

INTRODUCTION GENERALE

Les actinomycètes forment un grand groupe de microorganismes procaryotes appartenant à l'Ordre des Actinomycetales. La grande diversité métabolique des actinomycètes leur confère parfois certaines propriétés inhabituelles (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 alimentaire (Holzapfel *et al.*, 2002).

Près d'un quart des décès dans le monde résulte de maladies infectieuses et un nombre grandissant d'infections est provoqué par des bactéries de plus en plus résistantes aux antibiotiques (Mukhopadhyay *et al.*, 2008). Bien que ce phénomène illustre l'extraordinaire capacité d'adaptation du vivant, il est devenu une préoccupation essentielle de l'humanité. Ainsi, la production de nouvelles molécules «bioactives» sur les souches pathogènes résistantes aux antibiotiques actuellement disponibles fait l'objet de plus en plus de projets de recherche interdisciplinaires. C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude qui est sous forme de valorisation des travaux sur une nouvelle espèce bactérienne *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 (NRRL: Northern Regional Research Laboratory) (Zitouni *et al.*, 2004), cette espèce a été isolée en 1992 de la palmeraie d'Adrar (Algérie). Cette bactérie filamenteuse appartient au groupe des actinomycètes. Celle-ci s'est avérée productrice de molécules de la classe des dithiopyrrolones et présente des activités antibactériennes, antifongiques et anticancéreuses intéressantes (Webster *et al.*, 2000; Oliva *et al.*, 2001; Minamiguchi *et al.*, 2001). Le noyau dithiopyrrolone possède une structure composée de deux hétérocycles de 5 atomes : un cycle dithiol et un cycle pyrrol. Chaque association « radical-noyau » confère à la dithiopyrrolone des propriétés différentes, ce qui rend ce modèle d'étude intéressant. Lamari *et al.* (2002a) ont trouvé que *Sa. algeriensis* produit principalement six molécules de cette classe. Le genre *Saccharothrix* fait partie des Actinomycètes rares très peu étudiés. Aucune donnée intéressante sur ce groupe n'est disponible dans la littérature. Les travaux de Bouras (2005), ont permis de mettre en évidence l'influence de la composition du milieu de culture sur les productions spécifiques des six molécules produites. De plus, également lors de ces travaux, de nouveaux dérivés dithiopyrrolones ont pu être produits en modifiant le milieu de culture. Ces potentialités synthétiques sont donc prometteuses.

En effet, la compréhension du métabolisme des actinomycètes, producteurs d'une grande diversité de métabolites secondaires, est fondamentale. Par ailleurs, les exigences en matière de maîtrise du procédé sont primordiales en termes de compétitivité et de concurrence industrielle. Le travail de Strub (2008) a eu pour ultime objectif la définition de conditions d'un procédé de production d'une molécule d'intérêt. Ainsi, cette étude se concentre plus sur les aspects macroscopiques de l'examen du comportement du microorganisme que sur une analyse

microscopique de sa physiologie. Cet objectif se décompose en plusieurs étapes :- Concevoir un milieu de culture chimiquement maîtrisé permettant une croissance appréciable de *Sa. algeriensis* en culture liquide.- Présenter et comprendre la croissance du microorganisme et la production de thiolutine associée sur milieu semi-synthétique standard afin d'acquérir une certaine connaissance des caractéristiques physiologiques du microorganisme ainsi que des voies de biosynthèse de l'antibiotique produit et des régulations qui s'y opèrent.

Parallèlement, les connaissances se développent sur les voies de biosynthèse des molécules déjà découvertes et ces connaissances permettent ensuite d'exploiter la flexibilité naturelle du système de production pour la synthèse de nouveaux dérivés. Ainsi, l'ajout de précurseurs des métabolites au milieu de culture permet de diriger la production vers de nouveaux analogues de ces métabolites (Bouras *et al.* 2008). Au-delà même de la synthèse dirigée par les précurseurs, la modification des gènes de biosynthèse par ingénierie métabolique permet à la fois d'augmenter les rendements de production mais aussi de produire de nouvelles molécules, appelées aussi antibiotiques hybrides (Niemi, 1995). Enfin, la modification chimique ou enzymatique de composés naturels, ou semi-synthèse, permet d'obtenir de nouvelles molécules bioactives possédant des propriétés biologiques accrues. L'étude de Chorin (2009) s'inscrit dans cette volonté de découvrir et de synthétiser de nouvelles molécules bioactives. Elle illustre les tendances actuelles dans le développement de ces molécules, notamment l'utilisation de la biodiversité comme source de molécules bioactives, la compréhension des mécanismes de synthèse et de régulation des métabolites secondaires ainsi que la semi-synthèse de nouveaux composés.

Ce travail, structuré en quatre parties, est présenté ainsi :

La première partie est consacrée aux généralités sur le métabolisme.

La deuxième partie nous mettrons brièvement une définition des actinomycètes et leur métabolisme secondaire. La troisième partie étudie le genre *Saccharothrix* et notamment *Sa. algeriensis*, sa position taxonomique, et son métabolisme en faisant une valorisation des travaux antérieurs et la quatrième partie sur la régulation de la biosynthèse des antibiotiques et nous terminons par une conclusion et des perspectives.

Le métabolisme est l'ensemble des réactions chimiques qui se déroulent dans une cellule vivante ou un organisme. Par le biais de ces réactions, il y a construction [anabolisme], dégradation [catabolisme] ou modification de molécules, oxydation ou réduction d'atomes et d'ions, et transport de diverses entités d'un endroit à l'autre.

Toute cellule vivante a besoin d'énergie, sous une forme ou sous une autre, et une des fonctions majeures du métabolisme est de fournir à la cellule une forme d'énergie utilisable. Dans une cellule vivante les divers aspects du métabolisme sont intégrés.

Une réaction métabolique requiert habituellement un catalyseur protéique spécifique [enzyme]. Une enzyme d'un type donné ne fonctionnera que dans une gamme limitée de conditions physico-chimiques. Sortie de cette gamme, elle peut perdre temporairement ou définitivement son activité. Les enzymes des extrêmophiles travaillent dans des conditions extraordinaires 'température, pH' (Singleton, 2005).

1.- Les métabolites secondaires :

Il ont un rôle et une distribution plus spécifique, leur synthèse est souvent contenue à certains organismes, tissu ou cellules, et spécifique à certains stades de développement contrairement au métabolisme primaire, Ils sont chimiquement très divers (Catherine et Sylrie, Robin, 2004)

Historiquement, les composés produits par les plantes ont été séparés en métabolites primaires et secondaires. Par définition, les métabolites primaires sont des molécules présentes dans toutes les cellules végétales et nécessaires à la vie de la plante. Les sucres simples, les acides aminés, les protéines et les acides nucléiques sont des exemples de métabolites primaires. D'autre part, les métabolites secondaires ont une répartition limitée, dans la plante elle-même comme parmi les différentes espèces de végétaux. Ils ont d'abord été considérés comme des produits de rebut, mais on voit maintenant que les métabolites secondaires sont importants pour la survie et la propagation des plantes qui les produisent. Beaucoup fonctionnent comme signaux chimiques permettant à la plante de répondre aux contraintes de l'environnement.

D'autres interviennent pour défendre leur producteur contre les herbivores, les pathogènes (organismes responsables de maladies) ou les compétiteurs. Certains assurent une protection contre les radiations solaires et d'autres encore facilitent la dispersion du pollen et des graines.

Comme on l'a signalé, les métabolites secondaires ne sont pas également répartis au sein de la plante. Ils sont typiquement produits dans un organe, tissu ou type cellulaire spécifique à des stades particuliers du développement (par exemple durant le développement de la fleur, du fruit, de la graine ou de la plantule). Certains phytoalexines sont des substances antimicrobiennes produites uniquement après une blessure ou une attaque par des bactéries ou des champignons.

Les métabolites secondaires sont produits à différents endroits de la cellule et emmagasinés surtout dans les vacuoles. Ils sont souvent synthétisés dans une autre. En outre, leur concentration dans la plante varie souvent dans de grandes proportions au cours d'une période de 24 heures. Les trois classes principales de métabolites secondaires chez les plantes sont les alcaloïdes, les terpénoïdes et les substances phénoliques (Jerom *et al*, 2002).

2.- Courbe de croissance :

Une courbe de croissance caractéristique est représentée dans la figure n° 1, l'échelle en abscisse et en ordonnée peut changer selon les espèces mais l'aspect générale de la courbe reste identique. La courbe de croissance se divise en quatre phases distinctes, chacune ayant une pente différente. Ces phases sont : (1) la phase de latence, (2) la phase de croissance, exponentielle, (3) la phase stationnaire et (4) la phase de déclin. L'activité cellulaire au cours de ces différentes phases va être discutée.

- **Phase de latence** : est une période d'adaptation ; les cellules ne se divisent pas.
- **Phase exponentielle** : pendant la phase exponentielle de croissance, le temps de génération ou temps de doublement du nombre de cellules est constant.
- **Phase stationnaire** : au cours de la phase stationnaire, le nombre de cellules qui meurent est compensé par le nombre de cellules qui se divisent.
- **Phase de déclin** : lorsque le taux de mortalité est supérieur au taux de reproduction, la population cellulaire est en phase de déclin.

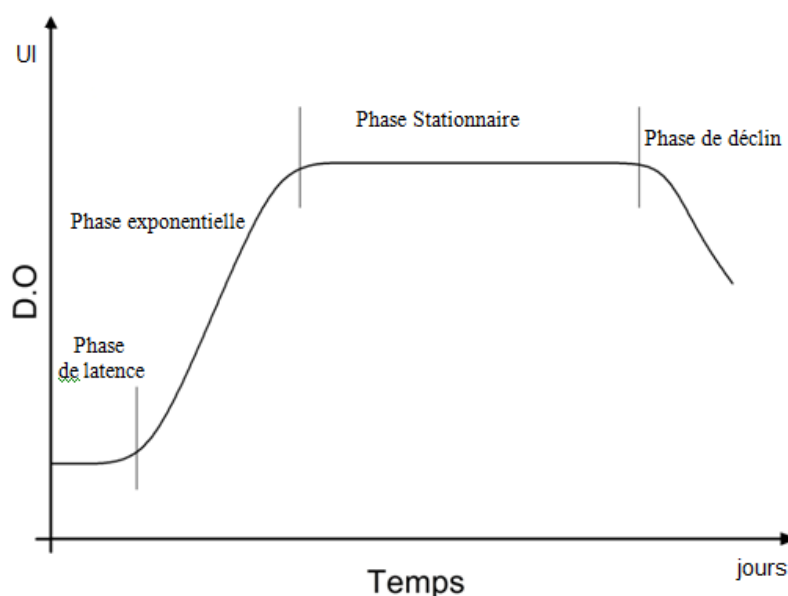


Fig 1. Courbe de croissance montrant les quatre phases de la croissance

Métabolites primaires: métabolites produits durant la phase de croissance (phase exponentielle) d'un microorganisme.

Métabolites secondaires: produits de métabolisme qui sont synthétisés après la phase de croissance (phase stationnaire).

1.- Définition des actinomycètes :

Les actinomycètes forment un grand groupe de microorganismes procaryotes appartenant à l'ordre des actinomycétales. 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).

2.- Les actinomycètes rares

Le genre *Streptomyces* prédomine très largement au sein des souches d'actinomycètes solées même si les genres *Nocardia* et *Micromonospora* sont relativement abondants (Sabaou *et al.*, 1998; Lechevalier and Lechevalier, 1967). Les actinomycètes, qui n'appartiennent pas au genre

Streptomyces et qui sont sous-représentés parmi les isolats avec des techniques d'isolement classiques, sont dits rares. Ils appartiennent, entre autres, aux genres *Microbispora*, *Microtetrastroma*, *Amycolatopsis*, *Actinomadura* ou *Saccharothrix*. (Lamari, 2006)

3.- Ecologie des actinomycètes

3. 1.- Distribution dans le monde

Les actinomycètes sont des microorganismes généralement saprophytes, mais quelques formes sont pathogènes pour l'homme, les plantes ou les animaux. Ils sont retrouvés dans tous les écosystèmes. Ils ont été isolés de plusieurs types de sols, de matières organiques en décomposition, des glaciers polaires, des sols contaminés par les métaux lourds et les dérivés du pétrole, du pétrole brut et des lacs extrêmement alcalins ou salés et des écosystèmes aquatiques. Ils sont également présents dans l'air, le fumier, les composts, le foin, les débris végétaux, les litières, les grains de céréales, le pollen des plantes, etc. (Lacey, 1973; 1997).

Mais c'est dans le sol qu'ils abondent le plus puisqu'ils constituent environ 20% de la microflore tellurique (Ishizawa et Araragi, 1976).

3. 2.- Les actinomycètes dans les sols du Sahara algérien

Les sols du Sahara Algérien, de part leur appartenance à des écosystèmes variés et particuliers, constituent un potentiel riche en actinomycètes. En effet, les sols des palmeraies ont montré une diversité plus importante que ceux par exemple des sols de la Mitidja (Badis, 1992). Les travaux de Boudjella en 1994 ont montré que les sols sahariens renferment un nombre appréciable d'actinomycètes rares, tels que *Spirillospora*, *Planomonospora*, *Streptosporangium*, *Actinomadura*, *Nocardioides*, *Nocardiosis*, *Nonomuraea*, *Oerskovia*, *Planobispora*, *Saccharothrix*, etc. Presque tous les autres genres fréquents sont retrouvés aussi, comme *Streptomyces* (qui reste majoritaire), *Nocardia*, *Micromonospora*, etc. La capacité des actinomycètes sahariens à produire de nombreuses substances antibiotiques a été déjà soulignée (Hacène *et al.*, 1994; Sabaou *et al.*, 1998) et de nouvelles molécules ont ainsi été découvertes. Dans le laboratoire de microbiologie de l'ENS de Kouba, Alger, plusieurs nouvelles molécules bioactives ont été mise en évidence: des antibiotiques nucléosidiques, des macrolides et des anthracyclines (Zitouni *et al.*, 2004a,b; 2005), des antibiotiques aromatiques (Badji *et al.*, 2006; 2007), des angucyclines (Boudjella *et al.*, 2006; Boudjella, 2007) et des dithiolopyrrolones (Lamari *et al.*, 2002a,b; Lamari, 2006).

4.- Importance des actinomycètes

4. 1.- Importance en agronomie

Les actinomycètes sont capables de dégrader les résidus récalcitrants des matières organiques comme la lignocellulose, la chitine, etc., et contribuent ainsi à la fertilisation des sols (Lechevalier

et Williams, 1983). Le genre *Frankia* est un actinomycète assez particulier; il fixe l'azote atmosphérique et vit en symbiose avec plusieurs plantes arbustives non légumineuses (Becking, 1974). Les souches de ce genre ont une aptitude considérable à produire de nombreuses substances probiotiques qui leur confère un rôle essentiel dans les interactions plantes-sols. Ainsi, ils sont préconisés dans le cadre de la lutte biologique contre les maladies des végétaux, tel que *Streptomyces griseoviridis* avec son fongicide connu sous le nom de mycostop qui est utilisé pour combattre les maladies causées par le *Fusarium* sur le concombre, la tomate, le poivron et les plantes ornementales cultivées en serre. Certains antibiotiques ont été conçus spécialement pour le marché agricole. La blasticidine est un antibiotique actif sur *Piricularia oryzae*, un phytopathogène du riz, et est utilisée à grande échelle au Japon (Misato, 1982). Les actinomycètes sont, en effet, connus par leur capacité de produire des antibiotiques qui leur permettent d'inhiber les agents phytopathogènes (Emmert et Handelsman, 1999; Barakate *et al.*, 2002; El-Tarabily et Sivasithampar, 2006; Toumatia, 2010).

4. 2. Importance en biotechnologie

Les actinomycètes produisent de nombreux antibiotiques et près de 70% des molécules actives connues et d'origine microbienne sont sécrétées par ce groupe de microorganismes. Il a été estimé que sur 16 500 antibiotiques connus, 8 700 (53%) sont produits par les actinomycètes (**Fig. 2**) dont 6550 (40%) par des espèces de *Streptomyces* (Perry *et al.*, 2004; Berdy, 2005). Le genre *Streptomyces* est le plus grand genre du monde bactérien, avec environ 574 espèces décrites (Euzéby, 2010). Les actinomycètes produisent 64% des antibactériens, 60% des antifongiques et 93% des antitumoraux (Barakate *et al.*, 2002). Près de 80% de ces molécules actives d'origine actinomycétale sont synthétisées par *Streptomyces*, le genre le plus répandu dans l'environnement (Eckwall et Schottel, 1997; Barakate *et al.*, 2002). Les actinomycètes synthétisent aussi des antiviraux, comme Ara-A produit par *Streptomyces antibioticus* (Larpen et Larpen, 1994), souvent utilisé contre l'herpès et l'hépatite. Quelques composés antiparasitaires, insecticides et herbicides sont aussi sécrétés par les actinomycètes.

Plusieurs enzymes sont également produites par ces microorganismes: les oxydoréductases (cholestérol oxydase, xanthine déshydrogénase), les transférases (phosphotransférases, acétyl transférases) et plusieurs hydrolases: chimotrypsine, cellulase, lactase, chitinases I et II, endonucléases, etc. (Yasuhara *et al.*, 2002).

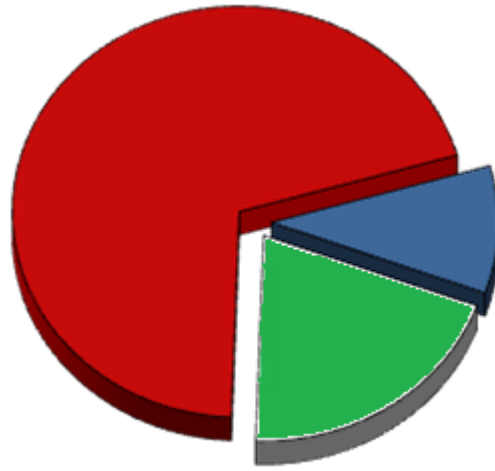


Fig 2. Origine des produits microbiens bioactifs : ■ de bactéries actinomycétales, ■ de champignons microscopiques , ■ produits issus de bactéries non actinomycétales d'après Berdy (2005).

5.- Le métabolisme secondaire des actinomycètes

Le métabolisme des actinomycètes peut être divisé en deux parties: le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire. Ces bactéries filamenteuses sont connues pour la richesse de leur métabolisme secondaire. Le métabolisme primaire regroupe les réactions cataboliques et anaboliques qui permettent la formation de biomasse. Le pouvoir réducteur et l'énergie produits par ces réactions sont utilisés pour former et assembler les monomères (ex: acides aminés) en macromolécules (ex : protéine).

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

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

L'école de la sélection par le produit final explique l'apparition du métabolisme secondaire par un processus de sélection naturelle. En effet, les métabolites secondaires, qui sont principalement des antibiotiques, pourraient servir à empêcher l'utilisation des produits de lyse du mycélium

primaire (substrat) lors du processus de différenciation au cours duquel ce mycélium est utilisé par le mycélium aérien et auraient de ce fait, un rôle protecteur. Cette hypothèse n'explique pas plusieurs constatations. Ainsi, tous les métabolites secondaires ne sont apparemment pas des antibiotiques. Par exemple le rôle sélectif d'un immunomodulateur dans le sol est inconnu à ce jour. Certaines espèces d'actinomycètes produisent beaucoup d'antibiotiques et d'autres très peu, voire pas du tout. Les espèces qui en produisent plus devraient donc être avantagées d'un point de vue évolutif au détriment de celles qui en produisent peu or ce n'est pas le cas. Il n'existe pas d'explication sur les possibilités d'évolution au cours du temps de ces voies complexes de biosynthèse. L'évolution étape par étape par un processus de sélection naturelle des voies du métabolisme secondaire n'est pas possible. Par exemple, bien souvent, le précurseur direct n'a pas d'activité antibiotique. De plus, il existe des antibiotiques, comme la streptomycine constitués d'assemblages de nouveaux sucres, unités n'ayant pas de rôle antimicrobien. Autrement dit, l'évolution ne peut pas regarder dans le futur. Par cette hypothèse, le métabolisme est un énorme paradoxe à lui tout seul (Zitouni, 2005).

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

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; Kampfer 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. (Bouras, 2005).

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

- Paroi cellulaire de type III E (présence d'acide méso-diaminopimélique).
- Présence de deux sucres caractéristiques, le rhamnose et le galactose.
- Phospholipides caractérisés par la présence de phosphatidylethanolamine, d'hydroxyphosphatidylethanolamine et de glucosamine.
- Ménaquinones (lipides membranaires) de type MK-9 (H4) ou MK-10(H4)(Strub, 2008)

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 flm x 0,7 à 1 flm) 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.

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.

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).

2.- Espèces appartenant au genre *Saccharothrix*

Le genre *Saccharothrix* a été marqué par quelques remaniements sur la base des parentés phylogénétiques. 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 *Saccharothrix* appartient au groupe des actinomycètes dans lequel il est minoritaire. Actuellement, il compte 11 membres.

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 thiazolylpyridine, ou encore antibactérienne et antifongique à la fois, comme les dithiolopyrrolones, 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/patfi) (Bouras, 2005).

4.- *Saccharothrix algeriensis* SA 233

Cette souche d'actinomycète étudiée (numéro de code SA 233) appartient au genre *Saccharothrix* qui appartient à un ensemble de bactéries (figure 3), les actinomycètes, regroupées dans le volume 4 de la première édition du Bergey's manual of systematic bacteriology (Holt 1989). Ce sont des bactéries aérobies à Gram positif possédant un pourcentage en guanine et cytosine supérieur à 50 % et qui se caractérisent par la formation de filaments ramifiés ou hyphes et de spores asexuées (Prescott *et al.*, 2003). Par leur morphologie générale, ces bactéries ressemblent donc aux champignons. (Chorin *et al.*, 2009).

La souche SA 233 a été isolée à partir d'un échantillon de sol non rhizosphérique de la palmeraie d'Adrar (Boudjella, 1994). La souche de *Saccharothrix* SA 233 est conservée à 4°C par repiquages successifs sur milieu solide ISP₂ (Shirling et Gottlieb, 1966) dont la composition est donnée en annexe et par lyophilisation dans du lait écrémé (Lamari, 2006).

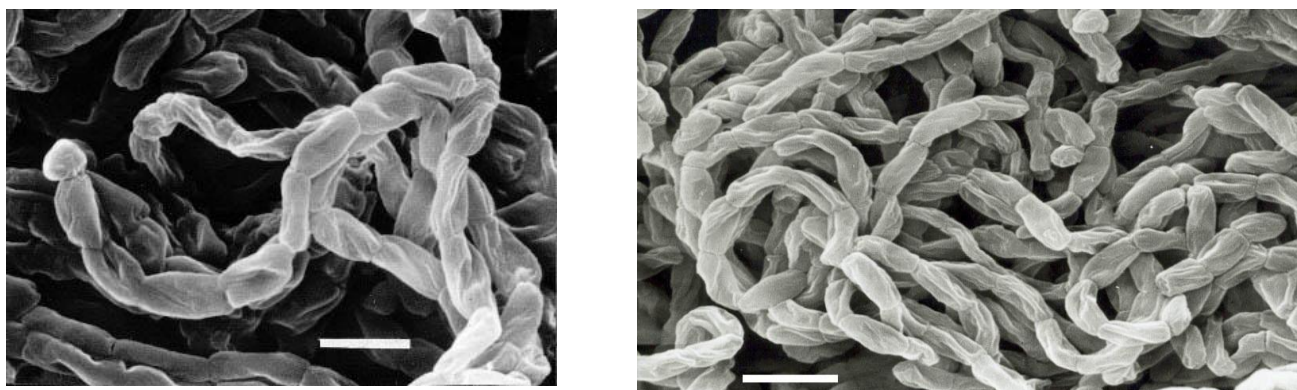


Fig. 3. *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 vu au microscope électronique à balayage après croissance sur ISP2 pendant 10 jours à 30 °C (obtenue de Zitouni *et al.* 2004). La barre indique 2 µm. Fragmentation totale du mycélium aérien en de longues chaînes de spores.

Les sporophores, les sporanges, les synnemata et les sclérotés sont absents. La couleur du mycélium de substrat varie de jaune vif à jaune-marron suivant le milieu de culture utilisé. Il est ramifié et se fragmente peu ou pas en milieu liquide et solide. La croissance a lieu de 18 à 45 °C mais pas à 48 °C et de pH 5 à 9.

La souche SA 233 produit un mycélium aérien jaune à jaune orange, un mycélium du substrat jaune vif à jaune brunâtre et des pigments solubles de couleur jaune vif. Ses caractéristiques culturelles la différencient des espèces de *Saccharothrix*. Du point de vue physiologique, la souche

SA 233 se rapproche de *Sa. australiensis* avec cependant certaines différences portant sur 8 tests d'utilisation de sources carbonées.

L'analyse du séquençage de l'ADNr 16S a montré 98,8% de similitude avec *Sa. australiensis* (qui est l'espèce la plus proche) mais l'hybridation ADN-ADN avec cette espèce n'a donné que 55,9% de ressemblance.

La souche SA 233 est donc différente de *Sa. australiensis* et de toutes les espèces de *Saccharothrix* connues dans le monde et représente ainsi une nouvelle espèce appelée *Saccharothrix algeriensis* (NRRL B-24137^T; DSM 44 581^T).

La position de l'ensemble des espèces de *Saccharothrix* par rapport à l'unique espèce du genre voisin *Crossiella* (*C. cryophila*) est indiquée. La barre 0,01 correspond au taux de substitution par nucléotide (Lamari, 2006).

5.- Caractéristiques de l'espèce *Saccharothrix algeriensis*

5.1- Isolement et positionnement taxonomique

Sa. algeriensis NRRL B-24137 a été isolée à partir d'un échantillon de sol collecté dans la palmeraie d'Adrar (Sud de l'Algérie). L'isolement a été réalisé suivant la méthode des dilutions sur milieu vitamine B – humique - agar complété avec du sulfate de streptomycine (10 µg mL⁻¹) et de l'actidione (50 µg mL⁻¹).

En premier lieu, une analyse chimiotaxonomique et morphologique de la souche isolée a permis de la classer au sein du genre *Saccharothrix*. Une analyse phylogénétique basée sur l'analyse de l'ARN 16S et sur le taux d'hybridation ADN-ADN a ensuite indiqué que la souche appartenait à une nouvelle espèce nommée *Sa. algeriensis* dont elle est la souche type (Lamari *et al.* 2002a, b, Zitouni *et al.* 2004). En effet, le pourcentage d'hybridation de 55,9% entre la souche isolée et la souche type de l'espèce la plus proche, *Sa. australiensis* NRRL 11239, s'avère inférieur à 70 %, pourcentage de délimitation des espèces (Wayne *et al.* 1987). La souche a alors été déposée dans deux collections, l'« Agricultural Research Culture Collection » (ARCC) et la « Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen » (DSMZ) sous les numéros NRRL-B 24137 et DSM 44581 respectivement. La position taxonomique de *Sa. algeriensis* NRRL-B 24137 est indiquée dans le tableau 1 :

Tableau 1. Position taxonomique de *Sa. algeriensis* NRRL-B 24137 (Chorin *et al.*, 2009).

Niveau de classification	Position
Domaine	Bacteria
Phylum	Actinobacteria
Classe	Actinobacteria
Sous-classe	Actinobacteridae
Ordre	Actinomycetales
Sous-Ordre	Pseudonocardineae
Famille	Actinosynnemataceae
Genre	<i>Saccharothrix</i>
Espèce	<i>algeriensis</i>

5.2.- Spectre d'action de la souche *Sa. algeriensis* NRRL B-24137

Sa. algeriensis NRRL B-24137 présente sur milieu ISP2 un large spectre d'action contre les bactéries à Gram positif, Gram négatif, les levures et les champignons filamenteux (Lamari 2006; Chorin *et al.* 2009).

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).

5.3.- Cinétique de croissance des cultures

D'après les résultats obtenus (figure 4a) nous remarquons que la croissance de la souche SA 233 de *Saccharothrix* sp. débute dans les heures qui suivent l'inoculation. La meilleure croissance est obtenue de manière incontestable en présence de 10 g/l d'amidon. La croissance est également bonne en présence d'amidon à 5 g/l, mais relativement faible en présence de saccharose (5 et 10 g/l). Le pH (figure 4b) devient basique durant le premier jour (dans tous les cas) puis tend vers la neutralité à l'exception des milieux avec saccharose (basique) et glucose à 10 g/l (légèrement acide).

5.4.- Cinétique de production de l'activité antibactérienne globale

On remarque sur la figure 4c que la production des antibiotiques antibactériens débute dès le premier jour. La meilleure activité globale est obtenue en présence de glucose à 5 g/l, suivi par l'amidon (5 g/l) et à un degré moindre le glucose (10 g/l), l'amidon (10 g/l) et le fructose (10 g/l). Les activités sont nettement moins importantes en présence de saccharose (5 et 10 g/l) et de fructose (5 g/l).

5.5.- Cinétique de production de l'activité antifongique globale

L'apparition de l'activité antifongique est légèrement retardée par rapport à l'activité antibactérienne (figure 4d). Elle est détectée après 48 h et augmente considérablement entre le 2^{ème} et le 4^{ème} jour d'incubation, sauf dans les cas du saccharose à 10 g/l et du fructose (5 et 10 g/l) où elle n'apparaît que tardivement, après 3 et 4 jours d'incubation, respectivement. Les meilleures activités antifongiques sont obtenues surtout avec le glucose et l'amidon à 5 g/l et ces activités sont maximales au 5^{ème} jour. L'activité est moindre, mais appréciable pour ces deux sources de carbone à une concentration de 10 g/l.

On note également une évolution importante mais tardive de l'activité antifongique en présence de fructose à 5 g/l, avec un maximum obtenu au 9^{ème} jour d'incubation. L'activité antifongique la plus faible est observée en présence de saccharose. Cependant, si on tient compte du rapport activité/biomasse, le saccharose (surtout à 5 g/l) peut être classé parmi les oses qui ont donné les meilleurs résultats (la biomasse obtenue avec ce sucre étant faible).

5.6.- Cinétique de production globale des mutactimycines

La détermination de l'absorption du filtrat de culture à 493 nm nous a permis de suivre l'évolution de la production globale des mutactimycines qui sont de couleur rouge. Sur la figure 4e, nous remarquons que la densité optique (DO) à 493 nm évolue considérablement dans les cultures contenant le glucose à 5 g/l ou le fructose à 10 g/l et à un degré nettement moindre, l'amidon à 5 g/l. Cette évolution débute après 24 h de culture, mais elle ne devient importante qu'à partir du 4^{ème} jour pour le glucose et l'amidon et du 5^{ème} jour pour le fructose. L'évolution de la DO est tardive et faible en présence de glucose (10 g/l) ou de fructose (5 g/l) et très faible en présence de saccharose (5 et 10 g/l) ou d'amidon (10 g/l).

6.- 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 A1

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 C 1, PS C 2 et PS D.

Parmi les produits actifs décrits par Zitouni (2005) les mutactimycines F et G (Tableau 2) qui ont montré des bonnes actions contre certains germes tests.

Tableau 2. Spectre d'activité Antimicrobienne de mutactimycines **F** and **G**.

Microorganisms	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	
	F	G
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	>50	>50
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9314	25	25
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 7625	>50	>50
<i>Staphylococcus aureus</i> CIP 53156	50	50
<i>Listeria monocytogenes</i> CIP 82110	>50	>50
<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 607	50	50
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CIP 82.91	15	15
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	>50	>50
<i>Pseudomonas syringae</i> No 1882	>50	>50
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> No 2410	>50	>50
<i>Mucor ramannianus</i> NRRL 1829	>50	>50
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 4226	>50	>50

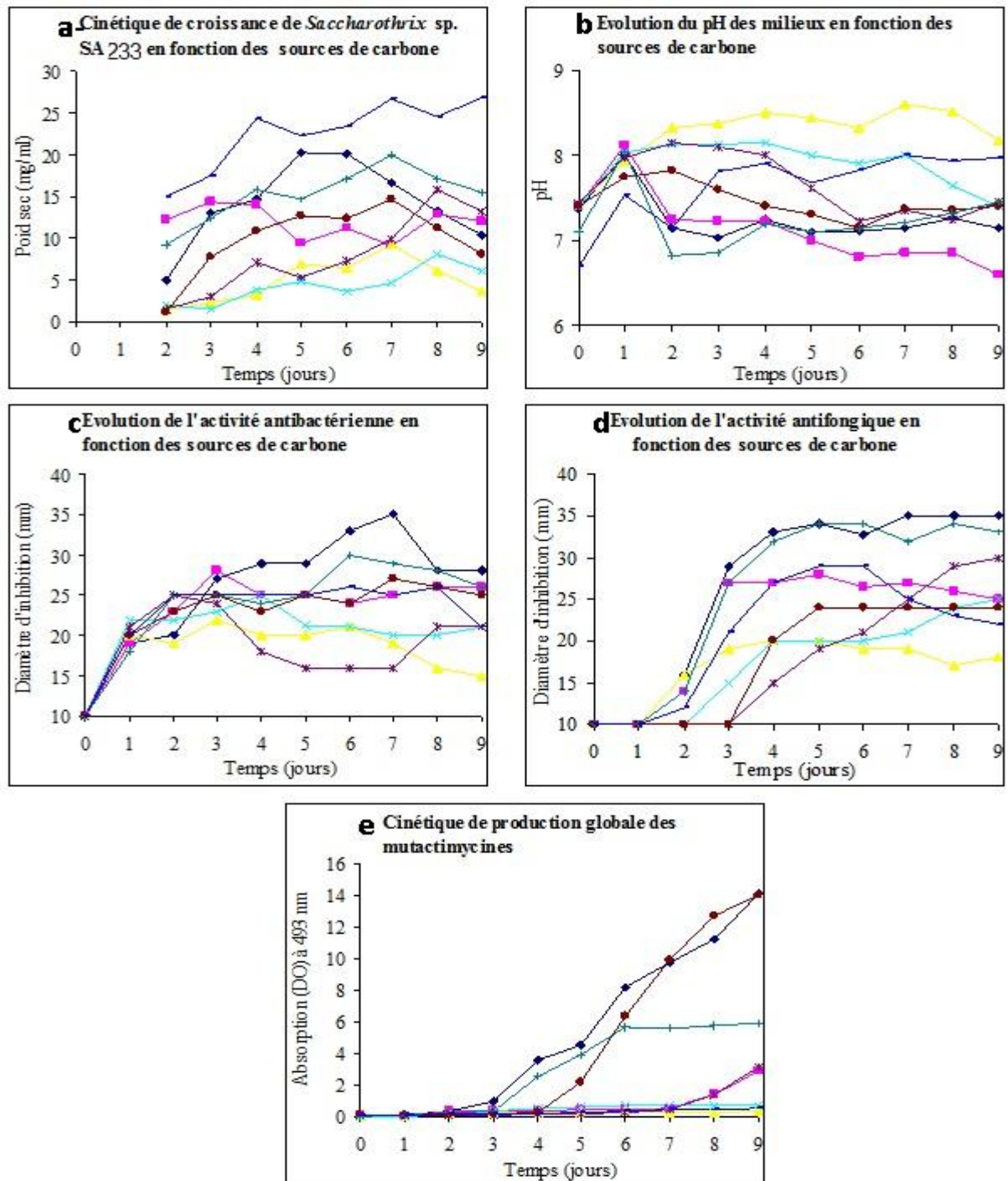


Fig 4. Cinétique de production des antibiotiques de *Saccharothrix* sp. SA 233 et évolution de la biomasse et du pH des milieux.

Note : activité antibactérienne sur *Bacillus subtilis* et activité antifongique sur *Mucor ramannianus*.

Glucose 5g/l (◆); glucose 10g/l (■); amidon 5g/l (+); amidon 10g/l (-); fructose 5g/l (*); fructose 10 g/l (●); saccharose 5 g/l (▲); saccharose 10 g/l (X).

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, Al, a été identifié à la thiolutine (syn. acétyl-pyrrothine, acéto-pyrrothine, farcinicine). La structure chimique de ces antibiotiques est donnée par la figure 5. *Sa. algeriensis* est le seul taxon de *Saccharothrix* à produire des antibiotiques de la famille des dithiopyrrolones (Zitouni, 2005; Bouras, 2006).

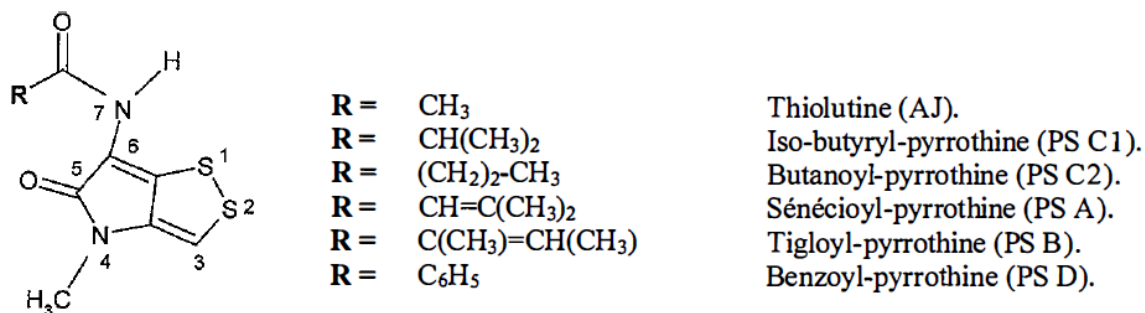


Fig 5. Antibiotiques du groupe des dithiopyrrolones synthétisés par *Sa. algeriensis* NRRL B-24137. (Bouras, 2005)

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; Vntrau *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 (II oelker 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, rétro inhibition et inactivation enzymatique (Martin 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.

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 Bhupathapapun, 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 d'antibiotiques dithiopyrrolones chez *Sa. algeriensis*

Bouras (2006) a constaté que 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, benzoïque, 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 (Bouras *et al.*, 2006). D'après les résultats obtenus par Bouras (2006) et Strub *et al.*, (2008), 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 (Chorin, 2009).

6.- Modélisation et Optimisation de la production de thiolutine chez *Sa. algeriensis*

Strub (2008) a concentré sur les aspects macroscopiques de l'analyse du comportement du *Sa. algeriensis* en milieu liquide en vue du développement d'un procédé de bioproduction. Une première étape a consisté en la recherche d'un milieu de culture chimiquement maîtrisé. Afin de s'affranchir de l'utilisation d'extrait de levure, substrat difficilement maîtrisable, l'influence de la teneur en différentes bases azotées, acides aminés et oligoéléments sur la croissance a été étudiée. L'uracile et la thymine, les acides aminés non polaires ainsi que les oligoéléments favorisent la croissance de *Saccharothrix algeriensis* (Strub *et al.*, 2010). Le milieu synthétique donnant les meilleurs résultats en terme de croissance et de production d'antibiotique a été testé en fermenteur « batch » de 2L équipé d'un analyseur gaz autorisant une étude cinétique plus fine et un environnement physicochimique maîtrisé. L'analyse qualitative des fermentations a montré que sur milieu contenant plusieurs substrats, la bactérie consomme les nutriments séquentiellement (Strub *et al.*, 2008).. Sa croissance apparaît diauxique. La synthèse des dithioloxyrrolones semble découplée de la croissance de la souche (Strub *et al.*, 2010). Cette analyse qualitative a permis d'établir un schéma réactionnel décrivant la croissance de *Saccharothrix algeriensis* en milieu semi-synthétique (Strub *et al.*, 2008).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

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

Les travaux conduits ont permis de répondre à un certain nombre de questions :

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

La bactérie consommerait les différents substrats de façon séquentielle. Ainsi, elle aurait une croissance diauxique. Dans un premier temps, elle croîtrait sur les substrats apportés par l'extrait de levure (principalement, les acides aminés libres) puis après une période d'adaptation elle utiliserait le glucose pour son développement. La production de 130 thiolutine apparaît découplée de la croissance et interviendrait après un ralentissement significatif de la croissance. Différentes carences, notamment en acides aminés, ammonium ou glucose pourraient engendrer de telles diminutions de la vitesse spécifique de croissance.

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

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

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

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

Les dithiopyrrolones suscitent un intérêt important. Ces composés possèdent une activité antibiotique, au sens large, contre les bactéries (Gram positif et négatif), les champignons microscopiques, les protozoaires et les insectes (Gaeumann *et al.* 1961, Otaguro *et al.* 1988, Mc Inerney *et al.* 1991, Oliva *et al.* 2001, Lamari *et al.* 2002, Lamari 2006). Par ailleurs, l'intérêt porté à ces molécules est grandissant depuis qu'on leur a découvert au début des années 2000 des propriétés anticancéreuses (Webster *et al.* 2000, Minamigushi *et al.*, 2001)

Enfin, ces composés ont démontré récemment (Guo *et al.* 2008, Guoping and Quanhai 2009) une autre activité biologique d'intérêt : leur capacité à stimuler la synthèse des globules blancs.

Cependant, l'activité biologique des dithiopyrrolones dépend de la nature de leurs radicaux variables. Aujourd'hui, les composés qui semblent les plus prometteurs en termes d'activité anticancéreuse possèdent des radicaux R1 et R2 aromatiques. Ils sont produits par voie chimique et n'ont pas d'origine biologique connue (Li *et al.* 2007). La production biologique des dithiopyrrolones doit donc être mieux contrôlée (rendement accru, dirigée vers la synthèse du composé choisi) et permettre de générer une plus grande diversité de dérivés pour représenter une véritable alternative à la synthèse chimique.

Dans ce contexte, *Saccharothrix algeriensis* s'avère une souche particulièrement prometteuse pour la production des dithiopyrrolones par voie biologique. En effet, elle produit sur un milieu de référence plusieurs dithiopyrrolones avec différents radicaux acyls R2 liés à l'amine exocyclique : la thiolutine, la butyryl-pyrrothine, l'isobutyryl-pyrrothine, la sénéciol-pyrrothine, la tigloyl-pyrrothine (Lamari *et al.* 2002) et la benzoyl-pyrrothine. Par ailleurs elle est capable de synthétiser de nouveaux dérivés en fonction des précurseurs (acide organiques) ajoutés au milieu de culture. Ainsi, l'ajout d'acide valérique au milieu de culture permet d'obtenir la valérylpyrrothine (Bouras *et al.* 2008).

Pour permettre la production par voie biologique de nouvelles dithiopyrrolones (nouveaux radicaux R) avec des rendements accrus, la voie de biosynthèse de ces dérivés et ses mécanismes de régulation a donc été explorée.

Dans cette optique, nous avons étudié la réaction enzymatique d'acylation du noyau pyrrothine, la réaction enzymatique pyrrothine N-acyltransférase, chez *Saccharothrix algeriensis*. Les objectifs étaient multiples : comprendre la capacité de cette souche à produire de nombreuses

dithiopyrrolones et à s'adapter à son milieu de culture, générer des nouveaux dérivés par voie enzymatique et obtenir la séquence protéique d'une enzyme de la voie de biosynthèse pour rechercher ensuite les gènes impliqués.

Tout d'abord, la synthèse de la pyrrothine, substrat de la réaction enzymatique pyrrothine N-acyl transférase, s'est avérée être un véritable jalon pour ce projet.

La production semi-biologique de la pyrrothine a d'abord été envisagée. La pyrrothine peut en effet être obtenue par hydrolyse acide ménagée des dérivés dithiopyrrolones obtenus par voie biologique (Pfizer and Co 1956, Celmer *et al.* 1952, Celmer *et al.* 1955). Cependant ce type de production s'est avéré difficile à mettre en œuvre car une importante quantité de dithiopyrrolones est fastidieuse à obtenir par voie biologique en laboratoire. Par ailleurs, la pyrrothine a pu être obtenue mais n'a pas pu être isolée de l'hydrolysate en raison de son instabilité lors des étapes de purification. Ce mode de production de la pyrrothine reste malgré tout envisageable. Cependant, récupérer la pyrrothine sous forme d'un précipité au terme de l'hydrolyse semble à ce jour le seul moyen d'obtenir la pyrrothine sous une forme purifiée. Cela nécessite un plus grand contrôle de l'étape d'hydrolyse dans tous ses aspects : ratio des réactifs, pureté des dithiopyrrolones hydrolysées, température et agitation.

La synthèse chimique de la pyrrothine s'est avérée être une bonne alternative à la synthèse semi-biologique. Sa production par adaptation du protocole de Hjelmgaard *et al.* (2007) a permis d'obtenir rapidement (6 semaines) une importante quantité de pyrrothine (100 mg), suffisamment pure pour que sa structure soit confirmée par RMN.

Dans un deuxième temps, une activité enzymatique pyrrothine N-acyltransférase a été mise en évidence dans un extrait intracellulaire brut de *Sa. algeriensis* avec deux substrats modèles l'acétyl-CoA et le benzoyl-CoA. La réaction enzymatique pyrrothine N-acétyltransférase, d'acylation de la pyrrothine avec le groupement acétyl- entraîne la formation de thiolutine. La réaction enzymatique pyrrothine N-benzoyltransférase, d'acylation de la pyrrothine avec le groupement benzoyl- entraîne la formation de benzoylpyrrothine.

Enfin, des études doivent être menées pour mieux définir les activités biologiques des composés synthétisés par *Sa. algeriensis* et par voie enzymatique. Leur cytotoxicité envers des lignées cellulaires cancéreuses pourrait notamment être déterminée. Par ailleurs, les données toxicologiques sur les dithiopyrrolones sont très peu abondantes dans la littérature bien qu'il semble que ce soit une limitation pour leur usage thérapeutique. Il serait donc important de déterminer pour chaque activité biologique des dithiopyrrolones, l'index thérapeutique des composés c'est-à-dire le ratio entre la dose efficace et la dose toxique et de mener des études pharmacocinétiques.