

Biosynthèse des antibiotiques pyrrothiniques par le procédé de biosynthèse dirigée par les précurseurs directs et Indirects chez *Saccharothrix algeriensis*

Noureddine BOURAS^{1,2,3*,*}, Rabiâa MERROUCHE¹, Lynda LAMARI¹, Atika MEKLAT^{1,4}, Salim MOKRANE¹, Hadjira BOUDJELLA¹, Abdelghani ZITOUNI¹, Boubekeur BADJI¹, Chacha BENDRISSOU², Abdellah KEMASSI^{2,5}, Florence MATHIEU³, Ahmed LEBRIHI^{3,6}, Nasserine SABAOU¹

¹Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), Ecole Normale Supérieure de Kouba, B.P. 92, 16 050 Vieux-Kouba, Alger, Algérie

²Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre, Université de Ghardaïa, BP 455, Ghardaïa 47000, Algérie

³Université de Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse (INPT)/Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (ENSAT), Laboratoire de Génie Chimique (LGC), UMR 5503 (CNRS/INPT/UPS), 1 Avenue de l'Agrobiopole BP 32607 Auzeville Tolosane 31326 Castanet-Tolosan, France

⁴Département de Biologie et Physiologie Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Saâd Dahleb, Blida, Algérie

⁵Laboratoire Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi-arides Université Kasdi Merbah Ouargla, BP 155, 30000 Ouargla, Algérie

⁶Université Moulay Ismail, Marjane 2, BP 298, Meknes, Maroc.

Résumé : *Saccharothrix algeriensis* DSM 44581^T, est une actinobactérie productrice de plusieurs antibiotiques: thiolutine, tiglyl-pyrrothine, sénéciolyl-pyrrothine, butyryl-pyrrothine et isobutyryl-pyrrothine, appartiennent au groupe des pyrrothines connu pour ses activités biologiques intéressantes. Les pyrrothines ont une structure particulière formée d'hétérocycles sur lesquels se greffe un acyl-CoA (issue d'un acide organique).

Dans cette étude, plusieurs acides organiques ont été additionnés au milieu semi-synthétique, pour éventuellement augmenter le niveau de production des cinq antibiotiques déjà caractérisés, et probablement pour former des nouveaux dérivés avec de nouvelles propriétés chimiques et/ou biologiques. Après ensemencement du milieu avec l'actinobactérie, les fioles Erlenmeyers ont été incubées dans un shaker. Les antibiotiques sont analysés avec un HPLC muni d'un détecteur à barrettes de diode.

Les résultats obtenus montrent que l'actinobactérie a effectivement incorporé directement quelques acides organiques (radical carboxylé : CO-R sous forme d'un acyl-CoA) comme l'acide benzoïque et l'acide valérique au niveau de la chaîne latérale du noyau pyrrothine (C₆H₄NOS₂-NH₂) pour former deux nouveaux dérivés de pyrrothines (valéryl-pyrrothine et benzoyl-pyrrothine). L'application de ce procédé biologique nommé biosynthèse dirigée en incorporant les précurseurs directs (*Precursor-directed biosynthesis* : PDB) ou indirects pourrait servir, dans un fermenteur industriel, à produire "à la carte" de nouvelles pyrrothines.

Mots clés: *Saccharothrix algeriensis*, biosynthèse dirigée par les précurseurs directs ou indirects, nouveaux dérivés de pyrrothines, acides organique, production d'antibiotique, Fermentation

* Corresponding author.

E-mail: noureddine_bouras@yahoo.fr (Bouras N.).

Address: LBSM, Ecole Normale Supérieure de Kouba, B.P. 92, 16 050 Vieux-Kouba, Alger, Algérie

Abstract: *Saccharothrix algeriensis* DSM 44581^T, is an actinobacterium producer of several antibiotics: thiolutin, tiglyl-pyrrothine, sénéciol-pyrrothine, butyryl and isobutyryl-pyrrothine. The pyrrothines belong to the pyrrothine group known for its interesting biological activities. The pyrrothines have a particular structure formed of heterocycles on which is attached an acyl-CoA (derived from an organic acid).

In this study, a number of organic acids have been added, to the semi-synthetic medium, to probably increase the level of production of the already five characterized antibiotics, and possibly to form new derivatives with new chemical and/or biological properties. After inoculation of the medium with the actinobacterium, the Erlenmeyer flasks were incubated in a shaker. Antibiotics are analyzed using a HPLC equipped with a diode-array detector.

The results obtained showed that actinobacterium actually incorporated directly some organic acids (carboxyl radical CO-R as an acyl-CoA) such as benzoic acid and valeric acid at the lateral chain of pyrrothine nucleus (C₆H₄NOS₂-NH₂) to form two novel pyrrothines (valeryl-pyrrothine and benzoyl-pyrrothine). Application of this biological process by incorporating direct precursors (Precursor-directed biosynthesis: PDB) or indirect precursors could be used in an industrial fermenter to produce the “looked-for” new pyrrothines.

1. Introduction

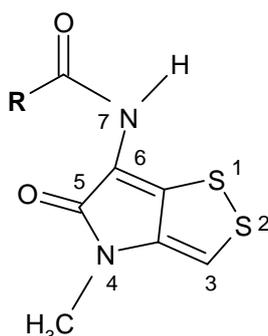
La production de nouvelles molécules bioactives est actuellement une préoccupation importante au plan mondial du fait de la prolifération de microorganismes pathogènes ayant développé une résistance aux molécules utilisées actuellement. Dans ce contexte, une bactérie mycélienne isolée du sol saharien algérien, *Saccharothrix algeriensis* DSM 44581^T (NRRL B-24137), fait l’objet de cette étude.

S. algeriensis est une actinobactérie productrice de plusieurs antibiotiques à large spectre, assez puissants, et ayant des activités biologiques intéressantes. Les molécules bioactives produites par cette bactérie: thiolutine (acétyl-pyrrothine), tiglyl-pyrrothine (tigloyl-pyrrothine = TIP), sénéciol-pyrrothine (3-méthyl-2-butenoylpyrrothine = 3,3-diméthacrylyl-pyrrothine = 3-méthylcrotonyl-pyrrothine = SEP), butyryl-pyrrothine (butanoyl-pyrrothine = BUP) et isobutyryl-pyrrothine (2-méthyl-propanoyl-pyrrothine = diméthylacétyl-CoA = ISP) appartiennent au groupe des dithiopyrrolones pyrrothiques, connu pour ses activités antibactérienne, antifongique, antiprotozoaire et même anticancéreuse et antitumorale [1]. La structure chimique de ces antibiotiques est donnée par la figure 1. Plusieurs autres pyrrothines furent isolés de certaines espèces de *Streptomyces* comme *S. cyanoflavus* et *S. griseus* [2, 3] ou de bactéries non mycéliennes telles que *Xenorhabdus* spp. qui sont des *Enterobacteriaceae* vivant en symbiose avec certains nématodes pathogènes d’insectes nuisibles dans l’agriculture [4], ou encore de *Alteromonas rava*, une bactérie marine [5].

Ces molécules sont caractérisées par la présence d’un noyau de type 1,2-dithiolo-[4,3-*b*]pyrrol-5(4H)-one. Le noyau pyrrothine possède une structure composée de deux hétérocycles de cinq atomes: un cycle dithiol (contenant deux atomes de soufre) et un cycle pyrrol (contenant un atome d’azote) liée à un groupement CH₃ porté par l’azote n° 7.

Le noyau pyrrothinique est produit à partir d'une molécule de cystine (deux cystéines). Ces antibiotiques diffèrent très souvent entre eux uniquement par la chaîne latérale composée par un acide organique (un acyl-CoA) relié au noyau pyrrothine par une liaison amide [6].

La formule des coenzymes est celle d'un ribonucléotide adénylique, phosphorylé en 3', conjugué par une liaison anhydride à la phosphopantéthéine. La fonction thiol permet de se lier par une liaison acylthiol (riche en énergie) à des acides (organiques ou gras), qui peuvent ainsi être métabolisés (β -oxydation des acides gras, synthèse des esters d'acides gras, etc.). L'acyl-CoA est le thioester d'un acide organique et du coenzyme A, qui est la forme activée des acides organiques dans le métabolisme.



R : CH ₃	Acetyl-pyrrothine (Thiolutine).
R : CH(CH ₃) ₂	Isobutyryl-pyrrothine (ISP).
R : (CH ₂) ₂ -CH ₃	Butyryl-pyrrothine (BUP).
R : CH=C(CH ₃) ₂	Sénécioyl-pyrrothine (SEP).
R : C(CH ₃)=CH(CH ₃)	Tiglyl-pyrrothine (TIP).

Fig. 1. Structure des principales pyrrothines produites par *S. algeriensis* DSM 44581^T.

La réaction avec le carboxyl-CoA aboutirait à la formation de différents antibiotiques selon le type de radical greffé (acyl-CoA), d'où l'idée d'ajouter différents acides organiques pour éventuellement augmenter le niveau de production des antibiotiques déjà caractérisés, ou pour former des nouveaux antibiotiques avec de nouvelles propriétés chimiques et/ou biologiques. Il est à signaler que chaque association, acide organique-noyau pyrrothine, conférerait à la pyrrothine des propriétés chimiques et/ou biologiques différentes, ce qui rend ce modèle d'étude intéressant [6].

2. Matériel et methods

2.1. Le microorganisme

Saccharothrix algeriensis DSM 44581 (= NRRL B-24137) a été isolée à partir d'un échantillon de sol saharien de la palmeraie d'Adrar (oasis du Sud Ouest algérien) par Boudjella [7]. Cette bactérie est productrice d'antibiotiques du groupe des pyrrothines) [8, 9].

2.2. Les condition de fermentation

La composition du milieu de production a été élaborée au sein de notre laboratoire [10]. Ce milieu, dit MSS (milieu Semi-Synthétique) est composé de (quantité pour 1000 mL): D(+) Glucose (anhydre): 10 g; (NH₄)₂SO₄: 2 g; NaCl: 2 g; KH₂PO₄: 0,5 g; K₂HPO₄: 1 g; MgSO₄·7H₂O: 0,2 g; CaCO₃: 5 g, et extrait de levure: 2 g. Le pH est ajusté à 7. Les fioles Erlenmeyer contenant ce milieu de culture sont stérilisées dans un autoclave pendant 20 min à 120 °C. De même les acides organiques, ajoutés au milieu MSS, sont autoclavés séparément et ajoutés au milieu MSS juste avant l'inoculation. Ces acides organiques ont été additionnés au milieu MSS à raison de 5 mM. Après ensemencement du milieu avec la bactérie, les fioles Erlenmeyers ont été incubés dans un shaker (model G25, New Brunswick Scientific Co. N.J., USA), durant 72 à 96 h (250 rpm, 30°C).

2.3. Le dosage des pyrrothines par HPLC

Les antibiotiques pyrrothiniques produits lors de la fermentation par *S. algeriensis* sont ainsi extraits avec le chlorure de méthylène et analysés avec un HPLC muni d'un détecteur à barrettes de diode. 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 et de l'eau bidistillée. La détection se fait à 390 nm. La colonne analytique utilisée, en phase inverse (C₁₈) ODB, est de type Zorbax SB, Uptisphere, de 5 µm 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 × 4 mm. 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 [6].

2.4. La spectrométrie de masse par l'impact électronique direct

Cette technique permet de déterminer le poids moléculaire des pyrrothines purifiées ainsi que ceux des fragments qui en résultent après le bombardement des molécules par des électrons. Une petite quantité du produit pur est dissoute dans un minimum de solvant (chlorure de méthylène) pour être analysé en phase gazeuse par impact électronique direct (EI-MS). 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).

3. Résultats et discussion

3.1. Les pyrrothines obtenues par le procédé de BDPD (Biosynthèse Dirigée par les Précurseurs Directs)

La biosynthèse dirigée par les précurseurs directs (BDPD) signifie que l'acide organique ajouté au milieu de culture est le précurseur direct de la pyrrothine dont la production est favorisée et sa structure correspond exactement au radical latéral [6, 11].

Les résultats montrent qu'à une concentration de 5 mM, l'acide butyrique et l'acide tiglique, ajoutés dans le milieu de culture MSS, favorisent considérablement la production de BUP et TIP, respectivement. L'acide butyrique multiplie par 35 la production de BUP et

l'acide tiglique multiplie par 10 la production de TIP. Ces deux acides organiques (l'acide tiglique et l'acide butyrique) semblent s'incorporer directement au niveau de la chaîne latérale produisant ainsi l'antibiotique correspondant (Fig. 2). En revanche, l'ajout d'acide acétique n'a pas montré d'effet significatif sur la production de thiolutine (acétyl-pyrrothine). L'acide isobutyrique (acide diméthylacétique = acide 2-méthylpropanoïque) et l'acide sénécioïque (acide méthyl-3-buténoïque-2 = acide β -méthylcrotonique) n'ont quant à eux pas été testés lors de cette étude.

A partir de la constatation que l'addition de certains acides organiques a favorisé considérablement la production des antibiotiques correspondants, l'effet de plusieurs acides organiques a été testé sur la production de nouvelles pyrrothines. Les acides organiques se transformeraient en acyl-CoA, et une fois le noyau pyrrothine formé, une réaction avec l'acyl-CoA aboutirait à la formation d'une nouvelle acyl-pyrrothine.

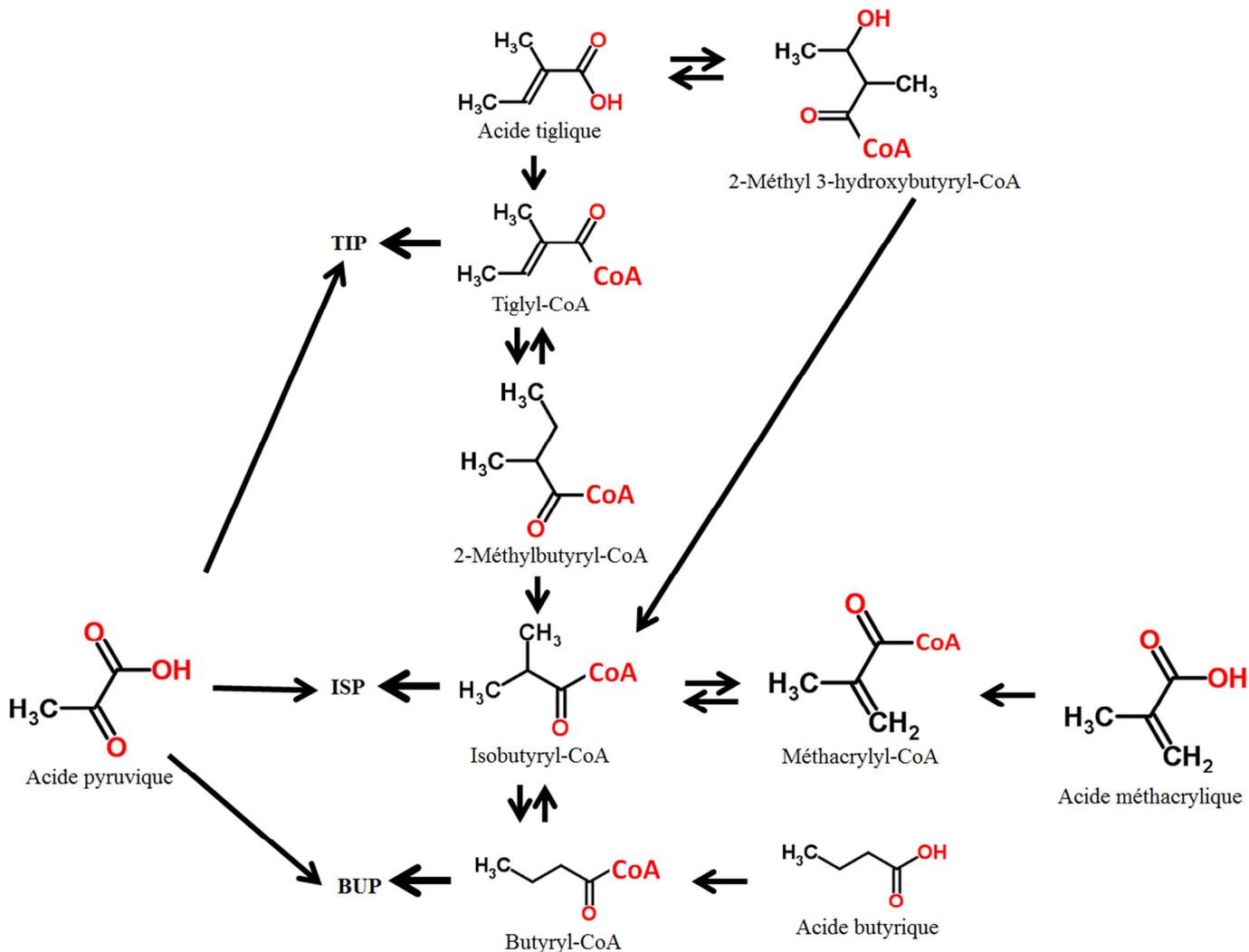


Fig. 2. Voies métaboliques (cataboliques et anaboliques) proposées conduisant à la formation de la TIP (tiglyl-pyrrothine), de l'ISP (isobutyryl-pyrrothine) et de la BUP (butyryl-pyrrothine).

Les différents ajouts ont permis l'induction de quelques nouvelles pyrrothines caractérisées par leur couleur jaune et leurs spectres UV-visible. Deux de ces nouveaux dérivés ont été purifiés et caractérisés par détermination de leurs spectres de masse (poids moléculaires et analyse des fragments de masse). Les résultats montrent la présence de molécules originales et ont permis d'avoir une idée précise sur leurs structures chimiques. Ainsi, l'addition de l'acide valérique a favorisé la production de la valéryl-pyrrothine et l'addition de l'acide benzoïque a favorisé la production de la benzoyl-pyrrothine (benzyl-pyrrothine).

Par ailleurs, l'ajout de l'acide sorbique favorise l'apparition d'une nouvelle pyrrothine: sorbyl-pyrrothine. Cet antibiotique est décrit pour la première fois par Merrouche *et al.* [12].

Les résultats obtenus montrent que la production de ces molécules bioactives est, en grande partie, conditionnée par la composition du milieu de culture [13]. L'intérêt de cette étude réside dans la mise en évidence de précurseurs qui a permis d'induire la production "à la carte" de nouvelles pyrrothines par *S. algeriensis* par le procédé de BDPI (biosynthèse dirigée par les précurseurs directs).

3.2. Les pyrrothines obtenues par le procédé de BDPI (Biosynthèse Dirigée par les Précurseurs Indirects)

La biosynthèse dirigée par les précurseurs indirects (BDPI) signifie que l'acide organique ajouté dans le milieu de culture n'est pas le précurseur direct de la pyrrothine dont la synthèse est stimulée et sa structure ne correspond pas au radical latéral [6, 11].

L'acide pyruvique favorise nettement la production des cinq dérivés pyrrothiques. De plus, l'acide méthacrylique multiplie par 50 la production de BUP, probablement *via* la formation successive de méthacrylyl-CoA, isobutyryl-CoA et butyryl-CoA (Fig. 2). De plus, l'acide tiglique multiplie par 5 la production d'ISP, éventuellement *via* deux voies de biosynthèse (2-méthyl-3-hydroxybutyryl-CoA et/ou 2-méthylbutyryl-CoA) comme indiqué dans la Figure 2. Par ailleurs, l'ajout de l'acide cinnamique (chimiquement proche de l'acide benzoïque) induit l'apparition d'une nouvelle pyrrothine qui est pratiquement identique à celle induite par la présence de l'acide benzoïque (benzoyl-pyrrothine), probablement *via* la transformation de cinnamoyl-CoA en benzoyl-CoA (Fig. 3). Il est à signaler également que l'ajout de l'acide benzoïque, l'acide cinnamique ou l'acide valérique a favorisé la formation de la nouvelle pyrrothine: formyl-pyrrothine (formoyl-pyrrothine) comme indiqué dans la Figure 3.

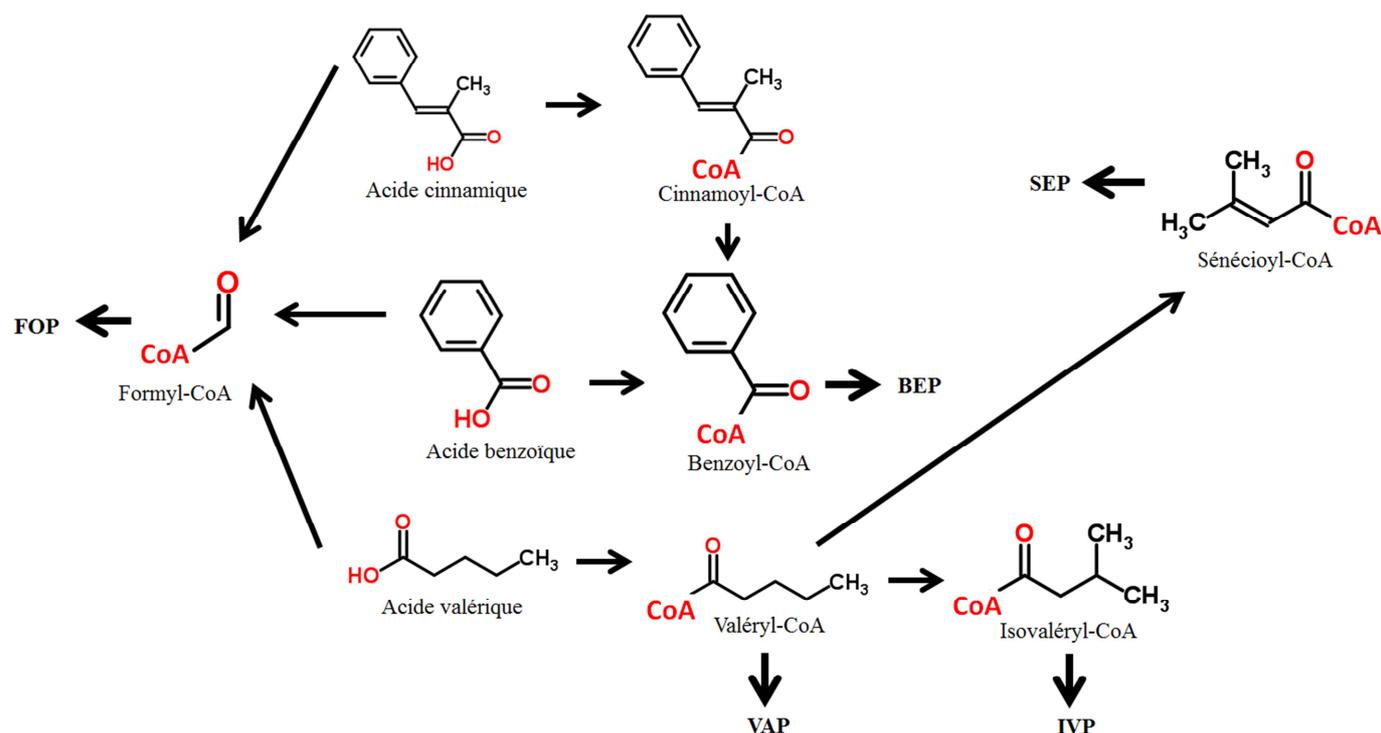


Fig. 3. Voies métaboliques (cataboliques et anaboliques) proposées conduisant à la formation de la VAP (valéryl-pyrrothine), de l'IVP (isovaléryl-pyrrothine), de la BEP (benzoyl-pyrrothine), de la SEP (sénécioyl-pyrrothine) et de la FOP (formyl-pyrrothine).

De plus, la production de SEP a été fortement stimulée par l'ajout de l'acide valérique (Fig. 3). Certaines voies métaboliques bactériennes pourraient permettre la conversion de l'acide valérique (valéryl-CoA) en sénécioyl-CoA (β -méthylcrotonyl-CoA).

Merrouche *et al.* [14] ont montré que l'ajout de l'acide valérique (3-méthylbutanoïque) induit l'apparition d'une nouvelle pyrrothine: isovaléryl-pyrrothine. Celle-ci pourrait être aussi synthétisée après une isomérisation de la valéryl-pyrrothine au niveau de la chaîne latérale. De plus, les mêmes auteurs ont signalé la production de 3 nouvelles pyrrothines: crotonyl-pyrrothine, 2-hexonyl-pyrrothine et 2-méthyl-3-pentenyl-pyrrothine en présence de l'acide sorbique dans le milieu de culture [12].

Egalement, l'ajout d'acide sorbique et l'acide crotonique a permis de multiplier la production de BUP par 118 et la production d'ISP par 22, respectivement. De plus, l'ajout d'acide 4-bromobenzoïque a entraîné une production de SEP, 21 fois plus élevée. Dans ces cas (parmi d'autres) il est possible d'émettre d'autres hypothèses quant aux voies métaboliques permettant de convertir l'acide organique ajouté dans le milieu de culture, en précurseur indirecte de la pyrrothine dont la production est augmentée.

Le procédé utilisé dans cette étude (par une biosynthèse dirigée par les précurseurs directs et indirects) se concentre sur l'amélioration des rendements de production des

molécules bioactives, nouvelles ou déjà existantes, par l'addition des précurseurs (directs ou indirects) dans le milieu de culture [15]. Par ailleurs, il est à noter qu'il existe d'autres techniques de l'ingénierie métabolique soit en redirigeant les flux de précurseurs métaboliques vers la production de la molécule d'intérêt, soit en dérégulant certaines voies métaboliques ou alors en sur-exprimant les enzymes impliquées dans les étapes goulot d'étranglement des voies métaboliques clés [16]. D'autres moyens de découvrir de nouvelles molécules bioactives sont de développer de nouvelles molécules soit par design moléculaire à partir des cibles moléculaires bactériennes [17], soit par modifications chimiques de molécules existantes ou alors par muta synthèse, c'est-à-dire en fournissant à la bactérie des intermédiaires métaboliques différents [18].

4. References

- [1] Minamiguchi K, Kumagai H, Masuda T, Kawada M, Ishizuka M, Takeuchi T. (2001) Thiolutin, an inhibitor of huvec adhesion to vitronectin, reduces paxillin in huvecs and suppresses tumor cell-induced angiogenesis. *Int J Cancer*;93:307-316.
- [2] Yamagishi S, Koyama Y, Fukakusa Y, Kyomura N, Ohishi JI, Hamamichi N et Arai T. (1971) On the metabolites of *Streptomyces luteoreticuliti* Katoh et Arai. Isolation of the metabolites. *Yakugaku Zasshi* 91, 351-357.
- [3] Okamura K, Soga K, Shimauchi Y, Ishikura T, Lein J. (1977) Holomycin and n-propionyl-holothin, antibiotics produced by a cephamycin C producer. *J Antibiot*;30:334-336.
- [4] Webster JM, Chen G, Hu K, Li J. Bacterial metabolites. *In: Gaugler R (eds) Entomopathogenic Nematology*, New Jersey, CAB International; 2002. p. 99-114.
- [5] 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.
- [6] Bouras, N. 2005. Régulation de la production d'antibiotiques dithiopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Thèse (Ph.D). Institut National Polytechnique, ENSAT-INP, Toulouse, 238 p.
- [7] Boudjella H. (1994) Influence des milieux de culture, des antibiotiques et du prétraitement des échantillons à la chaleur sur la sélection des genres et des espèces d'actinomycètes rares de quelques sols sahariens. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba, Algérie.
- [8] Lamari L, Zitouni A, Boudjella H, Badji B, Sabaou N, Lebrihi A, Lefebvre G, Seguin E, Tillequin F. (2002a) New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J Antibiot*;55:696-701.
- [9] Lamari L, Zitouni A, Dob T, Sabaou N, Lebrihi A, Germain P, Seguin E, Tillequin F. (2002b) New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. II. Physicochemical properties and structure elucidation. *J Antibiot*;55:702-706.
- [10] Bouras N, Mathieu F, Sabaou N, Lebrihi A. (2006a) Effect of amino acids containing sulfur on dithiopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *J Appl Microbiol*;100:390-397.
- [11] Bouras N., Mathieu F., Sabaou N., Lebrihi A. (2007). Influence on dithiopyrrolone antibiotic production by organic acids in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochemistry*. 42: 925-933.

[12] Merrouche R., Bouras N., Coppel Y., Mathieu F., Sabaou N., Lebrihi A. (2011). New dithiopyrrolone antibiotics induced by adding sorbic acid to the culture broth of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. FEMS Microbiology Letters ; 318: 41–46.

[13] Bouras N, Mathieu F, Sabaou N, Lebrihi A. (2006b) Nutritional requirements for the production of dithiopyrrolone antibiotics by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Enz Microbiol Technol;39:1423-1429.

[14] Merrouche R., Bouras N., Coppel Y., Mathieu F., Monje M-C., Sabaou N., Lebrihi A. (2010). Dithiopyrrolone antibiotic formation induced by adding valeric acid to the culture broth of *Saccharothrix algeriensis*. Journal of Natural Products. 73: 1164–1166.

[15] Bouras N, Merrouche R, Lamari L, Mathieu F, Sabaou N, Lebrihi A. (2008) Precursor-directed biosynthesis of new dithiopyrrolone analogs by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Process Biochemistry. 43: 1244-1252.

[16] Olano C, Lombó F, Méndez C, et Salas JA (2008). Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. Metabolic Engineering, Sous Presse.

[17] Juguet M, Lautru S, Gondry M. et Pernodet J.L (2008). Isolement et caractérisation du groupe de genes dirigeant la biosynthèse de la congocidine chez *Streptomyces ambofaciens*. Journées francophones des actinomycètes, Castanet-Tolosan, France.

[18] Singh S, Malik BK, et Sharma DK. (2007) Metabolic pathway analysis of *S. pneumoniae*: an in silico approach towards drug-design. J. Bioinform. Comput. Biol., 5, 135-53.