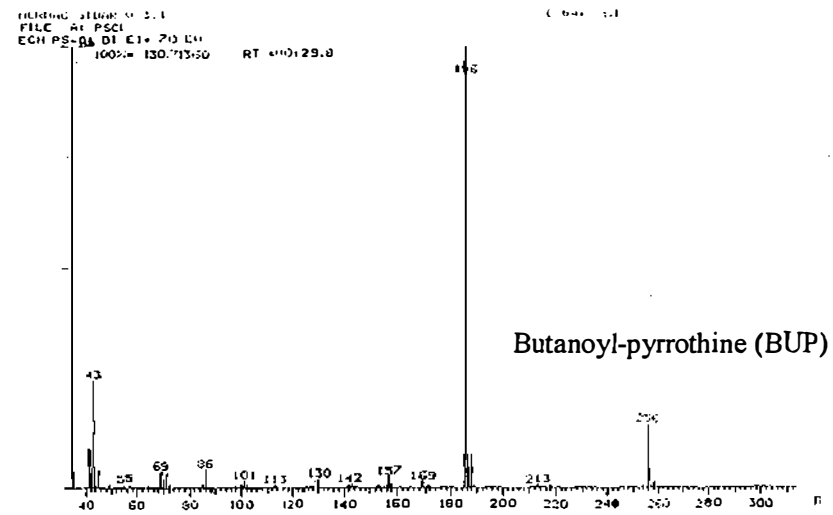
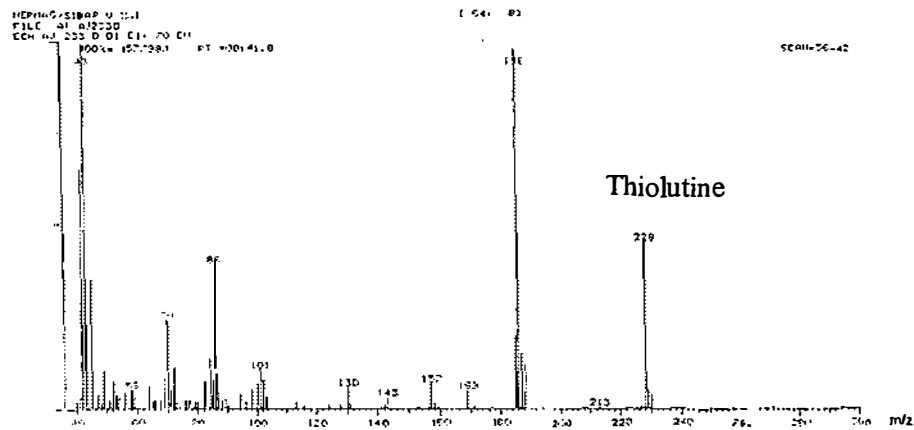
*Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 produit dans le milieu semi-synthétique (MSS) des antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones qui sont la thiolutine, l'isobutyryl-pyrrothine (ISP), la butanoyl-pyrrothine (BUP), la tigloyl-pyrrothine (TIP) et la sénéciol-pyrrothine (SEP). De plus, la souche sécrète également la benzoyl-pyrrothine: PS D (en très faible quantité) dans le milieu complexe ISP2 (Lamari *et al.*, 2002a,b).

Après addition au milieu MSS de certains acides aminés et organiques, la souche d'actinomycète synthétise d'autres molécules présentant la même couleur et les mêmes propriétés chimiques que les dithiopyrrolones, tant du point de vue de l'extractibilité (par le dichlorométhane), du comportement chromatographique et du spectre UV-visible. Certaines d'entre elles ont fait l'objet d'une analyse par spectrométrie de masse qui a donné des résultats intéressants et qui confirment que ces molécules sont des dithiopyrrolones.

Les produits ayant subi cette dernière analyse sont:

- La thiolutine, utilisée comme témoin.
- AJ 0 et AJ 00 obtenues après addition de cystine et de cystéine et à un degré moindre d'acide aurine tricarboxylique.
- AJ 1 et PR 16,64 apparues en présence d'acides organiques dérivés du benzène ou de la coumarine (acide benzoïque et dérivés, acide cinnamique et dérivés, acide coumarique,...).
- PR 14,60 obtenue exclusivement après ajout d'acide benzoïque.
- PR 16,16 apparue en présence uniquement d'acide valérique.
- PR 1 et PR 2 obtenues essentiellement avec l'acide trichloroacétique (pour les deux) ou l'acide trifluoroacétique (pour la seconde).

Les spectres de masse de ces molécules présentent des fragments similaires entre eux et à ceux des dithiopyrrolones déjà connues, telles que la thiolutine, l'ISP, la BUP, la TIP, la SEP et la benzoyl-pyrrothine (figure 34, *in*: Lamari *et al.*, 2002b).



**Figure 34.** Spectres de masse de la thiolutine, la butanoyl-pyrrothine (BUP), la sénécioyl-pyrrothine (SEP) et la benzoyl-pyrrothine, d'après Lamari *et al.*, (2002b).

\* Le spectre de masse de l'ISP est similaire à celui de la BUP (isomères) et celui de la TIP est similaire à celui de la SEP (isomères).



L'analyse spectrale de la thiolutine que nous avons effectuée a donné moins de fragments que celle effectuée par Lamari *et al.* (2002b).

Pour émettre certaines hypothèses de structure des dithiopyrrolones nouvellement apparues dans nos expérimentations, nous présenterons d'abord une corrélation entre certains fragments obtenus au niveau de la thiolutine (et d'autres dithiopyrrolones) et les structures éventuelles de ces fragments.

La thiolutine a un poids moléculaire de 228. Le bombardement d'électron permet l'obtention de plusieurs fragments (figure 35).

- Le fragment  $m/z = 213$  correspond ainsi à la perte d'un  $\text{CH}_3$  de la thiolutine ( $228 - 15 = 213$ ) (figure 35a).

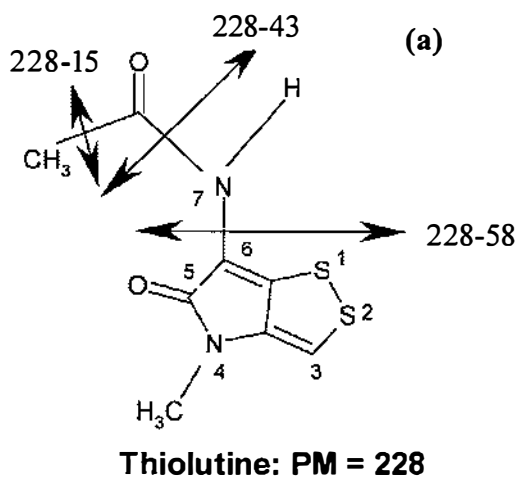
- Le fragment  $m/z = 186$  est obtenu après la perte du  $\text{CH}_3\text{-C=O}$  ( $228 - 43 = 186$ ) (figure 35a); le fragment 43 (obtenu avec toutes les dithiopyrrolones) apparaît dans ce cas.

- La perte du radical  $\text{CH}_3\text{-CO-NH-}$  donne un fragment à  $m/z = 170$  ( $228 - 58 = 170$ ) (Figure 35a). Ce fragment correspond au noyau de base des dithiopyrrolones constitué d'un bi-cycle auxquels sont liés un  $\text{CH}_3$  et un  $=\text{O}$ . La perte de 1 ou 3 H conduirait alors aux fragments à  $m/z = 169$  (observé par Lamari *et al.*, 2002b) ou 167 (obtenu dans notre cas). Le fragment 58 (ou 57) apparaît aussi très souvent après analyse.

- Lorsque le bi-cycle perd le  $\text{CH}_3$  (lié à l'azote n° 4), ceci donnera une structure à  $m/z = 157$  (figure 35b) ou 154 (figure 35c) si 3 H se détachent du noyau cyclique. Ces fragments sont retrouvés lors de nos analyses et ceux effectués par Lamari *et al.* (2002b).

- Par ailleurs, selon Mc Inerney *et al.* (1991), les dithiopyrrolones présentant un fragment à  $m/z = 172$  à la place de 186, sont des molécules ayant dans leur structure 1 H à la place du  $\text{CH}_3$  lié à l'azote n° 4 du cycle. C'est le cas par exemple de l'holomycine à  $\text{PM} = 214$  et dont la fragmentation donnerait une structure à  $m/z = 172$  (figure 36). Cette structure ( $\text{PM} = 172$ ) peut être obtenue chimiquement par hydrolyse ménagée de l'holomycine et a été appelée holothine (Bycroft, 1988).

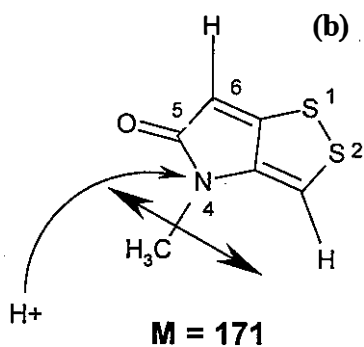
En tenant compte de toutes ces informations, et également de nos résultats, nous avons émis quelques hypothèses de structure de certaines dithiopyrrolones nouvellement synthétisées par *Sa. algeriensis* après addition de quelques acides aminés et organiques.



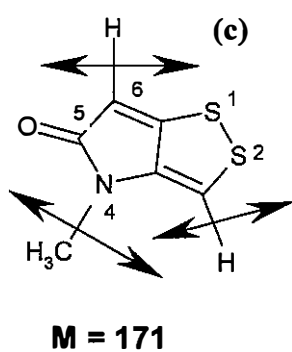
$$228 - 15 = \underline{213} \text{ (M-H): } M = 214.$$

$$228 - 43 = 185 \text{ (M-H): } M = \underline{186}.$$

$$228 - 58 = 170 \text{ (M-H): } M = 171.$$

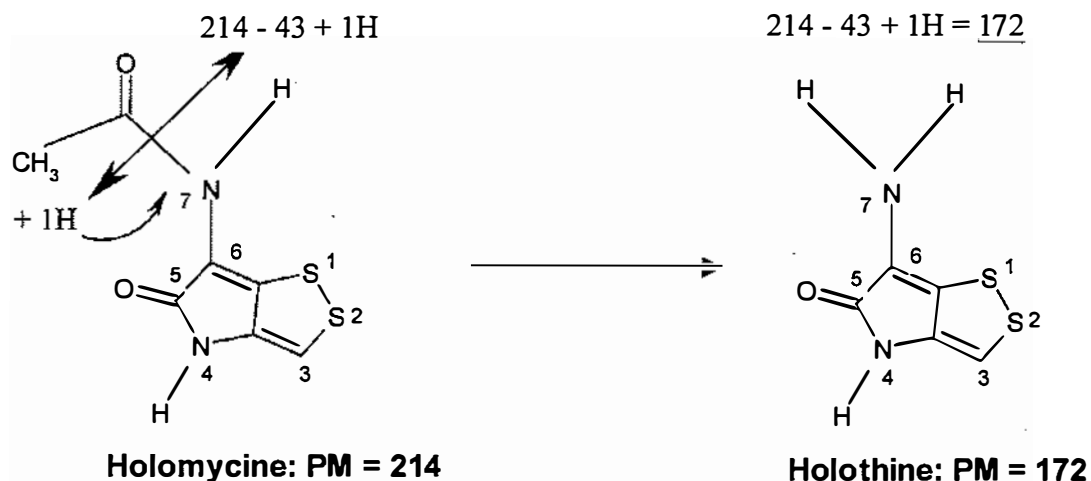


$$171 - 15 + 1 \text{ H} = \underline{157}$$



$$171 - 15 - 2 \text{ H} = \underline{154}$$

**Figure 35.** Hypothèses sur l'origine des fragments de masse à  $m/z = 213$ , 186, 157 et 154, obtenus à partir de la thiolutine (spectrométrie de masse par impact électronique direct).



**Figure 36.** Origine du fragment à  $m/z = 172$  (= holothine) obtenu à partir de l'holomycine (spectrométrie de masse à impact électronique direct). Selon Mc Inermy *et al.* (1991).

- Ainsi, le PM de AJ 00 semble être de 154. Ceci pourrait correspondre au bi-cycle des dithiopyrrolones sans  $\text{CH}_3$  et avec  $=\text{O}$  (figure 37a) correspondant à  $M - 3\text{H}$ ; le PM de AJ 0 serait donc en réalité de  $154 + 3 = 157$ . Cette hypothèse semble probable car les fragments qui découlent de AJ 00 (donc des deux cycles accolés) sont semblables à ceux des autres dithiopyrrolones. AJ 00 représenterait donc le noyau de base des dithiopyrrolones.

- Le PM de AJ 0 est de 172. Dans ce cas, deux hypothèses de structure peuvent être émises.

. La première est que AJ 0 serait le bi-cycle avec  $=\text{O}$  et  $\text{CH}_3$ , donc un PM de 171 (figure 37b).

. La seconde hypothèse, plus probable en raison de la grande polarité de AJ 0 par rapport à la thiolutine (voir profil HPLC, figure 24a et 24b) est que AJ 0 serait le bi-cycle des dithiopyrrolones avec  $=\text{O}$  mais sans  $\text{CH}_3$  (substitué par 1 H), et avec  $\text{NH}_2$  lié au carbone n° 6 (figure 37b'), ce qui donne exactement un PM de 172. Cette structure correspond à celle de l'holothine (Bycroft, 1988), un composé obtenu par hydrolyse de l'holomycine, mais jamais obtenue à l'état naturel dans le monde.

- AJ 1 a un PM de 214, ce qui pourrait correspondre à la structure de la thiolutine (PM = 228) mais dont le  $\text{CH}_3$  du radical a été substitué par un H (figure 37c). AJ 1 est effectivement plus polaire que

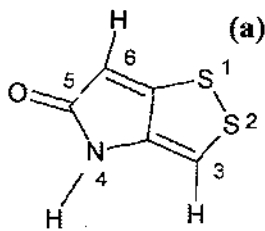
la thiolutine et ses fragments sont similaires à ceux de ce composé. La présence du fragment à  $m/z = 186$  exclut son appartenance à l'holomycine qui a le même PM mais un fragment à  $m/z = 172$ . Dans la littérature, une telle structure n'existe pas et AJ 1 pourrait être ainsi une nouvelle dithiopyrrolone.

- Le composé PR 16,16 a un PM de 270. Cette molécule est obtenue après addition de l'acide valérique [ $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-COOH}$ ]. Elle est nettement moins polaire que la thiolutine et ses fragments de masse sont similaires. Vu la capacité de notre souche à synthétiser la tigloyl-pyrrothine en présence d'acide tiglique, la butanoyl-pyrrothine en présence d'acide butyrique, etc., on serait tenté de croire que cette souche ait également synthétisé une nouvelle dithiopyrrolone, dont la structure intègre l'acide valérique au niveau du radical, ce qui donnerait effectivement un PM de 270 (figure 37d). Une telle structure est nouvelle. Cependant, PR 16,16 pourrait aussi être assimilée à la xénorhabdine VI ou à la xénorhabdine I (voir partie bibliographique, pages 14-15, tableau 3). La première est une 3-méthyl butanoyl-pyrrothine [ $\text{R} = \text{H-N-CO-(CH}_2\text{)}_2\text{-CH}_3$ ] et la seconde, une hexanoyl-holothine [ $\text{R} = \text{H-N-CO-(CH}_2\text{)}_4\text{-CH}_3$ ]. Cependant, au vu de la structure de l'acide valérique et vu aussi la présence du fragment 186 (au lieu de 172) de PR 16,16, il est plus probable que celle-ci soit un nouveau dérivé de dithiopyrrolone, c'est-à-dire, une "valéryl-pyrrothine" (voir annexe 3).

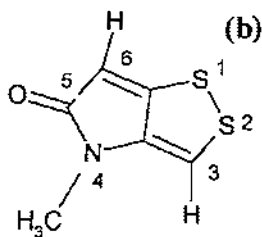
- La molécule PR 16,64, obtenue avec les acides benzoïque et cinnamique, a un PM de 290. En tenant compte de ce PM, des fragments de masse, du spectre UV-visible et du temps de rétention en HPLC, PR 16,64 est identique à la benzoyl-pyrrothine (PS D) identifiée par Lamari *et al.* (2002b). PSD possède dans sa structure un cycle benzénique, matérialisé par le fragment à  $m/z = 77$  (benzène substitué). Ce fragment est absent chez toutes les molécules citées précédemment. PR 16,64 serait donc la benzoyl-pyrrothine (figure 37e).

- La molécule PR 14,60 obtenue uniquement avec l'acide benzoïque, a un PM de 276, soit 14 de moins que la benzoyl-pyrrothine; ceci correspondrait à moins un  $\text{CH}_3$ . PR 14,60 possède le fragment 77, donc possède le cycle benzénique également (figure 32). Le  $\text{CH}_3$  en moins par rapport à la benzoyl-pyrrothine ne peut donc être que celui lié à l'azote n° 4, ce qui donnerait une structure plus polaire que la précédente molécule, donc un temps de rétention en HPLC moindre (ce qui est le cas). La perte de ce  $\text{CH}_3$  est confirmée par l'absence du fragment 186 et la présence du fragment 171 (assez petit) (figure 32). PR 14,60 serait donc une diméthyl-benzoyl-pyrrothine (figure 37f), laquelle n'a jamais été signalée dans la littérature.

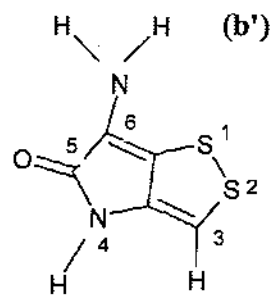
- Enfin, pour les molécules PR 1 et PR 2 obtenues avec l'acide trichloroacétique (pour les deux) et trifluoroacétique (pour PR 2 uniquement), leurs PM semblent être respectivement de 167 et 218. Ces deux molécules se distinguent de toutes les dithiopyrrolones synthétisés par leur couleur rose (jaune pour les autres) et par leur spectre UV-visible ayant un maximum à 302 nm. Les fragments de masse sont cependant similaires à ceux des autres molécules, ce qui atteste d'une structure de base assez proche. Cependant, PR1 et PR2 ne contiennent pas dans le structure du chlore, car l'amas isotopique du pic moléculaire de ces deux molécules montre des fragments très nettement inférieurs aux 2/3 du pic principal (si le chlore était présent, ces fragments atteindraient justement les 2/3 de ce pic). Des investigations de recherche plus approfondies sont nécessaires pour déterminer leur structure.



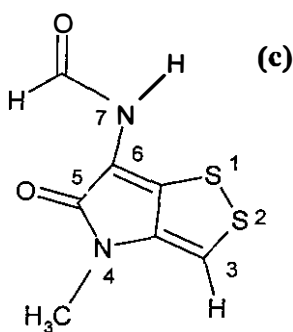
AJ 00: PM = 157



AJ 0: PM = 171 (hypothèse 1)  
Le CH<sub>3</sub> pourrait être aussi lié  
au C n° 3 ou au C n° 6

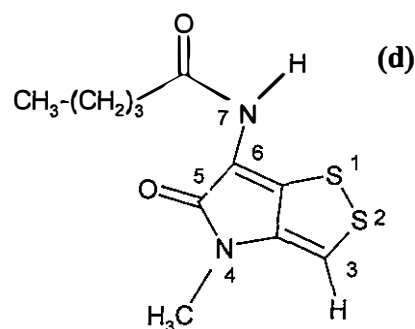


AJ 0: PM = 172 (hypothèse 2)  
(= holothine)



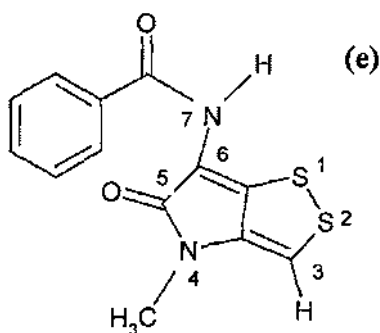
AJ 1: PM = 214

Le CH<sub>3</sub> pourrait être aussi lié  
au C n° 3 ou à N n° 7



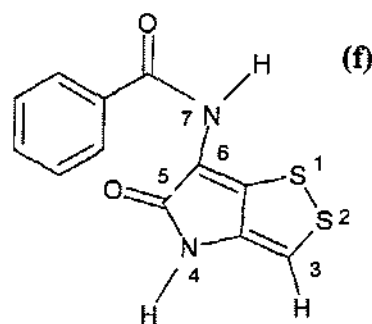
PR 16,16: PM = 270

(= valéryl-pyrrothine)



PR 16,64: PM = 290

(= benzoyl-pyrrothine)



PR 14,60: PM = 276

(= déméthyl-benzoyl-pyrrothine)

Figure 37. Hypothèse de structure de AJ 00 (a), AJ 0 (b et b'), AJ 1 (c), PR 16,16 (d), PR 16,64 (e), PR 16,64 (e) et PR 14,60 (f).

Il est connu que la composition de milieu de culture peut avoir un impact important sur la production de métabolites secondaires chez les microorganismes. La production de ces métabolites dépend de la nature et la concentration des sources de carbone et d'azote dans le milieu de culture, ainsi que la disponibilité de différents précurseurs. En général, la variation des paramètres de cultures offre des possibilités de modifications des voies de biosynthèse et la disponibilité en précurseurs aboutissant à la production des nouvelles molécules (Waites *et al.*, 2001; Bode *et al.*, 2002).

Dans notre cas, la nature et la concentration de l'acide organique ou l'acide aminé ajouté dans le milieu de culture joue un rôle important dans la production des dithiopyrrolones. La présence de certains acides organiques et aminés stimule la production de nouvelles molécules. Ces nouvelles molécules n'existent pas dans le cas où le milieu semi-synthétique de base est utilisé. Lorsque les concentrations ne sont pas en excès, ces acides organiques stimulent la production des dithiopyrrolones, éventuellement en fournissant différents types d'acides gras à courtes chaînes. Les précurseurs issus du catabolisme des acides organiques seraient des acyl-CoA qui conduisent à la biosynthèse de nouvelles dithiopyrrolones.

Certains acides organiques agissent de manière plus efficace à des concentrations relativement élevées, comme c'est le cas de l'acide cinnamique (5 mM pour PR 16,64 et 7,5 mM pour AJ 1 et PR 17,65) et inversement d'autres acides agissent mieux à des concentrations basses, comme l'acide benzoïque (1,25 mM pour PR 16,64 et PR 17,65 et 2,5 mM pour AJ 1). De même, les concentrations optimales d'acides organiques pour la production d'une même dithiopyrrolone varient suivant l'acide considéré. Par exemple, la concentration optimale pour la production de PR 3 est de 5 mM pour l'acide valérique et 7,5 mM pour l'acide propionique.

Nous avons remarqué que certaines dithiopyrrolones sont produites par différents acides organiques et acides aminés comme PR 16,64 et AJ 1. De même, la molécule PR 17,27 est induite en présence de méthionine et d'éthionine et elle pourrait être la même molécule que celle induite par l'acide 3-hydroxy-4-méthoxymandélique. En revanche, d'autres dithiopyrrolones sont produites uniquement en présence d'un seul acide organique ou acide aminé comme PR 16,85 et PR 17,90 (avec l'acide sorbique), PR 20,10 (avec l'acide 4-bromobenzoïque) ou PR 11,02 (avec l'arginine).

Lam *et al.* (2001) ont montré chez *Saccharothrix aerocolonigenes* ATCC 39243 l'induction de trois nouvelles molécules antitumorales: les fluoroindocarbazoles A et B par l'addition de la DL-6-fluorotryptophane et la fluoroindocarbazole C par l'addition de la DL-5-fluorotryptophane dans le milieu de culture. La production de ces trois dérivés par cette souche se fait par intégration du fluor dans la molécule de base (indocarbazole) produite en présence du tryptophane (sans fluor).

Ce phénomène d'intégration de molécules est observé également dans notre cas:

PR 16,64 qui est la benzoyl-pyrrothine, est obtenue après addition de l'acide benzoïque et cinnamique et probablement de tous les acides organiques cycliques dérivés du benzène, à l'exception de l'acide 4-bromobenzoïque qui inhibe cette molécule au profit de la thiolutine, de la SEP et de PR 20,10 (voir ci-après pour cette dernière). L'acide cinnamique, qui possède une chaîne latérale avec 2 CH en plus par rapport à l'acide benzoïque, s'est révélé meilleur que ce dernier pour la production de PR 16,64. *Sa. algeriensis* semble mieux l'assimiler, avant de le transformer progressivement en acide benzoïque lequel serait alors intégré (au fur et à mesure de son apparition) dans la structure de base pour donner la benzoyl-pyrrothine (PR 16,64). Sutherland *et al.* (1983) et Brunati *et al.* (2004) ont signalé la transformation de l'acide cinnamique en acide benzoïque par *Streptomyces setonii*.

PR 14,60 (probablement la diméthyl-benzoyl-pyrrothine) et PR 16,16 (probablement la valéryl-pyrrothine) sont obtenues uniquement après ajout des acides benzoïque et valérique, respectivement.

Il se pourrait également que PR 16,85 ou PR 17,90 (temps de rétention: TR = 16,85 et 17,90 min) induites par l'addition de l'acide sorbique, soient synthétisées après intégration de cet acide dans la molécule de base de la dithiolopyrrolone.

Dans le même ordre d'idée, PR 19,57 et PR 20,10 obtenues grâce respectivement aux acides 4-chlorobenzoïque et 4-bromobenzoïque, pourraient être des dérivés chlorés et bromés de la benzoyl-pyrrothine (PR 16,64) et de la supposée diméthyl-benzoyl-pyrrothine (PR 14,60) obtenues avec l'acide benzoïque.

Enfin, la molécule PR 3 (TR = 12,34) induite par l'acide propionique, pourrait être la propionyl-pyrrothine (temps de rétention similaire), antibiotique à PM = 242 et synthétisé par *Streptomyces kasugaensis* et *S. pimprina* (Yamagishi *et al.*, 1971; Naïk *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces hypothèses ne peut être confirmé qu'après la détermination des structures chimiques de toutes les molécules citées précédemment.



Cependant, d'autres mécanismes que celui relatif à l'intégration des acides organiques dans la structure de base de la dithiopyrrolone semblent également exister chez *Sa. algeriensis*. Ainsi, AJ 1 qui ne comporte pas de benzène dans sa structure, est induite par tous les acides organiques cycliques contenant du benzène. AJ 0 et AJ 00 sont induites par l'acide aurine tricarboxylique (structure avec trois molécules de benzène). D'autres cas semblent aussi exister au vu de la structure de l'acide organique et du temps de rétention de la dithiopyrrolone nouvellement apparue en présence de cet acide: ex. PR 12,63 pour les acides férulique et 3-hydroxy-4-méthoxymandélique, PR 8,03, PR 10,55 et PR 11,85 pour l'acide 3,5-dinitrosalicylique, etc. Ils se pourrait donc que ces acides inhibent certaines voies de biosynthèse en favorisant d'autres voies ou agissent encore par d'autres mécanismes.

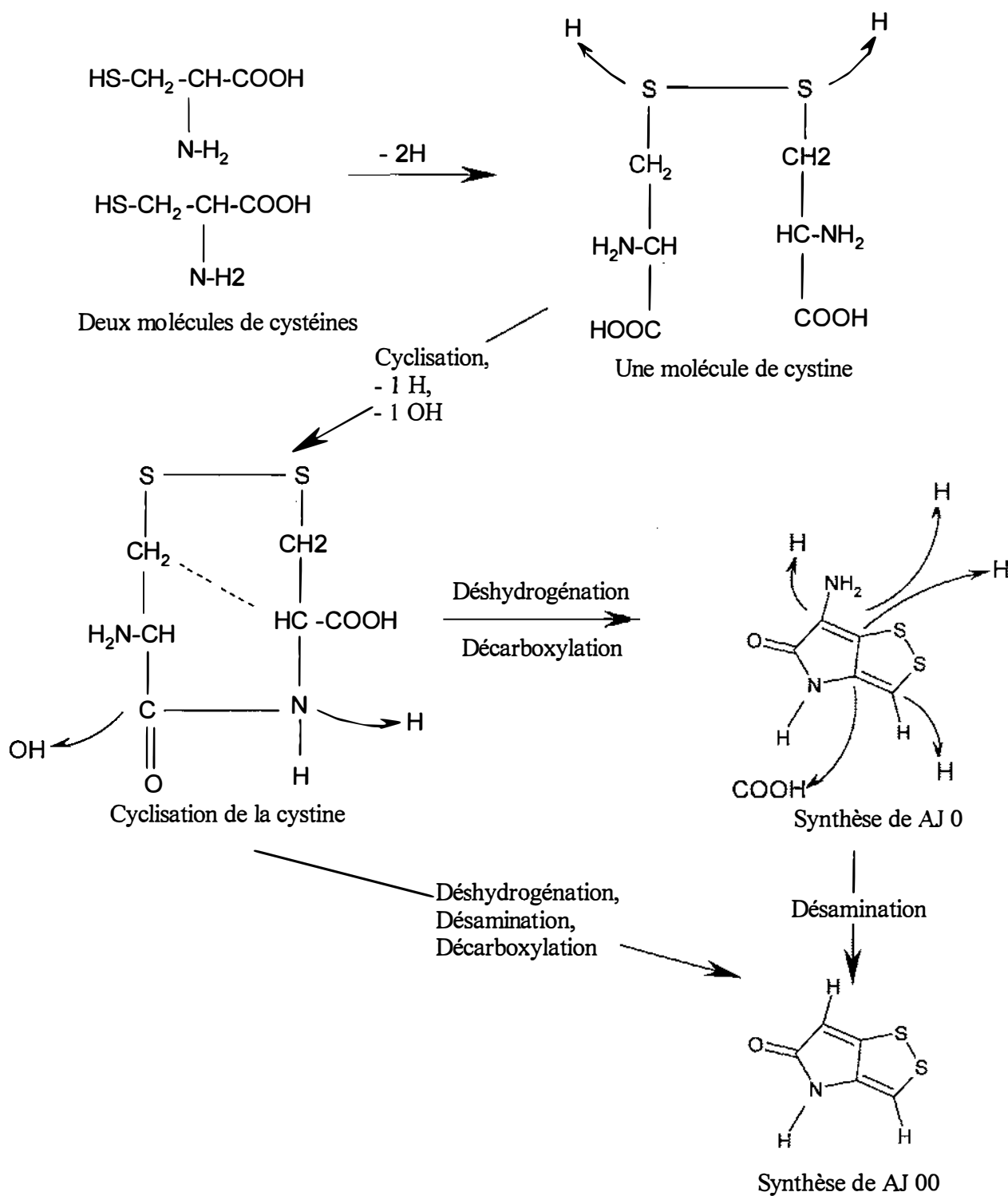
Il faut également signaler que les acides organiques dérivés directement de l'acide benzoïque mais comportant en plus dans leur chaîne latérale 1 ou 2 CH et avec ou sans OH, NH ou CO (acides cinnamique, hippurique et mandélique), favorisent mieux la production de la benzoyl-pyrrothine PR 16,64, alors que l'absence des CH et la présence des OH, Br, Cl, SO<sub>3</sub>H et NH<sub>2</sub> (acides 3-hydroxybenzoïque, 3,5-dihydroxybenzoïque, 4-bromobenzoïque, 4-chlorobenzoïque, *p*-aminobenzoïque et sulfosalicylique) inhibent cet antibiotique. Par contre, la production de la thiolutine est très fortement inhibée lorsque l'acide benzoïque est aminé (acide *p*-aminobenzoïque), hydroxylé (acides hydroxy- ou dihydroxy-benzoïque et mandélique) et favorisée par l'apport du brome de l'acide 4-bromobenzoïque.

En ce qui concerne l'influence des acides aminés sur la production des dithiopyrrolones, des résultats intéressants sont obtenus avec la cystéine et surtout, avec la cystine. Ces deux acides aminés ont été considérés (hypothèse) par Furumai *et al.* (1982), comme étant des précurseurs de la thiolutine et d'autres dérivés.

Cependant, nous avons constaté que seule la cystine favorise très fortement la production de la thiolutine, contrairement à la cystéine qui l'inhibe. Par contre, les deux acides aminés induisent la production de AJ 0 et de AJ 00 (voir structures proposées dans la figure 37) qui seraient probablement des intermédiaires de biosynthèse de la thiolutine (du moins, pour AJ 0).

L'hypothèse que nous avons émise sur la biosynthèse de AJ 0 et de AJ 00 par *Sa. algeriensis* est donnée dans la figure 38. Ces deux antibiotiques seraient synthétisés à partir de cystéine et de cystine après une série de réactions de cyclisation, de déshydrogénation, de décarboxylation et de désamination. AJ 0 (PM = 172) correspondrait probablement à l'holothine, déjà obtenue par

hydrolyse partielle de l'holomycine (Bycroft, 1988), mais jamais signalée à l'état naturel. La thiolutine pourrait être biosynthétisée après addition d'un  $-CO-CH_3$  sur le  $NH_2$  de AJ 0 et d'un  $CH_3$  sur le N du cycle de cette molécule. La cystéine, contrairement à la cystine, semble donc inhiber cette addition, par un mécanisme qu'il serait intéressant d'élucider à l'avenir.



**Figure 38.** Hypothèse sur la biosynthèse de AJ 0 et AJ 00 à partir de cystéine et de cystine.

\* Remarque: la structure de AJ 0 est considérée selon l'hypothèse n° 2 qui est la plus probable et correspondant à l'holothine (voir figure 37).

Enfin, les acides aminés basiques tels que la glutamine et l'arginine, et les acides aminés soufrés comme la méthionine et son analogue, l'éthionine, inhibent fortement ou même totalement parfois, la synthèse de la thiolutine tout en induisant la formation de nouvelles dithiopyrrolones, mais à des quantités faibles à très faibles.

En conclusion, les résultats obtenus montrent que la production de nouvelles dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis* est induite suite à un changement d'un seul paramètre qui est l'addition d'acides organiques ou d'acides aminés dans le milieu de culture. Ceci est particulièrement important dans le cas d'un procédé de production de nouveaux antibiotiques.

## **CHAPITRE V.**

# **ETUDE CINETIQUE DE LA CROISSANCE DE *SACCHAROTHRIX ALGERIENSIS* ET DE LA PRODUCTION DES DITHIOLOPYRROLONES EN FERMENTEUR BATCH SUR UN MILIEU SEMI-SYNTHETIQUE**

## I.- INTRODUCTION

Les travaux antérieurs réalisés dans des Erlenmeyers ont montré que la production, par *Sa. algeriensis*, des dithiopyrrolones déjà caractérisées: la thiolutine, la sénécioyl-pyrrothine (SEP), la tigloyl-pyrrothine (TIP), l'isobutyryl-pyrrothine (ISP) et la butanoyl-pyrrothine (BUP) et des dithiopyrrolones nouvellement apparues, est influencée par la nature et la concentration de différents acides organiques ajoutés dans le milieu de culture. Ainsi, l'addition de 1 g/L d'acide humique dans le milieu de culture provoque une importante augmentation de toutes les dithiopyrrolones caractérisées. De plus, des concentrations de 2,5 mM d'acide tiglique et de 5 mM d'acide méthacrylique mènent à une meilleure production de la tigloyl-pyrrothine et de la butanoyl-pyrrothine, respectivement. En outre, l'acide benzoïque à 1,25 mM favorise nettement la production des nouvelles dithiopyrrolones PR 16,64 et PR 17,65.

Afin d'affiner nos résultats dans des conditions mieux contrôlables, nous avons choisi quatre acides organiques: l'acide tiglique (à 2,50 mM), l'acide méthacrylique (à 5 mM), l'acide benzoïque (à 1,25 mM) et l'acide humique (à 1 g/L). Ces acides organiques ont été testés pour la croissance et la production des dithiopyrrolones sur le milieu semi synthétique de base (MSS) contenant 25 g/L de glucose.

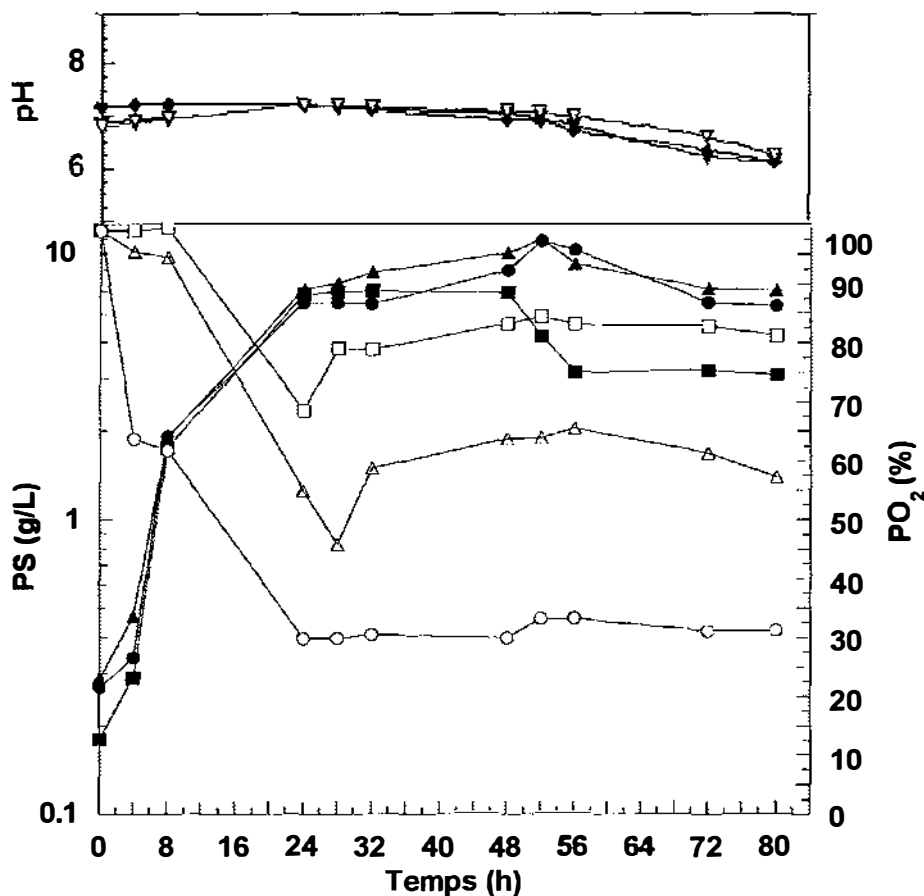
## II.- RESULTATS

### 1.- Effet sur la croissance de *Sa. algeriensis*

D'après les résultats obtenus sur la figure 38, la croissance de *Sa. algeriensis* dans toutes les fermentations (en présence d'acide tiglique, d'acide méthacrylique et dans le milieu témoin) est très rapide pendant les dix premières heures de culture. La biomasse maximale obtenue est de 5,97 g/L pour le témoin, 8,90 g/L en présence d'acide tiglique et 8,80 g/L en présence d'acide méthacrylique. La phase stationnaire est observée globalement entre 24 et 52 h de fermentation. De plus, après 48 h de fermentation, la culture témoin subit une lyse cellulaire partielle. En revanche, en présence d'acide tiglique ou d'acide méthacrylique, la biomasse se maintient à un niveau élevé.

Les valeurs obtenues de la vitesse spécifique maximale de croissance ( $\mu_{max}$ ) sont de 0,31, 0,31 et 0,32 h<sup>-1</sup>, en présence d'acide tiglique, d'acide méthacrylique et dans le milieu le témoin, respectivement. D'après ces résultats, il semblerait qu'il n'y ait pas de différence significative

concernant la croissance de *Sa. algeriensis* en présence des différents acides organiques. En outre, la vitesse spécifique maximale de croissance ( $\mu_{max}$ ) est obtenue après 8 h de fermentation en présence d'acide méthacrylique et après 10 h en présence d'acide tiglique et dans le milieu témoin.



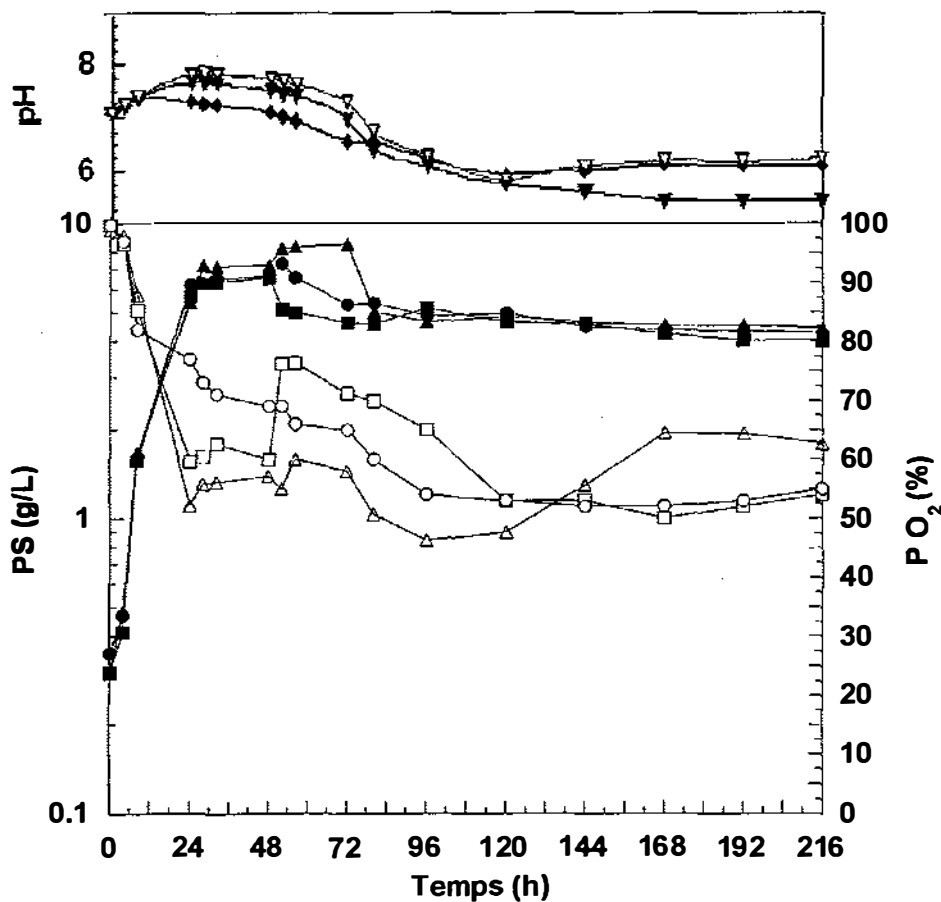
**Figure 38.** Cinétique de la variation de la biomasse ( $\blacktriangle$ ,  $\bullet$ ,  $\blacksquare$ ),  $P(O_2)$  ( $\triangle$ ,  $\circ$ ,  $\square$ ) et du pH ( $\blacktriangledown$ ,  $\triangledown$ ,  $\blacklozenge$ ), dans différentes cultures en batch, dans des fermenteurs de 2 L, en présence d'acide tiglique (2,5 mM), d'acide méthacrylique (5 mM), et dans le milieu témoin, respectivement.

Dans une deuxième série nous avons effectué des fermentations en présence d'acide benzoïque et d'acide humique mais pour une durée de fermentation de 216 heures. Nous avons utilisé l'acide benzoïque pour étudier son effet stimulateur sur la biosynthèse de nouvelles dithiopyrrolones comme celles obtenues dans le cas des fermentations en Erlenmeyers.

On remarque dans cette série de fermentation que la croissance est très rapide pendant les dix premières heures (figure 39). Les valeurs de la biomasse maximale sont de 6,54, 8,54 et 7,32 g/L pour le témoin et en présence d'acide benzoïque et d'acide humique, respectivement. Après 48 h

de fermentation, la culture témoin subit une lyse cellulaire plus remarquable que celles contenant les acides benzoïque et humique.

Les valeurs obtenues de  $\mu_{max}$  sont de  $0,27\text{ h}^{-1}$  pour le témoin et de  $0,30\text{ h}^{-1}$  en présence d'acide benzoïque et d'acide humique. Ces valeurs ont été obtenues après 13 h de fermentation chez le témoin et en présence d'acide humique et uniquement après à 25 h en présence d'acide benzoïque. Nos résultats montrent qu'il n'y a pas une différence significative de la croissance de *Sa. algeriensis* en présence des différents acides organiques.



**Figure 39.** Cinétique de la variation de la biomasse ( $\blacktriangle$ ,  $\bullet$ ,  $\blacksquare$ ),  $P(O_2)$  ( $\Delta$ ,  $\circ$ ,  $\square$ ) et du pH ( $\blacktriangledown$ ,  $\triangledown$ ,  $\blacklozenge$ ), dans différentes cultures de 2 L, en fermenteur, en présence d'acide benzoïque (1,25 mM), d'acide humique (1 g/L), et dans le milieu témoin, respectivement.

## 2.- Effet sur le pH et le $P(O_2)$

En présence d'acide tiglique, d'acide méthacrylique et dans le milieu témoin, les résultats obtenus montrent que malgré une légère acidification observée après 52 h de fermentation, le pH



évolue peu (une unité et demi) dans ce milieu fortement tamponné par le  $\text{CaCO}_3$  (figure 38). Par ailleurs, nous avons remarqué pour toutes les cultures, et dès les 24 premières heures suivant la mise en culture, que la  $\text{PO}_2$  chute rapidement. Cette observation témoigne d'un métabolisme actif qui s'installe et qui se traduit par l'augmentation de la biomasse. En outre, chez le témoin et en présence d'acide tiglique, nous avons remarqué une légère augmentation de la  $\text{PO}_2$  après 24 h de fermentation. Cette augmentation est probablement due à la lyse partielle des cellules. En présence d'acide méthacrylique, on observe qu'au fur et à mesure que la production de la biomasse se poursuit, le taux d' $\text{O}_2$  est maintenu à 30% (point de consigne).

Lors des fermentations en présence d'acide benzoïque, d'acide humique et dans le milieu témoin, les valeurs du pH ne sont pas significativement affectées pendant les 80 premières heures de fermentation (figure 39). En revanche, une légère acidification est observée après cette période de fermentation. L'acidité du milieu de culture en présence d'acide benzoïque est plus prononcée par rapport aux deux autres cultures (acide humique et témoin). Par ailleurs, nous avons remarqué une consommation rapide d' $\text{O}_2$  pendant les 24 premières heures de fermentation en présence d'acide benzoïque et dans le milieu le témoin. Cette période coïncide avec la phase exponentielle de croissance du microorganisme. En revanche, la chute du taux de l'oxygène dans le milieu de culture est moins prononcée en présence d'acide humique. De plus, chez le témoin en particulier, nous avons remarqué une légère augmentation de la  $\text{PO}_2$ . Elle serait due à une lyse cellulaire partielle.

### **3.- Effet sur la consommation des substrats**

Nous constatons par ailleurs que les quantités d'azote total et minéral diminuent lentement dans le milieu de culture, en particulier pour l'azote minéral en présence de l'acide méthacrylique, et pour l'azote total et minéral en présence de l'acide tiglique (figure 40).

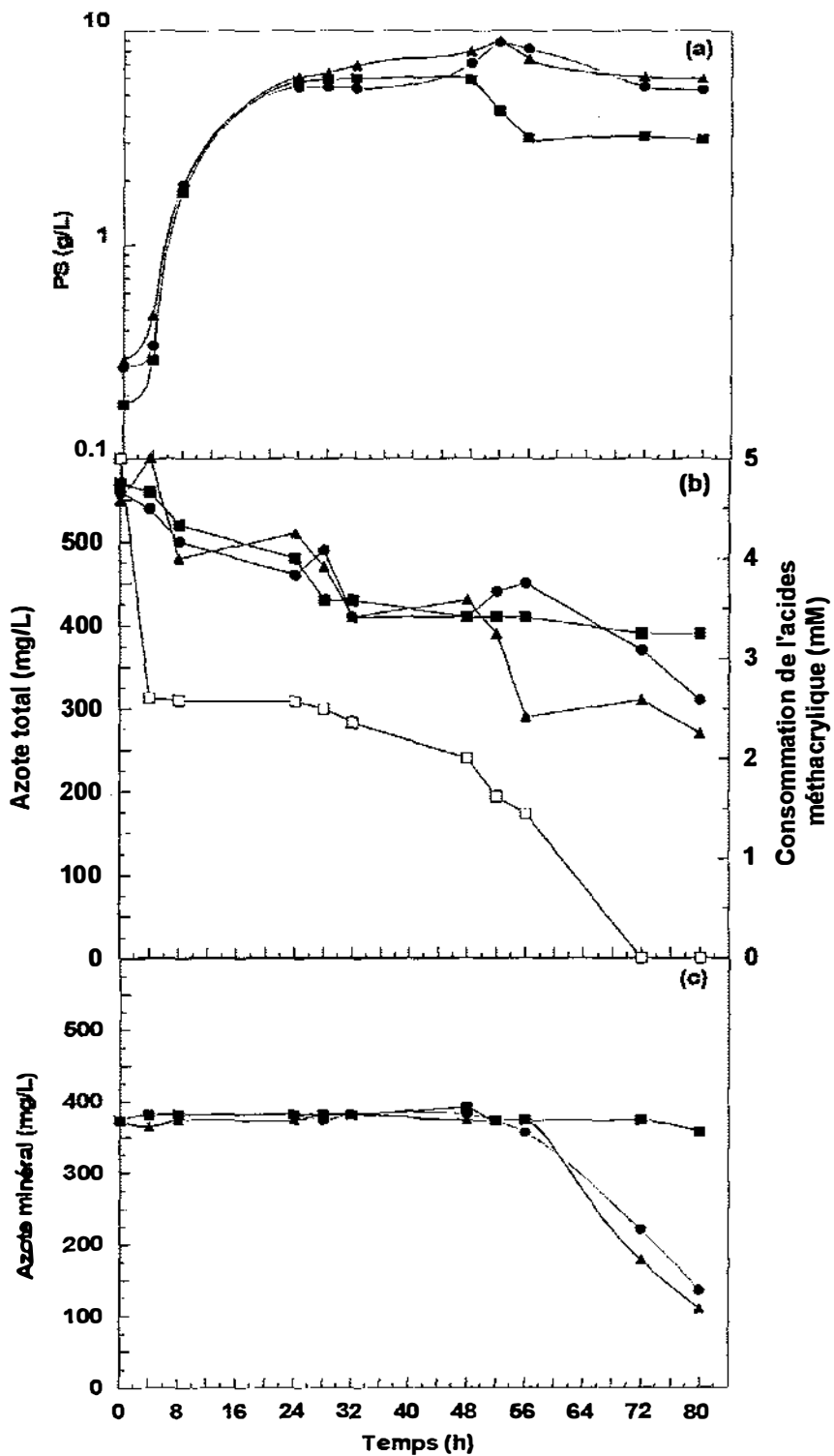


Figure 40. Cinétique de la variation de la biomasse (a) (▲, ●, ■), de l'azote total (b) (▲, ●, ■) et consommation de l'acide méthacrylique (b) (□) et de l'azote minéral (c) (▲, ●, ■), en différentes cultures en batch, dans des fermenteurs de 2 L, en présence d'acide tiglique (2,5 mM), d'acide méthacrylique (5 mM), et dans le témoin, respectivement.

Nous avons remarqué que les quantités d'azote total et minéral diminuent lentement dans toutes les cultures en présence d'acide benzoïque, d'acide humique et dans le milieu témoin pendant les 80 premières heures de fermentation. La quantité d'azote minéral est nulle à partir de 144 h de fermentation pour le témoin et également en présence d'acide benzoïque (figure 41).

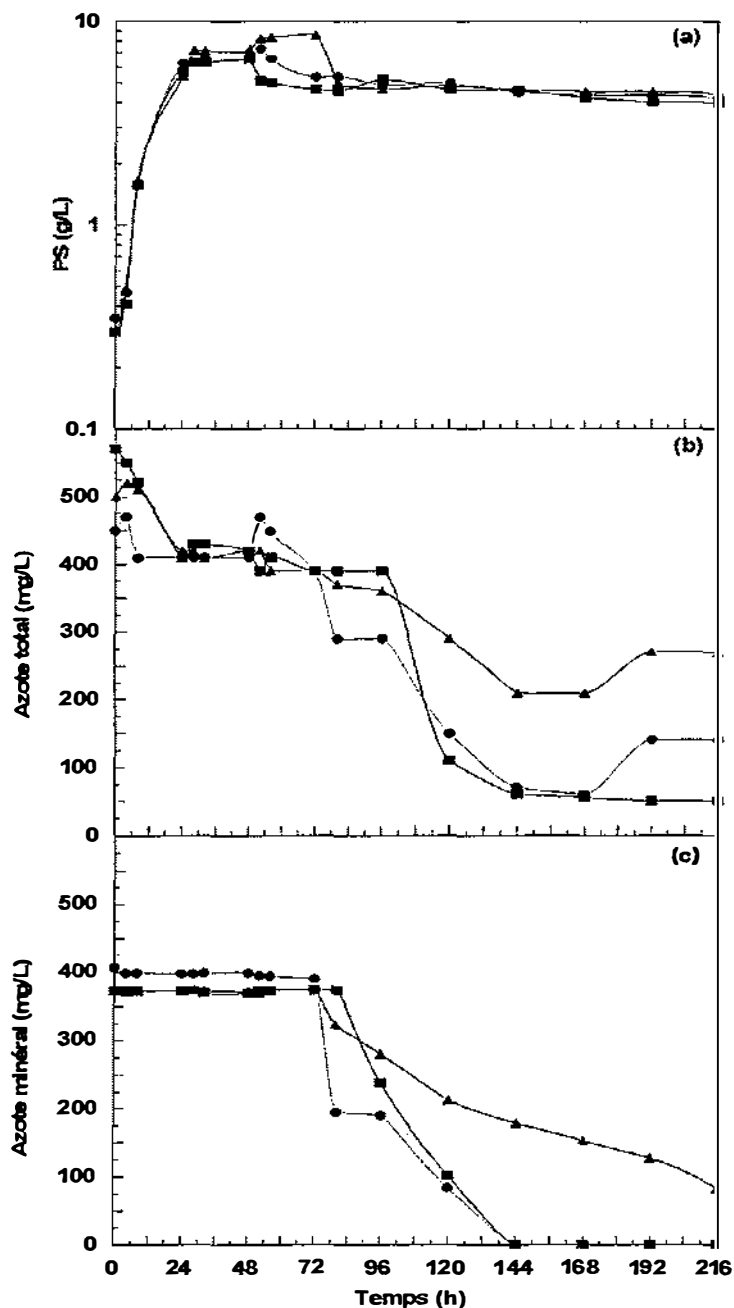


Figure 41. Cinétique de la variation de la biomasse (a) (▲, ●, ■), de l'azote total (b) (▲, ●, ■) et de l'azote minéral (c) (▲, ●, ■), dans différentes cultures en batch, dans des fermenteurs de 2 L, en présence d'acide benzoïque (1,25 mM), d'acide humique (1 g/L), et dans le témoin, respectivement.

En dehors de l'acide méthacrylique, aucun autre acide n'a pu être détecté par la méthode HPLC utilisée. Nous avons présenté alors uniquement la cinétique de consommation de l'acide méthacrylique et nous avons remarqué que sa concentration passe de 5 mM au début de la fermentation à 0 mM après 72 h de fermentation (figure 40). L'éventuelle excrétion des acides organiques à courte chaîne comme l'acétate, le propionate ou le butyrate a été recherchée. Aucun de ces acides n'a été détecté.

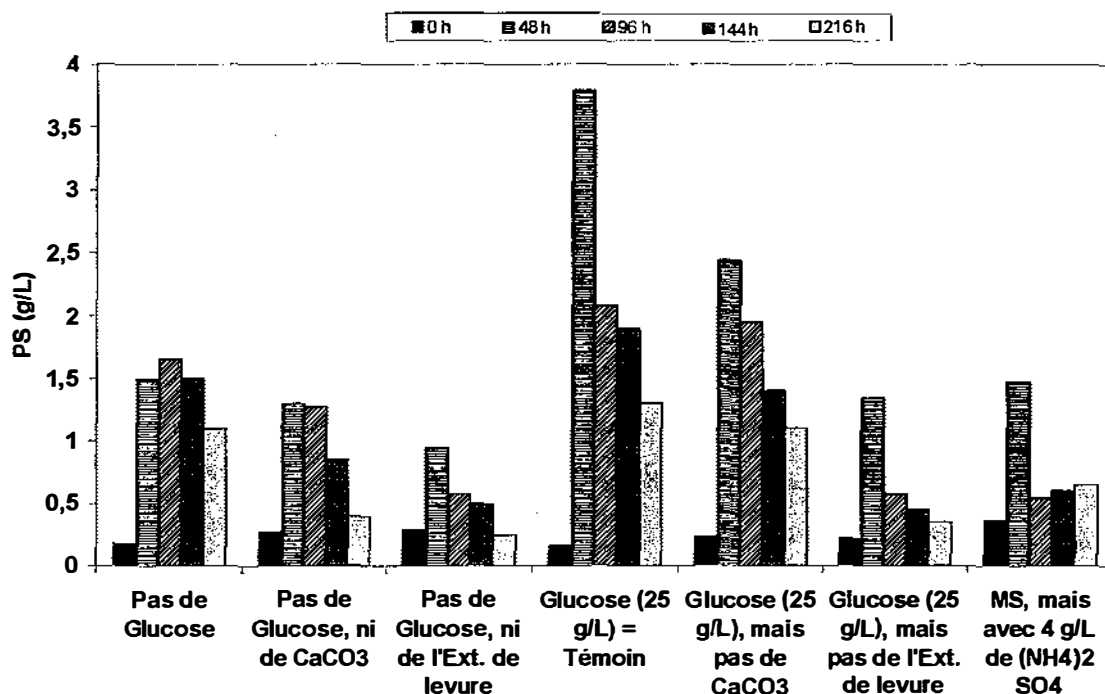
L'assimilation du glucose a été vérifiée. Les résultats montrent que la concentration de glucose passe de 25 g/L au début de fermentation à 24,21 et à 23,38 g/L après 80 h de fermentation chez le témoin et en présence de l'acide méthacrylique, respectivement. Par ailleurs, en présence de l'acide tiglique, nous avons constaté que la concentration du glucose est de 25 g/L, même après 80 h de fermentation. De plus, nous avons remarqué qu'après 72 à 80 h de fermentation en présence d'acide benzoïque, d'acide humique et dans le milieu témoin, que la consommation de glucose est très réduite, bien que les valeurs de biomasse soient de l'ordre de 6,54 à 8,54 g/L. Une légère consommation de glucose est observée après 96 h de fermentation. Les concentrations de glucose après 216 h de fermentation sont de 17,1, de 9,12 et de 8 g/L en présence d'acide benzoïque, d'acide humique et dans le milieu témoin, respectivement.

Ces résultats montrent qu'il n'y a pas ou peu de consommation de glucose dans le milieu de culture, malgré l'enregistrement des valeurs de biomasse de l'ordre de 5,97 à 8,90 g/L entre 32 et 52 h. Afin de vérifier les résultats obtenus par HPLC nous avons quantifié le glucose par une autre méthode enzymatique (l'YSI). Les résultats acquis par cette méthode nous ont confirmé ceux obtenus par HPLC.

Ces résultats inattendus et inexplicables nous amènent à se poser certaines questions sur les moyens disponibles pour former la biomasse. Contrairement à ce qui a pu être attendu, nous avons pensé que l'extrait de levure et peut être même le  $\text{CaCO}_3$  peuvent jouer un rôle dans la formation de la biomasse.

Dans la présente étude, six différentes fermentations ont été menées dans différentes conditions de culture. Cette étude sera focalisée sur une partie d'analyses, à savoir la mesure de la biomasse produite par *Sa. algeriensis* dans différentes conditions. Nous avons effectué des fermentations en absence et en présence de 25 g/L de glucose, en absence et en présence de 2 g/L d'extrait de levure et en absence et en présence de 5 g/L de  $\text{CaCO}_3$ . Par ailleurs, nous avons effectué une fermentation en présence de 4 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  au lieu de 2 g/L dans le milieu de

base (MSS). Cinq points de mesure de la biomasse sont effectués (à 0, à 48, à 96, 144 et à 216 h); les résultats sont présentés dans la figure 42.



**Figure 42.** Effet du glucose, du CaCO<sub>3</sub>, de l'extrait de levure et du NH<sub>4</sub><sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sur la biomasse de *Sa. algeriensis* obtenue après 0, 48, 96, 144 et 216 h de fermentation en Erlenmeyers.

Les résultats obtenus montrent que la biomasse maximale chez le témoin contenant 25 g/L est de 3,79 g/L. En revanche, l'élimination du glucose a fait diminuer la biomasse maximale de 3,79 à 1,65 g/L. De la même manière, l'élimination du CaCO<sub>3</sub> et de l'extrait de levure, a également fait abaisser la biomasse maximale à 2,44 et à 1,34 g/L, respectivement. Par ailleurs, la culture en absence du glucose a fourni une biomasse de 1,65 g/L. En revanche, l'élimination du CaCO<sub>3</sub> et de l'extrait de levure a diminué la biomasse à 1,30 et à 0,95 g/L, respectivement. En outre, la biomasse maximale obtenue en présence de 4 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,47 g/L) est moins élevée que celle obtenue en présence de 2 g/l de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,65 g/L). Nous avons constaté également que toutes les valeurs de la biomasse maximale ont été mesurées à 48 h, à l'exception de la fermentation effectuée sans glucose (mesurée à 96 h). Les résultats obtenus indiquent que le glucose n'est pas l'unique fournisseur de la biomasse mais que l'extrait de levure remplit aussi ce rôle.

#### 4.- Effet sur la production des dithiopyrrolones

Nous avons présenté l'effet de différents acides organiques sur la production des dérivés de dithiopyrrolones caractérisées et sur la production des nouvelles dithiopyrrolones.

##### 4.1.- Effet sur la production de la thiolutine

La production spécifique maximale de la thiolutine chez le témoin atteint 25,12 mg/g PS après 80 h de fermentation (figure 43). En revanche, les valeurs de la production spécifique maximale de la thiolutine sont respectivement de 12,92 mg/g PS à 80 h et de 16,62 mg/g PS à 72 h en présence d'acide tiglique et d'acide méthacrylique, respectivement. La vitesse spécifique maximale de la production de la thiolutine ( $q_{\text{thiolutine}}$ ) est de 0,45, 0,41 et 0,25 mg/h/g PS obtenues à 62, 39 et 72 h, respectivement chez le témoin, en présence d'acide méthacrylique et d'acide tiglique.

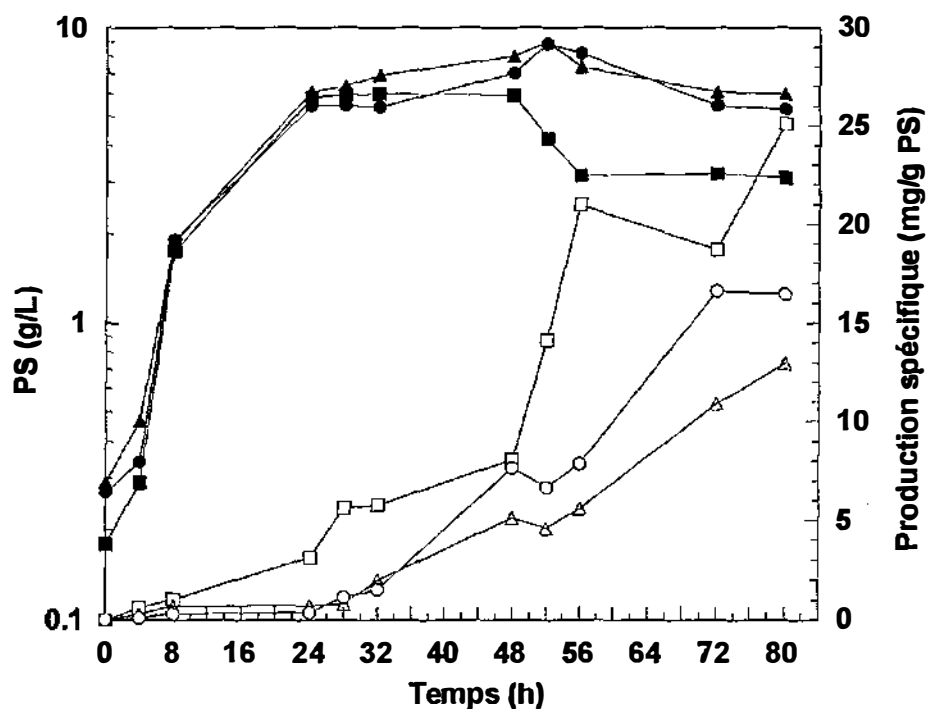
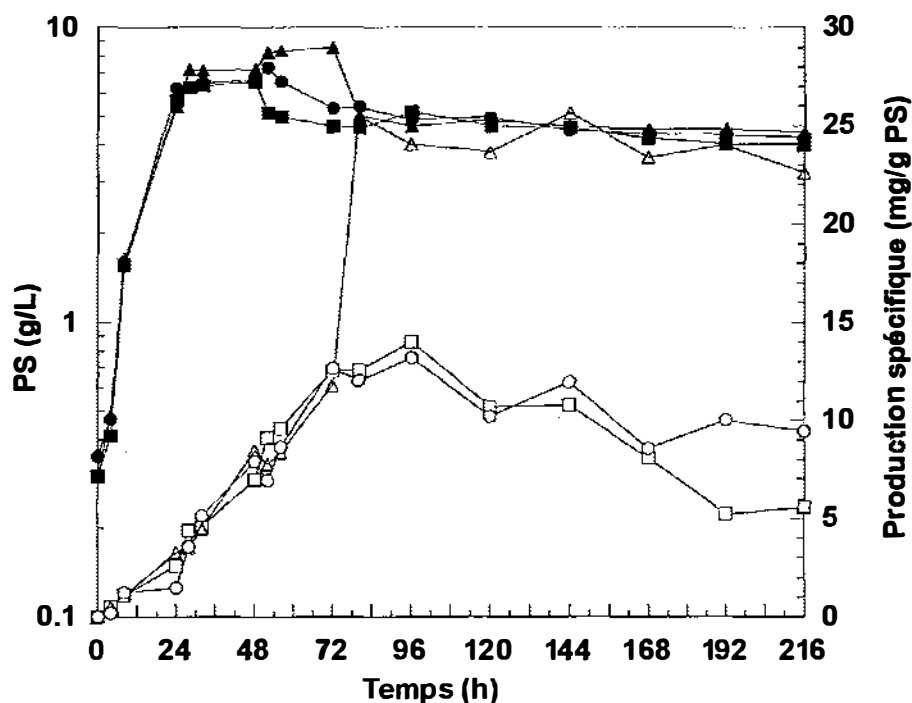


Figure 43. Cinétique de croissance de *Sa. algeriensis* (▲, ●, ■) et de la production spécifique de la thiolutine (△, ○, □), dans différentes cultures en batch, dans des fermenteurs de 2 L, en présence d'acide tiglique (2,5 mM), d'acide méthacrylique (5 mM), et dans le milieu témoin, respectivement.

Les résultats obtenus montrent que la production spécifique maximale de la thiolutine est de 14,01 mg/g PS enregistrée à 96 h chez le témoin de la deuxième série (figure 44). En revanche, cette valeur atteint 25,63 mg/g PS après 144 h de fermentation en présence d'acide benzoïque et 13,19 mg/g PS après 96 h de fermentation en présence d'acide humique. La vitesse spécifique maximale de la production de la thiolutine ( $q_{\text{thiolutine}}$ ) est de 0,25, 0,25 et 0,35 mg/h/g PS obtenues à 24, 74 et 29 h, respectivement chez le témoin, en présence d'acide benzoïque et d'acide humique.



**Figure 44.** Cinétique de croissance de *Sa. algeriensis* (▲, ●, ■) et de la production spécifique de la thiolutine (Δ, ○, □), dans différentes cultures en batch, dans des fermenteurs de 2 L, en présence d'acide benzoïque (1,25 mM), d'acide humique (1 g/L), et dans le milieu témoin, respectivement.

Malgré des conditions de préculture standardisées, qui permettent d'obtenir une biomasse initiale d'environ 0,2 g/L, des différences ont été enregistrées entre les deux témoins, de la première et de la deuxième série de fermentation. Des mesures différentes de biomasse maximale (5,97 et 6,54 g/L), de vitesse de croissance maximale (0,32 et 0,28 h<sup>-1</sup>) ont été constatées. Des variations également aux niveaux des productions spécifiques de la thiolutine ont été observées (25,12 et 12,57 mg/g PS) mesurées à 80 h par exemple.

Nous avons constaté que la culture témoin de la première série semble être un peu plus avancée que le témoin de la deuxième série. Ceci pourrait être dû au fait que l'état physiologique de la préculture était légèrement différent. Dans ces conditions, il est nécessaire de faire les comparaisons avec un témoin effectué dans la même série de fermentation.

#### 4.2.- Effet sur la production de la SEP et de la TIP

Nous avons remarqué sur la figure 45 que la présence d'acide tiglique ou d'acide méthacrylique a diminué la production spécifique de la SEP (0,18 et 0,20 mg/g PS, respectivement) et de la TIP (0,38 et 0,13 mg/g PS, respectivement) en comparaison avec le témoin (0,64 et 0,59 mg/g PS).

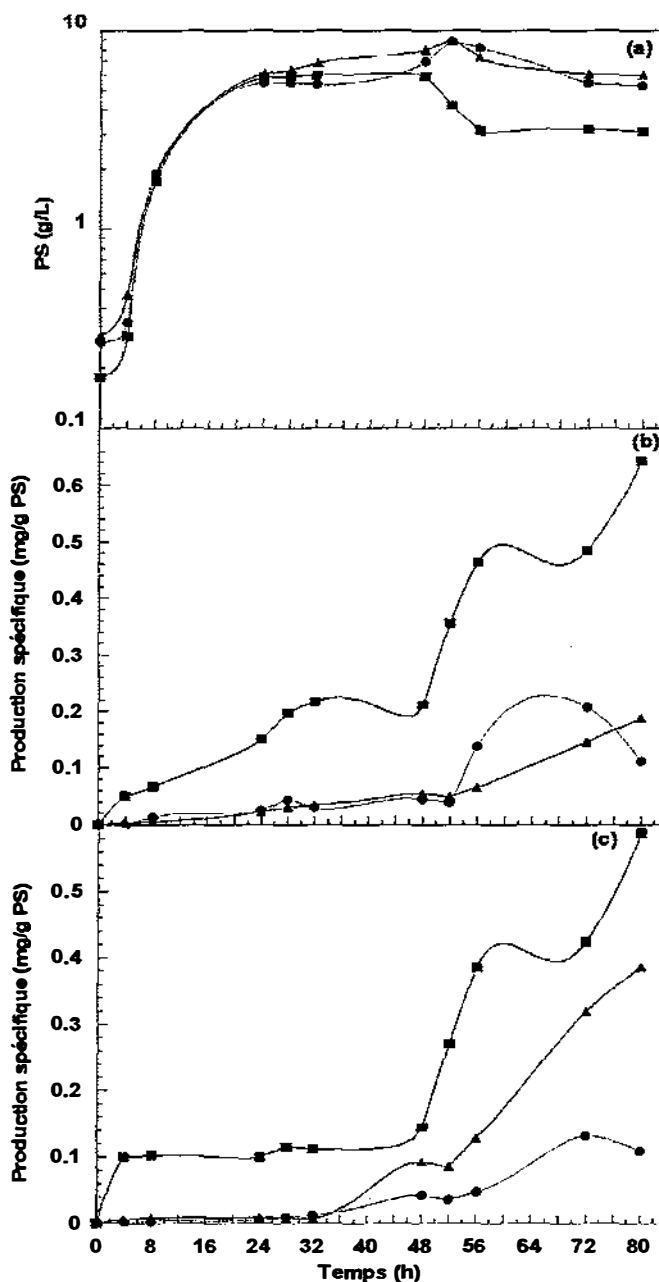


Figure 45.

Cinétique de croissance de *Sa. algeriensis* (a) ( $\blacktriangle$ ,  $\bullet$ ,  $\blacksquare$ ) et de la production spécifique de la SEP (b) ( $\blacktriangle$ ,  $\bullet$ ,  $\blacksquare$ ) et de la TIP (c) ( $\blacktriangle$ ,  $\bullet$ ,  $\blacksquare$ ), dans différentes cultures en batch, dans des fermenteurs de 2 L, en présence d'acide tiglique (2,5 mM), d'acide méthacrylique (5 mM), et dans le milieu témoin, respectivement.



Les résultats obtenus sur la figure 46 ont montré que la présence d'acide benzoïque a diminué la production spécifique maximale de la SEP (0,09 mg/g PS) contrairement à l'acide humique qui a augmenté cette production (0,64 mg/g PS) en comparaison avec le témoin (0,39 mg/g PS). Par ailleurs, la présence d'acide humique et d'acide benzoïque a augmenté la production spécifique maximale de la TIP (0,46 et 0,72 mg/g PS, respectivement) en comparaison avec le témoin (0,39 mg/g PS).

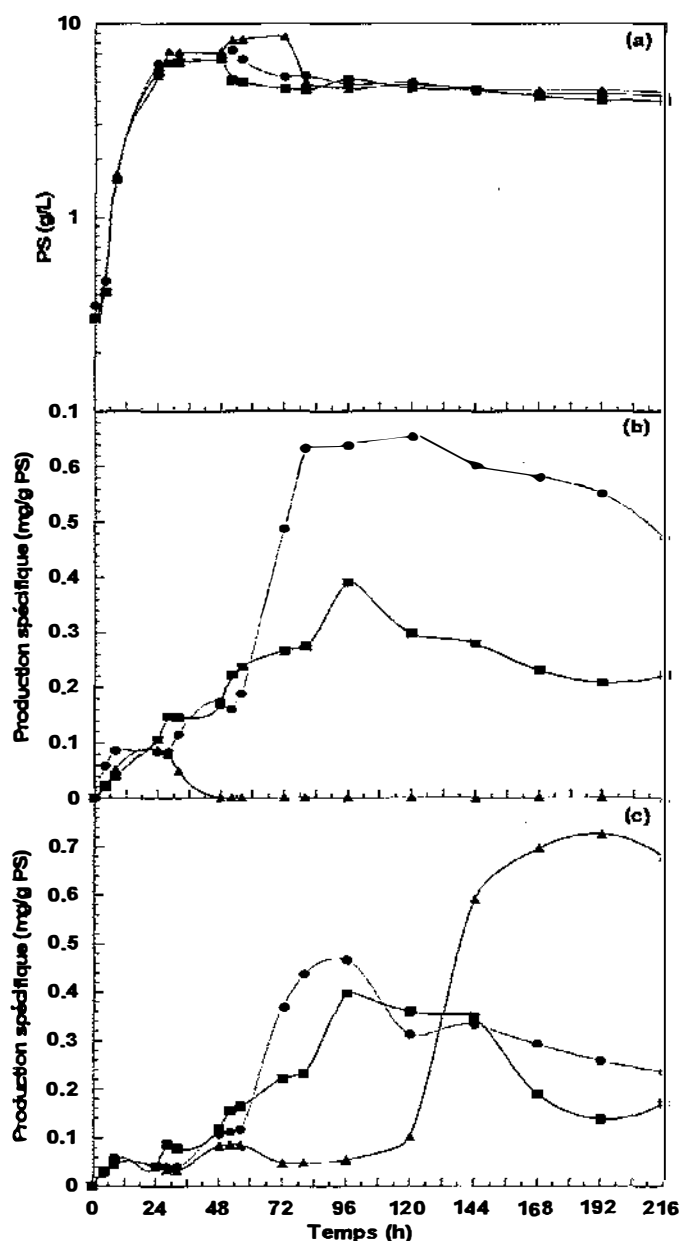


Figure 46. Cinétique de croissance de *Sa. algeriensis* (a) ( $\blacktriangle$ ,  $\bullet$ ,  $\blacksquare$ ) et de la production spécifique de la SEP (b) ( $\blacktriangle$ ,  $\bullet$ ,  $\blacksquare$ ) et de la TIP (c) ( $\blacktriangle$ ,  $\bullet$ ,  $\blacksquare$ ), dans différentes cultures en batch, dans des fermenteurs de 2 L, en présence d'acide benzoïque (1,25 mM), d'acide humique (1 g/L), et dans le milieu témoin, respectivement.

#### 4.3.- Effet sur la production de l'ISP et de la BUP

Les résultats obtenus montrent que la présence d'acide tiglique dans le milieu de culture a augmenté la production spécifique maximale de l'ISP de 0,03 à 0,06 mg/g PS (figure 47). En revanche, la présence d'acide méthacrylique a diminué la production spécifique maximale de l'ISP (0,01 mg/g PS). On note également que la présence d'acide méthacrylique a augmenté considérablement la production spécifique de la BUP (1,16 mg/g PS) en comparaison avec le témoin (0,25 mg/g PS).

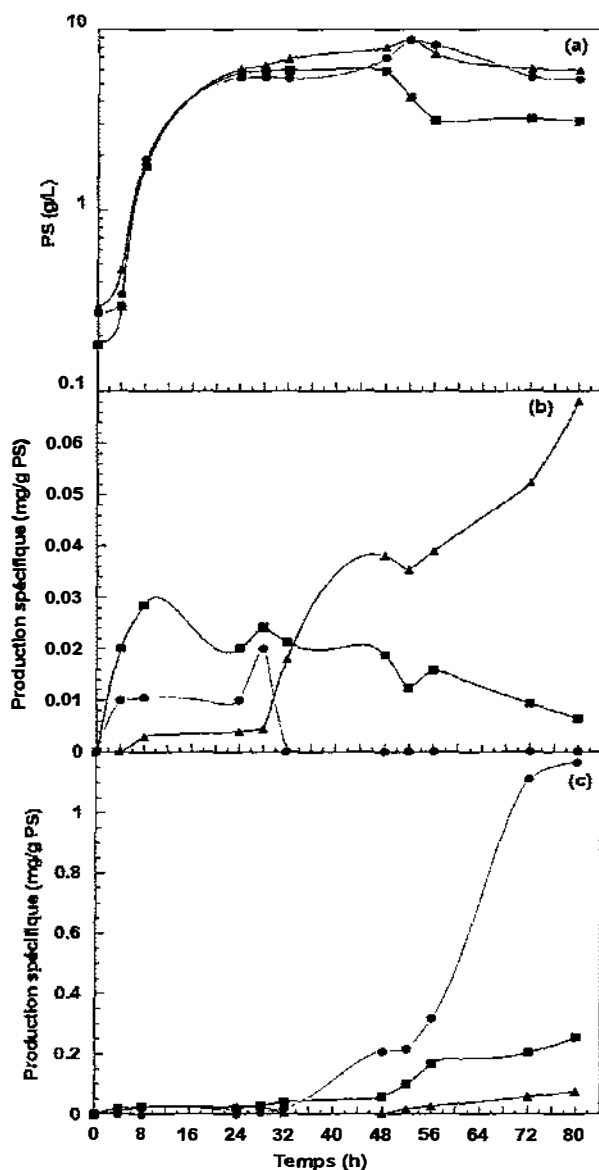
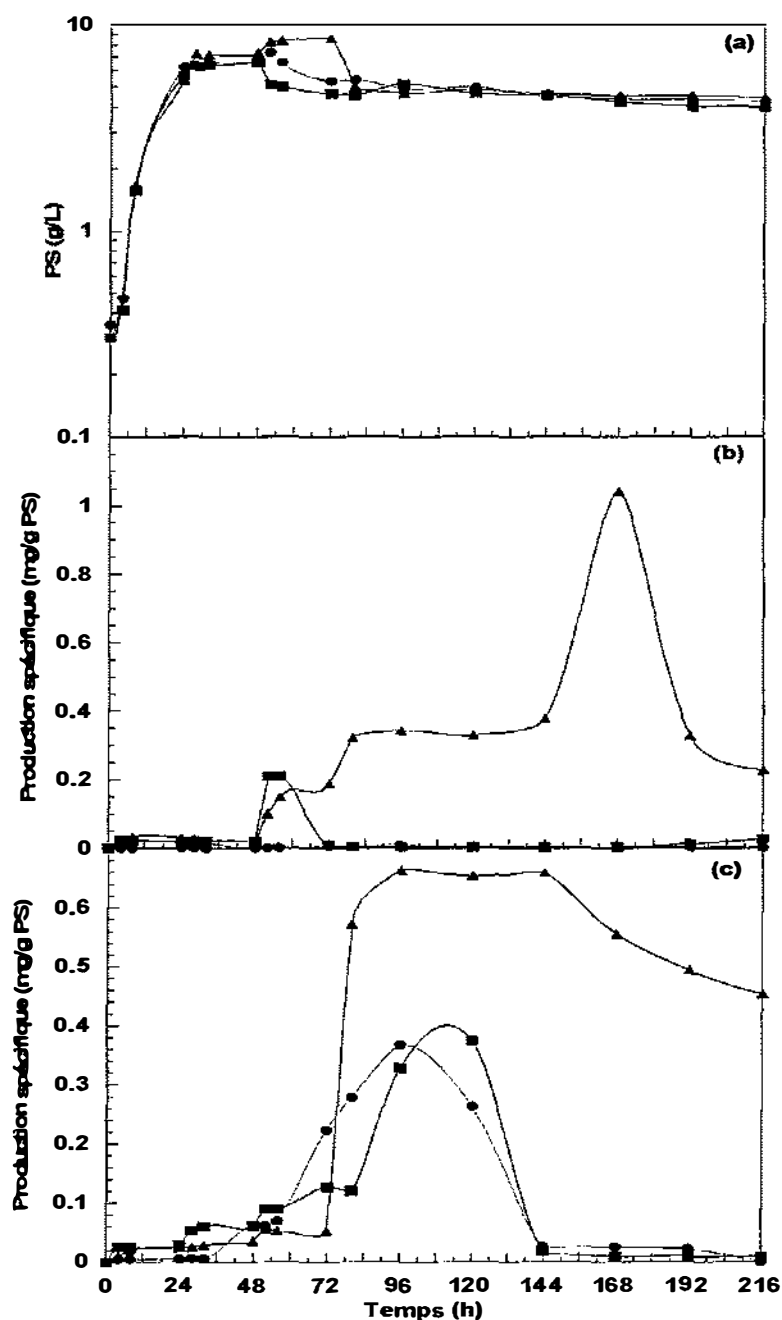


Figure 47. Cinétique de croissance de *Sa. algeriensis* (a) (▲, ●, ■) et de la production spécifique de la BUP (b) (▲, ●, ■) et de la ISP (c) (▲, ●, ■), dans différentes cultures en batch, dans des fermenteurs de 2 L, en présence d'acide tiglique (2,5 mM), d'acide méthacrylique (5 mM), et dans le milieu témoin, respectivement.

Sur la figure 48, nous remarquons que la présence de l'acide benzoïque dans le milieu de culture a augmenté considérablement la production spécifique maximale de l'ISP de 0,03 mg/g PS (chez le témoin) à 1,04 mg/g PS. En revanche, la production de l'ISP est très réduite en présence d'acide humique. Par ailleurs, nous avons constaté que la présence d'acide humique a augmenté la production spécifique de la BUP (0,66 mg/g PS) en comparaison avec le témoin (0,37 mg/g PS).



**Figure 48.** Cinétique de croissance de *Sa. algeriensis* ( $\blacktriangle$ ,  $\bullet$ ,  $\blacksquare$ ) et de la production spécifique de la BUP (b) ( $\blacktriangle$ ,  $\bullet$ ,  $\blacksquare$ ) et de la ISP (c) ( $\blacktriangle$ ,  $\bullet$ ,  $\blacksquare$ ), dans différentes cultures en batch, dans des fermenteurs de 2 L, en présence d'acide benzoïque (1,25 mM), d'acide humique (1 g/L), et dans le milieu témoin, respectivement.

#### 4.4.- Effet sur la production de nouvelles dithiopyrrolones

Nous avons remarqué l'induction de deux nouvelles dithiopyrrolones, en présence de l'acide benzoïque. Il s'agit des dithiopyrrolones PR 14,60 et PR 16,64. Les valeurs maximales de la production spécifique de ces molécules sont de 1,23 et de 3,23 mg/g PS pour PR 14,60 et PR 16,64 obtenues à 96 et à 80 h, respectivement (figure 49). La vitesse spécifique maximale de la production de PR 14,60 et PR 16,64 est de 0,01 et de 0,05 mg/h/g PS, respectivement. Ces deux valeurs ont été enregistrées à 80 et à 73 h, respectivement. Il est à rappeler qu'il n'y a pas de production de ces molécules dans le milieu de culture MSS.

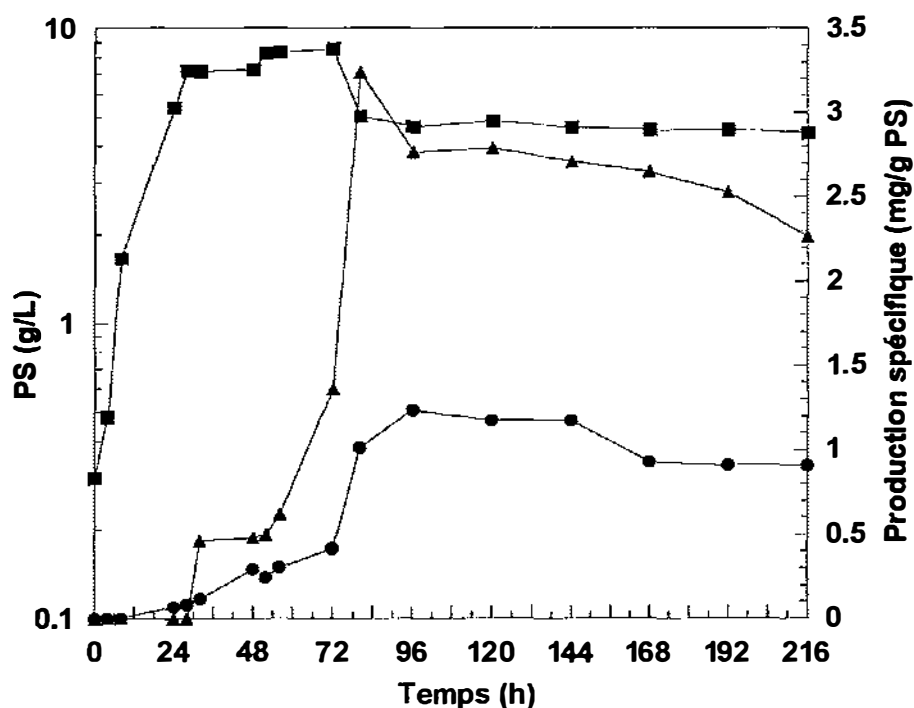


Figure 49. Cinétique de croissance de *Sa. algeriensis* (■) et productions spécifiques des nouvelles dithiopyrrolones PR 14,60 (●) et PR 16,64 (▲) dans une culture en batch, dans des fermenteurs de 2 L, en présence d'acide benzoïque (1,25 mM).

## VI- DISCUSSION

Les cinétiques de croissance de *Sa. algeriensis* et de production des dithiopyrrolones, en cultures discontinues montrent que celles-ci sont découplées comme dans le cas classique des deux phases successives, trophophase et idiophase. La faible production en phase exponentielle pourrait être due à la limitation en précurseurs pendant cette phase. La dissociation entre la croissance et la production des dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis* a été observée chez plusieurs microorganismes. Les antibiotiques ne sont alors produits que pendant l'idiophase (phase stationnaire). Les mêmes résultats ont été observés également avec d'autres espèces d'actinomycètes, comme chez *Streptomyces clavuligerus* (Aharonowitz et Demain, 1979), chez *S. fradiae* (Gray et Bhuwathanapun, 1980) et chez *S. ambofaciens* producteur des spiramycines (Khaoua *et al.*, 1992). Chez *S. clavuligerus*, Aharonowitz et Demain (1978) avaient montré que la production de la céphamycine C peut être associée ou dissociée de la croissance, selon la source de carbone utilisée. Ils avaient conclu que la phase de production de cet antibiotique est fonction de la nature de l'environnement nutritionnel dans le milieu de culture. En outre, une diminution de la teneur de toutes les dithiopyrrolones est observée après les 80 h de fermentation. Ces baisses constatées des titres sont à attribuer à une dégradation ou une transformation des dithiopyrrolones.

Malgré des conditions de préculture standardisées, des différences de biomasse, de vitesses de croissance et des variations aux niveaux des titres en dithiopyrrolones et des moments d'excrétion de celles-ci ont été observés. Ces différences pourraient être dues à la variabilité de l'état physiologique de l'inoculum lié à la préparation des précultures et à la particularité de différenciation du genre *Saccharothrix*. Lors d'une culture de microorganisme, le fermenteur représente un lieu de transformations biochimiques complexes.

La biosynthèse de nombreux antibiotiques est soumise à la régulation par les sources de carbone. Bien que ce contrôle par ces sources carbonées soit décrit depuis longtemps (Kennel et Demain, 1978; Martin et Demain, 1980), le mécanisme de base impliqué n'est pas encore totalement connu et la question importante qui reste posée dans notre cas, concerne la formation d'une biomasse relativement considérable à partir d'une consommation minimale de glucose. La concentration de glucose a été vérifiée par deux méthodes différentes. Nous avons essayé alors d'établir une corrélation entre la formation de la biomasse et la consommation d'autres sources comme l'extrait de levure et le CaCO<sub>3</sub>. Nous pouvons donc conclure à ce niveau que le glucose

n'est pas l'unique fournisseur de la biomasse chez *Sa. algeriensis* mais que l'extrait de levure et le  $\text{CaCO}_3$  remplissent aussi ce rôle.

L'assimilation de certains acides gras excrétés ou ajoutés dans le milieu de culture, stimule fortement la biosynthèse des métabolites secondaires. L'acide méthacrylique et l'acide tiglique dans certaines conditions augmentent la production des dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis*. Le même résultat a été signalé dans les fermentations industrielles productrices des antibiotiques (Omura *et al.*, 1984; Peroz-Collignon, 1993). Il est possible que le tiglolate et le méthacrylate entraîne une modification de la composition de la membrane cytoplasmique et évite le déclin cellulaire. Il a été montré que l'addition d'un acide gras comme le méthyloléate, modifie la composition lipidique membranaire chez *Streptomyces hygroscopicus* (David *et al.*, 1992). Ces modifications membranaires entraîneraient des variations dans l'activité de certaines enzymes et par la suite la production des précurseurs de l'antibiotique, tels que le 2-méthyl-butyryl-CoA et l'isobutyryl-CoA (Willecke et Pardee, 1971; Myrray et Magee, 1972; Machtiger et Fox, 1973). Ce même phénomène est observé chez *S. fradiae* avec l'emploi de palmitate ou d'oléate (Arima *et al.*, 1973).

Les résultats obtenus en fermenteurs ne sont pas exactement les mêmes que ceux obtenus en Erlenmeyers d'un point de vue qualitatif et quantitatif. Par ailleurs, cette étude a montré l'induction de deux nouvelles dithiopyrrolones (PR 14,60 et PR 16,64) en présence de l'acide benzoïque, comme cela a été signalé en Erlenmeyers. L'incorporation des acides organiques au niveau de la pyrrothine s'effectue sous forme d'acyl-CoA. L'activité de la condensation est liée à la concentration des substrats et les activités des enzymes conduisant aux substrats activés sont essentielles. Dans notre cas, l'acide benzoïque est greffé sur le noyau pyrrothinique pour former la diméthyl-benzoyl-pyrrothine (PR 14,60) et la benzoyl-pyrrothine (PR 16,64) (voir chapitre IV).

D'après cette étude préliminaire sur la croissance de *Sa. algeriensis* et la production des dithiopyrrolones, un milieu synthétique a été mis au point. Ce milieu nous a servi initialement pour les études de régulation de la production des dithiopyrrolones et pour tester la possibilité d'induire la production de nouveaux antibiotiques. Des études futures sur des mécanismes de régulation de la biosynthèse des antibiotiques fourniront des informations importantes qui permettront de définir des milieux de culture et des conditions de fermentation en vue de l'optimisation de la production de ces molécules actives.

---

---

**DISCUSSION ET CONCLUSION  
GENERALES**

## DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES

Plusieurs auteurs ont montré que les sols sahariens renferment un potentiel appréciable en actinomycètes producteurs de métabolites secondaires d'intérêt, englobant des genres très fréquents comme les *Streptomyces* ainsi que des genres rares à très rares comme *Saccharothrix*, *Nocardiopsis*, *Planomonospora*, *Nonomuraeae*, *Streptosporangium*, *Actinomadura*, etc. (Sabaou *et al.*, 1992 et 1998; Boudjella, 1994; Zitouni *et al.*, 2005).

Les dithiopyrrolones possèdent des activités contre les bactéries (Gram positif et Gram négatif), les levures, les champignons microscopiques, les protozoaires, les insectes et les larves (Šturdíková *et al.*, 1990; Oliva *et al.* 2001; Lamari *et al.*, 2002a; Webster *et al.*, 2002). De plus, ces molécules se sont avérées avoir une activité anticancéreuse (Webster *et al.*, 2002).

Outre l'intérêt fondamental que suscite la compréhension du métabolisme des actinomycètes producteurs d'antibiotiques, les exigences de la concurrence industrielle et le besoin accru en antibiotiques, particulièrement en antifongiques, sont tels que le travail d'optimisation de la production utilisant plusieurs techniques n'est pas prêt de s'achever.

Aujourd'hui parmi les axes d'investigation les plus actifs, la recherche de souches produisant des antibiotiques en quantité appréciable à partir de matière première peu coûteuse s'accompagnant de conditions de fermentation plus économiques, occupe une place importante en biotechnologie.

Pour être mené à bien, ce travail de sélection nécessite une bonne connaissance des caractéristiques physiologiques du microorganisme ainsi que des voies de biosynthèse de l'antibiotique produit et des régulations qui s'y opèrent.

Dans cette optique, notre contribution à l'étude de la régulation de la biosynthèse de différents dérivés de dithiopyrrolones: la thiolutine, l'isobutyryl-pyrrothine, la butanoyl-pyrrothine, la sénéciol-pyrrothine et la tigloyl-pyrrothine chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 a permis de répondre à un certain nombre de questions. Les précurseurs impliqués dans la biosynthèse du noyau de base (la pyrrothine) et dans la biosynthèse de différents dérivés de dithiopyrrolones sont jusqu'à présents peu ou pas connus.

Nous nous sommes alors intéressés aux relations entre métabolismes primaire et secondaire. L'étude de l'influence des acides aminés (soufrés et autres) et des acides organiques (aliphatiques



et cycliques) et de l'acide humique sur la production des dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis* et la compréhension des mécanismes par lesquels ces éléments interfèrent avec cette production ont constitué le premier axe de recherche de notre travail.

Nous avons confirmé que l'effet des acides aminés et des acides organiques sur la production des dithiopyrrolones dépendait de la concentration utilisée. A des concentrations appropriées, certains acides aminés comme la L-cystine, la L-proline, l'acide L-glutamique et la DL-histidine favorisent la production des dithiopyrrolones. La cystine, par exemple, à une concentration inférieure ou égale à 5 mM favorise la production des dithiopyrrolones en fournissant des précurseurs du noyau pyrrothine. Au-delà de 5 mM, cette production chute fortement. De même, l'effet des acides organiques sur la production des dithiopyrrolones dépend de la concentration utilisée. Certains acides organiques comme les acides 4-hydroxybenzoïque, benzoïque, pantoïque et pivalique employés, à des concentrations optimales, augmentent considérablement la production des dithiopyrrolones. Ceci pourrait s'interpréter principalement grâce à un bon apport de précurseurs fournis par la dégradation ou la transformation de ces nutriments conduisant à la formation du noyau pyrrothine et/ou à la formation de différents dérivés de dithiopyrrolones. De plus, la production des dithiopyrrolones est fortement favorisée en présence de 0,25 g/L d'acide humique. D'une façon générale, la présence d'un excès de ces nutriments défavorise la production de ces antibiotiques.

Par ailleurs, nous avons montré que d'autres acides aminés (cystéine, méthionine, éthionine, etc.) et organiques (pamoïque, benzenesulfonique et syringique, etc.), même à de faibles concentrations, ont un effet négatif sur la biosynthèse des dithiopyrrolones. Ces différents substrats exerceraient une régulation négative sur l'expression des gènes codant pour les enzymes nécessaires à la biosynthèse de ces antibiotiques.

Par ailleurs, notre souche a la capacité de produire par exemple une grande quantité de la tigloyl-pyrrothine en présence d'acide tiglique, et de la butyryl-pyrrothine en présence d'acide butyrique. Chez *Sa. algeriensis*, la formation des précurseurs acyl-thioesters (acétyl-CoA, tigloyl-CoA, butyryl-CoA, etc.) est très active. Certains acides organiques s'incorporent directement au niveau de la chaîne latérale produisant ainsi l'antibiotique correspondant. D'une manière générale, il existe une corrélation directe entre l'acide organique ajouté dans le milieu de culture et le type de la dithiopyrrolone favorisée. A l'issue de cette constatation, nous avons testé une grande variété d'acides organiques afin de former différentes dithiopyrrolones selon le type d'acide organique ajouté. Ceci a constitué notre deuxième axe de recherche. L'induction de nouvelles

dithiopyrrolones a été réalisée par l'addition de certains acides aminés (cystéine, cystine et arginine) et acides organiques (acides benzoïque, cinnamique, 4-bromobenzoïque, 4-chlorobenzoïque, sorbique, propionique, valérique, etc.). L'originalité de cette partie réside dans la mise en évidence des précurseurs qui a permis d'induire la production (à la carte) de nouvelles dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis*. Cette induction est le résultat de changement d'un seul paramètre qui est l'addition d'acides organiques ou d'acides aminés dans le milieu de culture. Ce mode de culture nous a permis d'obtenir dix huit molécules nouvellement produites par *Sa. algeriensis*. Ceci est particulièrement important dans le cas d'un procédé de production de nouveaux antibiotiques.

Notre troisième axe de recherche a porté sur les purifications de quelques unes des molécules apparues afin d'effectuer les analyses spectrométriques de masse par impact électronique direct. Les résultats indiquent qu'on est en présence de molécules appartenant au groupe des dithiopyrrolones et parfois, à des intermédiaires de leur synthèse. Les données ont révélé que la molécule PR 14,60 (PM = 276) est une diméthyl-benzoyl-pyrrothine, un nouveau dérivé jamais signalé dans le monde. En revanche, la dithiopyrrolone PR 16,64 est une benzoyl-pyrrothine, une molécule produite à l'état de traces dans le milieu complexe ISP2 (Lamari *et al.*, 2002a) mais sécrétée en grande quantités dans notre cas. Par ailleurs, les autres analyses des spectres de masse, ont permis d'émettre plusieurs hypothèses de structure suggérant fortement la présence de molécules originales.

Nous avons entrepris, dans une dernière partie, d'affiner notre expérience dans des conditions mieux contrôlées dans un fermenteur. Nous avons effectué pour cela des fermentations en batch en présence de l'acide benzoïque, de l'acide tiglique, de l'acide méthacrylique et de l'acide humique (pris un à un) employés à des concentrations choisies. Ce ne sont là que des expériences préliminaires pour vérifier la production de nouvelles dithiopyrrolones en fermenteur. Les résultats obtenus ont montré que la croissance de *Sa. algeriensis* dans toutes les fermentations est très rapide pendant les premières heures de culture. Cette observation témoigne d'un métabolisme très actif. La culture témoin subit une lyse cellulaire partielle plus remarquée que les cultures employées en présence des acides organiques. Ces acides organiques pourraient être utilisés comme source de carbone pour maintenir la biomasse. Les dithiopyrrolones ne sont produites que pendant l'idiophase, comme cela a été signalé dans le cas des fioles Erlenmeyer. La biosynthèse des dithiopyrrolones est soumise à la régulation par les acides organiques ajoutés. L'acide méthacrylique et l'acide tiglique, dans certaines conditions, augmentent la production de quelques dithiopyrrolones. En outre, une diminution de la teneur de toutes les dithiopyrrolones

est observée après les 80 h de fermentation. Ces baisses des titres sont à attribuer peut être à une dégradation ou une transformation des dithiopyrrolones par la souche. Les résultats obtenus en fermenteur ne sont pas exactement les mêmes que ceux obtenus en fioles Erlenmeyer, tant du point de vue qualitatif que quantitatif. En revanche, nous avons obtenu les deux nouvelles molécules induites par l'acide benzoïque (PR 14,60 et PR 16,64) observées auparavant dans ces fioles.

La consommation du glucose est très réduite, dans toutes les fermentations effectuées, malgré une production importante de la biomasse. Les quelques expériences de vérification du rôle de chaque élément du milieu dans la production de la biomasse n'ont pas permis d'élucider ce mécanisme. Ce point reste préoccupant et des études supplémentaires devraient être réalisées pour afin d'éclaircir ce problème.

Les perspectives qui découlent de ce travail sont nombreuses et peuvent être classées en trois parties complémentaires, l'une relative à la caractérisation et à la détermination des structures chimiques des nouvelles molécules induites et à l'étude de leurs activités biologiques, la deuxième à l'optimisation et la modélisation des dithiopyrrolones en fermenteurs, la troisième à l'études des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de ces antibiotiques et la quatrième aux applications des dithiopyrrolones produites par *Sa. algeriensis* dans plusieurs domaines agronomique, thérapeutique, etc.

Les analyses des spectres de masse, effectuées par impact électronique direct, ont permis d'émettre plusieurs hypothèses de structure. Il est indispensable d'effectuer les analyses de la RMN du proton et du carbone 13 pour aboutir à la structure définitive de ces nouvelles molécules. Par la suite, il est indispensable de tester les différentes activités biologiques de ces nouvelles molécules.

Il serait intéressant de procéder à des cultures semi-continues afin d'améliorer les productions de ces antibiotiques. Un travail d'optimisation et de modélisation de la production des dithiopyrrolones est nécessaire.

Les enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des dithiopyrrolones sont jusqu'à maintenant inconnues. Il serait intéressant de développer ce point dans le futur dans le cadre d'autres travaux. De plus, l'étude des profils protéiques par électrophorèse en gradient de concentrations de quelques acides aminés (cystéine et cystine, etc.) et de quelques acides organiques (benzoïque, 4-bromobanzoïque, humique, etc.) permettrait de vérifier la présence des protéines qui caractérisent la phase de production des antibiotiques. Il serait également intéressant à l'avenir, de rechercher si les acylthioesters, en plus de leur rôle de précurseurs métaboliques,

peuvent aussi jouer un rôle comme inducteurs de la biosynthèse d'enzymes du métabolisme secondaire. Afin de compléter et d'affiner ces points, il est indispensable d'acquérir d'autres outils tels que des mutants bloqués et des marqueurs isotopiques, ainsi que des techniques de la biologie moléculaire qui s'avèrent nécessaires à une telle étude physiologique. Dans un travail ultérieur, il serait important également de comprendre la voie de biosynthèse de la pyrrothine et des différents dérivés de dithiopyrrolones.

L'espèce *Sa. algeriensis* présente quant à elle une forte activité sur des champignons microscopique toxigènes et/ou phytopathogènes, tels que *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *B. fabae*, *Ascochyta fabae*, *Pythium irregulare*, *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., etc. Dans l'avenir, il serait alors intéressant de tester leur activité *in situ* sur les maladies de certaines plantes et sur les champignons toxigènes et phytopathogènes, afin de les éliminer ou de diminuer leurs populations. A ce titre, nous signalerons les résultats prometteurs obtenus par Merrouche (2001) et par Meklat (2004) avec les dithiopyrrolones de *Sa. algeriensis* sur les fusarioses vasculaires du palmier dattier, du pois-chiche, de la tomate, de la lentille et du lin et la maladie "tache chocolat" de la fève, due à *Botrytis fabae* et *Ascochyta fabae*.

Plusieurs dithiopyrrolones sont connues pour leur pouvoir antitumoral intéressant mais aucun travail n'a été publié jusqu'à présent sur les dithiopyrrolones produites uniquement par *Sa. algeriensis* (sénéciol-pyrrothine, tigloyl-pyrrothine, benzoyl-pyrrothine et diméthyl-benzoyl-pyrrothine). Il serait donc nécessaire de faire une étude comparative avec les autres dithiopyrrolones étudiées, tant du point de vue de la toxicité que du pouvoir antitumoral et antiangiogénique.

Les dithiopyrrolones sont connues pour leur activité protozoïcide, principalement contre *Entamoeba histolytica*, *Leishmania tropica*, *Trichomonas fætus* et *Trypanosoma cruzi* (Webster *et al.*, 2002). Par contre, aucune étude n'a été publiée jusqu'à présent sur les dithiopyrrolones de *Sa. algeriensis* qui mériteraient donc d'être testées dans ce sens. De même, il serait également intéressant de tester l'activité herbicide et insecticide des dithiopyrrolones pour une éventuelle application en agriculture.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## A

- **Abe, M., Ohmomo, S., Obasha, T. and Tabucla, T. (1969).** - Isolation of chanclavine (1) and two new interconvertible alkaloids rugulovincin A and B. from the culture of *Penicillium concarn-rugulovanam*. *Agri. Biol. Chem.*, **33**, 469-471.
- **Adams C.C. and Gross D.S. (1991).** - The yeast heat shock response is induced by conversion of cells to spheroplasts and by potent transcriptional inhibitors. *J. Bacteriol.*, **173** (23), 7429-7435.
- **Adelberg E.A. and Rabinovitz M. (1956).** - Metabolism of amino acids and proteins, *Ann. Rev. Biochem.*, **25**, 349-396.
- **Aharonowitz, Y. (1980).** - Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Annu Rev Microbiol* **34**, 209-233.
- **Aharonowitz, Y. and Demain, A.L. (1978).** - Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **14**, 159-164.
- **Aharonowitz, Y. and Demain, A.L. (1979).** - Nitrogen nutrition and regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Can. J. Microbiol.*, **25**, 61-67.
- **Al-Zarban, S.S., Abbas, I., Al-Musallam, A.A., Steiner, U., Stackebrandt, E. and Kroppenstedt, R.M. (2002).** - *Nocardiosis halotolerans* sp. nov., isolated from salt marsh soil in Kuwait. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 525-529.
- **An, G. and Vining, L.C., (1978).** - Intracellular levels of guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) and guanosine 5'-triphosphate 3'-diphosphate (pppGpp) in cultures of *Streptomyces griseus* producing streptomycin. *Can. J. Microbiol.*, **24**, 502-511.
- **Aoki H., Sakai, H., Kohsaka, M., Konomi, T., Hosoda, J., Kubouchi, Y., Iguchi and Imanaa, H. (1976).** - Nocardicin A, a new monocyclic beta-lactam antibiotic. I. Discovery, isolation and characterization. *J. Antibiot.*, **29**, 492-500.
- **Arima, K., Okasaki, H. Ono, H., Yamada, K. and Beppu Y. (1973).** - Effect of exogenous fatty acids on the cellular fatty acid composition and neomycin formation in a mutant strain of *Streptomyces fradiae*. *Agr. Biol.; Chem.*, **37**, 2313-2318.

- **Arnold, J.T., Wikinson, B.P., Sharma, S. and Steele, V.E. (1995).** - Evaluation of chemopreventive agents in different mechanistic classes using a rat tracheal epithelial cell culture transformation assay. *Cancer Res.*, **55**, 537-543
- **Asselineau J. et Zalta P. (1973).** - Les antibiotiques. Structure et exemples de mode d'action. Hermann (Eds.). Paris.
- **Athalye M., Goodfellow M., Lacey J. and White R.P. (1985).** - Numerical classification of *Actinomadura* and *Nocardiosis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **35**, 86-98.

## B

- **Balakrishnan, I., Johnson, M.A., Kibbler, C.C., Gillespie, S.H. (1997).** - Cryptococcal cholangitis: a novel presentation of disseminated cryptococcosis in AIDS. *Int. J. Std. AIDS.*, **8**, 785-8.
- **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.
- **Basak, K., and Majumdar, S.K. (1973).** - Utilization of carbon and nitrogen source of *Streptomyces kanamyceticus* for kanamycin production. *Antimicrob Agents Chemother* **4**, 6-10.
- **Behal, V.; Hostalek, Z. and Vanek, Z. (1979).** - A hydrotetracycline oxygenase activity and biosynthesis of tetracycline in *Streptomyces aurofaciens*. *Biotechnol. Lett.*, **1**, 177-182.
- **Behal, V., Neuzi, J. and Hostalek, Z. (1983).** - Effect of tetracycline derivatived and some cations on the activity of anhydrotertracycline oxygenase. *Biotechnol. Lett.* **5**, 537-542.
- **Berdy J., Aaszalos A. and Mc Nitt K.L. (1987).** - CRC Handbook of antibiotic compounds. Vol. **XIII**. Microbial metabolites. part 1,2,3. Florida, USA. CRC Press, Boca Raton.
- **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1989).** - Vol 4. Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds.) Williams and Wilkins Co., Baltimore, p. 2648.
- **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994).** - 9<sup>th</sup> Eds. Holt J.H., Kreig N.R, Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T. (Eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- **Bergman R. (1989).** - Thiolutin inhibits utilization of glucose and other carbon sources in cells of *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwehoek*, **55**, 143-152.
- **Bhate D. S., Hulyalkar R. K. and Menon S. K., (1960).**-Isolation of iso-butyropyrrrothine along with thiolutin and aureothricin from a *Streptomyces* sp.. *Experientia*, **11**, 504-505.
- **Bhathena Z. P., Vora C. and Kadam K. (2002).** - Rapid bioremediation of phenolic effluent

- through use of actinomycal consortium. *Pollution Research*, **21**(3), 265-275.
- **Block S.S. (1983).** - Perspectives for industrial products. *In: Desinfection, sterilisation and preservatiopn* (Block S.S. Eds.), 3<sup>rd</sup> Eds., Philadelphia: Lea and Febiger, 608-655.
  - **Blumauerova, M., Podojil, M., Maksimova, T.S., Panos, J., Vanek, Z. (1980).** - Effect of cultivation conditions on the activity of the beromycin producer *Streptomyces glomeratus* 3980 and its spontaneous variants. *Folia Microbiol. (Praha)*., **25**(3), 313-318.
  - **Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R. and Zeeck, A. (2002).** - Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem.*, **3**, 619-627.
  - **Boyaval, P., Corre, C., Dupuis, C. and Roussel, E. (1995).** - Effects of free fatty acids on propionic acid bacteria. *Lait*, **75**, 17-29.
  - **Braña, A.F., Wolf, S. and Demain, A.L.(1985).** – Ammonium repression of cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. *Can. J. Microbiol.*, **31**, 736-743.
  - **Boudjella H. (1994).** - Influence des milieux de culture, des antibiotiques et du pré-traitement des échantillons à la chaleur sur la sélection des genres et des espèces d'actinomycètes rares de quelques sols sahariens. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba. 177 p.
  - **Brazhnikova M. G., Konstantinova N.V., Potapova N. P. and Tolstykh I. V. (1977).** - Physicochemical characteristics of the new antineoplastic antibiotic, nocamycin. *Antibiotiki.*, **22**, 486-489.
  - **Brooks P.C., Strömblad S., Klemke R.L., Visscher D., Sarkar F.H. and Cheresch D.A. (1995).** - Antiintegrin  $\alpha\beta 3$  blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J. Clin. Invest.*, **96**, 1815-1822.
  - **Brown, D., Foster, J. Hitchcock, M.J., Ochi, K., Troost, T. and Katz, E. (1983).** – Regulation of tryptophan metabolism and its relationship to actinomycin D synthesis. *In: Proceeding of the 4<sup>th</sup> International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms*, (Ikeda, Y., and Beppu, T. Eds), pp. 85-91. Kodansha Ltd: Tokyo.
  - **Brown A.G. (1995).** – Recent examples of novel secondary metabolites. *Folia Microbiol.*, **40**, 31-42.



- **Brown, D.E. and Zainudeen, M.A. (1978).** – Effect of inoculum size on the aeration pattern of batch cultures of a fungal microorganism. *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1045-1061.
- **Brunati, M., Marinelli F., Bertolini, C., Gandolfi, R., Daffonchio, D. and Molinari, F. (2004).** - Biotransformations of cinnamic and ferulic acid with actinomycetes. *Enzyme and Microbial Technology.*, **34**(1), 3-9.
- **Büchi G. and Lukas G., (1964).** - A total synthesis of holomycin. *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 5654-5658.
- **Budavari S., O'Neil M.J, Smith, A. and Heckelman P.E.** - The merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Eleventh edition, Merck & Co., Inc. 1989.
- **Bu'Lock, J.D. (1975).** – Secondary metabolite in fungi and its relationship to growth and development. *In: The Filamentous Fungi.* (Smith, J.E. and Berry, R.D. Eds), Vol I, pp. 35-38: Wiley and Soc. Inc: New York.
- **Burg, R.W. (1982).** – Fermentation products in animal health. *ASM News*, **48**, 460-463.
- **Bush, B. D., Fitchett, G. V. Gates, D. A. and Langley, D. (1993).** - Carbocyclic nucleosides from species of *Saccharothrix*. *Phytochemistry*, **32**, 737-739.
- **Bushell, M. (1989).** – The process physiology of secondary metabolite production. *In: Microbial products: new approaches.* (Baumberg, S., Hunter, I., Rhodes, M., Eds.), pp. 95-120. Cambridge University Press: Cambridge.
- **Bycroft B. W. (1988).** - Dictionary of antibiotics and related substances. London: Chapman and Hall, p. 944.

## C

- **Cardova, E.; Kremen, A.; Vanek, Z. and Hostalek, Z. (1976).** - Regulation and biosynthesis of secondary metabolites, XVII: adenylate level and chlorotetracycline production in *Streptomyces aureofaceins*. *Folia Microbiol.*, **21**, 481-487.
- **Calam, C.T. (1976).** – Starting investigational and production cultures. *Process Biochem.*, **11**, 7-12.
- **Cashel, M. (1975).** – Regulation of bacterial ppGpp and pppGpp. *Ann. Rev. Microbiol.*, **29**, 301-318.

- **Celmer, W.D. and Solomons, I.A., (1955).** - The structures of thiolutin and aureothricin, antibiotics containing a unique pyrrolinonodithiole nucleus. *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 2861-2865.
- **Celmer, W. D. and Solomons, I. A., (1963).** -1,5-Dimethyl-2-oxo-3-pyrrolidineglyoxylic acid. *Medical Research Laboratories, Chas. Pfizer and Company, Inc., Groton, Connecticut*, 3221-3222.
- **Celmer, W. D., Tanner, F. W., Harfenist, M., Lees, T. M. and Solomons, I. A. (1952).** - Characterization of antibiotic thiolutin and its relationship with aureothricin. *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 6304-6305.
- **Choi, K.I., Cha, J.H., Pae, A.N., Kim, Y., Chang, M.H., Park, S.Y., Kim, D., Jeong, D.Y., Kim, Y.H., Kong, J.Y. and Koh, H.Y. (1998).** - Studies on novel 3-isoxazolylynylcephalosporins: II. Synthesis and biological activity of 7-[2-(2-aminothiazol-4-yl)-2-hydroxyiminoacetamido] derivatives. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **51**(12),1122-5.
- **Chun, J., Bae, K.S., Moon, E.Y., Jung, S.O., Lee, H.K. and Kim, S.J. (2000).** - *Nocardiosis kunsanensis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a saltern. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50** (5),1909-1913.
- **Cole, M. and Rolinson, G.B. (1972).** - Microbial metabolites with insecticidal properties. *Nematologia*, **42**, 124-127 *In: Webster et al.*, 2002.
- **Corcoran, J.W. (1981).** – Biochemical mechanism in the biosynthesis of the erythromycins. *In: Antibiotics, IV, Biosynthesis.* (Corcoran J. W., Ed.), pp. 132-175. Springer Verlag; Berlin.
- **Cross T.(1981).** - Aquatic actinomycetes: a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. *J. Appl. Bacteriol.*, **50**, 397-423.
- **Cruz, R., Arias, M.E. and Soliveri, J. (1999).** – Nutritional requirements for the production of pyrazoloisoquinolinone antibiotics by *Streptomyces griseocarrneus* NCIMB 40447, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 115-119.
- **Culter, H.G. (1988).** – Natural products and their potential in agriculture. *In: “Biologically active natural products-potential use in agriculture”.* Culter, H.G. ed., American Chemical Society, Washington. pp. 1-22.

## D

- **Dancer, J. E., Hughes, R. G. and Lindell, S. D., (1997).** - Adenosine-5'-phosphate deaminase, a novel herbicide target. *Plant Physiol*, **114**, 119-129.
- **Da Silva, M.C.; Bertolini, M.C. and Ernandes, J.R. (2001).** - Biomass production and secretion of hydrolytic enzymes are influenced by the structural complexity of the nitrogen source in *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus nidulans*. *J. Basic Microbiol.*, **41**, 269-280.
- **David, L., Loutheiller, H., Bauchart, O., Auboiron, S. and Asselineau (1992).** – Effects of exogenous methyl oleate on the biosynthesis of nigericin, a polyether carboxylic antibiotic, by *Streptomyces hygroscopicus* NRRL B-1865. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 330-339.
- **Deshpande, B.S., Ambedkar, S.S. and Shewale, G.G. (1988).** – Biologically active secondary metabolite from *Streptomyces*. *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 455-473.
- **Davidson, S.B. (1995).** - New dimensions in natural products research: cultured marine microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, **6**, 284-291.
- **Davies, J.L., Baganz, F., Ison, A.P., Lye, G.J. (2000).** – Studies on the interaction of fermentation and microfiltration operations: erythromycin recovery from *Saccharopolyspora erythraea* fermentation broths. *Biotechnol. Bioeng.*, **69**, 429-439.
- **Deb, P.R., Dutta, B.K. (1984).** – Activity of thiolutin against certain soil-borne plant pathogen. *Curr. Sci.*, **53**, 659-660.
- **De la Fuente, A., Lorenzana, L.M., Martín, J.F., Liras, P. (2002).** – Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin: possible cross-regulation of two unrelated secondary metabolic pathways. *J. Bacteriol.*, **23**, 6559-6565.
- **Dell I., Godfrey, C.R. A. and Wadsworth, D.J. (1992).** - Total synthesis of naturally occurring 1,2-dithiolo (4,3-b) pyrrolones and compounds. *American Chemical Society*, 384-394.
- **Demain, A.L. (1982).** - Catabolite regulation in industrial microbiology, pp. 3-20 *In: Overproduction of microbial products*, (V. Krumphanzl, B. Sikyta, Z. Vanek, Eds). Academic Press, New York.

- **Demain, A.L. (1983).** – Biosynthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics. *In: Handbook of Experimental Pharmacology* (Eds.), Antibiotics containing the  $\beta$ -lactam structures. **67**, 189-227.
- **Demain, A.L. (1998).** – Induction of microbial secondary metabolism. *Internatl. Microbiol.*, **1**, 259-264.
- **Demain, A. L. (1989).** - Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in actinomycetes. *In: Shapiro, S., editor. Regulation of secondary metabolism in actinomycetes.* Boca Raton, FL: CRC Press, p. 127-34.
- **Demain, A.L., Aharonowitz, Y. and Martín, J.F. (1983).** – Metabolic control of secondary biosynthetic pathways. *In: "Biochemistry and genetic regulation of commercially important antibiotics"*. Vining, L.C., Ed, Addison Wesley, London. pp. 49-72.
- **Demain, A.L., and Matteo, C.C. ( 1976).** - Phenylalanine stimulation of gramicidin S formation. *Antimicrob Agents Chemother.*, **9(6)**,1000-3.
- **Dixit, V.S., Pant, A. (2000).** - Comparative characterization of two serine endopeptidases from *Nocardioopsis* sp. NCIM 5124. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1523** (2-3), 261-268.
- **Dommergues, Y. et Mangenot, F. (1970).** - Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie (Eds.), Paris.
- **Donadio, S., Monciardini, P., Alduina, R., Mazza, P., Chiocchini, C., Cavaletti, L., Sosio, M. and Anna, P.M. (2002 ).** - Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites, *J. Biotechnology*, **99** (3), 187-198
- **Dotzlar, J.E., Mandzger, L.S. and Foglesong, M.A. (1984).** – Incorporation of amino-acid derived carbon into tylactone by *Streptomyces fradiae* GS. *Antimicrob. Agents Chemother.* **25**, 216-220.
- **Doull, J.I., and Vining, L.C. (1990).** – Nutritional control of actinothodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): suppressive effects of nitrogen and phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 449-454.
- **Drew, S.W., Winstanley, D.J. and Demain, A.L. (1976).** – Effects of norleucine on mycelial fragmentation in *Cephalosporium acremonium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 153-145.
- **Dutton, M.F. (1988).** – Enzymes of aflatoxins biosynthesis. *Microbiol. Rev.*, **52**, 274-236.

## E

- **Eder, C., Kurz, M. and Wink, J. (2002).** - Use of thiolutin dioxide and its derivatives for the treatment of CNS disorders and a process for the preparation thereof. *Eur. Pat. Appl.*, p.11.
- **Eiki, H., Gushima, H., Saito, T., Ishida, H., Oka, Y. and Osono, T. (1998).** – Product inhibition and its removal on josamycin fermentation by *Streptomyces narbonensis* var. *josamyceticus*. *J. Ferment. Technol.*, **66**, 559-565.
- **Eisenman, W., Minieri, P.P., Abbey, A., Charlebois, J., Moncrieff-Yeates, M. and Rigler, N.E. (1953).** - A new sulfur-containing antibiotic, produced by a *Streptomyces*, active against bacteria and fungi. *Antibio. and chemother.*, **3**, 385-392.
- **Elgazwy, A-S.S.H. (2003).** - The chemistry of isothiazoles. *Tetrahedron*, **59**, 7445-7463.
- **Ellis, J. E., Fried, J. H., Harrison, I. T., Rappe, E. and Ross, C. H. (1977).** - Synthesis of holomycin and derivatives. *J. Org. Chem.*, **42**, 2891-2893.
- **Elorza, M.V., Lostau, C.M., Villanueva, J.R. and Sentandreu, R. (1976).** - Cell wall synthesis regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Effect of RNA and protein inhibition, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **454**, 263-272.
- **Embley T.M., Smida J. and Stackebrandt E. (1988).** - Reverse transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA from *Faenia rectivirgula*, *Pseudonocardia thermophila* and *Saccharopolyspora hirsuta*, three wall type IV actinomycetes which lack mycolic acids. *J. Gen. Microbiol.*, **134** (4), 961-6.
- **Ettlinger, L., Gäumann, E., Hütter, R., Keller-Schierlein, W., Kradolfer, F., Neipp, L., Prelog, V. and Zähler, H. (1959).** - Stoffwechselprodukte von actinomyceten (Metabolic products of actinomycetes). Holomycin, *Helv. Chim. Acta.*, **42**, 563-569.
- **Evtushenko L.I., Taran V.V., Akimov V.N., Kroppenstedt R.M., Tiedje J.M. and Stackebrandt E. (2000).** - *Nocardioopsis tropica* sp. nov., *Nocardioopsis trehalosi* sp. nov., nom. rev. and *Nocardioopsis dassonvillei* subsp. *albirubida* subsp. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50** (1), 73-81.

## F

- **Ferreira, N.P. (1968).** – The effect of amino acids on the production of ochratoxin A in chemically defined media. *J. Microbiol. Serol.*, **34**, 433-440.

- **Ferreira, N.P. (1967).** - Recent advances in research on ochratoxin, part 2. Microbiological aspects, p. 157-168. *In: R.I.Mateles and G.N. Wogan (ed.). Biochemistry of some foodborne microbial toxins.* M.I.T. Press, Cambridge.
- **Floss, H.G. and Chang, C.J. (1981).** – Biosynthesis of some unusual macrolide antibiotics in biosynthesis. *Antibiotics IV.* (ed.) Corcoran, J.W. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 193-215.
- Forst, S. and Nealson K. (1996).** – Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. *Microbiological Review.*, **60**, 21-43.
- **Furumai, T., Takeda K. and Okanishi M. (1982).** - Function of plasmids in the production of aureothricin. I. Elimination of plasmids and alteration of phenotypes caused by protoplast regeneration in the *Streptomyces kasugaensis*. *J. Antibiot.*, **35**, 1367-1373.

## G

- **Gairola, C. and Hurley, L. (1976).** - The mechanism for the methionine mediated reduction in anthramycin yields in *Streptomyces refuincus* fermentations. *Eur. J. App. Microbiol.*, **2**, 95-101.
- **Gallo, M. and Katz, E. (1972).** - Regulation of secondary metabolite biosynthesis: catabolite repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose. *J. Bacteriol.*, **109**, 659-667.
- **Gastaldo, L. and Marinelli, F. (2003).** - Changes in GE2270 antibiotic production in *Planobispora rosea* through modulation of methylation metabolism. *Microbiology*, **149**, 1523-1532.
- **Gersch, D., Shurk, A. and 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. and Sanchez, S. (1995).** - Gentamicin formation in *Micromonospora purpurea* : stimulatory effect of ammonium. *J. Antibiot.*, **48**, 715-9.
- **Goodfellow, M. and Williams, S.T. (1983).** - Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.*, **37**, 189-216.

- **Goupil, N., Corthier, G., Ehrlich, S.D and Renault, P. (1996).** - Imbalance of leucine flux in *Lactococcus lactis* and its use for the isolation of diacetyl-overproducing strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**(7), 2636-40.
- **Gräfe, U., Fleck, W.F., Schade, W., Reinhardt, G., Tresselt, D. and Thrun, H. (1980).** - The platenolides I and II as precursors of turimycin. *J. Antibiot. (Tokyo)*., **33**(6), 663-4.
- **Gray, P.P. and Bhuwathanapun, S. (1980).** - Production of the macrolide antibiotic tylosin in batch and chemostat culture. *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1785-1804.
- **Gray, P.P. and Vu-Trong, K. (1987).** – Production of the macrolide tylosin in cyclic fed-batch culture. *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 33-40.
- **Gopalkrishnan, K. S. and Jump, J. A. (1952).** - The antibiotic activity of thiolutin in the chemotherapy of the *Fusarium* wilt of tomato. *Phytopathology*, **42**, 338-340.
- **Grosso, J.J. (1954).** - Control of tobacco blue mould by antibiotics. *Plant Dis. Repr.*, **38**, 333-334.
- **Grund, E. and Kroppenstedt, R.M. (1989).** - Transfer of five *Nocardopsis* species to the genus *Saccharothrix*. *Syst. Appl. Microbiol.*, **12**, 267-274.
- **Grund E. and Kroppenstedt R.M. (1990).** - Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus *Nocardopsis* Meyer 1976. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**, 5-11.
- **Gupte, M., Kulkarni, P. and Ganguli, B.N. (2002).** – Antifungal antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 46-57.

## H

- **Haavik, H.I. (1974).** - Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis*: role of catabolite repression and organic acids. *J. Gen. Microbiol.*, **84**, 321-326.
- **Hagio, K. and Yoneda, N. (1974).** - Total synthesis of holomycin, thiolutin and aureothricin. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **47**, 1484-1489.
- **Hamedi, J., Malekzadeh, F. and Saghafi, A.E. (2004).** - Enhancing of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* with common and uncommon oils. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **31**(10), 447-56.

- Hamill, R.L., Haney, M.E.J., Stamper, M. and Wiley, P.F. (1961). – Tylosin, a new antibiotic: II. isolation, properties and preparation of desmycosin. a microbiologically active degradation product. *Antibiot. Chemother.*, **11**, 328-334.
- Herrick D., Parker R. and Jacobson A. (1990). - Identification and comparison of stable and unstable mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 2269-2284.
- Holzapfel, W., Brost, I., Faerber, P., Geisen, R., Bresch, H., Jany, K-D., Mengu, M., Jakobsen, M., Steyn, P. S., Teniola, D., Addo, P. (2002). - Bacterial degradation of aflatoxin B1, ochratoxin A and/or zearalenone . *PCT Int. Appl.*, p. 19.
- Horinouchi, S. and 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. and Potapova, N.P. (1979). - The structure of nocamycin, a new antitumor antibiotic. *J. Antibiot.*, **32** (6), 555-558.
- Hostalek, Z. (1964). – Relationship between the carbohydrate of *Streptomyces aureofaciens* and the biosynthesis of chlortetracycline. I. The effect of interrupted aeration, inorganic phosphate and benzyl thiocyanate on chlorotetracycline biosynthesis. *Folia Microbiol.*, **9**, 78-86.
- Hozzein W.N., Li W.J., Ali M.I., Hammouda O., Mousa A. S., Xu L.H. and Jiang C. (2004). - *Nocardioopsis alkaliphila* sp. nov., a novel alkaliphilic actinomycete isolated from desert soil in Egypt. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 247-252.
- Hsiao, C-P., and Siebert, K.J. (1999). – Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **47**, 189-201.
- Hseih, D.P.H. and Matele, S. (1970). – The relative contribution of acetate and glucose to aflatoxin biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.*, **208**, 482-486.
- Hu, Y.T., Zhou, P.J., Zhou, Y-G., Liu, Z-H. and Liu S-J. (2004). - *Saccharothrix xinjiangensis* sp. nov., a pyrene-degrading actinomycete isolated from Tianchi lake, Xinjiang, China. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1-9.

## I

- Igarashi, M., Kinoshita, N., Ikeda, T., Nakagawa, E., Hamada, M. and Takeuchi, T (1997). - 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 (1997).** - Formamicin, a novel antifungal antibiotic produced by a strain of *Saccharothrix* sp. II. Structure elucidation of formamicin. *J. Antibiot.*, **50**, 932-936.
- **Ikeda, Y., Naganawa, H., Kondo, S., Takeuchi, T. (1992).** - Biosynthesis of bellenamine by *Streptomyces nashvillensis* using stable isotope labeled compounds. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **45**(12), 1919-24.
- **Ingraham, J.L., Maaloe, O. and Neidhardt, F.C. (1983).** – Regulation at the whole cell level. *In: Growth of the bacterial cell*, (Ingraham, J.L., Maaloe, O., Neidhardt, F.C., Eds.), pp. 349-385. Sinauer Associates Inc.: Sunderland.
- **Isaacson, P.J., Webster, J.M. (2002).** – Antimicrobial activity of *Xenorhabdus* sp. RIO (Enterobacteriaceae), symbiont of the entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* (Rhabditida: Steinernematidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, **79**, 146-153.
- **Isshiki, K., Sawa, T., Naganawa, H., Matsuda, N., Hattori, S., Hamada, M., Takeuchi, T., Oosono, M., Ishizuka, M., Yang, Z., Zhu, B. and Xu, W., (1989).** - 3-*O*-isobutyrylkinamycin C and 4-deacetyl-4-*O*-isobutyrylkinamycin C, new antibiotics produced by a *Saccharothrix* species. *J. Antibiot.*, **42**, 467-469.
- **Ishizawa, S. and Araragi, M. (1976).** - Composition of actinomycetes population in soil. *In: Actinomycetes, the boundary microorganisms*. Arai T. (Eds.) Toppan Co. Ltd, Tokyo, 97-107.
- **Isono, K. (1988).** - Nucleoside antibiotics: structure, biological activity, and biosynthesis. *J. Antibiot. (Tokyo)*., **41**(12), 1711-39.
- **Ito, S., Matsuya, T., Omura, S., Otani, M. and Nakagaxa, A (1970).** - A new antibiotic, kinamycin. *J. Antibiot. (Tokyo)*., **23**(6), 315-7.

## J

- **Jain, T.C., Newman, D.J. and Shearer, M.C. (1982).** - Polynitroxin antibiotics produced by *Nocardiopsis mutabilis* Shearer sp. nov. ATCC 31520. U.S. **4**, 317-812. A, Mar. 2. (brevet).
- **James, A.G., Watson-Craik, I.A. and Senior, E. (1998).** – The effect of organic acids on the methanogenic degradation of the landfill leachate molecules butyrate and valerate. *Water Research*, **32**, 792-800.

- **Jimenez., A., Tipper, D.J. and Davies, J. (1973).** - Mode of action of thiolutin, an inhibitor of macromolecular synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. agents and chemother.*, **3**, 729-738.
- **Joshi, A., Verma, M., Chakravorty, M. (1982).** - Thiolutin resistant mutants of *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob. Agents chemother.*, **22**, 541-547.
- **Juhl, M.J., Clark, D.P. (1990).** – Thiophene-degrading *Escherichia coli* mutants possess sulfone oxidase activity and show altered resistance to sulfur-containing antibiotics. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **56**, 3179-3185.
- **Junker, B.; Mann, Z.; Galliot, P.; Byrne, K. and Wilson, S. (1998).** - Use of soya bean oil and ammonium sulphate to optimize secondary metabolite production. *Biotech. Bioeng.*, **60**, 580-588.

## K

- **Kämpfer, P., Busse, H. J. and Rainey, F. A. (2002).** - *Nocardiopsis compostus* sp. nov., from the atmosphere of a composting facility. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 621-627.
- **Kaneda, T. (1963).** – Biosynthesis of branched chain fatty acids. II. Microbial synthesis of branched long chain fatty acids from certain short chain fatty acid substrates. *J. Biol. Chem.*, **4**, 1229-1235.
- **Kase, H., Iwahashi, K. and Matsuda, Y. (1986).** - K-252a, a potent inhibitor of protein kinase C from microbial origin. *J. Antibiot.*, **39**, 1059-1065.
- **Kawaguchi, T., Azuma, M., Horinouchi, S. and Beppu, T. (1988).** – Effect of B-factor and its analogues on rifamycin biosynthesis in *Nocardia* sp.. *J. Antibiot.*, **41**, 360-365.
- **Kennel, Y.M. and Demain, A.L. (1978).** – Effect of carbon on  $\beta$ -lactam antibiotic formation by *Cephalosporium acreminium*. *Exp. Mycol.*, **2**, 234-238.
- **Khachatourians, G.G., Tipper, D.J. (1974).** – Inhibition of messenger ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli* by thiolutin. *J. Bacteriol.*, **119**, 795-804.
- **Khan, N., Xiao, H., Zhang, B., Cheng, X., Mootoo, D.R. (1999).** – Oxocarbenium ion cyclisations under non-acidic conditions: synthesis of tetrahydropyran analogues of the pseudomonic acids. *Tetrahedron*, **55**, 8303-8312.

- **Khaoua, S. (1990).** – Régulation des étapes initiales de la biosynthèse de la spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. *Thèse de Doctorat* de l'INPL-Nancy.
- **Khaoua, S., Lebrihi, A., Germain, P. and Lefebvre, G. (1991).** – Cephamycin C biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 253-257.
- **Khaoua, S., Lebrihi, A., Laakel, M., Schneider, F., Germain, P. and Lefebvre, G. (1992).** – Influence of short-chain fatty acids on the production of spiramycin by *Streptomyces ambofaciens*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 763-767.
- **Khokhlov, A.S., and Tovarova, I.I. (1979).** – Autoregulator from *Streptomyces griseus*. *In: Regulation of secondary product and plant hormone metabolism*, (Lukner, M. and Schreiber, K. Eds.), pp. 133-145. Pergamon Press: Oxford.
- **Kim, Y. J., Furihata, K., Shimazu, A., Furihata, K., Seto H. (1991).** - Isolation and structural elucidation of sekothrixide, a new macrolide effective to overcome drug-resistance of cancer cells. *J. Antibiot.*, **44** (11), 1280-1282.
- **Kim Y. S. and Kawai A. (1998).** - Studies on the antiviral mechanisms of protein kinase inhibitors K-252a and KT5926 against the replication of vesicular stomatitis virus. *Biological And Pharmaceutical Bulletin*, **21**(5), 498-505.
- **Kim, Y. S. and Sagara, J. (1995).** - Studies on the antiviral activity of protein kinase inhibitors against the replication of vesicular stomatitis virus. *Biol. Pharm. Bull.*, **18** (6), 895-899.
- **Kim, W.S., Wang, Y., Fang, A. and Demain, A.L. (2000).** - Methionine interference in rapamycin production involves repression of demethylrapamycin methyltransferase and S-adenosylmethionine synthetase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 2908-2910.
- **Kimura, T., Nakamura, K. and Takahashi, E. (1995).** - Phosphonothrixin, a novel herbicidal antibiotic produced by *Saccharothrix* sp. ST-888. II. Structure determination. *J. Antibiot.*, **48**, 1130-1133.
- **Kinoshita, N., Igarashi, M., Ikeno, S., Hori, M. and Hamada, M. (1999).** - *Saccharothrix tangerinus* sp. nov., the producer of the new antibiotic formamicin: taxonomic studies. *Actinomycetologica*, **13**, 20-31.
- **Kirby, J.P., Maise, W.M., Testa, R.T. and Labeda, D.P. (1987).** - New antibacterial LL – C 19004 cpd-prepd. by fermentation of *Saccharothrix espanaensis*. *U.S.*, **4**, 699-790.

- **Knarreborg, A., Engberg, RM, Jensen, SK, and Jensen, BB (2002).** - tative determination of bile salt hydrolase activity in bacteria isolated from the small intestine of chickens. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**(12), 6425-8.
- **Koguchi, Y., Khono, J., Suzuki, S., Takahashi, K., Ohnuki, T. and Komatsubara, S. (1999).** TMC-86A, B and TMC-96, new proteasome inhibitors from *Streptomyces* sp. TC 1084 and *Saccharothrix* sp. TC 1094. I. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities. *J. Antibiot.(Tokyo)*, **52**(12), 1069-76.
- **Kusakabe, H. and Isono, K. (1988).** - Taxonomic studies on *Kitasatosporia cystarginea* sp. nov., which produces a new antifungal antibiotic cystargin. *J. Antibiot.*, **41**, 1758-1762.
- **Kusakabe, Y., Takahashi, N., Kiyono, A. and Iwagaya Y. (1987).** - Antibiotic 6270-containing anticoccidia preparation. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho.*, p. 9.
- **Küster, E. and Neumeier, W. (1981).** – Halotolerance in some *Streptomyces* producing tetracyclines. *Zbl. Bakt. Suppl.*, **11**, 315-319.

## L

- **Laakel, M., Lebrihi, A., Khaoua, S., Schneider, F., Lefebvre, G. and Germain, P. (1994).** A link between primary and secondary metabolism: malonyl-CoA formation in *Streptomyces ambofaciens* on ammonium ion or valine. *Microbiology*, **140**, 1451-1456.
- **Labeda, D.P. (1986).** - Transfert of "*Nocardia aerocolonigenes* " (Shinobu and Kawato 1960) Pridham 1970 into the genus *Saccharothrix* Labeda, Testa, Lechevalier and Lechevalier (1984) as *Saccharothrix aerocolonigenes* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**, 109-110.
- **Labeda, D.P. (1987).** – Actinomycete taxonomy; generic characterization. *J. of Ind. Microbil.*, **28**, 115-121.
- **Labeda, D.P. (1988).** - An evaluation of strains of the genus *Saccharothrix* by numerical taxonomic and molecular taxonomic methods. *In: Biology of actinomycetes 88.* Okami Y., Beppu T. and Ogawara H. (Eds). Japan Society Scientific Press, Tokyo. pp. 227-232.
- **Labeda, D.P., Hatano, K., Kroppenstedt, R.M. and Tamura, T. (2001).** - Revival of the genus *Lentzea* and proposal for *Lechevalieria* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 1045-1050.

- **Labeda, D.P. and Kroppenstedt, R.M. (2000).** - Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa: proposal for *Actinosynnemataceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 331-336.
- **Labeda, D.P. and Lechevalier, M.P. (1989).** - Amendment of the genus *Saccharothrix* Labeda *et al.* 1984 and descriptions of *Saccharothrix espanaensis* sp. nov., *Saccharothrix cryophilis* sp. nov., and *Saccharothrix mutabilis* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**, 420-423.
- **Labeda, D.P. and Lyons, A.J. (1989).** - *Saccharothrix texasensis* sp. nov. and *Saccharothrix waywayandensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**, 355 - 358.
- **Labeda D.P., Testa R.T., Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1984).** - *Saccharothrix*: new genus of the *Actinomycetales* related to *Nocardioopsis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **34**, 426-431.
- **Labeda, D.P., Testa, R.T., Lechevalier, M.P. and Lechevalier, H.A. (1986).** - *Glycomyces*, a new genus of the *Actinomycetales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **35** (4), 417-421.
- **Lacey, J. (1973).** - Actinomycetes in soils, composts and fodders. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.*, **2**, 231-51.
- **Lacey, J. (1997).** Actinomycetes in composts. *Ann. Agric. Environ. Med.*, **4**, 113-121.
- **Lam, K. S., Schroeder, D. R., Veitch, J.M., Matson, J. A. and Forenza, S. (1991).** - Isolation of a bromo analog of rebeccamycin from *Saccharothrix aerocolonigenes*. *J. Antibiot.*, **44**, 934-939.
- **Lam, K.S., Schroeder, D.R., Veitch, J.M., Colson, K.L., Matson, J.A., Rose, W.C., Doyle, T.W. and Forenza, S. (2001).** - Production, isolation and structure determination of novel fluorindolocarbazoles from *Saccharothrix aerocolonigenes* ATCC 39243. *J. Antibiot.*, **54** (1), 1-9.
- **Lamari, L., Zitouni, A., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Lebrihi, A., Lefebvre, G., Seguin, E. and Tillequin, F. (2002).** - New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233 – I. Taxonomy, production, isolation and biological properties. *J. Antibiot.*, **55**, 696-701.
- **Lamari, L., Zitouni, A., Dob, T., Sabaou, N., Lebrihi, A., Germain, P., Seguin, E. and Tillequin, F. (2002).** - New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. II. Physicochemical properties and structure elucidation. *J. Antibiot.*, **55**, 702-707.

- **Lamsaïf, D. (1992).** – Effects des sources d’azote sur la biosynthèse de la spiramycine chez *Streptomyces ambofaciens*. Etude des enzymes impliquées dans l’assimilation des ions ammonium. *Thèse de Doctorat* de l’INPL de Nancy.
- **Larpent-Gourgaud, M. and Sanglier, J.J. (1992).** "Biotechnologies, principes et méthodes". Doin, Paris.
- **Laskin, A.I. and Lechevalier, H. (1984).** - Handbook of Microbiology. Vol. 3, CRC Press.
- **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.
- **Leben, C. and Keitt, G.W. (1954).** – Antibiotics and plant disease, effect of antibiotics in control of plant diseases. *Agricultural and Food Chemistry*, **2**, 234-239.
- **Lebrihi, A., Lamsaif, D., Lefebvre, G. and Germain, P. (1992).** - Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 382-387.
- **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.
- **Lechevalier, M.P., De bievre, C. and Lechevalier, H.A. (1977).** - Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.*, **5**, 249-260.
- **Lechevalier, M.P. (1981).** - Ecological associations involving actinomycetes. *In: Actinomycetes*. Shaal and Pulverer (Eds.). *Zbl. Bakt. suppl.*, **11**, 159-166.
- **Lee, M., Henry, M. and Silver, P. A. (1996).** - A protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm is an important mediator of RNA export. *Genes Dev.*, **10**, 1233-1246.
- **Lewis, J.C. and Michener, H.D. (1954).** – Antibiotics in food processing, additives accelerating death spores by heat. *Agricultural and food chemistry*, **2**, 298-302.
- **Li, I.V., Terekhova, L.P., Alferova, I.V., Galatenko, O.A. and 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. and Webster, M. (1995).** - Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont. *J. Nat. Prod.*, **55**, 1081-1086.

- Li, H., Lu, W., Zhang, Y., Jin, W., Tao, P., Liu, X., He, Y. and Zeng, Y. (1992). - Isolation and characterization of mutactimycin-producing mutant. *Weishengwu Xuebao*, **32**, 353-358.
- Li, J., Chen, G. and Webster, M. (1996).- N-(indol-3-ylethyl)-2'-hydroxy-3'-methylpentanamide, a novel indole derivative from *Xenorhabdus nematophilus*. *J. Nat. Prod.*, **59**, 1157-1158.
- Liao, X., Vining, L.C., and Doull, J.D. (1995). Physiological control of trophophase and idiophase separation on *Streptomyces* cultures producing secondary metabolites. *Can. J. Microbiol.*, **41**, 309-315.
- Lilley, G. Clark, A.E. and Lawrence, G.C. (1981). – Control of the production of cephamycin C and thienamycin by *Streptomyces cattleya* NRRL 8057. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **31**, 127-134.
- Lin, T.F., and Demain, A.L. (1994).- Leucine interference in the production of water-soluble red *Monascus* pigments. *Arch. Microbiol.*, **162**, 114-119.
- Liras, P., Asturias, J.A. and Martín, J.F. (1990). – Phosphate control sequences involved in transcriptional regulation of antibiotic biosynthesis. *Tibtech.*, **8**, 184-189.
- Lisker, N. and Paster, N. (1983). - Ochratoxin production by *Aspergillus ochraceus* as affected by methionine and structurally related compounds. *Can. J. Microbiol.*, **29**, 536-540.
- Locci, R. and Sharples, G.P. (1984). – Morphology. In: “The biology of Actinomycetes”. Goodfellow, M., Mordarski, M., Williams, S.T. Eds. Academic Press, London. pp. 165-199.
- Lombardi, P. and Crisanti, A. (1997). – Antimalarial activity of synthetic analogues of distamycin. *Pharmacol. Ther.*, **76**, 125-133.
- Loria, A. (1986). - The national institute of health quality control program. III. Follow-up studies (phase 3). *Rev. Invest. Clin.*, **38**, 435-440.
- Lounès, A., Lebrihi, A., Benslimane, C., Lefebvre, G. and Germain P. (1995a). - Regulation of valine catabolism by ammonium in *Streptomyces ambofaciens*, producer of spiramycin. *Can. J. Microbiol.*, **41**, 800-808.
- Lounès, A.; Lebrihi, A.; Benslimane, C.; Lefebvre, G. and Germain P. (1995b). – Glycerol effect on spiramycin production and valine catabolism in *Streptomyces ambofaciens*. *Curr. Microbiol.*, **31**, 304-311.

- Lounès, A.; Lebrihi, A.; Benslimane, C.; Lefebvre, G. and Germain P. (1995c). - Regulation of spiramycin synthesis in *Streptomyces ambofaciens*: Effect of glucose and inorganic phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 204-211.
- Lounès, A., Lebrihi, A., Benslimane, C., Lefebvre, G. and Germain P. (1996). – Effect of nitrogen/carbon ratio on the specific production rate of spiramycin by *Streptomyces ambofaciens*. *Process Biochem.*, **31**, 13-20.
- Luckner, M., Nover, I., Bohn, H. (1977). – Secondary metabolism and cell differentiation. New York: Springer-Verlag, p. 57.
- Lueck, E. (1980). – Antimicrobial food additives: characteristics, uses, effects. Springer, Berlin, p. 280.

## M

- Machtiger, N.A. and Fox, C.F. (1973). – Biochemistry of bacterial membranes. *Ann. Rev. Biochem.*, **42**, 575-600.
- Magasanik, K. B. (1992). - Regulation of nitrogen –utilization. *In*: Jones, E. W., Pringle, J. R., Broach, J. R. (eds.) The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol. 2, p. 283-317.
- Malik, V.S. (1982). - Genetics and Biochemistry of secondary metabolism. *Adv. Appl. Microbiol.*, **28**, 27-115.
- Manzoni, M.; Bergomi, S.; Rollini, M. and Cavazzoni, V. (1999). - Production of lovastatins by filamentous fungi. *Biotechnol. Lett.*, **21**, 253-7.
- Marshall, V.P., Cialdella, J.I., Fox, J.A. and Laborde, A.L. (1984). – Precursor direct biosynthesis of paulomycins A and B. The effects of valine, isoleucine, isobutyric acid and 2-methylbutyric acid. *J. Antibiot.*, **37**, 923-925.
- Marshall, V.P., Mc Wethy, S.J., Visser, J., Cialdella, J.I. and Laborde, A.L. (1987). – Fermentation technology for the production of antibiotics from actinomycetes, the example of paulomycin. *J. Ind. Microbiol.*, **28**, 105-113.
- Martin, J.F. (1977). - Control of antibiotic synthesis by phosphate. *Adv. Biochem. Eng.*, **6**, 105-127.



- **Martín, J.F. (1989).** – Regulation of secondary metabolite formation. *In: Physiological genetic modulation of product formation*, (Alberghina, L., Frontali, L., Hamer, G., Eds.), pp. 55-80. VCH: Weinheim.
- **Martín, J.F. and Aharonowitz, Y.** Regulation of biosynthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics, *In: Demain, A.L. and Solomon, N.A. (edn.), Antibiotics containing the  $\beta$ -lactam structure*, Springer, New York, N.Y., 1983, pp. 229-254.
- **Martín, J.F. and Aharonowitz, Y. (1983).** – Regulation of biosynthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics. *In: Handbook of Experimental Pharmacology (Eds.), Antibiotics containing  $\beta$ -lactam structures.* **67**, 229-254.
- **Martín, J.F. and Demain, A.L. (1980).** – Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.*, **44**, 230-251.
- **Martín, J. F., and P. Liras. (1981).** - Biosynthetic pathways of secondary metabolites in industrial microorganisms, p. 211-233. *In: H.-J. Rehm, and G. Reed (ed.), Biotechnology*, vol. 1. Verlag Chemie GmbH, Weinheim, Germany.
- **Marwick, J.D., Wright, P.C., Burgess, J.G. (1999).** – Bioprocess intensification of production of novel marine bacterial antibiotics through bioreactor operation and design. *Mar. Biotechnol.*, **1**, 495-507.
- **Massey, L.K., Sokatch, J.R. and Conard, S.R. (1976).** – Branched-chain amino acid catabolism in bacteria. *Bacteriol. Rev.*, **40**, 42-54.
- **Matsuo, N., Saito, N. and Akino, T. (1994).** - Preparation of bacteriolytic enzymes with actinomycetes. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho.*, p. 13.
- **Matsuo, N., Negishi, A. and Negishi, Y. (2003).** - Jpn. Kokai Tokkyo Koho, p 6.
- **Mc Carthy, P., Malcolm, R.L., Clapp, C.E., Bloom, P.R. (2003).** – Humic substances in soil and crop sciences. Editors, American Society of Agronomy, Madison.
- **Mc Intyre, J.J., Bull, A.T., Bunch, A.W. (1996).** – Vancomycin production in batch and continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.*, **49**, 412-420.
- **Mc Inerney, B. V., Gregson, R. P., Lacey, M. J., Akhurst, R. J., Lyons, G. R., Rhods, S. H., Smith, D. R. J., Engelhardt, L. M. and White, A. H. (1991).** - Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp. Part 1. Dithiopyrrolone derivatives with antibiotics activity. *J. Nat. Prod.*, **54**, 774-784.

- **Meklat, A. (2004).** – Effet des antibiotiques de deux souches d'actinomycètes sur la maladie tache chocolat et l'antracnose de la fève et sur la fusariose vasculaire du lin. Magister de microbiologie, E.N.S. de Kouba, 97p.
- **Melchior, D.L. and Steim, J.M. (1977).** – Control of fatty acid composition of *Acholeplasma laidlawii* membranes. *Biochem. Biophys. Acta.*, **466**, 148-159.
- **Merrouche, R. (2001).** - Influence d'une souche se *Saccharothrix* (Actinomecetales) et de son antibiotique, la thiolutine, sur l'expression de la fusariose vasculaire de quelques plantes cultivées. Magister de microbiologie, E.N.S. de Kouba, 101p.
- **Messenger, A.J. and Turner, J.M. (1983).** – Effects of growth conditions on phanazine production by *Pseudomonas phenazinium*. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 1013-1018.
- **Meyrath, J. and Suchanek, G. (1972).** – Inoculation techniques-Effect due to quality of inoculum. *Methods. Microbiol.* **7**, 159-209.
- **Miller, L.K., Lingg, A.J., and Bulla, L.A. (1983).** – Bacterial, viral and fungal insecticides. *Science*, **219**, 715-721.
- **Michael, T., Christopher, W. (2002).** - New Mechanism for Pyrrole Synthesis: Proline to Pyrrole Conversion During Undecylprodigiosin and Pyoluteorin Biosynthesis. *Chem. and Biol.*, **9**, 171-184.
- **Minamiguchi, K., Kumagai, H., Maduda, T., Kawada, M., Ishizuka, M. and Takeuchi, T. (2001).** - Thiolutin, an inhibitor of huvec adhesion to vitronectin, reduces paxillin in huvecs and suppresses tumor cell-induced angiogenesis. *Int. J. Cancer*, **93**, 307-316.
- **Misato, T. (1982).** - Present status and futur prospects of agricultural antibiotics. *J. pesticides Sci.*, **7**, 301-305.
- **Miyairi, N., Miyoshi, T., Aoki, H., Kohsaka, M., Ikuushima, H., Kunugita, K., Sakai, H. and Imanaka, H. (1970).** – Studies on thiopeptin antibiotics. I. Characteristics of thiopeptin B. *J. Antibiot.*, **23**, 113-119.
- **Mizuhara, Y. (1962).** - Synthesis of 5-substituted derivatives of 3-acetamido-1-methyl-2,4-dioxopyrrolidine. *11<sup>th</sup> Annual Meeting of the Chemical Society of Japan*, Tokyo. 2085-2088.

- **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.
- **Moreira K.A., Albuquerque B.F., Teixeira M.F.S., Porto A.L.F., Lima Filho J.L. (2002).** - Application of protease from *Nocardioopsis* sp. as a laundry detergent additive. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **18** (4), 307-312.
- **Mousslim, J., David, L., Pétel, G. and Gendraud, M. (1993).** – Effect of exogenous methyl oleate on time course of some parameters of *Streptomyces hygroscopicus* NRRL B-1865 culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **39**, 585-588.
- **Murakami, R., Tomikawa, T., Shin-Ya, K., Shinozaki, J., Kajiura, T., Seto, H., Hayakawa, Y. (2001).**-Ammocidin, a new apoptosis inducer in ras-dependant cells from *Saccharothrix* sp. I. Production, isolation and biological activity. *J. Antibiot.*, **54**, 710-713.
- **Murakami, R., Tomikawa, T., Shin-Ya, K., Shinozaki, J., Kajiura, T., Kinoshita, T., Miyajima, A., Seto, H., Hayakawa, Y. (2001).** - Ammocidin, a new apoptosis inducer in ras-dependent cells from *Saccharothrix* sp. II. Physico-chemical properties and structure elucidation. *J. Antibiot.*, **54**, 714-717.
- **Murakata, C., Matsuda, Y. (1998).** - Development of the bioprobe K-252a for treatment of neurodegenerative diseases. *Bio. Industry.*, **15** (7), 43-49.
- **Murneek, A. E. (1952).** - Thiolutin as a possible inhibitor of fire blight. *Phytopathology*, **42**, 57-58.
- **Myrray, W.C. and Magee, W.L. (1972).** – Phospholipid metabolism. *Am. Rev. Biochem.*, **41**, 121-129.

## N

- **Naidenova, M., Vladimirova, D. (2002).** – Isolation and taxonomic investigation of actinomycetes from specific biotopes in bulgaria. *Journal of Culture Collections*, **3**, 15-24.
- **Naik, S.R., Harindran, J. Varde, A.B. (2001).** – Pimpirine, an extracellular alkaloid produced by *Streptomyces* CDRIL-312: fermentation, isolation and pharmacological activity. *Journal of Biotechnology*, **88**, 1-10.

- Nakamura, K., Kimura, T., Takahashi, E. (1999). - Synthesis and biological activities of phosphonothrixin. Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements. *Naturstoffren. Angew. Chem.*, **69**, 50-58.
- Niemi, J. (1995). - Hybrid anthracycline antibiotics: Analysis and application of rhodomycine biosynthetic genes from *Streptomyces purpuracens*. PH.D. Thesis, Univ. Turku (Finland).
- Nickell, L.G., Finlay and A.C. (1954). – Growth modifiers, antibiotics and their effects on plant growth, *Agricultural and Food Chemistry*, **2**, 178-182.
- Novikova, L.M. and Makarevich, V.G. (1984). – Inter-relationship of dehydrogenase activity of mycelium of *Streptomyces aureofaciens* and its capacity for tetracycline biosynthesis. *Antibiotiki*, **29**, 735-740.
- Nowak-Thompson, B., Chaney, N., Wing, J.S., Gould, S.J., Loper, J.E. (1999). - Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J. Bacteriol.*, **181**(7), 2166-2174.

## 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*, (Okami, Y., Beppu, T. and Ogawara, H., Eds.), pp. 303-337. Japan Scientific Societies Press: Tokyo.
- Ochi, K. and Ohsawa, S. (1984). – Initiation of antibiotic production by the stringent response of *Bacillus subtilis*. Marburg. *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 2473-2482.
- Oestergaard, P.R and Sjoeholm, C. (2001). - Use of acid-stable proteases in animal feed. *PCT Int. Appl.*, p. 49.

- Ohmori, K., Ishii, H., Manabe, H., Satoh, H., Tamura, T. and Kase, H. (1988). – Anti-inflammatory and antiallergic effects of a novel metabolite of *Nocardioopsis* sp. as a potent protein kinase C inhibitor from microbial origin. *Arzneimittelforschung.*, **38**, 809-814.
- Okanishi, M. and Hotta, K. (1980). – Regulation of antibiotics production in microorganism. *In: Molecular breeding and genetics of applied microorganisms.* (Sakagushi, K. and Okanishi, M., Eds.), pp. 9-28. Academic Press: New York.
- Okazaki, H.; Ono, H.; Yamada, K.; Beppu, T. and Arima, K. (1973). - Relationship among cellular fatty acid composition, amino acid uptake and neomycin formation in a mutant strain of *Streptomyces fradiae*. *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2319-23.
- Okami, Y. and Hotta, K. (1988). - Search and discovery of new antibiotics. *In: M. Goodfellow, S.T. Williams & M. Mordarski (eds.) Actinomycetes in Biotechnology.* Academic Press, New York, pp. 33-67
- Okamura, K., Soga, K., Shimauchi, Y., Ishikura, T. and Lein, J. (1977). - Holomycin and N-propionylholothin, antibiotics produced by a cephamycin C producer. *J. Antibiot.*, **30**, 334-336.
- 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.
- Omura, S. (1986). – Introduction. *In: "The bacteria. A treatise on structure and fonction, Antibiotics-producing Streptomyces"*, Vol IX, volume Eds. by Queener, S.W. and Day, L.E. Eds. by Sokatch, J.R. and Ornston, L.N. Ac. Press, XVII-XXI.
- Omura, S., Taki, A., Matsuda, K. and Tanaka, Y. (1984a). – Ammonium ions suppress the amino acid metabolism involved in the biosynthesis of protylonolide in mutant of *Streptomyces fradiae*. *J. Antibiot.*, **37**, 1362-1369.
- Omura, S. and Tanaka, Y. (1986a). – Macrolide antibiotics. *In: Rehm, H.J., Reed, G. (Eds.), Biotechnology, Vol 4, Weinheim, VCH Verlagsgesell-Schaft.* pp. 359-591.
- Omura, S. and Tanaka, Y. (1986b). - Biosynthesis of tylosin and its regulation by ammonium and phosphate. *In: Regulation of secondary metabolite formation* (Kleinkauf, H., Dohren, H. V., Dormauer, H. and Nesmann, G., Eds.). VCH Publishers, Berlin, 305-332.

- **Omura, S., Tanaka, Y., Hamada, H. and Masuma, R. (1984b).** - Effect of ammonium ion, inorganic phosphate and amino acids of the biosynthesis of protylonolide, a precursor of tylosin aglycone. *J. Antibiot.*, **37**, 494-502.
- **Omura S., Tanaka Y., Takahashi Y. and Iwai Y. (1980).** - Stimulation of production of macrolide antibiotics by magnesium phosphate and related insoluble materials. *J. Antibiot.*, **33**, 1568-1569.
- **Omura, S., 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.
- **Omura, S., Tomado, H., Yamamoto, S., Tsukui, M. and Tanaka, H. (1984c).** - Studies on new dioxygenases involved in the synthesis of tylosin in *Streptomyces fradiae*. *Bioch. Biophys. Acta*, **802**, 141-147.
- **O'Neill A., Oliva B., Storey C., Hoyle A., Fishwick C and Chopra I. (2000).** - RNA polymerase inhibitors with activity against Rifampin-Resistant Mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, **44**, 3163-3166.

## P

- **Paik, S., Park, Y.H., Suh, S.H., Kim, H.S., Lee, I.S., Park, M.K., Lee, C.S. and Park, S.H. (2001).** - Unusual cytotoxic phenethylamides from *Xenorhabdus nematophilus*, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **22**, 372-374.
- **Papp, M., Kase, H. and Gigler, G. (1992).** - Antiinflammatory effect of a protein kinase C inhibitor (K-252a) on the development of the dextran-induced paw edema in the rat (preliminary results). *Acta Physiol Hung.*, **80**, 423-425.
- **Patent, U.K. Pat., 1990, 2 232 668, CA, 115, 112815u.** - In: Bush, B. D., Fitchett, G. V., Gates, D. A. and Langley, D. (1993).
- **Peltola, J.S.P., Anderson, M.A., Kampfer, P., Auling, G., Kropensstedt, R.M., Busse, H.J., Salkinoja-Salonen, M.S. and Rainey, F.A. (2001).** - Isolation of toxigenic *Nocardiosis* strains from indoor environments and description of two new *Nocardiosis* species, *N. exhalans* sp.nov. and *N. umidischholae* sp. Nov. *Appl. Env. Microbiol.*, **67**, 4293-4304.
- **Pen-Chaur, W., Kroening, T.A., White, P.J. and Kendrick, K.E. (1992).** - Histidine ammonia-lyase from *Streptomyces griseus*. *Gene*, **115**, 19-25.

- **Piret, J.M. and Demain, A.L. (1988).** - Actinomycetes in biotechnology: an overview in: Goodfellow, M., Mordarski, M and Williams S.T. (Edn.) Actinomycetes in biotechnology. Academic Press, London, pp 461-482.
- **Peroz-Collignon, A. (1993).** – Biosynthèse de la spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*: études cinétiques en discontinu et en semi-continu de l'influence de précurseurs du platénolide en présence de glycérol. *Thèse de Doctorat* de l'INPL-Nancy.
- **Perry, D.A., Tone, J., Maeda H., (1990).** - Antiparasitic menaquinones from *Saccharothrix*. (Pfizer Ltd., UK). Brit. UK Pat. Appl. p. 28.
- **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. and Distler, J. (1997).** - Aminoglycosides and sugar components in other secondary metabolites. In : Rehn H-J, Reed G, editors. Products of secondary metabolism, Vol. 7. Weinheim: VCH, p.397-488.
- **Pitt, J.I. (1987).** - *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.*, p. 266-269.
- **Pokorny, M., Vitale, L., Turk, V., Renko, M. and Zuvanic, J. (1979).** – *Streptomyces rimosus* extracellular protease: (1) Characterization and evaluation of various crude preparation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **8**, 81-90.
- **Pospíšil, S., Cimburkova, E., Krumphanzl, V. and Vanek, Z. (1985).** - Effect of precursors on biosynthesis of monensins A and B. *Folia Microbiol. (Praha)*, **30**(1), 30-3.
- **Pregolato M., Terreni M., Ubiali D., Pagani G., Borgna P., Pastoni F., 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

- **Rao, K.C.S., Karanth, N.G., Sattur, A.P. (2005).** Production of nigerloxin, an enzyme inhibitor and a free radical scavenger, by *Aspergillus niger* using solid state fermentation. *Process Biochemistry*, **40**, 2517-2522.

- **Raczynska-Bojanowska, K., Ruczaj, Z., Sawnor-Korszynska, D. and Rafalski, A. (1973).** – Limiting reactions in activation of acyl units in biosynthesis of macrolide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **3**, 162-167.
- **Raty K., Kantola J., Hautala A., Hakala J., Ylihonko K. and Mantsala P. (2002).** - Cloning and characterization of *Streptomyces galilaeus* aclacinomycins polyketide synthase (PKS) cluster. *Gene.*, **293**, 115-122.
- **Reitzer, L. J. (1996).** - Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, L-alanine and D-alanine. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2 nd edn, vol. 1, pp. 391-407. Edited by F. C. Neidhardt and others. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- **Rodwell, V.W. (1969).** - Biosynthesis of amino acids and related compounds, p. 317-324. In: D.M. Greenberg (ed.), metabolic pathways, vol. 3. Academic Press Inc., New York.
- **Ruczaj, Z., Sawnor-Korszynska, D. and Raczynska-Bojanowska, K.(1969).** – Propionate and acetate kinase in *Streptomyces*. *Bulletin de l'académie Polonaise de sciences.* **17**, 531-533.
- **Rudakova, A.V. and Malkov, M.A. (1987).** – Characteristics of oleandomycin-producing organism inoculum at various levels of antibiotic biosyntheses. *Antibiot. Med. Biotekhnol.*, **32**, 434-437.

## S

- **Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A, Lamari L., Bennadji H., Lefebvre G. et Germain P. (1998).** -Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*, **9**, 147-153.
- Sabaou N., Hacène H., Bennadji A., Bennadji H. et Bounaga N. (1992).** - Distribution quantitative et qualitative des actinomycètes dans les horizons de sol de surface et profonds d'une palmeraie algérienne. *Can. J. Microbiol.*, **38**, 1066-1073.
- **Sallam, L.A.S., El-Abyad, M.S., El-Refai, A-M.H., El-Menofi, H.A. and Adham, N.Z. (1995).**  
- Bioconversion of 19-Nortestosterone by *Rhodococcus* sp. DSM 92-344. I: Optimization of Transformation Parameters. *Process Biochemistry*, **30**(1), 25-34.
- **Sanchez S. et Demain A.L. (2002).** – Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzy. Microb. Technol.*, **31**, 895-906.



- Satoh, A., Ogawa, H. and Satomura, Y. (1976). – Role and regulation mechanism of kanamycin acetyltransferase in kanamycin biosynthesis. *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 191-196.
- Sawada, Y., Konomi, T., Solomon, N.A., Demain, A.L. (1980). – Increase in activity of  $\beta$ -lactam synthetases after growth of *Cephalosporium acromenium* with methionine or norleucine. *FEMS Microbiol. Lett.*, **9**, 281-284.
- Schachtner, J.E., Nienaber, J. Stachel, H.D. and Waisser, K. (1999). - Fused 1,2-dithioles, V: Carbenoid anions as intermediates in reactions of pyrrothines and their heteroanalogues, *Pharmazie*, **54**, 335-340.
- Schippers, A., Bosecker, K., Willscher, S., Sproer, C.P., Schumann, C. and Kroppenstedt, R.M. (2002). - *Nocardiosis metallicus* sp. nov., a metal-leaching actinomycete isolated from an alkaline slag dump. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 2291-2295.
- Seepersaud, M., Kettunen, M., Abu-Surrah, A.S., Voelter, W., Al-Abed, Y. (2002). – Hydroformylation of glycals using a rhodium(I)(acac)(CO)<sub>2</sub> catalyst. *Tetrahedron Letters.*, **43**, 8607-8609.
- Seneca, H., Kane, J. H. and Rockenbach, J. (1952). - Bacterial, protozoical and fungicidal properties of thiolutin. *Antibiot. Chemother.*, **2**, 375-360.
- Sethuraman, A., Akin, D.E., Eisele, J.G. and Eriksson, K-E.L. (1998). – Effect of aromatic compounds on growth and ligninolytic enzyme production of two white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispota* and *Cyathus stercoreus*. *Can. J. Microbiol.*, **44**, 872-885.
- Seto, H., Shimazu, A. (1992). - Novel anticancer cyclic compound CF-24 and its manufacture with *Saccharothrix* species. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho.*, p. 7.
- Shapiro, S. (1989). - Nitrogen assimilation in *actinomycetes* and the influence of nitrogen nutrition on *actinomycete* secondary metabolism. *In: regulation of secondary metabolism in Actinomycetes*, pp. 135-211. Edited by S. Shapiro. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Sherman, D.H., Malpartida, F., Bipp, M.J., Kieser, H.M., Hallam, S.E., Robinson, J.A., Bergh, S., Uhlen, M., Simpson, T.J. and Hopwood, D.A. (1988). – Cloning and analysis of genes for the biosynthesis of polyketide antibiotics in *Streptomyces* species. *8<sup>th</sup> Int. Biotechnol. Symp. Symp.* eds. 123-136.
- Shiozawa, H., Kagasaki, T., Kinoshita, T., Haruyama, H., Domon, H., Utsui, Y., Kodama, K., Takahashi, S. (1993). - Thiomarinol, a new hybrid antimicrobial antibiotic produced by a

marine bacterium. Fermentation, isolation, structure, and antimicrobial activity. *J. Antibiot.*, **46**, 1834-1842.

- **Shiozawa, H., Kagasaki, T., Torikata, N., Hata, T., Furukawa, Y. and Takahashi, S. (1995).**  
- Thiomarinols B and C, new antimicrobial antibiotics produced by a marine bacterium.  
*J. Antibiot. (Tokyo)*, **48(8)**, 907-909.
- **Shiozawa, H., Shimada, A. and Takahashi, S. (1997).** - Thiomarinols D, E, F and G, new hybrid antimicrobial antibiotics produced by a marine bacterium; isolation, structure, and antimicrobial activity. *J. Antibiot.*, **50**, 449-452.
- **Shiozawa, H., Takahashi, S. (1994).**- Configurational studies on thiomarinol. *J. Antibiot.*, **47**, 851-853.
- **Sivasubramanian, N. and Jayaraman, R. (1976).** - Thiolutin resistant mutants of *Escherichia coli* are they chain initiation mutants. *Mol. Gen. Genet.*, **145**, 89-96.
- **Sivasubramanian, N. and Jayaraman, R. (1980).** - Mapping of twotranscription mutation (tln I and tln II) conferring thiolutin rsistance, adjacent to DNA Z anr Rho in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **180**, 609-615.
- **Schaffner, C.P. (1954).** - Studies on orchid media inhibitory to fungi. *American Orchid Society Bulletin*, 798-802.
- **Shirling, E. B. and Gottlieb, D. (1966).**- Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44**, 313-340.
- **Smith, G.M., Calam, C.T. (1980).** - Variations in inocula and their influence on the productivity of antibiotic fermentations. *Biotechnol. Lett.*, **2**, 261-266.
- **Singh, M.P., Petersen, P.J., Weiss, W.J. Kong, F. and Greenstein, M. (2000).** - Saccharomicins, novel heptadecaglycoside antibiotics produced by *Saccharothrix espanaensis*: antibacterial and mechanistic activities. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 2154-2159.
- **Slininger, P.J. and and Jackson, M.A. (1992).** – Nutritional factors regulating growth and accumulation of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 388-392.
- **Solé, M.; Rius, N. and 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.
- **Stahl, P., Seidel, H., Von der Eltz, H., Wilhelms, O.H. and Roesch, A.** - Pyrrothine derivatives and pharmaceutical use thereof, U. S. Patent 4,760,077, 1988.
- **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 dithiolopyrrolones. *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.
- **Stachel, I. D., Nienaber, J. and Zoukas, T. (1992).** - Synthese von thiolutin und verwandten verbindungen. *Liebigs Ann. Chem.*, 473-480.
- **Stevenson, F.J. (1985).** – Geochemistry of soil humic substances. p. 13-52. *In: Aiken, G.R. et al. (Ed.). Humic substances in soil, sediment, and water. John Wiley & Sons, New York.*
- **Sugawara, T., Tanba, T., Kaneda, Y., Yamamoto, H. and Adachi, T. (1999).** - Antifungal thiazolylpyridine compound from *Saccharothrix* species and pharmaceutical compositions containing it. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho.*, p.10.
- **Šturdíková, M., Proska, B., Uhrín, D. and Fuska, J. (1990).** - Regulation of biosynthesis of thiolutin and aureothricin in *Streptomyces kasugaensis*. *Folia Microbiol. (Praha)*, 35, 278-283.
- **Sutherland, J.B., Crawford, D.L. and Pometto, A.L. (1983).** - Metabolism of cinnamic, p-coumaric, and ferulic acids by *Streptomyces setonii*. *Can. J. Microbiol.*, 29(10), 1253-1257.
- **Suzuki, M., Fujisawa, Y. and Uchida, M. (1980).** - S-sulfocysteine as a source of the sulfur atom of cephalosporin C. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1995-1997.
- **Suzuki, K., Sato T., Morioka, M., Nagai, K., Abe, K., Yamaguchi, H., Saito, T., Ohmi, Y. and Susaki, K., (1991).** - Tetrazomine, a new antibiotic produced by an actinomycete strain. Taxonomy, fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot.*, 44, 479-485.
- **Szabo, G., Szeszak, F., Vitalis, S. and 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*. (Okami, Y., Beppu, Y. and Ogawara, H. Eds.), pp. 324-329. Japan Scientific Societies Press: Tokyo.

- Szakacs, G.; Morovjan, G. and Tengerdy, R. P. (1998). - Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus*. *Biotechnol. Lett.*, **20**, 411-5.

## T

- Takahashi, A., Hotta, K., Saito, N., Morioka, M., Okami, Y. and Umuzawa, H. (1986). - Production of novel antibiotic, dopsisamine, by a new subspecies of *Nocardioopsis mutabilis* with multiple antibiotic resistance. *J. Antibiot.*, **39**, 175-183.
- Takahashi, E., Kimura, T., Nakamura, K., Arahira, M. and Iida, M. (1995). - Phosphonothrixin, a novel herbicidal antibiotic produced by *Saccharothrix* sp. ST-888. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot.*, **48**, 1124-1129.
- Takeuchi, M., Takahashi, S., Enokita, R., Sakaida, Y., Haruyama, H., Nakamura, T., Katayama, T. and Inukai, M., (1992). - Galacardins A and B, new glycopeptide antibiotics. *J. Antibiot.*, **45**, 297-305.
- Takiguchi, Y., Mishima, H., Okuda, M., Terao, M., Aoki, A. and Fukido, R. (1980). - Milbemycin, a new family of macrolide antibiotics. Fermentation, isolation and physiological properties. *J. Antibiot.*, **33**, 1120-1127.
- Tanaka, Y., Taki, A., Masuma, R. and Omura, S. (1985). - Mechanism of nitrogen regulation of protylonolide biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *J. Antibiot.*, **39**, 813-821
- Tanner, F. W., Means, J. A. and Davisson, J. W. (1950). - Thiolutin, an antibiotic produced by certain strains of *Streptomyces albus*. *118<sup>th</sup> Meeting, American Chemical Society*. 7-8 September, 1950.
- Terry, J. and 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.
- Ter Schure, E.G., Van Riel, N.A.W. and Verrips, C.T. (2000). - The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**, 67-83.
- Thayer, D.W., Heintz, C.E., Marx, J.N., Cox, D.E. and Huff, R. (1985). - Antibiotic production by *Streptomyces cinnamonensis* ATCC 12308. *Dev. Ind. Microbiol.*, **26**, 445.

- **Thomas, M.G., Burkart, M.D. and Walsh, C.T. (2002).** – Conversion of L-proline to pyrrolyl-2-carboxyl-S-PCP during undecylprodigiosin and pyoluteorin biosynthesis. *Chemistry and Biology*, **9**, 171-184.
- **Tipper, D.J., (1973).** - Inhibition of yeast ribonucleic acid polymerases by thiolutin. *J. Bacteriol.*, **116**, 245-256.
- **Tokiwa, Y. (2001).** - *Saccharothrix* for degradation of polylactate resin. *Jpn. Tokkyo Koho.*, p. 6.
- **Tomita, K., Oda, N., Hoshino, Y., Ohkusa, N. and Chikazawa, H. (1991).** - Fluvirucins A1, A2, B1, B2, B3, B4 and B5, new antibiotics active against influenza A virus. IV. Taxonomy on the producing organisms. *J. Antibiot.*, **44**, 940-8.
- **Tresner, H.D., Fantini, A.A., Borders, D.B. and Mc Gahren, W.J. (1980).** - Antibiotics BM 782 alpha 1,2 and 1a-useful as broad spectrum antibacterials and antitubercular agents. U.S. 4,234,717, Nov. 18 (brevet).
- **Trilli, A., Crosseley, M.V. and Kontakou, M. (1987).** – Relation between growth and erythromycin production in *Streptomyces erythreus*. *Biotechnol. Lett.*, **9**, 765-770.
- **Tsuboya, S., Takayuki, D., Takenori, I. and 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. and Okuhara, M. (1995).** - WS75624 A and B, new endothelin converting enzyme inhibitors isolated from *Saccharothrix* sp. No. 75624. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J. Antibiot.*, **48**, 1066-1072.

## U

- **Untrau, S., Lebrihi, A., Germain, P. and Lefebvre, G. (1995).** – Influence of growth rate and precursor availability on spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens*. *Can. J. Microbiol.*, **41**, 157-162.
- **Untrau, S., Lebrihi, A., Lamsaïf, D., Germain, P., and Lefèbvre, G. (1992).** – Lysine catabolism in *Streptomyces ambofaciens* producer of macrolide antibiotic, spiramycin. *Curr. Microbiol.*, **25**, 313-118.
- **Untrau, S., Lebrihi, A., Lefebvre, G. and Germain, P. (1994).** – Nitrogen catabolite regulation of spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens*. *Curr. Microbiol.*, **28**, 111-118.

- **Umezawa, H. (1988).** - Low molecular-weight enzyme inhibitors and immunodifiers. *In: Actinomycetes in biotechnology.* Goodfellow M., Williams S.T. and Mordarski M (Eds.). London: Academic Press, p. 285-325.
- **Umezawa, H., Maeda, K. and Kosada, H. (1949).** - Isolation of a new antibiotic substance, aureothricin, from a strain of *Streptomyces*. *J. Antibiot. Ser. A*, **02**, 107.
- **Uyeda, M. and Demain, A.L. (1988).** - Methionine inhibition of thienamycin formation. *J Ind Microbiol* **3**, 57-59.

## 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.
- **Vandamme, E.J. (1985).** - Biotechnology of industrial antibiotics. Drugs and pharmaceutical sciences. Vol. **22**. New-York. Marcel Dekker. p 808.
- **Vértesy, L., Barbone, F. P., Cashmen, E., Decker, H., Ehrlich, K., Jordan, B., Knauf, M., Schummer, D., Segeth, M. P., Wink, J. and Seibert, G. (2001).** - Pulraflavins, potent antitumor antibiotics from *Saccharothrix* sp. DSM 12931. *J. Antibiot.*, **54**, 718-729.
- **Vining, L.C., and Doull, J.L. (1988).** – Catabolite repression of secondary metabolism in Actinomycetes. *In: Proceeding of Seventh International Symposium on Biology of Actinomycetes*, (Okami, Y., Beppu, Y., Ogawara, H., Eds.), pp. 406-411, Japan Scientific Soceities Press: Tokyo.
- **Voelker, F. et Altaba, S. (2001).** – Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbiology*, **147**, 2447-2459.
- **Von Daehne, W., Godfredsen, W. O. and Tybring, L. (1969).** - New antibiotics containing the 1,2-dithiolo[4,3-b]pyrrole ring system. *J. Antibiot.*, **22**, 233-236.
- **Vu-Trang, K., Bhuwapathanapun, S. and Gray, P.P. (1980).** – Metabolic regulation in tylosin-producing *Streptomyces fradiae*: regulatoty role of adenylate nucleotide pool and enzymes involved in biosynthesis of tylonolide precursors. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **17**, 519-525.
- **Vu-Trang, K. and Gray, P.P. (1982).** – Continuous culture studies on the regulation of tylosin biosynthesis. *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 1093-1103.

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

## W

- **Waites, M. J., Morgan, N. L., Rockey, J.S. and Higton, G. (2001).** - Industrial Microbiology- An Introduction, Blackwell Science, London.
- **Walker, J.B. (1974).** – Biosynthesis of the monoguanidinated inositol moiety of bluensomycin. A possible evolutionary precursor of streptomycin. *J. Biol. Chem.*, **249**, 2397-2404.
- **Wang, Z.X., Li, S.M. and Heide, L. (2000).** – Identification of the coumermycin A, biosynthetic gene cluster of *Streptomyces rishiriensis* and biochemical SSM 40489. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 3040-3048.
- **Wang, L., Zhang, Y., Lu, Z., Shi, Y., Liu, Z., Maldonado, L., and Goodfellow, M.(2001).** - *Nocardia beijingensis* sp. nov., a novel isolate from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**,1783-8.
- **Webster, J.M., Chen, G., Hu K. and Li, J. (2002).** - Bacterial metabolites, *In: Entomopathogenic Nematology*, R. Gaugler (ed.). CAB International. p 99-114.
- **Webster, J.M., Li, J. and Chen, G.** - Anticancer property of dithiopyrrolones, U.S. Patent 6,020,360, 2000.
- **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.
- **Westley, J.W. (1981).** – Polyether antibiotics in “Biosynthesis Antibiotics” IV. (Ed.) Corcoran, J.W. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 47-73.
- **Whitaker, A. and Long, P.A. (1973).** – Fungal pelleting. *Process Biochem.*, **8**, 27-31.
- **Willecke, K., and Pardee, A.B. (1971).** – Fatty acid-requiring mutant of *Bacillus subtilis* defective in branched chain-keto acid dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **246**, 5364.
- **Williams, D.H. and Fleming, I. (1989).** - *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry* (fourth ed.), McGraw Hill, New York.

- Winter, H.F., Young, H.C. (1955). – Antibiotics in plant disease, comparative studies on control of fireblight in apple and pear. *Agricultural and Food Chemistry*, **3**, 623-624.

#### 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.
- Xuguang, Y., Shaozhao, W. and Jianbo, W. (1993). - Isolation and structure determination of XF-1, a new anthracycline antibiotic. *Chinese Chemical Letters*, **4** (9), 787-790.

#### Y

- Yamagishi, S., Koyama, Y., Fukakusa, Y., Kyomura, N., Ohishi, J. I., Hamamichi, N. and Arai, T. (1971). - On the metabolites of *Streptomyces luteoreticuliti* Katoh et Arai. Isolation of the metabolites. *Yakugaku Zasshi*, **91**, 351-357.
- Yamatodami, S., T. Asahi, T. Matsukura, S. Ohmono and Abc, M. (1970). - Structure of rugulovasine A, B and their derivatives. *Agri. Biol. Chem.*, **34**, 485-487.
- Yamamoto, M., Okachi, R., Kawamoto, I. and Nara, T. (1977). - Fortimicin A production by *Micromonospora olivoasterospora* in a chemically defined medium. *J. Antibiot.*, **30**(12), 1064-1072.
- Yang, X-F., Yang, H-W., Jiang, H. (1998). – The antibiotics of *Xenorhabdus* spp. against *Phytophthora boehmeriae*, *Chi. J. Bio. Control.*, **14**, 21-24.
- Yang, X-F., Zhang, Z-M., Yang, H-W., Jiang, H. (2001). – Inhibition of metabolites from *Xenorhabdus nematophilus* against *Phytophthora infestans*, *J. Agri. Univ. of Hebei.*, 1-5.
- Yoshimura, S., Tsurumi, Y., Takase, S. and Okuhara, M. (1995). - WS75624 A and B, new endothelin converting enzyme inhibitors isolated from *Saccharothrix* sp. No. 75624. II. Structure elucidation of WS75624 A and B. *J. Antibiot.*, **48**, 1073-1075.
- Yassin, A.F., Rainey, F.A., Brzezinka, H., Jahnke, K.D., Weissbrodt, H., Budzikiewicz, H., Stackebrandt, E. and Schaal, K.P. (1995). - *Lentzea* gen. nov., a new genus of the order *Actinomycetales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45**, 357-363.



- **Young, H.P., Chung, T.W., Han, M.H. (1980).** – Studies on the microbial glucose isomerase: (4). Characteristics of immobilized whole-cell glucose isomerase from *Streptomyces* sp. *Enzyme Microb. Technol.*, **2**, 227-233.

## Z

- **Zaldivar, J. and Ingram, L.O. (1999).** - Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnol. Bioeng.*, **66**(4), 203-210.
- **Zemek, J., Kosikova, B., Augustin, J. and Joniak, D. (1979).** - Antibiotic properties of lignin components. *Folia Microbiol. (Praha)*, **24**(6), 483-486.
- **Zentmyer, G. A. (1995).** - A laboratory method for testing soil fungicides, with *Phytophthora cinnamomi* as test organism. *Phytopathology*, **45**, 398-404.
- **Zhang, J., Banko, G., Wolfe, S. and Demain, A.L. (1987).** – Methionine induction of ACV synthetase in *Cephalosporium acremonium*. *J. Ind. Microbiol.*, **2**, 251-255.
- **Zhang, Y-X., Denoya, C.D., Skinner, D.D., Fedechko, R.W., McArthur, A.I., Morgenstern, M.R., Davies, R.A., Lobo, S., Reynolds, K.A. and Hutchinson, C.R. (1999).** – Genes encoding acyl-CoA dehydrogenase (AcdH) homologues from *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces avermitilis* provide insights into the metabolism of small branched-chain fatty acids and macrolide antibiotic production. *Microbiology*, **145**, 2323-2334.
- **Zitouni, A. (1995).** - Les genres *Nocardioopsis* et *Saccharothrix* (Actinomycetales) dans les sols sahariens: taxonomie numérique ; extraction ; purification et caractérisation de quelques antibiotiques synthétisés. Magister de microbiologie, E.N.S. de Kouba, 177 p.
- **Zitouni, A. (2004).** – Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Nocardioopsis* et des *Saccharothrix* des sols sahariens et production de nouveaux antibiotiques par *Saccharothrix* sp. 103. Thèse de Doctorat, INP-ENSAT, 230 p.
- **Zitouni, A. Boudjella, H., Lamari, L., Badji, B., Mathieu, F., Lebrihi, A. and Sabaou, N. (2005).** - *Nocardioopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *In Press*.
- **Zitouni, A., Boudjella, H., Mathieu, F., Sabaou, N. and Lebrihi, A. (2004a).** - Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities. *J. Antibiot.*, **57**, 367-372.

- **Zitouni, A., Lamari, L., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Gaouar, A., Mathieu, F., Lebrihi, A. and Labeda, D.P. (2004c).** - *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., isolated from a saharan soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 1377-1381.
- **Zitouni, A., Mathieu, F., Coppel, Y., Pont, F., Sabaou, N. and Lebrihi, A. (2004b).** - Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103. II. Physico-chemical Properties and Structure Elucidation. *J. Antibiot.*, **57**, 373-378.

## **ANNEXES**

## ANNEXE 1

### 1.- La liste détaillée de l'appareillage utilisé

- Appareil YSI (*Yellow Spring Instruments*), Bioblock Avantec, (*Biochemistry analyzer*), modèle 2700 Select, Ohio.
- pH-mètre (Consort C 832, Consort, NY).
- Autoclave de 23 L (P 8020), SMI Groupe Unicom (Science, Medecine Industrie), Modèle 136X.
- Congélateur (LIEBHERR, Confort) réglable à -32 °C.
- Congélateur à - 80 °C (Thermo Electron Corporation), Forma-86C, ULT Freezer.
- Bain-marie (LAUDA) A100, Ecoline 019.
- Agitateur giratoire (rotatif) de fioles de culture (New Brunswick Scientific Co. NJ).
- Centrifugeuse (Jouan) C3000.
- Centrifugeuse (Sigma, 3K 20, Bioblock Scientific).
- Rotavapor (Laborata 4000, Heidolph).
- Appareil à eau bidistillée (Gaubì), Purelab Maxima (ELGA).
- Spectrophotomètre UV-visible (Perkin Elmer), Lambda 20 en conditions tempérés à 25 °C, dans des cuvettes en quartz de marque Hellmã, de trajet optique 1 cm et de volume 1 mL, avec logiciel UV. Lab.
- Ultra-micro-centrifugeuse (Microlitre Centrifuges, Heraeus instruments, Biofuge).
- Sonificateur (Vibra Cell) 72405, Bioblock Scientific.
- Dilueur automatique, Dilutor Gilson® Diluer, model 401™ Controller (précision 0,1%).
- Balance de précision (METTLER), Type AE 260, DeltaRange.
- Balance de précision Sartorius ® 2006MP™.
- Balance de précision, (*humidity analyzer*), model HA60; Precisa, Swiss Quality, Zurich, Switzerland.
- Balance de pesée: Scout, OHAUS, ITEM, (capacité 200 x 0,01).
- Etuve à 30 °C (Armoire Thermorégulatrice) LIEBHERR.
- Etuve à 28 °C (Heraeus Instruments), Type B 12.
- Four (memmert), Germany.
- Vortex Agitateur (Bioblock Scientific), Top-Mix 11118, 45 W (40 Hertz).
- Microscope (NIKON), Modèle SE, Japan.
- Microscope (NIKON) + Appareil photo Canon.
- Homogénéisateur (Ultra Thurax) X 120 CAT (Labo Moderne).

- Appareil Mascot: Lisabio, France.
- Réacteur: COD, *Analyzer and COD heating Reactor*, Hach. Company., USA.
- Spectrophotomètre Spectro-Hach Odyssey.

## 2.- La liste détaillée des produits chimiques utilisés

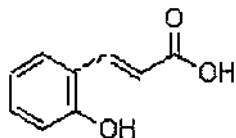
- Acétonitrile pour HPLC (Acros).
- Acide acétique (Sigma).
- Acide acetyl-salicylique (Extrasynthèse).
- Acide adipique (Merck-Schuchardt).
- Acide p-aminobenzoïque (Kodak).
- Acide L(+) ascorbique (Prolabo).
- Acide aurine tri-carboxylique (Prolabo).
- Acide benzene-1,4-dicarboxylique.
- Acide benzene-sulfonique 99% (Aldrich).
- Acide 1,2,4-benzene-tri-carboxylique 99% (Aldrich).
- Acide benzoïque 99,5% (Acros).
- Acide 4-bromobenzoïque 99% (Fluka).
- Acide butyrique (Merck-Schuchardt).
- Acide cafféique 97% (Fluka).
- Acide calcon-carboxylique (Merck).
- Acide chlorhydrique (Acros).
- Acide 4-chlorobenzoïque 97% (Fluka).
- Acide chlorogénique (Extrasynthèse).
- Acide cinnamique 99% (Fluka).
- Acide citramallique (Aldrich).
- Acide citrique, anhydre (Sigma).
- Acide 2-coumarique (Extrasynthèse).
- Acide 3-coumarique (Extrasynthèse).
- Acide p-coumarique 98% (Fluka).
- Acide crotonique 98% (Sigma).
- Acide déoxy-cholique 97% (Sigma).
- Acide 2,6-diaminopimelique (Riedel-de-Haën).
- Acide 2,3-dihydroxybenzoïque 99% (Janssen Chimica).
- Acide 2,4-dihydroxy-benzoïque 97% (Janssen, Chimica).
- Acide 2,5-dihydroxybenzoïque 99% (Interchim).
- Acide 2,6-dihydroxybenzoïque 99% (Janssen Chimica).
- Acide 3,4-dihydroxybenzoïque 99% (Fluka).
- Acide 3,5-dihydroxybenzoïque 97% (Janssen Chimica).
- Acide 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (Merck).
- Acide 3,5 dinitrosalicylique 98% (Acros).
- Acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) (Sigma).
- Acide férulique (Sigma).
- Acide formique 99% (Prolabo).
- Acide fumarique (Sigma).
- Acide 3-hydroxy-benzoïque 99% (Fluka).
- Acide 4-hydroxy-benzoïque 99% (Fluka).
- Acide 3-hydroxy-4-methoxy-mandélique 98% (Fluka).

- Acide 4-hydroxy-3-methoxy-mandélique 99% (Fluka).
- Acide hippurique (Flucka).
- Acide homo-vanillique 99% (Fluka).
- Acide humique (Fluka).
- Acide D-galacturonique (Merck).
- Acide gallique 98% (Fluka).
- Acide D-glucuronique 98% (Aldrich).
- Acide L-glutamique 99%, anhydre (Acros).
- Acide isonicotinique 99% (Fluka).
- Acide L (+) lactique 90% (Acros).
- Acide L-lysine-monohydrochloride (Merck).
- Acide maléique 99% (Sigma).
- Acide DL-malique 99% (Fisher).
- Acide malonique (Flucka).
- Acide DL-mandélique (Sigma).
- Acide méthacrylique 99% (Sigma).
- Acide mucique 98% (Aldrich-Chemie).
- Acide nicotinique (Fluka).
- Acide oléique 97% (Acros).
- Acide orotique, anhydre (Sigma).
- Acide ortho-phtalique (Prolabo).
- Acide oxalique 99,8% (Prolabo).
- Acide pamoïque (Sigma).
- Acide D-pantothénique 99% (Fluka).
- Acide pélargonique 97% (Sigma).
- Acide phenyl-acétique (Sigma).
- Acide DL-β-Phenyl-lactique (Sigma).
- Acide pimélique, dihydrate (Flucka).
- Acide pivalique 98% (Fluka).
- Acide propionique (Flucka).
- Acide pyroméllitique 96% (Janssen Chimica).
- Acide pyruvique (Labosi).
- Acide salicylique (Prolabo)
- Acide sébacique (Merck-Schuchardt).
- Acide shikimique 98% (Aldrich-Chemie).
- Acide sodium benzene-sulfonate (Aldrich).
- Acide sorbique 99% (Fluka).
- Acide succinique (Acros).
- Acide 3-sulf-benzoïque 98% (Fluka).
- Acide 4-sulfamoylbenzoïque 95% (Fluka).
- Acide sulfosalicylique (Prolabo).
- Acide sulfurique, analytique (Sigma).
- Acide syrinique 97% (Fluka Chemie).
- Acide L (+) tartrique, dihydrate (Acros).
- Acide terephthalique 98% (Aldrich).
- Acide tiglique 98% (Aldrich).
- Acide tri-chloroacétique (TCA), pur cristallisé (Prolabo).
- Acide tri-fluoroacétique (TFA) 99% (Prolabo).
- Acide valérique 98% (Fluka).
- Acide vanillique (Fluka).
- Acide vératrique 97% (Fluka).
- Agar (Difco).

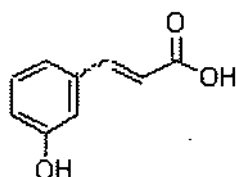
- L-alanine 99% (Acros).
- Antimousse: Polyglycol P-2000 E (Lambert Rivière, Fontenay sous bois, France).
- Asparagine, monohydrate 99% (Fluka).
- L (+) arginine (Prolabo).
- Carbonate de calcium (Prolabo).
- Chlorure de magnésium (Prolabo).
- Chlorure de potassium (Fisher).
- Chlorure de sodium (Fisher Labosi).
- L-cystéine (Sigma).
- L-cystine 99,5% (Fluka).
- Dichlorométhane (Prolabo).
- Acide éllagique (Fluka).
- Ethanol (Acros).
- DL-éthionine 95% (Sigma).
- Extrait de levure (Difco).
- Extrait de malt (Difco).
- D (+)-Glucose anhydre (Fisher Labosi).
- L-glutamine 99% (Fluka).
- DL-histidine 98% (Acros).
- Hydroxyde de sodium (Fisher).
- L-hydroxy-proline (Merck).
- Méthanol pour analyse (Acros).
- Méthanol pour HPLC (Acros).
- L-méthionine 98% (Sigma).
- L-phenyl-alanine 98,5% (Acros).
- Phosphate de potassium dihydrogéné (Acros).
- Phosphate de potassium monohydrogéné (Acros).
- L-proline 99% (Fluka).
- L-sérine 99% (Acros Organics).
- Sulfate d'ammonium (Prolabo).
- Sulfate de magnésium heptahydraté (Acros).
- DL-thréonine (Roche).
- L (-) tryptophane 99% (Acros).
- DL-valine (Roche).

## ANNEXE 2

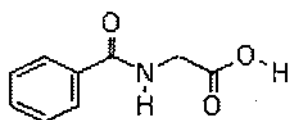
### 1.- La Liste des acides organiques induisant la production de nouvelles dithiopyrrolones



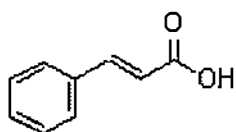
Acide *o*-coumarique (C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>), PM = 164,16.



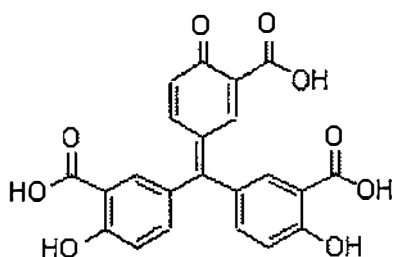
Acide *m*-coumarique (C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>), PM = 164,16.



Acide hippurique, *Syn.*: acide N-benzoylglycine, (C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>), PM = 179,17.

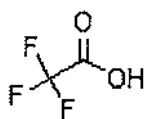


Acide *trans*-cinnamique, *Syn.*: acide 3-Phenyl-2-propenoïque; acide *trans*-3-Phenylacrylique; acide *trans*-3-Phenylacrylique; acide 3-Phenyl-2-propenoïque (C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>), PM = 148,16.

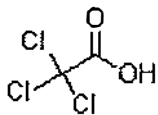


Acide aurintricarboxylique, (C<sub>22</sub>H<sub>14</sub>O<sub>9</sub>), PM = 422,34.

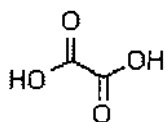




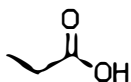
Acide trifluoroacétique (TFA), (C<sub>2</sub>HF<sub>3</sub>O<sub>2</sub>), PM = 114,02.



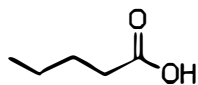
Acide trichloroacétique (TCA), (C<sub>2</sub>HCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>), PM = 163,38.



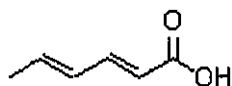
Acide oxalique, *Syn.*: acide éthanedionique, (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), PM = 90,03.



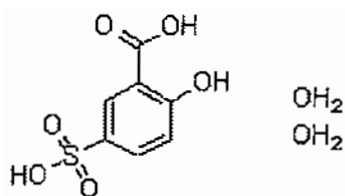
Acide propionique, *Syn.*: acide acidimétrique, (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>), PM = 74,07.



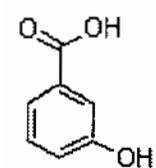
Acide valérique, *Syn.*: acide pentanoïque, acide 1-butanecarboxylique, (C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>), PM = 102,13.



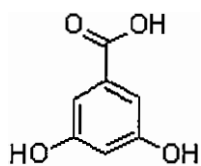
Acide sorbique, *Syn.*: acide 2,4-hexadiénoïque, (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>), PM = 112,12.



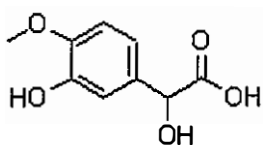
Acide 5-sulfosalicylique, (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S), PM = 254,21.



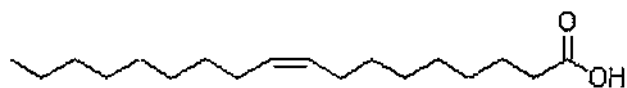
Acide 3-hydroxybenzoïque, (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>), PM = 138,12.



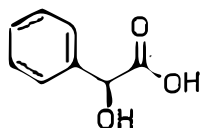
Acide 3,5-dihydroxybenzoïque, (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>), PM = 154,12.



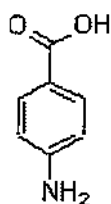
Acide DL-3-hydroxy-4-méthoxymandelique, *Syn.*: acide DL-2-hydroxy-2-(3-hydroxy-4-méthoxyphenyl) acétique; DL-2-Hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) acétique (C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>), PM = 198,17.



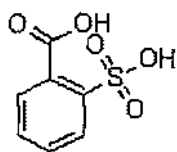
Acide oléique, *Syn.*: cis-9-Octadecenoïque, (C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>), PM = 282,46.



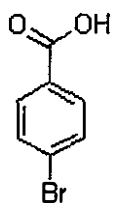
Acide mandélique, *Syn.*: acide alpha-hydroxyphenylacétique, (C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>), PM = 152,14.



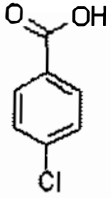
Acide 4-acide aminobenzoïque, *Syn.*: PABA, (C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>), PM = 137,13.



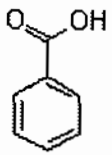
Acide 2-sulfobenzoïque, (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S), PM = 202,18.



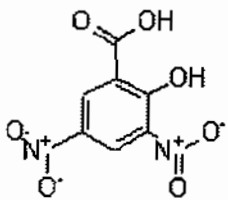
Acide 4-bromobenzoïque, (C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>BrO<sub>2</sub>), PM = 201,01.



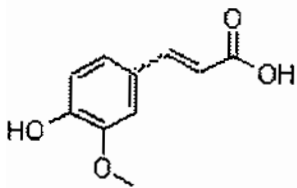
Acide 4-chlorobenzoïque, *Syn.*: PCBA, (C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>ClO<sub>2</sub>), PM = 156,56.



Acide benzoïque, *Syn.*: PCBA, (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) PM = 122,12.

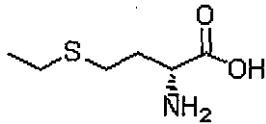


Acide 3,5-dinitrosalicylique, *Syn.*: acide 2-hydroxy-3,5-dinitrobenzoïque, (C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), PM = 228,11.

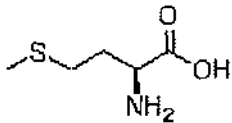


Acide férulique, *Syn.*: acide 4-hydroxy-3-méthoxycinnamique, (C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>), PM = 194,18.

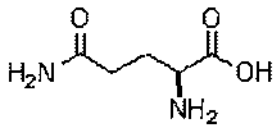
## 2.- La Liste des acides aminés induisant la production de nouvelles dithiolopyrrolones



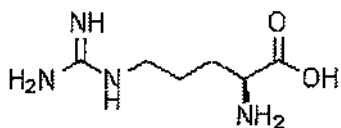
Acide aminé: éthionine, *Syn.*: acide D-2-amino-4-(éthylthio)butyrique, (C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>S), PM = 163,23.



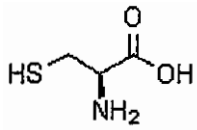
Acide aminé: méthionine, *Syn.*: acide L-2-amino-4-(méthylthio)butyrique, (C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>S), PM = 163,23.



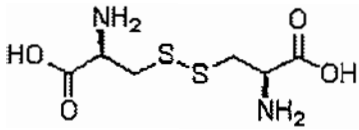
Acide aminé: L-glutamine, *Syn.*: acide L(+)-Glutamique -5-amide, (C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), PM = 146,14.



Acide aminé: arginine, (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>), PM = 174,20



Acide aminé: L-cystéine, *Syn.*: acide (+)-2-amino-3-mercaptopropionique, (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>S), PM = 121,15.

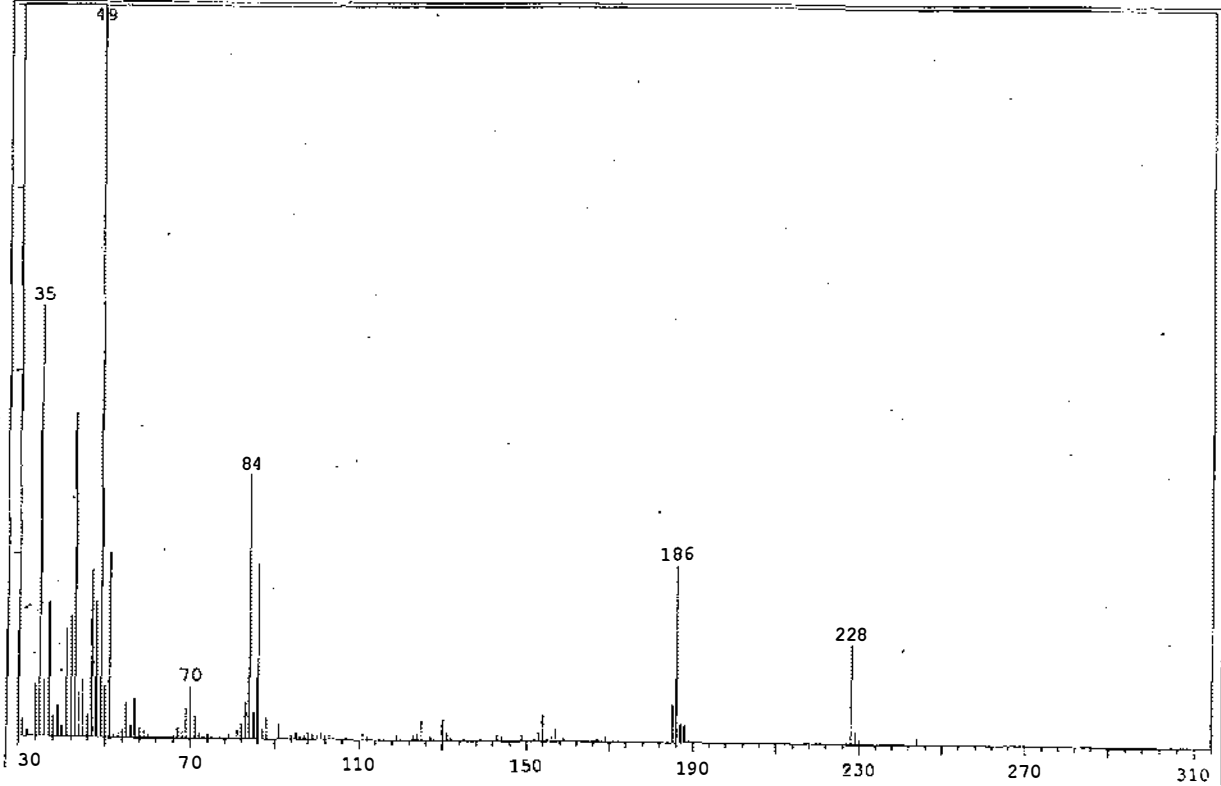


Acide aminé: L-Cystine, *Syn.*: acide L(-)-3,3'-dithiobis(2-aminopropanoic); acide 2-amino-3-[(2-amino-2-carboxyethyl)dithio]propanoïque, (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>), PM = 240,29.

Annexe 3

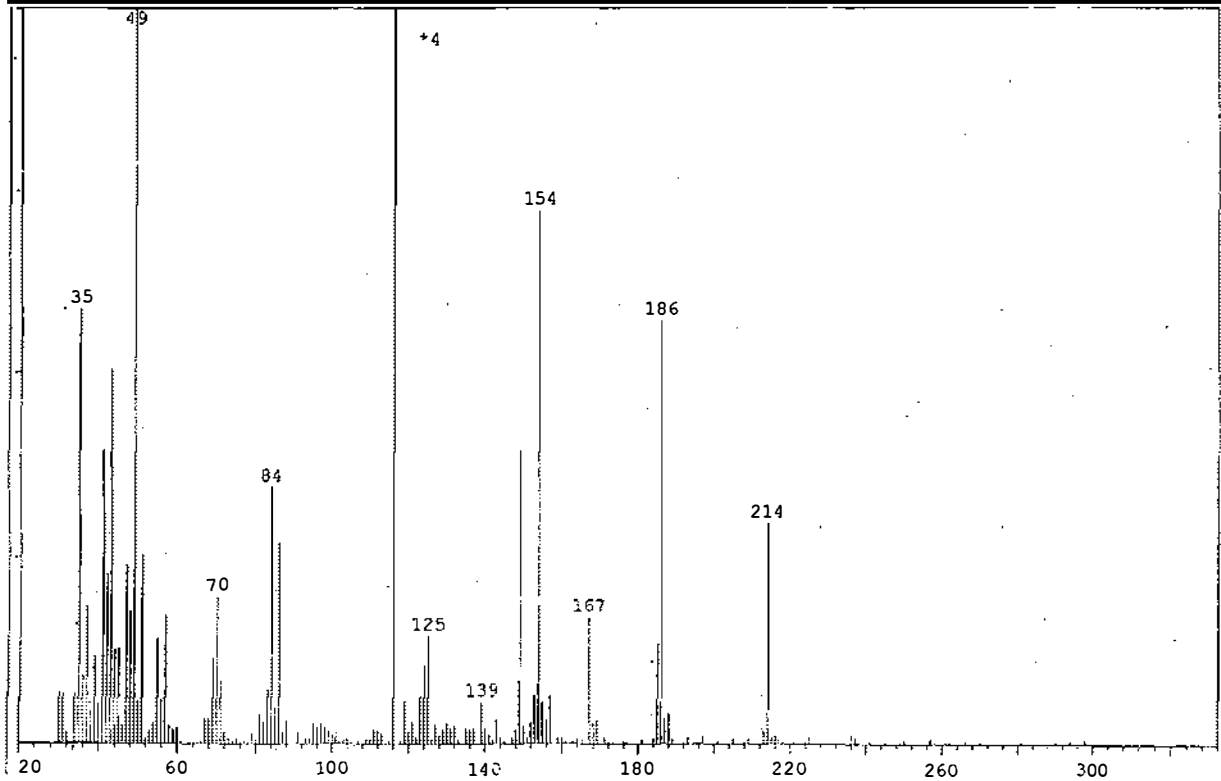
Titre: BOURAS REF Thiolutine (CH2Cl2) EI  
Fichier: C:\ONYX\FICH\05072105 Date:21/ 7/2005 Heure:10:18:28  
DS=30 FS=599 DA=30 FA=310 N=0 S=0.00000 Fact( -> ) \*1

S-Moy[15->16] Bp=49 Ib=0.0352 Rét=00:00:23

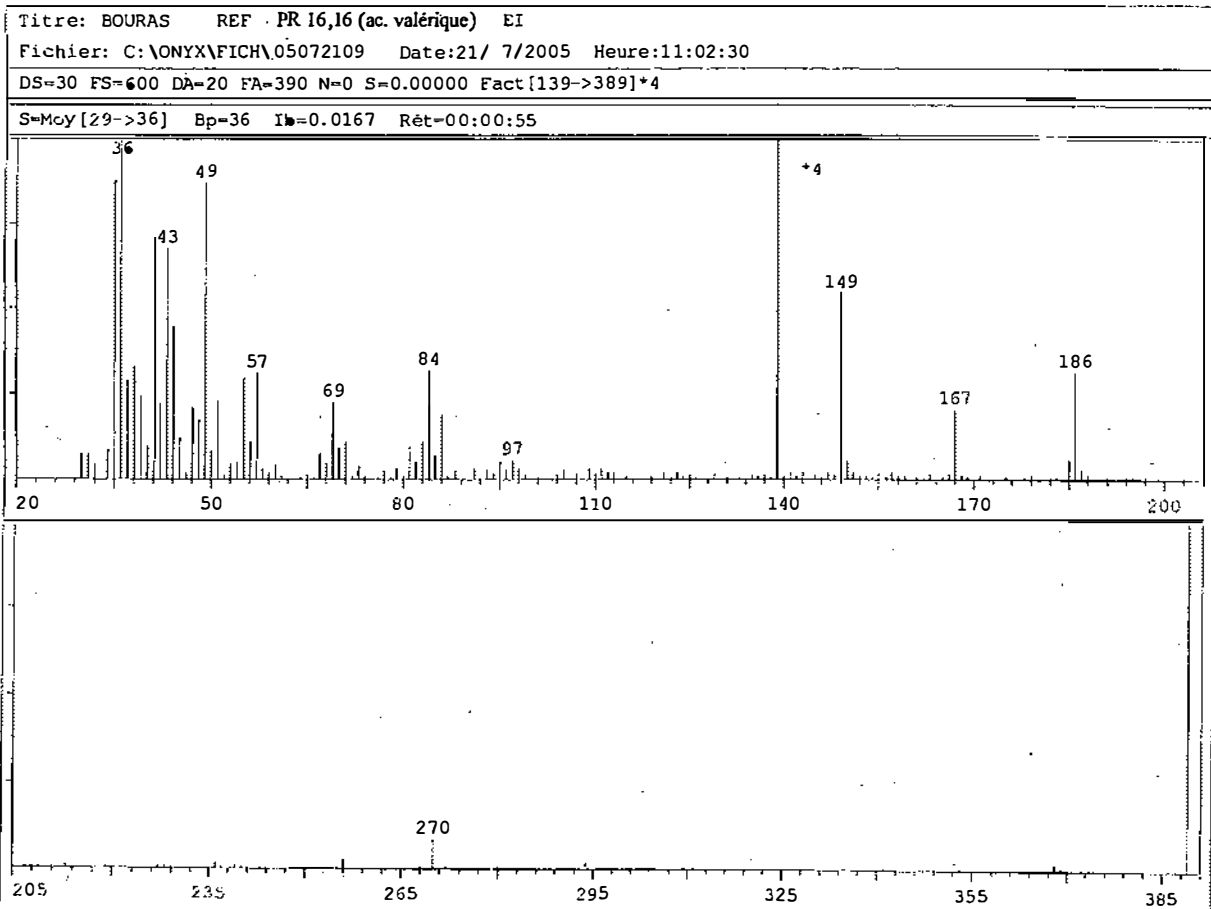
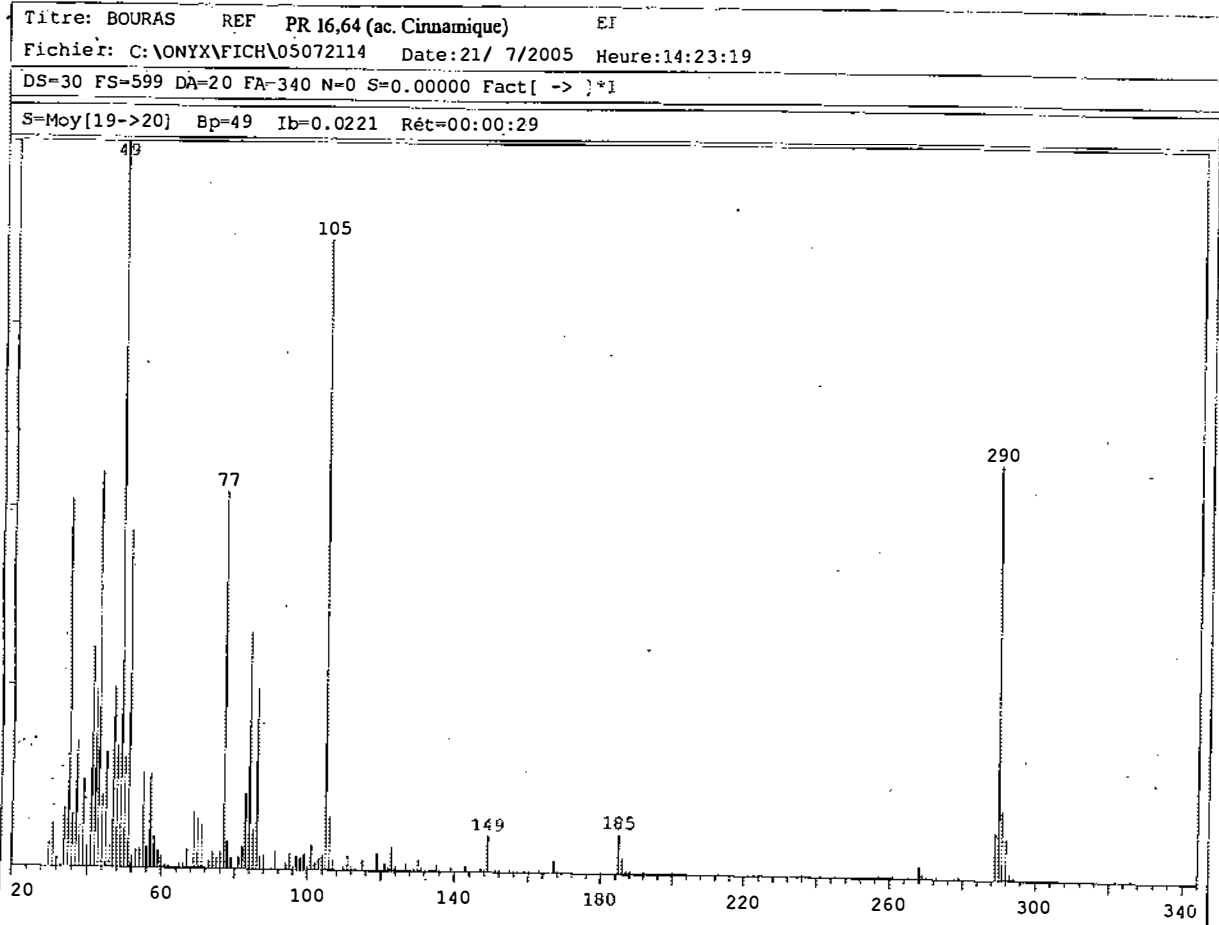


Titre: BOURAS AJ 1 (ac. cinnamique) (CH2Cl2) EI  
Fichier: C:\ONYX\FICH\05072110 Date:21/ 7/2005 Heure:11:08:10  
DS=30 FS=599 DA=20 FA=330 N=0 S=0.00000 Fact[116->600] \*4

S-Moy[15->16] Bp=49 Ib=0.0303 Rét=00:00:23

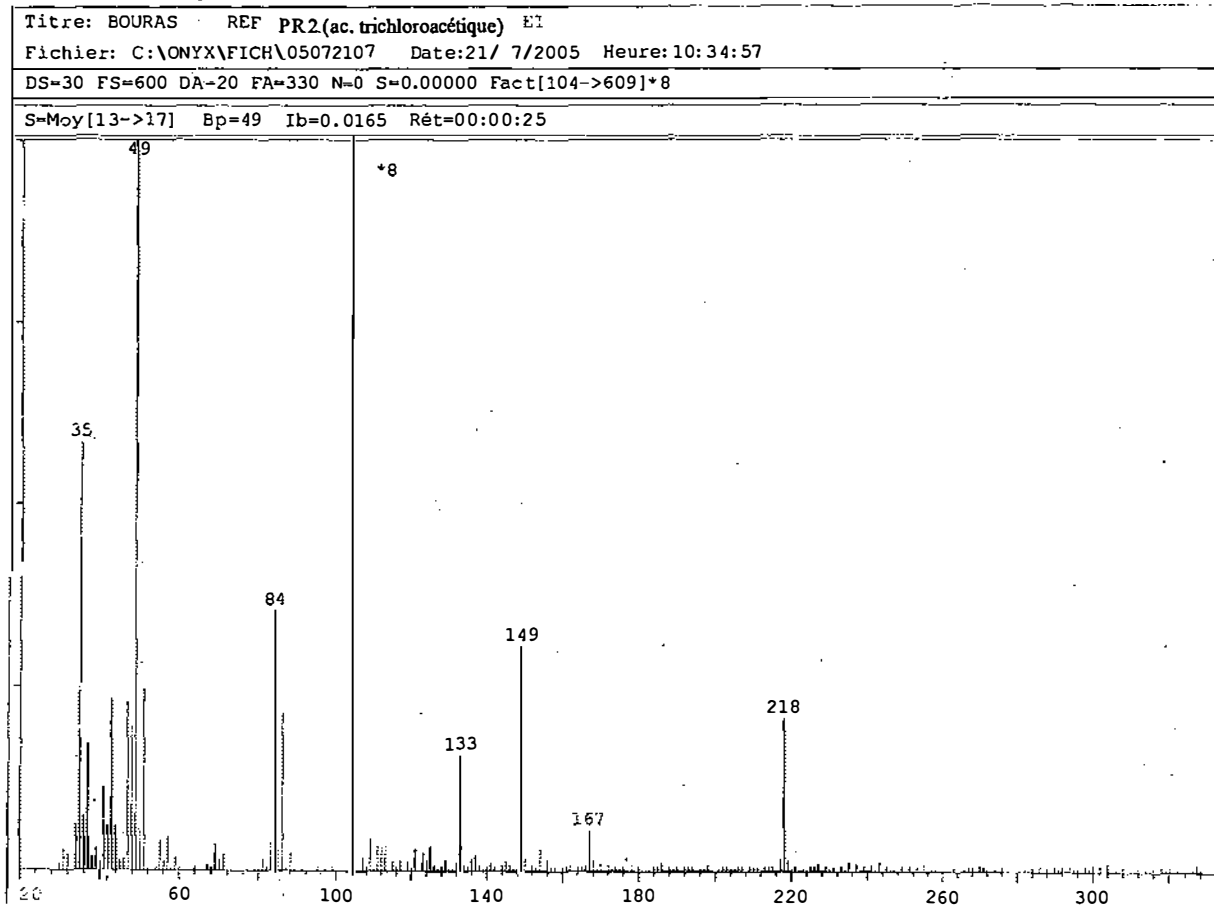
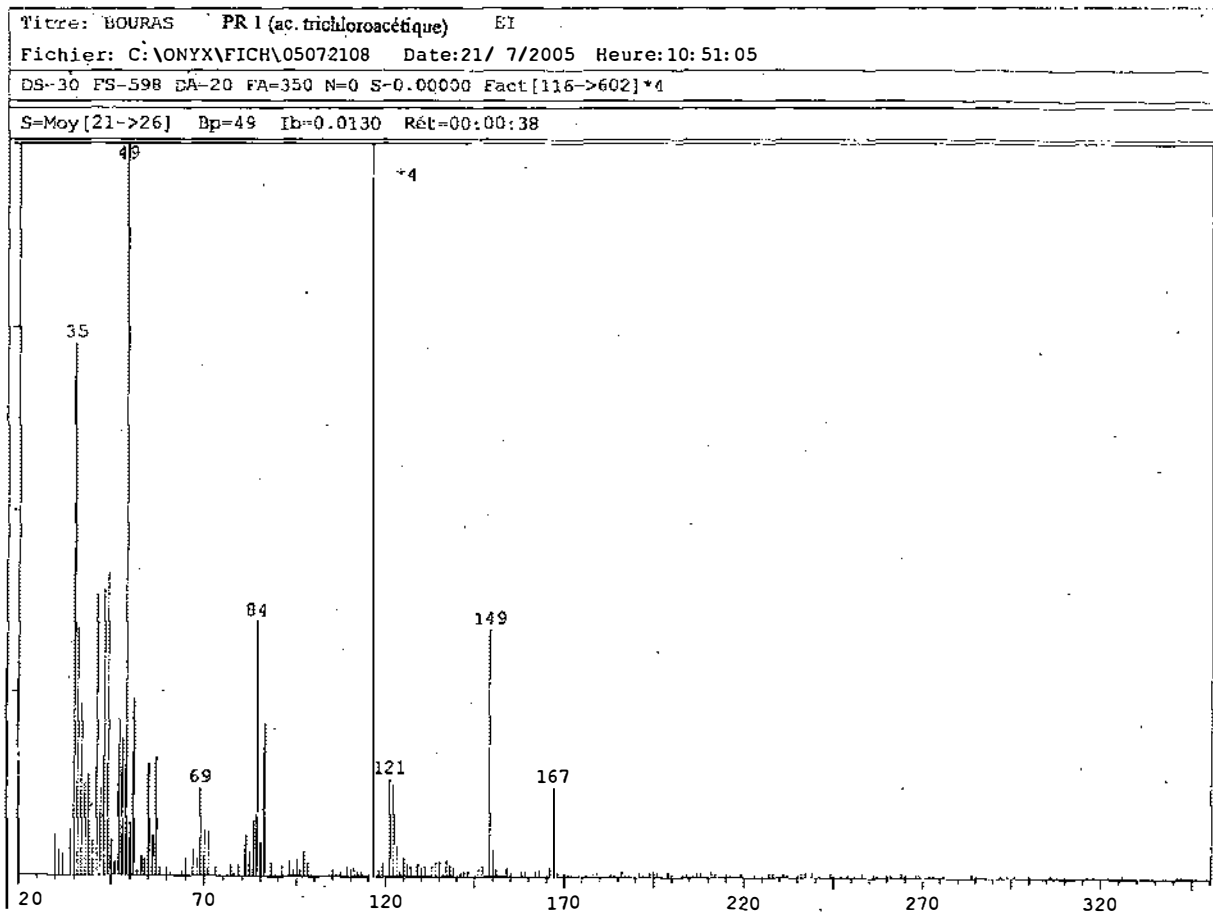


Annexe 3

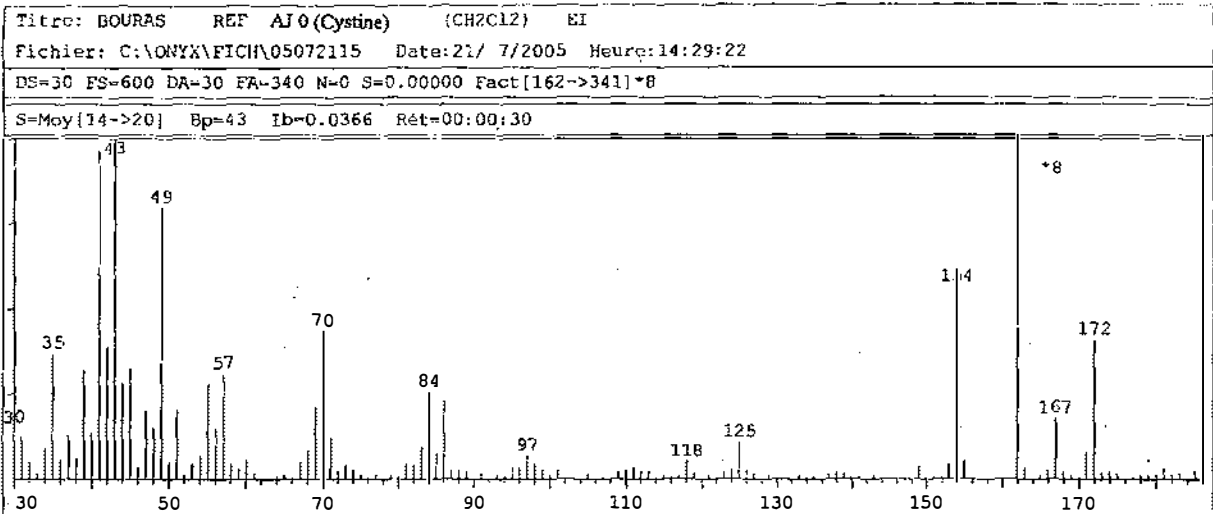
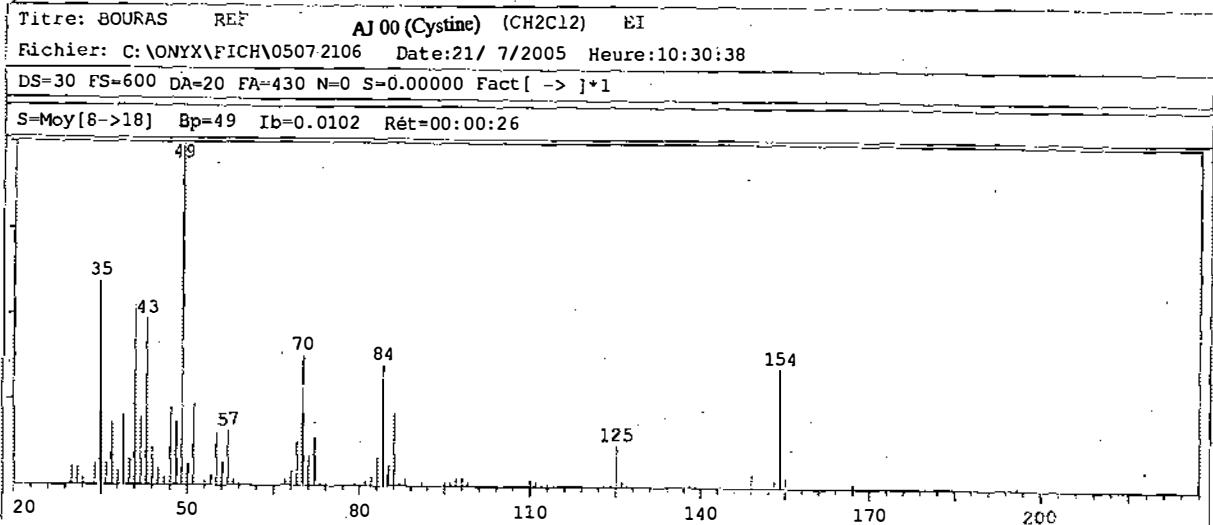




Annexe 3



Annexe 3



## Aurasperone F – a new member of the naphtho-gamma-pyrone class isolated from a cultured microfungus, *Aspergillus niger* C-433

NOUREDDINE BOURAS†, FLORENCE MATHIEU†, YANNICK COPPEL‡  
and AHMED LEBRIHI†\*

†Laboratoire de Génie Chimique, Équipe “Génie des Systèmes Microbiens” UMR 5503  
(CNRS, INPT, UPS), ENSAT, 1, Avenue de l’Agrobiopôle, B.P. 107, F-31 326  
Auzeville-Tolosane Cedex, France

‡Laboratoire de Chimie de Coordination UPR8241 (CNRS) 205 route de Narbonne,  
31 077 Toulouse cedex 4, France

(Received 7 May 2004; in final form 7 July 2004)

A novel dimeric naphtho- $\gamma$ -pyrone, named aurasperone F (1), was isolated from the fermentation broth of the culture extracts of *Aspergillus niger* C-433, isolated from grapes, along with the known compounds fonsecin (2), aurasperone B (3), aurasperone C (4), aurasperone D (5) and aurasperone E (6). The chemical structure of the new natural product was established by extensive one- and two-dimensional NMR spectroscopic studies ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HMQC, 1D NOE spectra), as well as on the UV, MS and IR spectral analysis.

**Keywords:** *Aspergillus niger*; Deuteromycete; Naphtho- $\gamma$ -pyrones; Aurasperone F

### 1. Introduction

Monomeric and dimeric naphthopyrones are widespread in nature. These compounds have been found in higher plants belonging to the genera *Senna* (*S. longiracemosa* [1], *S. rugosa* [2]), *Cassia* (*C. quinquangulata* [3], *C. obtusifolia* [4], *C. pudibunda* [5], *C. tora* [6]) and *Paepalantlus bromelioides* [7], and in a wide variety of filamentous fungi (deuteromycetes) which belong to the genera *Fusarium* (*F. culmorum*, *F. gramineum*) [8,9] and *Aspergillus* (*A. fonsecaus* [10], *A. awamori* [11,12], *A. niger* [13–17]). The fungus *A. niger* is the most common species responsible for the post-harvest decay of fresh fruits, including apples, pears, peaches, citrus, figs, melons, mangoes and grapes [26]. *A. niger* produced many unknown naphthopyrones which could not be characterized until now [18,19]. The interest of many investigators in this class of compounds is due to their broad-range biological actions: antimicrobial [6], antimycobacterial [20], hepatoprotective [4,21], antimutagenic [22], antioxidant [13],

\*Corresponding author. Tel.: (+33)-5-62-19-39-44; Fax: (+33)-5-62-19-39-01. Email: lebrihi@ensat.fr

cytotoxic [24], antitumor [24], anti-allergenic [4], reversal multi-drug resistance of human epidermal KB carcinoma cells [25], strong hypotensive activity in cats [20], acute toxicity to mice and rats acting mainly as a central nervous system depressant [13], inhibitor of IL-4 signal transduction [16], inhibitor of *Taq* DNA polymerase [17], and inhibitor of HIV-1 Integrase [9]. Earlier chemical studies of *A. niger* aggregate revealed the presence of monomeric (flavosperones [8,13,15], rubrofusarins [8,13,15], and fonsecins [8,15]) and dimeric (fonsecinones [8,17], aurasperones [8,13], nigerones [14,15], and asperpyrones [17]) naphtho- $\gamma$ -pyrone pigments. The present study reports the isolation and the structural elucidation of aurasperone F (**1**), a new naphtho- $\gamma$ -pyrone derivative. The biological activity of the isolated new compound has also been assayed.

## 2. Results and discussion

The mass spectrum of aurasperone F (**1**) exhibited a molecular ion at  $m/z$  573  $[M - H]^-$  by analysis of the negative mode, and a molecular ion at  $m/z$  575  $[M + H]^+$  by analysis of the positive mode nano-ESI-MS. The corresponding high-resolution data revealed a molecular formula of  $C_{31}H_{26}O_{11}$ . This compound had not been reported earlier in nature or had been synthetically prepared. This new dimeric metabolite belongs to the polyketide group and can be formulated to be biosynthetically derived from monomeric intermediates by phenol oxidative coupling. Aurasperone F (**1**) and the related natural products belong to naphtho- $\gamma$ -pyrone class contain a naphtho- $\gamma$ -pyrone nucleus as a characteristic structural element. The UV spectrum of compound **1** exhibits the same characteristics to those of **3**–**6**. The structure of **1** was established by a spectral interpretation as 2,5,8,5'-tetrahydroxy-6,6',8'-trimethoxy-2,2'-dimethyl-[7,10'-Bi-4H-naphtho[2,3-b]pyran]-4,4'-dione together with five known compounds: fonsecin (**2**) [8,15], aurasperone B (**3**) [8,15], aurasperone C (**4**) [15], aurasperone D (**5**) [13,15], and aurasperone E (**6**) [13,15], identified by comparison with a literature spectral analysis. The IR spectrum of the new compound revealed the presence of a conjugated carbonyl group ( $1620\text{cm}^{-1}$ ), a phenolic hydroxyl group ( $3441\text{cm}^{-1}$ ), a carbon-oxygen single bond (C–O) of ether, alcohol and/or phenol ( $1000\text{--}1300\text{cm}^{-1}$ ), and an aliphatic C–H ( $2863, 2929$  and  $2981\text{cm}^{-1}$ ). In the present study, the  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy were used for the characterization of the compound **1**. All the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  signals were assigned on the basis of chemical shifts ( $\delta$ ), spin-spin coupling constants ( $J$ ), splitting patterns and signal intensities, and by using the  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC experiments. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shifts of compound **1** are given in table 1. The  $^{13}\text{C}$  and HMQC spectra showed 31 carbon signals with a large number of quaternary carbons (20 out of 31). From the  $^{13}\text{C}$  data, it was possible to discern two keto-carbonyl groups ( $\delta_{\text{C}}$  184.9 and 199.3), 22  $\text{sp}^2$ -hybridized carbons ( $\delta_{\text{C}}$  from 97.3 to 169.4), three methoxy groups ( $\delta_{\text{C}}$  56.0, 56.9 and 62.2), one  $\text{sp}^3$ -hybridized carbon bearing two electronegative heteroatoms ( $\delta_{\text{C}}$  101.1), one  $\text{sp}^3$ -hybridized carbon ( $\delta_{\text{C}}$  48.6) and two methyl groups ( $\delta_{\text{C}}$  21.0 and 28.4). The  $^1\text{H}$ -NMR spectrum revealed two meta-coupled aromatic protons ( $\delta_{\text{H}}$  6.18 and 6.54, 2H,  $J=2.0\text{Hz}$ ), three aromatic protons ( $\delta_{\text{H}}$  6.21, 6.64 and 6.93, 3H, s), an AB system ( $\delta_{\text{H}}$  2.79 and 3.24,  $J_{\text{AB}}=16.8\text{Hz}$ ), two enol protons ( $\delta_{\text{H}}$  14.29 and 15.10, 2H, s), three methoxy groups ( $\delta_{\text{H}}$  3.34, 3.59 and 3.93, 9H, s), one phenolic hydroxyl proton ( $\delta_{\text{H}}$  10.20, 1H, br s), two methyl groups ( $\delta_{\text{H}}$  1.66 and 2.15, 6H, s) and a hydroxy signal ( $\delta_{\text{H}}$  7.11, 1H, s).

Table 1.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -NMR and HMBC Data for Aurasperone F (1) in DMSO- $d_6$  at 400 MHz for  $^1\text{H}$  and 100 MHz for  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$  in ppm,  $J$  in Hz).

Position	$^{13}\text{C}$ -NMR	$^1\text{H}$ -NMR	HMBC
2	101.1		CH <sub>3</sub> -2, OH-2
3	48.6	2.79/3.24 (2H, AB system, 16.8)	CH <sub>3</sub> -2, OH-2
4	199.3		H-3
4a	103.9		H-3, OH-5, H-10
5	163.9		OH-5
5a	109.4		OH-5, H-9
6	159.9		OCH <sub>3</sub> -6
7	116.2		H-9
8	160.0		H-9
9	106.4	6.93 (1H, s)	H-10
9a	143.1		H-9, H-10
10	102.3	6.64 (1H, s)	H-9
10a	154.3		H-10, CH <sub>3</sub> -2
CH <sub>3</sub> -2	28.4	1.66 (3H, s)	
OH-2		7.11 (1H, s)	
OH-5		14.29 (1H, s)	
OH-8		10.20 (1H, br s)	
OCH <sub>3</sub> -6	62.2	3.34 (3H, s)	
2'	169.4		CH <sub>3</sub> -2', H-3'
3'	107.6	6.21 (1H, s)	CH <sub>3</sub> -2'
4'	184.9		H-3'
4a'	104.2		H-3', OH-5'
5'	162.8		OH-5'
5a'	108.4		OH-5', H-7'
6'	161.6		OCH <sub>3</sub> -6', H-7'
7'	97.3	6.54 (1H, d, 2.0)	H-9'
8'	162.0		OCH <sub>3</sub> -8', H-9'
9'	97.4	6.18 (1H, d, 2.0)	H-7'
9a'	141.0		
10'	106.4		H-9'
10a'	151.1		
CH <sub>3</sub> -2'	21.0	2.15 (3H, s)	H-3'
OH-5'		15.10 (1H, s)	
OCH <sub>3</sub> -6'	56.9	3.93 (3H, s)	
OCH <sub>3</sub> -8'	56.0	3.59 (3H, s)	

The spectra were taken at 298 K. s = singlet. d = doublet.

The 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  experiments and especially the long-range  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  couplings observed in the HMBC spectrum (figure 1), permitted the combination of all the determined structural elements. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  assignments were also compared with the NMR data of their related compounds [17]. The structure of the compound 1 was established as a dimeric naphtho- $\gamma$ -pyrone, consisting of a linear fonsecin and a linear rubrofusarin B linked at C7 and C10', respectively. The C7-C10' linkage between the fonsecin and the rubrofusarin B was further supported by a NOE correlation between the OMe-6 protons and H-9' observed in a 1D NOE experiment.

The dimeric naphtho- $\gamma$ -pyrones were isolated from a wide variety of fungi belonging to the genera *Aspergillus* [8,9] and *Fusarium* [10,17] as yellow pigments. These compounds have dual characteristics either beneficial, which could be used for pharmacological studies as inhibitors of the HIV-1 Integrase [9], or harmful [13,15] which could exhibit a serious health hazard to both humans and animals consuming contaminated foodstuffs. The compound 1 was assayed against the Gram positive bacteria (*Micrococcus luteus* ATCC 9314 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633), filamentous fungus



### 3. Experimental

#### 3.1. General experimental procedure

The UV/Vis spectra were measured in MeOH at 25°C with a Beckman DU-65 diode array spectrophotometer. The IR spectra were obtained with a Perkin-Elmer 1760-X spectrophotometer. The mass spectra (nano-ESI-MS) were recorded on the Finnigan LCQ spectrometer equipped with an electrospray ion source (positive and negative ion mode), the scan-range was from 100 to 1000 *m/z*. An NMR sample was prepared by dissolving 9.5 mg of compound 1 in 600  $\mu$ L DMSO- $d_6$ . All spectra were recorded on a Bruker AMX400 spectrometer equipped with a 5 mm triple resonance inverse probe operating at 400.13 MHz for  $^1\text{H}$  and 100.61 MHz for  $^{13}\text{C}$ . All chemical shifts for  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  are relative to TMS using  $^1\text{H}$  (residual) or  $^{13}\text{C}$  chemical shifts of the solvent, DMSO- $d_6$  signals in parts per million with reference to the  $\delta$  2.50 ( $^1\text{H}$ ) and 39.50 ppm ( $^{13}\text{C}$ ), as a secondary standard. The temperature was set at 298 K in DMSO. A gradient-enhanced  $^1\text{H}$  COSY 45 was realised by 16 scans per increment. The  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlation spectra, using a gradient-enhanced HMQC sequence (delay was optimised for  $^1J_{\text{CH}}$  of 145 Hz) was obtained with 80 scans per increment. The gradient-enhanced HMBC experiment was performed allowing 62.5 ms for long-range coupling evolution (280 scans were accumulated). Typically, 2048 t2 data points were collected for 256 t1 increments. One dimensional selective DPGSE-NOE were obtained with mixing time of 600 ms. The gradient was sine wave shaped in all experiments with a duration of 1 or 1.7 ms. The selective pulse used was all Gaussians truncated at the 1% level. The duration of the shaped pulses was kept as short as possible. A high performance liquid chromatography (HPLC) Bio-Tek Instruments consisted of a UV visible 545V diode detector array, pump system 525, column thermostat 582 and an auto-sampler 465 with a 80  $\mu$ l loop. The elution was performed with a Uptisphere UP15WOD preparative column,  $\phi$  7.8  $\times$  300 mm i.d., Interchim, 15  $\mu$ m.

#### 3.2. Microorganism and culture conditions

A strain C-433 was characterized and identified as *A. niger* van Tieghem. This fungus was isolated from grapes collected from the Languedoc-Roussillon region (France) in September 2001. The stock cultures were maintained at  $-18^\circ\text{C}$  in a final concentration of 25% glycerol. The suspension of the fungus spores (5 mL) was used to inoculate 4  $\times$  1 L Roux bottles, each containing 300 mL of sterile CYA solid medium (Czapek yeast agar) which was composed of (g/L): sucrose (30); yeast extract (5); agar (15); 50 mL of solution A (in g/0.5 L distilled water):  $\text{NaNO}_3$  (20); KCl (5);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (5) and  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.1); 50 mL of solution B (in g/0.5 L distilled water):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (10) and 1 mL of trace mineral oligoelements. The trace mineral solution comprised of (g/0.1 L):  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1) and  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.5). Prior to autoclaving the pH of the medium was adjusted to 6.7. These cultures were incubated for 10 days (without shaking) at 25°C.

#### 3.3. Extraction and isolation

The mycelia and the culture filtrate were extracted with MeOH, and evaporated to dryness under vacuum at 45°C to give a black residue (9 g). The crude extract was

purified by reversed-phase C<sub>18</sub> and performed using a detector at wavelength 354 nm. The elution was at a flow rate of 1 mL/min with acetonitrile/acetic acid in water (0.2%). The separation of the linear gradient started with 30% to 100% acetonitrile for 30 min and then remained at a steady state for 15 min. The retention time was 25.3 min for **1**, and the yield obtained per liter of fermentation broth was 8.1 mg.

**3.3.1. Aurasperone F (1).** Yellow powder (9.5 mg); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  213, 281, 320, 334, 406 nm; IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3441, 2981, 2929, 2863, 1620, 1458, 1424, 1388, 1000–1300 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR data (DMSO-d<sub>6</sub>), see table 1; HMBC correlations, see figure 1; nano-ESI-MS/MS (positive-ion mode)  $m/z$  575 [M + H]<sup>+</sup> (18), 517 (100), 560 (30), 491 (20), 557 (9), 502 (5), 476 (4); (calcd for C<sub>31</sub>H<sub>26</sub>O<sub>11</sub>, 574.1475); HPLC  $t_R$  = 25.3 min.

#### 3.4. Biological study

The *in vitro* biological activity of aurasperone F (**1**) was determined by the agar plate diffusion assay. The strains were maintained on the International *Streptomyces* Project 2 (ISP 2) slant (0.4% glucose, 1% malt extract, 0.4% yeast extract, and 1.2% agar). The compound **1** was assayed against Gram positive bacteria (*Micrococcus luteus* ATCC 9314 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633), filamentous fungus (*Mucor ramannianus* NRRL 1829) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4226). The activities were measured after 24–48 h of incubation at 37°C for bacteria and after 48–72 h of incubation at 28°C for fungi and yeasts.

#### Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the support of EC, Quality of Life Programme (QoL), Key Action 1 (KA1): Food, Nutrition and Health; contract number QLK1-CT-2001-01761-Wine-Ochra Risk. The authors also acknowledge the “Ministère de la Jeunesse, de l'Éducation Nationale et de la Recherche Scientifique” of France for their help in this project under the programme (Aliment-Qualité-Sécurité); contract number 02 P0571.

#### References

- [1] G. Alemayehu, B. Abegaz, G. Snatzke, H. Duddeck, *Phytochemistry*, **32**, 1273 (1993).
- [2] F.G. Barbosa, M.C.F. de Oliveira, R. Braz-Filho, E.R. Silveira, *Biochem. Syst. Ecol.*, **32**, 363 (2004).
- [3] X.-C. Li, D.C. Dunbar, H.N. ElSohly, M.R. Jacob, A.C. Nimrod, L.A. Walker, A.M. Clark, *J. Nat. Prod.*, **64**, 1153 (2001).
- [4] S. Kitanaka, M. Takido, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3980 (1988).
- [5] I. Messana, F. Ferrari, M.S.B. Cavalcanti, G. Morace, *Phytochemistry*, **30**, 708 (1991).
- [6] T. Hatano, H. Uebayashi, H. Ito, S. Shioto, T. Tsuchia, T. Yoshida, *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 1121 (1999).
- [7] R.G. Coelho, W. Vilegas, K.F. Devienne, M.-S.G. Raddi, *Fitoterapia*, **71**, 497 (2000).
- [8] H.A. Priestap, *Tetrahedron*, **40**, 3617 (1984).
- [9] S.B. Singh, D.L. Zink, G.F. Bills, A. Teran, K.C. Silverman, R.B. Lingham, P. Felock, D.J. Hazuda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 713 (2003).
- [10] O.L. Galmarini, F.H. Stodola, *J. Org. Chem.*, **30**, 112 (1965).
- [11] H. Tanaka, P.-L. Wang, O. Yamada, T. Tamura, *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 107 (1966).



- [12] P.-L. Wang, H. Tanaka, *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 683 (1966).
- [13] S. Ghosal, K. Biswas, D.K. Chakrabarti, *J. Agri. Food. Chem.*, **27**, 1347 (1979).
- [14] C.P. Gorst-Allman, P.S. Steyn, C.J. Rabie, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **11**, 2474 (1980).
- [15] K.C. Ehrlich, A. J. II. DeLucca, A. Ciegler, *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 1 (1984).
- [16] M. Sakurai, J. Kohno, K. Yamamoto, T. Okuda, M. Nishio, K. Kawano, T. Ohnuki, *J. Antibiot.*, **55**, 685 (2002).
- [17] K. Akiyama, S. Teraguchi, Y. Hamasaki, M. Mori, K. Tatsumi, K. Ohnishi, H. Hayashi, *J. Nat. Prod.*, **66**, 136 (2003).
- [18] G. Fischer, T. Müller, R. Schwalbe, R. Ostrowski, W. Dott, *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **203**, 105 (2000).
- [19] K.F. Nielsen, *Fungal. Genet. Biol.*, **39**, 103 (2003).
- [20] J.G. Graham, H. Zhang, S.L. Pendland, B.D. Santarsiero, A.D. Mesecar, F. Cabieses, N.R. Farnsworth, *J. Nat. Prod.*, **67**, 225 (2004).
- [21] S.M. Wang, M.M. Wong, O. Seligmann, H. Wagner, *Planta Med.*, **55**, 276 (1989).
- [22] J.S. Choi, H.J. Lee, K. Park, J. Ha, S.S. Kang, *Planta Med.*, **63**, 11 (1997).
- [23] M. Rabache, J. Adrian, *Sci. Aliment.*, **2**, 505 (1982).
- [24] K. Koyama, K. Ominato, S. Natori, T. Tashiro, T. Tsuruo, *J. Pharmacobio-dyn.*, **11**, 630 (1988).
- [25] S. Ikeda, M. Sugita, A. Yoshimura, T. Sumizawa, H. Douzono, Y. Nagata, S. Akiyama, *Int. J. Cancer*, **45**, 508 (1990).
- [26] A.L. Snowdon, In *Fungi and Food Spoilage*. J.I. Pitt, A.D. Hocking (Eds.), p. 387, Academic Press, New York (1985).

**Résumé:** Ce travail s'est donné pour objectif l'étude de l'effet de certains nutriments (acides aminés, acides organiques et acide humique) sur la production des antibiotiques dithiopyrrolones, ainsi que l'induction de la production de nouvelles dithiopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 (= DSM 44581) dans un milieu semi-synthétique. La cystine à une concentration comprise entre 0 et 5 mM favorise la production des dithiopyrrolones en fournissant des précurseurs du noyau pyrrothine. Au-delà de cette concentration, la production des dithiopyrrolones chute fortement. La présence de certains acides aminés comme L-proline, acide L-glutamique et DL-histidine et certains acides organiques comme 4-hydroxybenzoïque, benzenotétracarboxylique, pantothénique et pivalique mène à une augmentation de la production des dithiopyrrolones. En outre, les productions des dithiopyrrolones sont fortement favorisées en présence de 0,25 g/L de l'acide humique. En revanche, la présence de certains acides aminés (cystéine, méthionine, éthionine, etc.) et acides organiques (pamoïque, benzenesulfonique et syringique, etc.) a un effet inhibiteur sur la production des dithiopyrrolones même à des concentrations peu élevées. Certains acides organiques s'incorporent directement au niveau de la chaîne latérale produisant ainsi l'antibiotique correspondant. Dans le milieu synthétique de base, *Sa. algeriensis* ne produit qu'un nombre limité de dithiopyrrolones. L'induction de nouvelles dithiopyrrolones a été réalisée par l'addition de certains acides aminés (cystéine et cystine) et acides organiques (benzoïque, cinnamique, 4-bromobenzoïque, etc.). Dans cette étude, dix huit principales nouvelles dithiopyrrolones ont été obtenues. Les similarités des molécules nouvellement apparues observées dans les spectres UV-visible et les fragments de masse indiquent qu'on est en présence de molécules appartenant au même groupe des dithiopyrrolones ou des précurseurs proches des dithiopyrrolones. Les données ont révélés que la molécule PR 14,60 (PM = 276) est une déméthyl-benzoyl-pyrrothine, une nouvelle molécule jamais signalée. En revanche, la nouvelle dithiopyrrolone PR 16,64 est une benzoyl-pyrrothine, une molécule produite en traces dans le milieu complexe.

Des fermentations contrôlées dans des fermenteurs en batch ont été effectuées en présence de l'acide benzoïque, de l'acide tiglique, de l'acide méthacrylique et de l'acide humique (pris un à un) pour affiner les résultats obtenus en Erlenmeyers. D'après les résultats obtenus, la croissance de *Sa. algeriensis* dans toutes les fermentations est très rapide pendant les premières heures de culture. Les cellules de la culture témoin subissent une lyse cellulaire assez marquée alors que les cellules en présence des acides organiques se maintiennent bien. Les acides organiques en tant que source de carbone permettent la conservation de l'intégrité des cellules. Les dithiopyrrolones ne sont produits que pendant l'idiophase. La biosynthèse de ces antibiotiques est soumise à la régulation par les acides organiques ajoutés. L'acide méthacrylique et l'acide tiglique, dans certaines conditions, augmentent la production de quelques dithiopyrrolones. En outre, une diminution de la teneur de toutes les dithiopyrrolones est observée après les 80 h de fermentation. Ces baisses constatées des titres sont à attribuer peut être à une dégradation ou transformation des dithiopyrrolones. Les résultats obtenus en fermenteurs ne sont pas exactement les mêmes que ceux obtenus en Erlenmeyers d'un point de vue qualitatif et quantitatif. En revanche, nous avons obtenu les deux nouvelles molécules induites par l'acide benzoïque (PR 14,60 et PR 16,64).

**Mot clés:** *Saccharothrix algeriensis*, dithiopyrrolone, régulation, acide aminé, acide organique

**Abstract:** This work aimed to investigate the effect of some nutrients (amino acids, organic acids and humic acid) on dithiopyrrolone antibiotic productions and also the induction of the production of new dithiopyrrolones produced by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 (= DSM 44581) while growing on chemically defined medium. The dithiopyrrolone productions are variables according to the nature and the concentration of used sources. Cystine at concentration of 0 to 5 mM favoured dithiopyrrolone productions by supplying good precursors. In contrast, when it was used in excess, showing a negative effect. The presence of some amino acids (L-proline, L-glutamic and DL-histidine) and some organic acids (4-hydroxybenzoic, benzenetetracarboxylic, pantothenic and pivalic) favoured the dithiopyrrolone antibiotics. In addition, the presence of humic acid (0.25 g/L) stimulated the dithiopyrrolone productions. In contrast, some amino acids (cysteine, methionine, ethionine, etc.) and some organic acids (pantoic, benzenesulfonic, syringic, etc.) had an inhibitory effect on dithiopyrrolone productions even at low concentrations. Some organic acids are directly incorporated on the pyrroline radical forming the corresponding antibiotic. In semi-synthetic medium, the strain produced a limited number of dithiopyrrolones. The induced production of new dithiopyrrolones has been achieved by the addition of some amino acids (cysteine et cystine) and organic acids (benzoic, cinnamic, 4-bromobenzoic, etc.). In our study, eighteen principal new dithiopyrrolones have been obtained. The similarity in UV- and mass spectra between these molecules indicated that they are belonging to the same group of dithiopyrrolones or they are precursors of dithiopyrrolones. The data have also revealed that the molecule PR 14,60 is demethyl-benzoyl-pyrroline, a new molecule not reported in the literature. However, the second molecule PR 16,64 is benzoyl-pyrroline produced in few quantity in the complex medium.

The controlled batch fermentations were conducted in the presence of benzoic, tiglic, methacrylic and humic acids. The growth rate of *Sa. algeriensis* in all fermentations was fast during the first 10 h of fermentation. The control culture showed a partially cell lysis in comparison to cultures with organic acids. As this result, these organic acids could be used for biomass maintaining. The dithiopyrrolone productions were observed only at idiophase. The dithiopyrrolone biosyntheses were influenced by the addition of organic acids. The methacrylic and tiglic acids increased the dithiopyrrolone productions in some conditions. In addition, all dithiopyrrolone productions were decreased after 80 h of fermentation, probably due to the antibiotic degradation or transformation. The experiment in the fermentor showed some differences with results obtained in Erlenmeyers. However, the same two new dithiopyrrolones (PR 14,60 and PR 16,64) obtained in Erlenmeyers was also obtained in the fermentor.

**Key words:** *Saccharothrix algeriensis*, dithiopyrrolone, regulation, amino acid, organic acid