



**HAL**  
open science

**Procédés innovants pour la production de  
dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*  
NRRLB-24137**

Alaa Hamdar

► **To cite this version:**

Alaa Hamdar. Procédés innovants pour la production de dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis* NRRLB-24137. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2018. Français. NNT : 2018TOU30289 . tel-02383093

**HAL Id: tel-02383093**

**<https://theses.hal.science/tel-02383093>**

Submitted on 27 Nov 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

Délivré par l'université Toulouse 3 – Paul Sabatier

Université Toulouse III – Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par :

**M. Alaa HAMDAR**

Le 24 octobre 2018

**Procédés innovants pour la production de dithioloxyrrolones  
par *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137.**

---

École doctorale : **SEVAB - Sciences Écologiques, Vétérinaires, Agronomiques et  
Bioingénieries**

Spécialité : **Ingénieries microbienne et enzymatique**

Unité de recherche :

**LGC- Laboratoire de Génie Chimique**

Thèse dirigée par :

**Geneviève BAZIARD et Barbora LAJOIE**

Jury :

**M. Raphaël Emmanuel DUVAL, Rapporteur**

**M. Abdelghani ZITOUNI, Rapporteur**

**M. Frédéric JORAND, Rapporteur**

**Mme Florence MATHIEU, Examinatrice**

**Mme Geneviève BAZIARD, Directrice de thèse**

**Mme Barbora LAJOIE, Co-directrice de thèse**

« La vraie science est une ignorance qui se sait »

Montaigne, *Essais*, Livre II, chapitre XII.

*Je dédie ce travail  
À mes parents,  
Choses promises, choses dues.*

*À ma très chère Mayssoun,  
Sans toi ce travail n'aurait pas vu le jour.*

*À mes amis les plus proches,  
Je ne vous remercierai jamais assez !*

## Remerciements

Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse ont été réalisés au laboratoire de génie chimique (LGC) UMR 5503, sur le site de la Faculté de Pharmacie.

Je remercie Messieurs les Professeurs Abdelghani ZITOUNI, Frédéric JORAND et Raphaël-Emmanuel DUVAL, qui me font l'honneur de participer à ce jury en tant que rapporteurs et à Madame Florence MATHIEU en tant qu'examinatrice.

Je tiens à remercier Monsieur Pierre AIMAR, Directeur du laboratoire, pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire de Génie Chimique (LGC – UMR 5503). Je remercie aussi Messieurs Alain BERGEL et Nicolas BERNET ainsi que Mme Christine ROQUES pour la participation à mon comité de thèse.

Mes remerciements vont également à Mesdames Geneviève BAZIARD et Barbora LAJOIE pour avoir dirigé cette thèse. Merci à l'ensemble de l'équipe BioSyM de la Faculté de Pharmacie et au personnel de la Fonderephar.

Un grand merci à Mme Odile BOURBIAUX, responsable pédagogique du département de génie biologique à l'IUT-AUCH, pour ses conseils pédagogiques, ses encouragements, sa gentillesse et sa confiance en moi.

Tous mes remerciements à ma famille et à mes amis qui m'ont motivé et soutenu pour arriver jusqu'au bout de mon objectif. Vous vous reconnaissez, merci buddies du fond du pec !

Mille mercis (et c'est peu dire) à Mayssoun. Elle sait pourquoi...

## Table des matières

Remerciements .....	I
Liste des abréviations .....	III
Liste des tableaux .....	V
Liste des figures .....	VII
Résumé .....	XI
Abstract .....	XII
Introduction générale.....	1
.....	1
Contexte et problématique.....	2
Objectifs et stratégies de la thèse.....	3
Organisation du manuscrit.....	4
Chapitre 1 : Revue Bibliographique.....	5
1.1. Le genre <i>Saccharothrix</i> .....	6
1.1.1. <i>Saccharothrix algeriensis</i> .....	10
1.1.1.1. Position taxonomique et caractéristiques .....	10
1.1.1.2. Activités biologiques de <i>Saccharothrix algeriensis</i> NRRL B-24137 .....	14
1.2. Les Dithiopyrrolones.....	16
1.2.1. Définition et propriétés structurales.....	16
1.2.2. Propriétés physico-chimiques des dithiopyrrolones diversement substituées .....	18
1.2.3. Source de production des dithiopyrrolones .....	19
1.2.3.1. Synthèse chimique.....	19
1.2.3.2. Source Biologique .....	20
1.2.4. Mécanisme d'action des dithiopyrrolones .....	25
1.2.5. Intérêt des dithiopyrrolones .....	26
1.2.5.1. Utilisation dans l'agriculture .....	26
1.2.5.2. Utilisation dans le domaine médical.....	27
1.3. Élicitation des métabolites secondaires.....	28
1.3.1. Notion d'éliciteur chimique .....	29
1.3.2. Élicitation chimique .....	31
1.3.2.1. Le stress oxydatif chez les bactéries.....	34
1.3.2.1.1. Les mécanismes de défenses contre le stress oxydatif .....	36
1.3.2.1.2. Récepteurs des espèces réactives de l'oxygène chez les bactéries .....	37
1.3.3. Élicitation chimique par des inducteurs du Quorum Sensing .....	39

1.3.3.1.	Communication bactérienne : le Quorum Sensing .....	39
1.3.3.2.	Historique .....	41
1.3.3.3.	Auto-inducteurs du Quorum Sensing .....	41
1.3.3.4.	Les différentes molécules inductrices du QS .....	42
1.3.3.5.	Quorum Sensing chez les <i>Actinobactéries</i> .....	50
1.3.4.	Systèmes bio-électrochimiques .....	53
1.3.4.1.	Mécanismes de transfert des électrons .....	53
1.3.4.2.	Synthèse microbienne électro-assistée .....	54
1.3.4.2.1.	Principe de la synthèse microbienne électro-assistée .....	55
1.3.4.2.2.	Paramètres d'optimisation .....	56
1.4.	Conclusion générale .....	57
Chapitre 2 : Matériel et Méthodes .....		58
2.	Microorganisme .....	59
2.1.	Milieus de cultures microbiennes.....	59
2.1.1.	International <i>Streptomyces</i> Project 2 (ISP2) .....	59
2.1.2.	Milieu semi-synthétique basal (SS).....	59
2.2.	Conservation de la souche .....	60
2.2.1.	Production de spores .....	60
2.2.2.	Récupération et stockage des spores .....	60
2.2.3.	Comptage des spores .....	60
2.3.	Conditions de culture.....	61
2.3.1.	Pré-culture .....	61
2.3.2.	Cultures .....	61
2.3.3.	Préparation des réactifs .....	61
2.4.	Méthodes analytiques .....	62
2.4.1.	Dosage des dithiolopyrrolones par HPLC.....	62
2.4.2.	Quantification de la biomasse par mesure du poids sec.....	64
2.5.	Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices et Bactéricides.....	64
2.6.	Matériel électrochimique .....	65
2.6.1.	Cellule électrochimique.....	65
2.6.2.	Électrodes de travail et contre-électrode .....	66
2.6.3.	Électrode de référence .....	66
2.7.	Technique électrochimique.....	67
2.8.	Microscopie à épifluorescence 3D .....	67
2.9.	Analyses statistiques des données .....	68

Chapitre 3 : Étude de l'effet des éliciteurs chimiques sur la biosynthèse de dithiopyrrolones par <i>Saccharothrix algeriensis</i> .....	69
3. Stratégie de travail .....	70
3.1. Effet de la gamma-butyrolactone ( $\gamma$ -butyrolactone, GBL).....	72
3.1.1. Effet de la concentration en GBL.....	72
3.1.2. Effet du temps d'addition de la GBL .....	73
3.2. Effet des homo-sérines-lactones (HSL).....	74
3.2.1. Effet de la N-butyryl-Homosérine lactone (C <sub>4</sub> -HSL) .....	74
3.2.1.1. Effet de la concentration en C <sub>4</sub> -HSL .....	74
3.2.1.2. Effet des ajouts successifs de la C <sub>4</sub> -HSL.....	75
3.2.2. Effet de la N-(3-oxo-dodécanoyl)-Homosérine lactone (3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL).....	77
3.2.2.1. Effet de la concentration en 3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL .....	77
3.2.2.2. Effet des ajouts successifs de la 3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL.....	78
3.2.2.3. Effet des ajouts simultanés et successifs de la C <sub>4</sub> -HSL et la 3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL .....	80
3.2.3. Effet de la 3-OH-C <sub>12</sub> -HSL .....	82
3.2.3.1. Effet de la concentration en 3-OH-C <sub>12</sub> -HSL .....	82
3.3. Discussion.....	83
3.3.1. Effet de la Gamma-butyrolactone .....	83
3.3.2. Effets des Homosérines-lactones .....	84
3.4. Conclusion .....	87
3.5. Influence de solvants organiques sur la production de dithiopyrrolones .....	88
3.5.1. Toxicité des solvants .....	88
3.6. Effet des alcools.....	89
3.6.1. Effet de l'éthanol.....	89
3.6.2. Effet du butan-1-ol .....	95
3.6.3. Effet de l'ajout des inhibiteurs des espèces réactives de l'oxygène (ROS) .....	98
3.6.3.1. Effet du diphénylène iodonium (DPI) et de l'azoture de sodium (NaN <sub>3</sub> ) .....	98
3.7.3. Discussion .....	104
3.7.4. Conclusion.....	106
3.8. Effet du diméthylsulfoxyde (DMSO) .....	107
3.8.1. Effet de la concentration en DMSO .....	107
3.8.2. Effet du temps d'addition du DMSO .....	109
3.8.3. Effet des ajouts successifs du DMSO .....	110
3.8.4. Discussion .....	111
3.8.5. Conclusion.....	112

Chapitre 4 : Étude de l'effet d'une électrode polarisée sur la biosynthèse des dithiopyrrolones par <i>Saccharothrix algeriensis</i> .....	113
4. Introduction .....	114
4.1. Sélection de l'électrode de travail .....	115
4.2. Effet du potentiel d'électrode sur le comportement de <i>Saccharothrix algeriensis</i> .....	118
4.2.1. Effet des potentiels de + 0,2 et + 0,3 V/ECS.....	118
4.2.2. Effet du potentiel 0 V/ECS.....	121
4.2.3. Effet des potentiels de - 0,2 et - 0,3 V/ECS .....	123
4.2.4. Effet du potentiel de -0,3 V/ECS appliqué après 24 h de culture. ....	127
4.2.5. Quantification de la biomasse et des dithiopyrrolones à différents potentiels.....	128
4.2.6. Études des charges échangées à - 0,3 V/ECS.....	129
4.3. Investigations sur l'effet du matériau de l'électrode de travail .....	131
4.3.1. Électrode en acier .....	131
4.3.2. Électrodes en carbone.....	132
4.3.3. Électrodes en platine .....	134
4.4. Discussion.....	136
4.4.1. Choix du matériau d'électrode .....	136
4.4.2. Études chronoampérométriques de l'effet du potentiel.....	136
4.4.3. Échanges des charges électriques à - 0,3 V/ECS et production de dithiopyrrolones. ....	139
4.4.4. Effet du matériau de l'électrode de travail sur la production des dithiopyrrolones ...	142
4.5. Conclusion .....	143
Conclusion générale et perspectives.....	144
Élicitation par des composés chimiques .....	145
Utilisation d'une électrode polarisée dans le milieu de culture .....	146
Références bibliographiques .....	148
Communications et publications scientifiques réalisées .....	170

## Liste des abréviations

Acétate d'éthyle	EtOAc
Acétone	Me <sub>2</sub> CO
Acétonitrile	CH <sub>3</sub> CN
Acide acétique	CH <sub>3</sub> COOH
Acide chlorhydrique	HCl
Acide trifluoroacétique	TFA
Acyl Carrier Protein	ACP
Acyl Homoserine Lactone	AHL
2-Alkyl-4-hydroxyméthylfuran-3-carboxylique	AHFCA
Anion superoxyde	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Azoture de sodium	NaN <sub>3</sub>
Butan-1-ol	ButOH
Catalase	CAT
Chloroforme	CHCl <sub>3</sub>
Chloroforme deutéré	CDCl <sub>3</sub>
Concentration minimale bactéricide	CMB
Concentration minimale inhibitrice	CMI
Contre-électrode	CE
Dichlorométhane	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
Diméthylsulfoxyde	DMSO
Diphenylène iodonium	DPI
Dithiopyrrolones	DTPs
4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione	DPD
Électrode à calomel saturé	ECS
Électrode de travail	WE
Électrode standard à hydrogène	ESH
Espèces réactives de l'oxygène	ROS
Éthanol	EtOH
Gamma-butyrolactone	GBL
Glutarédoxine	Grx

Guanosine pentaphosphate	(p)ppGpp
Homosérine lactone	HSL
High Performance Liquid Chromatography	HPLC
Ménaquinones	MK
Méthanol	MeOH
Méthoxyde de sodium	NaOMe
Méthylamine	MeNH <sub>2</sub>
Méthylénomycine furane	MMF
Méthylisobutylcétone	MIBC
Milieu semi-synthétique	Milieu SS
millimolaire	mM
Méthylénomycine Furan	MMF
Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate	NADP
<i>N</i> -butyryl-homosérine lactone	C <sub>4</sub> -HSL
<i>N</i> -(3-hydroxy-dodécanoyl)-homosérine lactone	3-OH-C <sub>12</sub> -HSL
<i>N</i> -(3-oxo-dodécanoyl)- homosérine lactone	3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL
Peroxyde d'hydrogène	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
picomolaire	pM
<i>p</i> -méthoxybenzylthiol	PMBS
partie par million	ppM
Production Spécifique	PS
Quantité suffisante pour	q.s.p
Radical hydroxyle	HO·
Reactive Oxygen Species	ROS
<i>Saccharothrix algeriensis</i>	<i>S. algeriensis</i>
<i>S</i> -Adenosyl-Méthionine	SAM
Superoxyde dismutase	SOD
Tétrachlorure de titane	TiCl <sub>4</sub>
Tétrahydrofurane	THF
2-méthyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofurane	THMF
Thiorédoxine	Trx
Triéthylamine	Et <sub>3</sub> N

## Liste des tableaux

Tableau 1.1: Espèces du genre <i>Saccharothrix</i> , d'après le National Center for Biotechnology Information (NCBI, <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy</a> ).....	8
Tableau 1.2: Position taxonomique de <i>Saccharothrix algeriensis</i> NRRL B-24137. ....	11
Tableau 1.3: Profil des acides gras constituant la paroi de <i>S. algeriensis</i> NRRL b-24137 (Zitouni et al., 2004 b).....	12
Tableau 1.4: Tableau comparatif des différentes propriétés physiologiques de quelques espèces appartenant au genre <i>Saccharothrix</i> . (Zitouni et al., 2004 b).....	13
Tableau 1.5: Activités biologiques de <i>Saccharothrix algeriensis</i> sur milieu ISP2 déterminée par la méthode des stries croisées. (Lamari, 2006). ....	15
Tableau 1.6: Propriétés physico-chimiques et spectroscopiques de quelques dérivés de dithiopyrrolones (d'après (Celmer & Solomons, 1955 ; Okamura et al., 1977 ; Lamari et al., 2002) ). ....	18
Tableau 1.7: Les gènes du cluster thi de la biosynthèse des dithiopyrrolones par <i>S. algeriensis</i> et leurs fonctions (d'après Saker, 2013). ....	24
Tableau 1.8: Utilisation de la thiolutine sur des agents phytopathogènes.....	26
Tableau 1.9: Liste non exhaustive de métabolites secondaires produits par élicitation biologique ; (P) : espèce productrice ; (I) : espèce inductrice. ....	28
Tableau 1.10: Liste non exhaustive de métabolites secondaires produits par élicitation chimique. ....	31
Tableau 1.11 : Phénotypes de QS régulés par des oligopeptides. ....	42
Tableau 1.12: Genres d' <i>Actinobactéries</i> chez qui le QS a été démontré par des expériences (Polkade et al., 2016).....	51
Tableau 2.1: Structures des homosérines lactones testées. ....	61
Tableau 3.1 : Effet de la concentration et du temps d'addition de la GBL sur la production spécifique des dithiopyrrolones par <i>S. algeriensis</i> . ....	83
Tableau 3.2 : Effet de la concentration et du temps d'addition des homosérines lactone sur la production spécifique de dithiopyrrolones par <i>S. algeriensis</i> . ....	85
Tableau 3.3 : Effet des ajouts simultanés et successifs de la C <sub>4</sub> -HSL et de la 3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL sur la production spécifique de dithiopyrrolones par <i>S. algeriensis</i> . ....	86
Tableau 3.4 : Valeurs des CMI et CMB des solvants. ....	88
Tableau 3.5 : Récapitulatif des essais avec des inhibiteurs des ROS en présence d'éthanol ou de butan-1-ol. ....	103

Tableau 3.6 : Effet de la concentration et du temps d'addition de l'éthanol sur la production de dithiopyrrolones par <i>S. algeriensis</i> .....	104
Tableau 3.7 : Comparaison de l'effet des concentrations de l'éthanol et du butan-1-ol sur la production de dithiopyrrolones par <i>S. algeriensis</i> .....	105
Tableau 4.1 : Résultats du test de croissance de <i>S. algeriensis</i> sur différents supports d'électrode. ....	117
Tableau 4.2 : Quantités de charges échangées par jour pour les cinq cultures en présence de feutre de carbone. ....	129
Tableau 4.3 : Échanges électroniques en présence des électrodes en feutre de carbone et en plaque de platine.....	141

## Liste des figures

Figure 1.1: Comparaison de la micromorphologie des deux genres <i>Saccharothrix</i> et <i>Streptomyces</i> (Bergey, 1989). .....	7
Figure 1.2: Micrographie électronique des chaînes de spores de <i>Saccharothrix algeriensis</i> SA 233 <sup>T</sup> après 10 jours de culture sur milieu ISP2 à 30 °C (extrait de l'article de Zitouni et al., 2004 b). .....	11
Figure 1.3: (A). Structure générale des dithiopyrrolones d'origine biologique : le noyau pyrrolinodithiole et ses radicaux R1 et R2. (B). Dérivés dithiopyrrolones dont ceux produits par <i>Saccharothrix algeriensis</i> NRRL B-24137 sur milieu ISP2 et complètement caractérisés (Bouras et al., 2008). .....	17
Figure 1.4 : Synthèse de la pyrrothine. ....	20
Figure 1.5: Voie de biosynthèse potentielle des dithiopyrrolones d'après Furumai et al. 1982. ....	21
Figure 1.6: Le cluster de gènes de la voie de biosynthèse de l'holomycine chez <i>S. clavuligerus</i> , <b>A</b> , <b>B</b> , la voie de biosynthèse l'holomycine proposée par Li & Walsh (2011). ....	21
Figure 1.7: Comparaison des gènes de biosynthèse de microorganismes producteurs de dithiopyrrolones (extrait de l'article de Zhai et al., 2016) . ....	22
Figure 1.8: Mécanisme d'action des dérivés de dithiopyrrolones (schéma extrait de l'article Chan et al., 2017). ....	25
Figure 1.9: Mécanisme d'action hypothétique des éliciteurs chimiques chez les bactéries (extrait de la revue d' Abdelmohsen et al., 2015). ....	29
Figure 1.10: Cascade hypothétique du signal de transduction induite par l'éthanol (à 10 mM) chez <i>S. hygroscopicus</i> (extrait de l'article de Zhou et al., 2012). ....	33
Figure 1.11: Les origines et les cibles des espèces réactives d'oxygène (extrait de l'article D'Autréaux et al., 2007). ....	35
Figure 1.12: Récepteurs bactériens des espèces réactives d'oxygène (extrait de l'article D'Autréaux et al., 2007). ....	38
Figure 1.13: Le mécanisme du Quorum Sensing (Schéma extrait de l'article Roy et al., 2011). ....	40
Figure 1.14: Structures de deux AI-2 sécrétés par deux espèces différentes. ....	43
Figure 1.15: Différentes structures d'AHL (d'après Uroz et al. 2005). ....	44
Figure 1.16: Mécanisme du QS chez <i>Vibrio fischeri</i> médié par AHL (extrait de l'article de Waters & Bassler, 2005). ....	46
Figure 1.17: Auto-inducteurs produits par les <i>Actinobactéries</i> (d'après Polkade et al., 2016). ....	47
Figure 1.18: Mécanisme d'action du Facteur A (en a) et quelques structures des molécules SCB (en b) (schéma adapté de Kato et al., 2007). ....	49

Figure 1.19: Mécanismes impliqués dans le transfert des électrons : (A) Transfert indirect par l'intermédiaire des médiateurs ou des produits de fermentation des matières organiques ; (B) transfert direct via des protéines (cytochromes) ; (C) transfert direct via des pili conducteurs (extrait de l'article de Santoro et al., 2017). .....	54
Figure 1.20: Principe de la synthèse microbienne électro-assistée (extrait de l'article Santoro et al., 2017). .....	55
Figure 2.1: Droite d'étalonnage de la gamme d'holothine.....	63
Figure 2.2 : Schéma du montage de la cellule électrochimique. ....	65
Figure 2.3 : Électrodes utilisées dans cette étude : électrode en feutre de carbone (a), électrode en maille de platine (b), électrode en acier inoxydable (c), contre-électrode en tissu de carbone (d) et une électrode de référence à calomel saturé (ECS) (e). ....	66
Figure 3.1 : Culture batch de <i>S. algeriensis</i> sur milieu semi-synthétique standard, (extrait de l'article de Strub et al., 2010). ....	71
Figure 3.2 : Effet de GBL sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b) (n= 9). ....	72
Figure 3.3 : Effet de différents temps d'addition de 500 $\mu\text{M}$ de GBL sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b). ....	73
Figure 3.4 : Effet de la C <sub>4</sub> -HSL sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b). ....	74
Figure 3.5: Effet de différents temps d'addition de 500 $\mu\text{M}$ de C <sub>4</sub> -HSL sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b). ....	75
Figure 3.6 : Effet de l'ajout de 250 $\mu\text{M}$ et 500 $\mu\text{M}$ de 3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b). ....	77
Figure 3.7 : Effet de différents temps d'addition de 500 $\mu\text{M}$ de 3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b). ....	78
Figure 3.8 : Effet de l'ajout successif et simultané de 500 $\mu\text{M}$ de C <sub>4</sub> -HSL et 3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b). ....	81
Figure 3.9 : L'effet de l'ajout de 250 $\mu\text{M}$ et 500 $\mu\text{M}$ de 3-OH-C <sub>12</sub> -HSL sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b). ....	82
Figure 3.10 : Décomposition de la 3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL en milieu aqueux (extrait de l'article de Kaufman et al., 2005). ....	86
Figure 3.11 : Effet de la gamme d'éthanol sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b). ....	89
Figure 3.12: Étude cinétique de l'effet de l'ajout de 300 mM d'éthanol sur la biomasse (a) et la concentration de DTPs (b). ....	92
Figure 3.13 : Effet des doses successives de 300 mM d'éthanol à différents temps d'incubation sur la biomasse (a) et la concentration de DTPs (b). ....	94
Figure 3.14: Effet de la gamme de butan-1-ol sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b). ...	95
Figure 3.15 : Effet de l'ajout simultané de 300 mM d'éthanol et deux concentrations de butan-1-ol sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b). ....	96

Figure 3.16: Effet d'une gamme de concentration de DPI sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b) dans différentes conditions de culture (en absence et en présence de l'éthanol ou du butan-1-ol)..	99
Figure 3.17 : Effet de l'ajout de DPI et NaN <sub>3</sub> seuls et en présence de 300 mM d'éthanol sur la biomasse (a) et sur la concentration en DTPs (b).	100
Figure 3.18 : Effet de l'ajout de DPI et NaN <sub>3</sub> seuls et en présence de 50 mM de butan-1-ol sur la biomasse (a) et sur la concentration en DTPs (b).	102
Figure 3.19 : Effet d'une gamme de concentration de DMSO sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b).	108
Figure 3.20 : Effet du temps d'addition de 3 % v/v DMSO sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b).	109
Figure 3.21 : Effet des doses successives de 3 % v/v DMSO à des différents temps d'incubation sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b).	110
Figure 4.1 : Filaments mycéliens sur maille en acier (a) et sur plaque d'acier (b) par microscopie à épifluorescence 3D.	115
Figure 4.2 : L'agglomérat du mycélium sur maille de platine par microscopie à épifluorescence 3D.	116
Figure 4.3 : Pelotes sur tissu de carbone (a) et sur feutre de carbone (b) par microscopie à épifluorescence 3D.	117
Figure 4.4 : Chronoampérogramme enregistré à + 0,3 V/ECS en absence de culture.	118
Figure 4.5 : Chronoampérogramme enregistré à + 0,2 V/ECS en présence d'une culture de <i>S. algeriensis</i> .	119
Figure 4.6 : Chronoampérogrammes enregistrés à + 0,3 V/ECS en présence de trois cultures indépendantes de <i>S. algeriensis</i> .	120
Figure 4.7 : Chronoampérogramme enregistré à 0 V/ECS en absence de culture.	121
Figure 4.8 : Chronoampérogramme enregistré à 0 V/ECS en présence d'une culture de <i>S. algeriensis</i> .	122
Figure 4.9 : Chronoampérogramme enregistré à - 0,2 V/ECS en absence de culture.	123
Figure 4.10 : Chronoampérogrammes enregistré à - 0,3 V/ECS en absence de culture et sans ou avec aération.	124
Figure 4.11 : Chronoampérogramme enregistré à - 0,2 V/ECS en présence d'une culture de <i>S. algeriensis</i> .	125
Figure 4.12 : Chronoampérogrammes enregistrés à - 0,3 V/ECS en présence de cinq cultures indépendantes de <i>S. algeriensis</i> .	126
Figure 4.13 : Chronoampérogramme enregistré sur une électrode en feutre de carbone polarisée à - 0,3 V/ECS après 24 h de culture.	127
Figure 4.14 : Biomasse déposée sur l'électrode (a) et concentration en dithiopyrrolones (b) en fonction de la polarisation de l'électrode (vs ECS) (n=1, 3 ou 5).	128

Figure 4.15 : Chronoampérogrammes sur une électrode en plaque d'acier polarisée à - 0,3 V/ECS...	131
Figure 4.16 : Chronoampérogrammes enregistrés à un potentiel (vs ECS) = - 0,3 V avec une électrode en tissu de carbone.....	132
Figure 4.17 : Chronoampérogrammes enregistrés à un potentiel (vs ECS) = - 0,3 V avec une électrode en feutre de carbone.....	133
Figure 4.18 : Biomasse déposée sur l'électrode et concentration en dithiopyrrolones (b) en présence des électrodes en feutre et tissu de carbone (n = 3).....	133
Figure 4.19 : Chronoampérogrammes enregistrés à un potentiel (vs ECS) = - 0,3 V avec des électrodes en maille de platine.....	134
Figure 4.20 : Biomasse déposée sur l'électrode (a) et concentration en dithiopyrrolones (b) en présence des électrodes en platine (n = 2).....	135
Figure 4.21 : La dithiol oxydase catalyse la formation du pont disulfure des dérivés dithiopyrrolones (Schéma extrait de l'article de Li & Walsh, 2011).....	138
Figure 4.22 : Variation de la concentration en dithiopyrrolones en fonction des échanges électriques entre <i>S. algeriensis</i> et l'électrode polarisée à -0,3V/ECS (a) ; Variation de la charge totale échangée en fonction de la biomasse déposée sur la surface de l'électrode en feutre de carbone (b).....	140
Figure 4.23 : Effet du matériau de l'électrode de travail sur la biomasse (a) et la concentration en dithiopyrrolones (b) produites par <i>S. algeriensis</i> .....	142

## Résumé

*Saccharothrix algeriensis* est une *Actinobactérie* rare capable de synthétiser divers dérivés de dithiopyrrolones (DTPs) aux propriétés phytosanitaires intéressantes. L'objectif de la thèse vise à développer différentes méthodes, alternatives à la synthèse organique, pour optimiser la production de DTPs par la régulation du métabolisme de la bactérie. Deux approches ont été envisagées :

- la première fait appel à des éliciteurs chimiques tels que l'éthanol, le butan-1-ol, le diméthylsulfoxyde et des homosérines lactones (C<sub>4</sub>-HSL, 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL et 3-OH-C<sub>12</sub>-HSL). Les effets de la concentration de ces composés et du temps d'addition dans le milieu de culture ont été étudiés et une investigation sur le mécanisme d'action de l'éthanol a été initiée
- la deuxième utilise une approche physico-chimique innovante modifiant le métabolisme microbien à l'aide d'une électrode polarisée. Des électrodes en carbone, en acier et en platine de topographies variées ont servi pour l'étude de l'effet du potentiel, par rapport à une électrode au calomel saturée (ECS), sur la croissance de *S. algeriensis* et la production de dithiopyrrolones.

Les résultats obtenus montrent que l'ajout de l'éthanol à une concentration de 1,74 % v/v ou du diméthylsulfoxyde à 3 % v/v au début de la culture, induit une augmentation significative de la production spécifique des DTPs. Celle-ci est multipliée par un facteur 19 avec l'éthanol et par 6 avec le diméthylsulfoxyde. Dans le cas de l'éthanol, cette induction serait médiée par des espèces réactives de l'oxygène. Par ailleurs, l'ajout simultané de la C<sub>4</sub>-HSL et de la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL à des doses successives de 500 µM permet de multiplier la production spécifique des DTPs par un facteur 2,5.

L'utilisation d'une électrode polarisée, en platine ou en carbone, permet un bon développement mycélien de *S. algeriensis* contrairement à une électrode en acier. Sous le potentiel -0.3 V/ECS, des concentrations élevées en dithiopyrrolones ont été quantifiées.

**Mots clé :** *Saccharothrix algeriensis*, dithiopyrrolones, éliciteurs chimiques, espèces réactives d'oxygène, électrode polarisée.

## Abstract

*Saccharothrix algeriensis* is a rare *Actinobacterium* that produces a variety of dithiolopyrrolone derivatives (DTPs). These biocidal compounds are used as plant and crop-protection products. The aim of this thesis is to develop new strategies for DTPs production by regulating bacterial metabolism as an alternative to the chemical synthesis of these compounds. Two strategies were used :

- the first strategy consist of using chemical elicitors such as ethanol, butan-1-ol, dimethylsulfoxide and homoserine lactones (C<sub>4</sub>-HSL, 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL and 3-OH-C<sub>12</sub>-HSL). The effects of concentration and time addition of these compounds were studied and ethanol mode of action was investigated.
- the second strategy is a physico-chemical innovative approach that modifies bacterial metabolism using a polarized electroded. Platinum, carbon and stainless steel electrodes with varied topographies were used to study the effect of the potential, versus a saturated calomel electrode (SCE), on the growth of *S. algeriensis* and DTPs production.

Our results show that the addition of pure ethanol and dimethylsulfoxide, at the beginning of the culture (t<sub>0</sub>), in respective concentrations of 1,74 % v/v and 3 % v/v increases DTPs specific production. This one was multiplied by nineteen-fold in presence of ethanol and by six-fold in presence of dimethylsulfoxide. In the case of ethanol, the induction of DTPs biosynthesis is mediated by reactive oxygen species (ROS). Furthermore, simultaneous addition of C<sub>4</sub>-HSL and 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL in multiple doses of 500 μM increases DTPs specific production by 2,5 fold.

In presence of polarized platinum and carbon electrodes mycelium development of *S. algeriensis* is thicker than that grown on stainless steel electrode. Although, under -0,3 V/SCE, high DTPs concentrations were quantified in comparison to other conditions tested.

**Keywords :** *Saccharothrix algeriensis*, dithiolopyrrolones, chemical elicitors, reactive oxygen species, polarized electrode.

## Introduction générale

---

## Contexte et problématique

Une des plus importantes sources pour la découverte de nouveaux biocides sont les *Actinobactéries* et en particulier le genre *Streptomyces*. Ces bactéries mycéliennes à Gram positif sont connues pour leur grande capacité à produire des métabolites secondaires de structures chimiques variées qui sont utilisées en tant qu'antibactériens, antifongiques et anticancéreux (Okada & Seyedsayamdost, 2017 ; Genilloud, 2017 ; Newman, & Cragg, 2016).

Mais au sein des milliers d'espèces appartenant à cette famille, il existe encore un réservoir immense et sous-exploité de souches présentant des capacités métaboliques d'intérêt.

*Saccharothrix algeriensis* est une *Actinobactérie* rare décrit par Zitouni et al., (2004 b) au sein du Laboratoire de Génie Chimique. Cette bactérie possède une capacité à produire naturellement cinq dérivés de dithiopyrrolones. Celles-ci sont des composés hétérocycliques contenant deux atomes de soufre et un autre d'azote qui diffèrent très souvent entre eux uniquement par la chaîne latérale composée par un acide organique relié au cycle par une liaison amide. Plusieurs autres dérivés des dithiopyrrolones peuvent être obtenus à partir d'acides organiques en fonction des conditions de culture (Bouras et al., 2008).

Les dithiopyrrolones sont des biocides à large spectre utilisés en tant qu'insecticides, larvicides, fongicides et bactéricides (Merrouche et al., 2017 ; Webster et al., 2000 ; Qin et al., 2013). C'est pourquoi, les recherches sur ces composés constituent une piste intéressante pour pallier aux dégâts causés par les agents phytopathogènes ravageurs des cultures viticoles et maraîchères.

Les recherches réalisées jusqu'à présent sur la production des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis* se sont focalisées sur l'amélioration des conditions de culture et la composition chimique du milieu de culture (Strub et al., 2008 ; Merrouche et al., 2010 ; Bouras et al., 2008 ; Bouras et al., 2006).

En raison du spectre d'action très intéressant de ces molécules, nous proposons au travers de ce travail de thèse une nouvelle approche, utilisant des outils physico-chimiques, pour l'optimisation de la production de ces biocides par *Saccharothrix algeriensis*.

## Objectifs et stratégies de la thèse

Le travail présenté dans ce manuscrit a été effectué au sein du Laboratoire de Génie Chimique (UMR 5503), dans le département de Bioprocédés et Systèmes Microbiens (BioSyM)- axe biofilm-santé, sur le site de la Faculté de Pharmacie.

L'objectif de cette thèse vise à développer diverses stratégies pour améliorer la production des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*, cette méthode constituant une alternative à la synthèse organique complexe, onéreuse et polluante de ces composés.

Dans un premier temps, nous avons choisi d'étudier l'action de divers composés chimiques, molécules solubles et diffusibles pouvant jouer le rôle d'éliciteurs. Ce sont :

- soit des molécules pouvant être considérées comme des molécules signal,
  - la gamma-butyrolactone, du fait de la similitude structurale du noyau avec le facteur A du système de communication des *Streptomyces*,
  - trois molécules de la famille des homosérines lactones : la C<sub>4</sub>-HSL, la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL et la 3-OH-C<sub>12</sub>-HSL. Il s'agit de molécules signal de bactéries à Gram négatif, que nous retrouvons plus particulièrement chez *Pseudomonas aeruginosa*.

C'est une approche originale de la stimulation du métabolisme secondaire dans le cas de *Saccharothrix algeriensis*. Elle est susceptible de nous apporter des informations supplémentaires sur le mécanisme du Quorum Sensing chez cette espèce bactérienne et sur les interactions inter-espèces.

- soit des solvants organiques, notamment l'éthanol, le butan-1-ol et le diméthylsulfoxyde, souvent décrits dans la littérature pour leur capacité à influencer le métabolisme secondaire des bactéries en générant un stress métabolique.

Dans un deuxième temps, une autre voie innovante a également été explorée, utilisant cette fois une approche physico-chimique modifiant le métabolisme microbien. Nous avons développé une approche originale permettant l'optimisation de la production de dithiopyrrolones/biomasse par la régulation du métabolisme de la bactérie à l'aide d'une électrode polarisée. Jusqu'à présent aucune étude ne s'est intéressée au comportement électrochimique de *Saccharothrix algeriensis*. Ces travaux devraient constituer une base pour la compréhension du métabolisme électroactif de cette espèce.

## Organisation du manuscrit

Ce mémoire de thèse est organisé en quatre chapitres :

Le chapitre 1 est une étude bibliographique divisée en trois parties. La première partie est consacrée au genre *Saccharothrix* et plus précisément à l'espèce *Saccharothrix algeriensis* : taxonomie, physiologie et métabolisme. La deuxième partie est consacrée aux dithiopyrrolones, des biocides qui font l'objet de nombreuses études notamment pour leurs propriétés phytosanitaires et thérapeutiques. Et enfin, la troisième partie met l'accent sur les moyens d'élicitation chimique du métabolisme secondaire des *Actinobactéries* et sur les systèmes bio-électrochimiques.

Le chapitre 2 décrit les milieux de culture utilisés, les protocoles de culture et de conservation de la souche ainsi que les méthodes analytiques, électrochimique et statistiques utilisées pour l'analyse et le traitement des données.

Le chapitre 3 présente les résultats des essais de l'effet des inducteurs du Quorum Sensing et des solvants organiques sur la croissance de *Saccharothrix algeriensis* et sa capacité à biosynthétiser les dithiopyrrolones. La première partie s'intéresse à l'effet de la gamma-butyrolactone et de trois homosérines lactones (la C<sub>4</sub>-HSL, la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL et la 3-OH-C<sub>12</sub>-HSL). La deuxième partie décrit l'effet des alcools (l'éthanol et le butan-1-ol) et leur mécanisme d'action hypothétique dans l'induction de la surproduction de dithiopyrrolones par la bactérie. La dernière partie est consacrée à l'effet du diméthylsulfoxyde.

Le chapitre 4 porte sur l'étude de l'effet du matériau et du potentiel de l'électrode polarisée sur le développement de *Saccharothrix algeriensis* et la production de dithiopyrrolones.

Des conclusions partielles sont présentées à la fin de chaque chapitre. Nous présenterons enfin une conclusion générale qui synthétise les résultats de ce travail de thèse et les perspectives pour l'optimisation de la biosynthèse de dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*.

Chapitre 1 : Revue Bibliographique

---

## 1.1. Le genre *Saccharothrix*

Le genre *Saccharothrix* a été créé et décrit pour la première fois par Labeda en 1984 en utilisant l'espèce-modèle *Saccharothrix australiensis* (Labeda et al., 1984). Initialement classé, à tort, dans la famille des *Pseudonocardiaceae*, ce genre a été reclassé sur la base des parentées phylogénétiques dans la famille des *Actinosynnemataceae* (Embley et al., 1988 ; Labeda et Kroppenstedt, 2000). Le genre *Saccharothrix* appartient donc au grand groupe des *Actinobactéries* qui regroupe tous les microorganismes procaryotes de l'ordre des *Actinomycetales*.

Morphologiquement similaire au genre *Nocardiopsis*, *Saccharothrix* se distingue par son chimiotype et ses constituants cellulaires (Labeda et Kroppenstedt, 2000) :

- Paroi cellulaire de type III E (présence d'acide *méso*-diaminopimélique sans glycine),
- Présence de deux types de ménaquinones (lipides membranaires) : MK-9 (H4) ou MK-10 (H4), constituées d'un noyau quinone méthylé et d'une chaîne carbonée aliphatique formée de neuf à dix unités isoprènes dont quatre sont hydrogénées,
- Présence de deux types de phospholipides membranaires composés de phosphatidyléthanolamine et d'hydroxy-phosphatidyléthanolamine avec ou sans glucosamine (type P II ou P IV, respectivement),
- Présence de trois sucres caractéristiques (dans les cellules entières) : le galactose, le rhamnose et le mannose,
- Absence d'acides mycoliques pariétaux et de glycine.

Les espèces appartenant à ce genre sont à Gram positif, chimioorganotrophes hétérotrophes, saprophytes et aérobies stricts. *Saccharothrix* colonise des écosystèmes très variés tels que les eaux usées, les sols désertiques, salés et alcalins voire les sédiments océaniques et les gisements de minéraux (Schippers et al., 2002 ; Hozzein et al., 2004 ; Zitouni et al., 2005). Isolé en petit nombre à partir de divers substrats et écosystèmes, ce genre reste minoritaire parmi les *Actinobactéries*. En effet, le pourcentage des isolats de *Saccharothrix* par rapport au total des *Actinobactéries* ne dépasse pas 0,5 % pouvant atteindre les 15 % dans des échantillons de sols sahariens (Athalye et al., 1985 ; Sabaou et al., 1998).

Les colonies portent souvent un mycélium aérien, qui est très peu produit ou abondant selon les espèces.

La fragmentation des filaments mycéliens est anarchique, souvent en « zig-zag », produisant de longues chaînes de spores. Les spores sont non mobiles, en bâtonnets (1 à 2  $\mu\text{m}$  x 0,7 à 1  $\mu\text{m}$ ) ou ovoïdes. À la différence des *Streptomyces*, *Saccharothrix* ne produit pas de sporophores. Le mycélium du substrat se fragmente en éléments allongés ou coccoïdes (Figure 1.1) (Bouras, 2005).

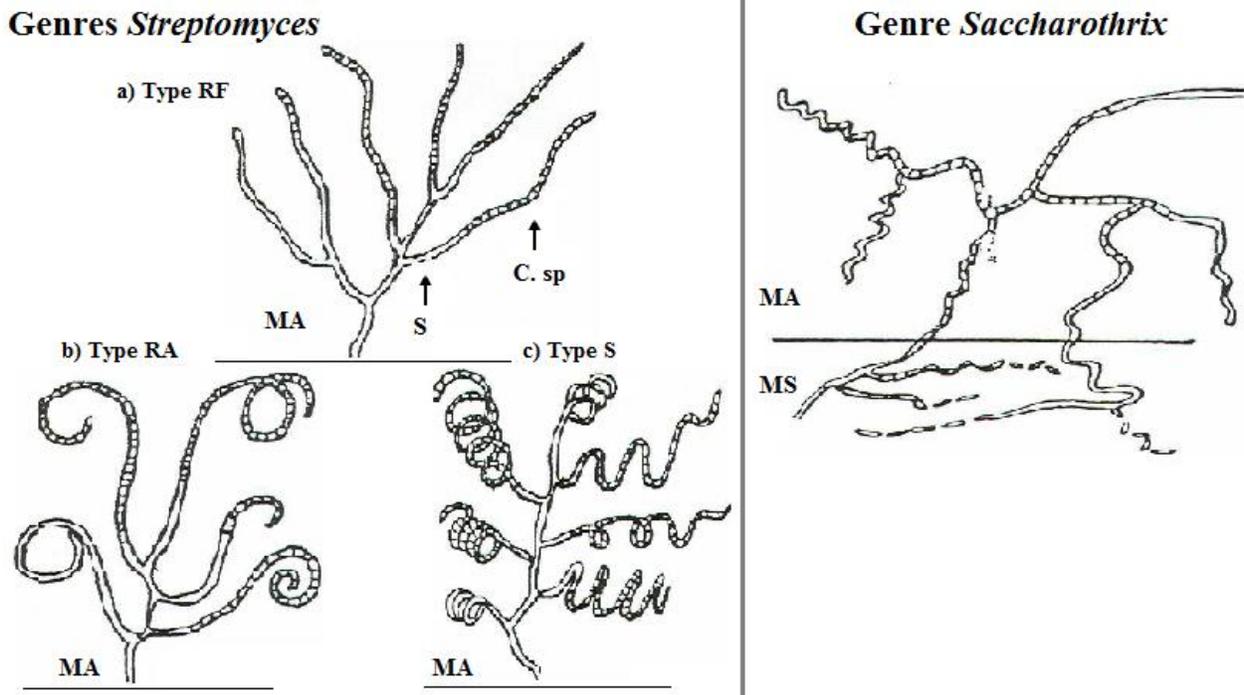


Figure 1.1: Comparaison de la micromorphologie des deux genres *Saccharothrix* et *Streptomyces* (Bergey, 1989). (MA : Mycélium aérien ; MS : Mycélium du substrat ; RF : *Rectus Flexibilis* (chaînes de spores droites à flexueuses) ; RA : *Retinaculum Apertum* (chaînes de spores en crochets ou en boucles fermées) ; Type S : *Spira* (chaînes spiralées) ; S : Sporophore (organe de fructification) ; C. sp : Chaîne de spores).

Plusieurs espèces de *Saccharothrix* furent décrites quelques années après la création de ce genre, grâce à la taxonomie numérique et moléculaire basée sur le séquençage de l'ADNr 16S et l'hybridation ADN-ADN. Certaines espèces ont été ainsi reclassées dans le genre *Saccharothrix* : *S. waywayendensis* et *S. aerocolonigensis* rattachées au genre *Lentzea* créé par Yassin *et al.* (1995), *S. flava* rattachée à *Lechevalieria* créé par Labeda *et al.* (2001) (Yassin *et al.*, 1995 ; Labeda *et al.*, 2001). Actuellement, le genre *Saccharothrix* compte 23 espèces (Tableau 1.1).

Tableau 1.1: Espèces du genre *Saccharothrix*, d'après le National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>).

<b>Espèce</b>	<b>Numéros d'accès dans les collections</b>	<b>Références</b>
<i>Saccharothrix algeriensis</i>	NRRL B-24137, NBRC 101915, JCM 13242, DSM 44581	(Zitouni et al., 2004 b)
<i>Saccharothrix australiensis</i>	NRRL 11239, NBRC 14444, JCM 3370, DSM 43800, ATCC 31497, IFO 14444, VKM Ac-894	(Labeda et al., 1984)
<i>Saccharothrix carnea</i>	DSM 45878, CGMCC 4.7097	(Liu et al., 2014)
<i>Saccharothrix coeruleofusca</i>	NRRL B-16115, DSM 43679, NBRC 14520, JCM 3313, INA 1335, IFO 14520, ATCC 35108	(Labeda et Lechevalier, 1989)
<i>Saccharothrix ecbatanensis</i>	DSM 45486, UTMC 00537, CCUG 63021	(Hamedi et al., 2015)
<i>Saccharothrix espanaensis</i>	NRRL 15764, ATCC 51144, DSM 44229	(Labeda et Lechevalier, 1989)
<i>Saccharothrix flavoverrucoides</i>	Taxonomy ID: 104214	(Wang et al., 1999)
<i>Saccharothrix ghardaiensis</i>	DSM 46886, CECT 9046	(Bouznada et al., 2017)
<i>Saccharothrix hoggarensis</i>	DSM 45457, CCUG 60214	(Boubetra et al., 2013)
<i>Saccharothrix isguenensis</i>	DSM 46885, CECT 9045	(Bouznada et al., 2016)
<i>Saccharothrix longispora</i>	NRRL B-16116, DSM 43749, NBRC 14522, JCM 3314, ATCC 35109, IFO 14522, INA 10222, VKM Ac-907	(Labeda et Lechevalier, 1989)
<i>Saccharothrix lopnurensis</i>	YIM LPA2h, KCTC 39545, CGMCC 4.7246	(Li et al., 2015)
<i>Saccharothrix mutabilis</i>		
<i>Saccharothrix mutabilis subsp. capreolus</i>	NRRL 2773, DSM 40225, NBRC 12847, JCM 4630, JCM 4248, IFO 12847, ATCC 23892	(Grund et Kroppenstedt, 1989)

<i>Saccharothrix mutabilis subsp. mutabilis</i>	NRRL B-16077, ATCC 31520, DSM 43853, IFO 14310, IFM 240	(Labeda et Lechevalier, 1989)
<i>Saccharothrix saharensis</i>	DSM 45456, CCUG 60213	(Boubetra et al., 2013)
<i>Saccharothrix stipae</i>	JCM 30560, ACCC 19714	(Guo et al., 2016)
<i>Saccharothrix syringae</i>	NRRL B-16468, DSM 43886, NBRC 14523, JCM 6844, INA 2240, ATCC 51364, IFO 14523, VKM Ac-1858	(Labeda et Lechevalier, 1989)
<i>Saccharothrix tamanrassetensis</i>	DSM 45947, CECT 8640	(Boubetra et al., 2015)
<i>Saccharothrix texasensis</i>	NRRL B-16134, DSM 44231, NBRC 14971, JCM 9113, IFO 14971, ATCC 51593, VKM Ac-1968	(Labeda et Lechevalier, 1989)
<i>Saccharothrix variispora</i>	NRRL B-16296, DSM 43911, NBRC 14104, JCM 3273, IFO 14104, ATCC 31203, KCC A-0274	(Kim et al., 2011)
<i>Saccharothrix violaceirubra</i>	NBRC 102064, JCM 16955, KCTC 19326	(Otoguro et al., 2009)
<i>Saccharothrix xinjiangensis</i>	NBRC 101911, JCM 12329, AS 4.1731	(Hu et al., 2004)
<i>Saccharothrix yanglingensis</i>	KCTC 19722, CGMCC 4.5627	(Yan et al., 2012)

Les espèces du genre *Saccharothrix* sont capables de produire divers métabolites secondaires d'intérêt tels que les biocides tels que des benzoquinones, des aminoglycosides, des glycopeptides, des alcaloïdes, des composés phosphorés acides et hydrophiles, des hétérocycles azotés et soufrés (lactames), des heptadecaglycosides, des macrolides, des anthracyclines et des nucléosides carbocycliques (Zitouni et al., 2004 a ; Tsurumi et al., 1995 ; Takahashi et al., 1986 ; Takeuchi et al., 1992 ; Bush et al., 1993). Certains de ces biocides possèdent seulement une activité antibactérienne (surtout contre les bactéries à Gram positif) tels que les galacardines, ou antifongique et antibactérienne à la fois, tels que les dithiolyrrolones, la formamycine et la dopsisamine, ou seulement antifongique comme la thiazolylpyridine.

Notre travail porte sur l'espèce *Saccharothrix algeriensis*, une espèce productrice de dérivés dithiolyrrolones, à laquelle nous consacrons la partie suivante de ce chapitre.

### 1.1.1. *Saccharothrix algeriensis*

#### 1.1.1.1. Position taxonomique et caractéristiques

Isolée en 1992 à partir d'un échantillon de sol prélevé d'une oasis du Sud-Ouest algérien (à Adrar), *Saccharothrix algeriensis* a été identifiée et classée dans le genre *Nocardiopsis* (Boudjella, 1994). Elle a été reclassée par la suite dans le genre *Saccharothrix* dont elle possède la micromorphologie typique. Suite à une analyse phylogénétique (séquençage de l'ADNr 16S et taux d'hybridation ADN-ADN) suivie d'une taxonomie numérique, incluant 77 tests physiologiques, des différences ont été mises en évidence entre *S. algeriensis* et les autres espèces connues du genre. Elle fut ainsi nommée *Saccharothrix algeriensis* par Zitouni et al. en 2004 et déposée dans deux collections mondiales : Leibniz-Institut DSMZ (« Leibniz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen ») et ARC culture (« Agricultural Research Service Culture ») sous les numéros d'accessions DSM 44581 et NRRL B-24137. Le numéro d'accession de la séquence ARN 16S est le AY054972 (Zitouni et al., 2004 b). La position taxonomique de *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 est indiquée dans le Tableau 1.2.

Tableau 1.2: Position taxonomique de *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137.

<b>Taxon</b>	<b>Position</b>
<b>Domaine</b>	<i>Bacteria</i>
<b>Phylum (Embranchement)</b>	<i>Actinobacteria</i>
<b>Classe</b>	<i>Actinobacteria</i>
<b>Sous-classe</b>	<i>Actinobacteridae</i>
<b>Ordre</b>	<i>Actinomycetales</i>
<b>Sous-ordre</b>	<i>Pseudonocardineae</i>
<b>Famille</b>	<i>Actinosynnemataceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Saccharothrix</i>
<b>Espèce</b>	<i>algeriensis</i>

Au niveau morphologique, *Saccharothrix algeriensis* forme un mycélium aérien abondant de couleur jaune-orange sur milieu Bennet, ISP2 et ISP5. La fragmentation de celui-ci donne des spores sous forme de bâtonnets ou ovoïdes non mobiles et à surface lisse (Figure 1.2). Le mycélium du substrat est ramifié de couleur jaune vif, jaune-orange ou jaune-marron, en fonction du milieu de culture utilisé, mais ne se fragmente pas ou peu en milieu liquide comme en milieu solide. Des pigments solubles non mélaniques de même couleur sont abondamment sécrétés (Zitouni et al., 2004 b).

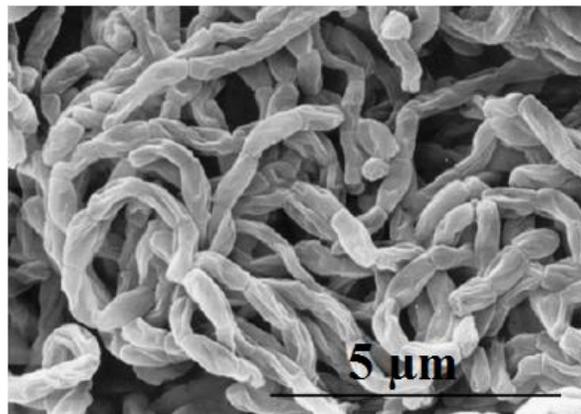


Figure 1.2: Micrographie électronique des chaînes de spores de *Saccharothrix algeriensis* SA 233<sup>T</sup> après 10 jours de culture sur milieu ISP2 à 30 °C (extrait de l'article de Zitouni et al., 2004 b).

*Saccharothrix algeriensis* est aérobie, à Gram-positif et catalase-positive. Sa paroi cellulaire est de type III composée d'acide *méso*-diaminopimélique, de galactose, de mannose et de rhamnose. Les phospholipides membranaires sont de type P IV (phosphatidyl-éthanolamine et hydroxy-éthanolamine contenant de la glucosamine) (§1.1).

L'acide gras membranaire prédominant est l'acide palmitique (iso-C<sub>16:0</sub>) soit 31,26 % du total des acides gras. Les acides pentadécylique (iso-C<sub>15:0</sub>) et myristique (iso-C<sub>14:0</sub>) sont également présents alors que les acides mycoliques sont absents (Tableau 1.3).

Tableau 1.3: Profil des acides gras constituant la paroi de *S. algeriensis* NRRL b-24137 (Zitouni et al., 2004 b).

<b>Acide gras</b>	<b>Pourcentage par rapport aux acides gras membranaires totaux (%)</b>
<b>iso-C<sub>14:0</sub></b>	3,46
<b>iso-C<sub>15:0</sub></b>	10,06
<b>anteiso-C<sub>15:0</sub></b>	1,8
<b>C<sub>15:1</sub> B</b>	2,11
<b>iso-C<sub>16:1</sub> H</b>	14
<b>iso-C<sub>16:0</sub></b>	31,26
<b>cis-9-C<sub>16:1</sub></b>	3,92
<b>9-méthyl-C<sub>16:0</sub></b>	3,42
<b>iso-C<sub>17:0</sub></b>	1,65
<b>anteiso-C<sub>17:0</sub></b>	3
<b>cis-9-C<sub>17:1</sub></b>	7,37
<b>iso-2-hydroxy-C<sub>16:0</sub></b>	10,44
<b>10-méthyl-C<sub>17:0</sub></b>	1,13

*Saccharothrix algeriensis* peut se développer dans un milieu dont la gamme de pH est comprise entre 5 et 9 et sur une gamme de température allant de 18 à 45 °C mais pas en-dessus de 48 °C. Elle utilise le D-fructose, le D-galactose, le D-glucose, le maltose, le D-tréhalose, le glycérol, l'acétate, le citrate, le pyruvate, le succinate comme source de carbone. Elle est capable d'hydrolyser la caséine, la gélatine, l'esculine, la tyrosine et le Tween 80 et elle possède la nitrate réductase. Les principales différences des propriétés physiologiques entre *S. algeriensis* et quelques espèces du genre *Saccharothrix* sont regroupées dans le Tableau 1.4 (Zitouni et al., 2004 b).

Chapitre 1 : Revue bibliographique.

Tableau 1.4: Tableau comparatif des différentes propriétés physiologiques de quelques espèces appartenant au genre *Saccharothrix*. (1 : *S. algeriensis* ; 2 : *S. australiensis* ; 3 : *S. coeruleofuscus* ; 4 : *S. coeruleoviolacea* ; 5 : *S. espanaensis* ; 6 : *S. longispora* ; 7 : *S. mutabilis* subsp. *mutabilis* ; 8 : *S. mutabilis* subsp. *capreolus* ; 9 : *S. syringae* ; 10 : *S. tangerinus* ; 11 : *S. texasensis* ; (-) : réaction négative ; (+) : réaction positive ; f : réaction positive faible) (Zitouni et al., 2004 b).

Caractéristique	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Décomposition de :</b>											
Adénine	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Amidon	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Hypoxanthine	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
Tyrosine	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<b>Assimilation du citrate</b>											
	+	-	-	+	f	+	+	-	-	+	-
<b>Production de :</b>											
Nitrate réductase	+	+	-	+	f	+	+	-	-	-	+
Pigments solubles	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
<b>Production d'acide à partir de :</b>											
Arabinose	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Dextrine	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
Lactose	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Melibiose	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
Méthyle $\alpha$ -D-glucoside	-	-	+	f	-	-	+	-	-	f	+
Raffinose	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
Rhamnose	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Saccharose	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Xylose	-	-	+	+	f	+	+	+	+	+	+
<b>Croissance en présence de :</b>											
4 % NaCl	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
5 % NaCl	-	-	+	-	-	+	-	+	+	f	-
<b>Croissance à :</b>											
37 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
45 °C	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-

#### 1.1.1.2. Activités biologiques de *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137

*S. algeriensis* présente des activités biologiques contre les bactéries à Gram-positif, à Gram négatif, les champignons filamenteux et les levures. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 1.5. L'activité bactéricide est moins marquée contre les bactéries à Gram négatif (à l'exception de *Klebsiella pneumoniae*) que celles à Gram positif (à l'exception d'*Enterococcus faecalis*). Toutefois, la seule bactérie testée montrant une absence totale de sensibilité à *S. algeriensis* est *Pseudomonas aeruginosa*. L'activité antifongique de *S. algeriensis* est importante contre les champignons filamenteux phytopathogènes (tels que ceux du genre *Fusarium*, notamment l'espèce *Fusarium oxysporum* (Merrouche et al., 2017)) et toxigènes (tels que *Mucor ramannianus*), et moyenne contre les levures (*Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*) (Zitouni, 1995).

Cette activité antifongique a été également valorisée dans le biocontrôle direct contre l'agent phytopathogène de la vigne *Botrytis cinerea*. En effet, *S. algeriensis* est capable de coloniser les cellules racinaires de la plante et de réduire le nombre de feuilles infectées par *Botrytis cinerea* (Muzammil, 2012 ; Compant et al., 2013 ; Muzammil et al., 2014).

Ces activités biologiques sont dues à des composés sécrétés par *S. algeriensis* identifiés comme étant des dithiopyrrolones, qui font l'objet du paragraphe suivant.

Tableau 1.5: Activités biologiques de *Saccharothrix algeriensis* sur milieu ISP2 déterminée par la méthode des stries croisées. L'intensité de l'activité biologique est fonction du diamètre de la zone d'inhibition de croissance en mm : (-) pas de zone, (+) zone de 2 à 9 mm, (++) zone de 10 à 19 mm, (+++) zone de diamètre supérieur à 19 mm (Lamari, 2006).

Espèce cible	Activité biologique	Espèce cible	Activité biologique
<b>Bactérie à Gram +</b>		<b>Champignons filamenteux</b>	
<i>Bacillus subtilis</i>	++	<i>Alternaria sp.</i>	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	<i>Aspergillus niger</i>	+
<i>Micrococcus luteus</i>	+++	<i>Botrytis cinerea</i>	++
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	<i>Fusarium culmorum</i>	+
<b>Bactérie à Gram -</b>		<i>Fusarium graminearum</i>	+
<i>Alcaligenes faecalis</i>	+	<i>Fusarium oxysporum f. sp. albedinis</i>	++
<i>Escherichia coli</i>	++	<i>Fusarium oxysporum f. sp. ciceri</i>	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+++	<i>Fusarium oxysporum f. sp. lentis</i>	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+	<i>Fusarium oxysporum f. sp. lini</i>	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i>	++
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	<i>Geotrichum candidum</i>	++
<i>Serratia marcescens</i>	+	<i>Mucor ramannianus</i>	+++
<b>Levures</b>		<i>Penicillium purpureum</i>	++
<i>Candida albicans</i>	+	<i>Penicillium sp.</i>	++
<i>Debaryomyces subglobosus</i>	+	<i>Pythium irregulare</i>	++
<i>Kluyveromyces lactis</i>	+	<i>Rhizoctonia solani</i>	++
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	<i>Sclerotium sclerotiorum</i>	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	++	<i>Thielaviopsis neocaledoniae</i>	+++
		<i>Verticillium sp.</i>	++

## 1.2. Les Dithiopyrrolones

### 1.2.1. Définition et propriétés structurales

Les dithiopyrrolones sont des biocides d'origine naturelle caractérisés par un noyau hétérocyclique de type 1,2-dithiolo-[4-3-*b*]-pyrrol-5-(4H)-one, aussi appelés pyrrolinodithiole ou pyrroloisothiazole. La structure de ces dérivés est formée de deux cycles pentanoïques : un cycle pyrrole portant des radicaux liés aux azotes 4 et 7, et un cycle dithiole (Figure 1.3.A).

Selon la nature du radical (R1) relié à l'azote en position 4 du cycle pyrrole, deux familles de dithiopyrrolones, d'origine biologique, sont distinguées : la famille des dérivés holothine (R1 = H) et celle des dérivés pyrrothine qui portent un groupement méthyl (-CH<sub>3</sub>). Une sous-famille de dérivés holothine existe sous le nom des thiomarinols. Ce sont des dérivés hybrides composés d'un analogue de l'acide pseudomonique C lié par une liaison amide au noyau holothine (Shiozawa et al., 1993).

Plusieurs dérivés naturels des deux familles principales ont été identifiés, ils diffèrent par le radical porté sur l'azote en position 7. Par ailleurs, d'autres dérivés ont été synthétisés à partir des précurseurs chimiques tels que la pyrrothine.

#### 1.2.1.1. Dithiopyrrolones sécrétés par *Saccharothrix algeriensis*

Les travaux réalisés par Zitouni en 1995 ont mis en évidence la présence dans le filtrat de culture de *S. algeriensis* de composés extractibles par le dichlorométhane. Par séparation sur chromatographie sur couche mince (CCM) apparaissaient deux taches de couleur jaune vif. L'analyse des composés par spectroscopie (UV-visible, IR, RMN et MS) a révélé la présence de six produits appartenant à la famille des dithiopyrrolones : la thiolutine, l'isobutyryl-pyrrothine, le butanoyl-pyrrothine, la benzoyl-pyrrothine, la sénécioyl-pyrrothine et la tigloyl-pyrrothine (Lamari et al., 2002) (Figure 1.3.B).

*S. algeriensis* est actuellement le seul taxon de son genre capable de produire des dithiopyrrolones. Sur milieu ISP2, la thiolutine est le dithiopyrrolone majoritairement produit par *S. algeriensis* (Bouras et al., 2008 ; Merrouche et al., 2011). Toutefois, cette dernière est capable de biosynthétiser différents dérivés à partir d'acides organiques tels que l'acide valérique, l'acide sorbique et benzoïque (Bouras et al., 2008).

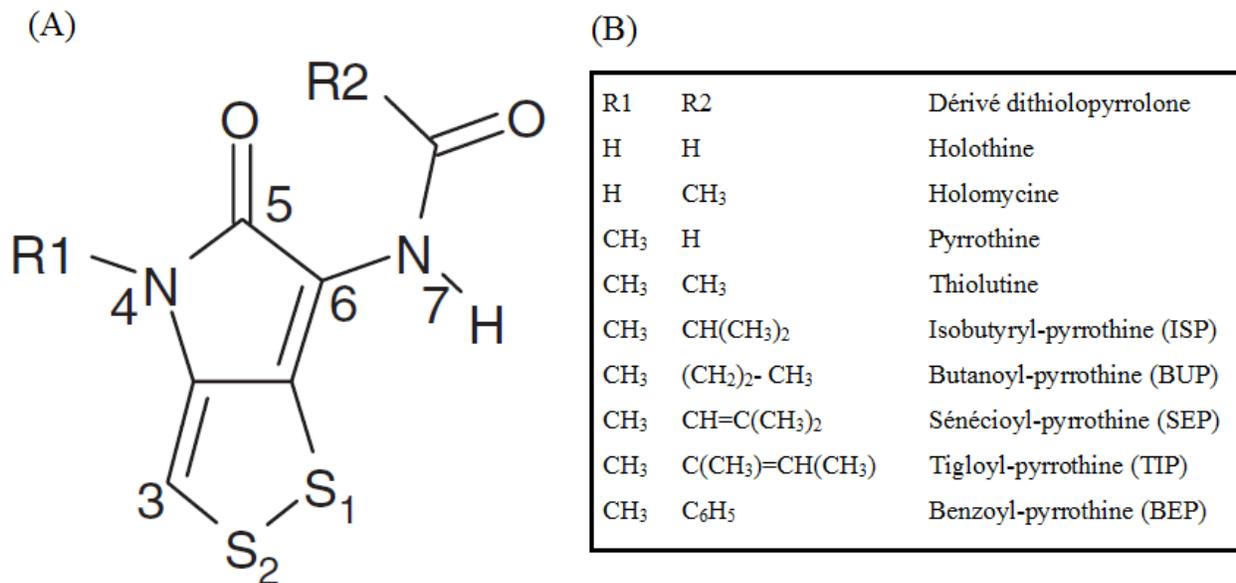


Figure 1.3: (A). Structure générale des dithiopyrrolones d'origine biologique : le noyau pyrrolinodithiolenone et ses radicaux R1 et R2. (B). Dérivés dithiopyrrolones dont ceux produits par *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 sur milieu ISP2 et complètement caractérisés (Bouras et al., 2008).

### 1.2.2. Propriétés physico-chimiques des dithiopyrrolones diversement substituées

Les principales propriétés physico-chimiques de quelques dérivés de dithiopyrrolones sont présentées dans le Tableau 1.6.

Tableau 1.6: Propriétés physico-chimiques et spectroscopiques de quelques dérivés de dithiopyrrolones (d'après (Celmer & Solomons, 1955 ; Okamura et al., 1977 ; Lamari et al., 2002) ).

	<b>Thiolutine</b>	<b>Seneciocyl-pyrrothine</b>	<b>Tigloyl-pyrrothine</b>	<b>Butanoyl-pyrrothine</b>	<b>Holomycine</b>
<b>Couleur</b>	jaune	jaune-orange	jaune-orange	jaune-orange	jaune-orange
<b>Formule brute</b>	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>
<b>Solubilité</b>					
<b>Soluble</b>	MeOH, EtOH, CHCl <sub>3</sub> , acétone, CH <sub>3</sub> COOH glacial, MIBC, DMSO	MeOH, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , DMSO, CHCl <sub>3</sub>	MeOH, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , DMSO, CHCl <sub>3</sub>	MeOH, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , DMSO, CHCl <sub>3</sub>	
<b>Légèrement soluble</b>	H <sub>2</sub> O	Me <sub>2</sub> CO, H <sub>2</sub> O, EtOAc, CH <sub>3</sub> CN	Me <sub>2</sub> CO, H <sub>2</sub> O, EtOAc, CH <sub>3</sub> CN	Me <sub>2</sub> CO, H <sub>2</sub> O, EtOAc, CH <sub>3</sub> CN	
<b>Peu soluble</b>	Éther, benzène, hexane				
<b>Insoluble</b>		Hexane	Hexane	Hexane	
<b>UV dans le MeOH: λ max en nm (log ε)</b>	250 (3,80), 311 (3,75), 388 (4,04)	302 (3,87), 402 (3,97)	302 (3,85), 402 (3,96)	308 (3,70), 389 (3,92)	246 (3,81), 302 (3,49), 388 (4,05)
<b>IR dans le KBr: ν max en cm<sup>-1</sup></b>	1550, 1600, 1633, 1666, 3205	1225, 1520, 1600, 1635, 1655, 1680, 3270	1210, 1500, 1600, 1650, 1670, 3220	1225, 1540, 1600, 1650, 1680, 3280	1553, 1600, 1639, 1661, 3225
<b>EI-MS (m/z)</b>		268 (M <sup>+</sup> ), 186, 83, 55	268 (M <sup>+</sup> ), 186, 83, 55	256 (M <sup>+</sup> ), 186, 43	214 (M <sup>+</sup> ), 172, 43

### 1.2.3. Source de production des dithiopyrrolones

#### 1.2.3.1. Synthèse chimique

Trois dérivés de dithiopyrrolones : la thiolutine, l'auréothricine et l'holomycine ont été synthétisées totalement par voie chimique dès 1962 par Schmidt et Geiger. Depuis différentes approches ont été utilisées pour la synthèse chimique totale des dithiopyrrolones mais les voies de synthèse utilisées restaient complexes (7 étapes au moins). Des voies de synthèse simplifiées permettant par ailleurs de multiplier les composés synthétisés ont été aussi rapportées. À titre d'exemple, Hjelmgaard et al. (2007) ont réussi à proposer une voie de synthèse en six étapes permettant de synthétiser différentes dithiopyrrolones (R1= H, R2 variable) grâce à l'acylation de l'intermédiaire holothine à l'aide de chlorures d'acyle. En outre, Li et al.(2007) ont élaboré une voie de synthèse en six étapes qui permet de diversifier à la fois les radicaux R1 et R2 fixés sur le noyau pyrrolinodithiole mais cette voie nécessite l'usage de composés toxiques et polluants tels que l'acétate de mercure (Hjelmgaard & Nielsen, 2007 ; Li et al., 2007 ; Li et al., 2014).

Au sein de l'équipe de chimie du LGC, la synthèse de la pyrrothine, a été réalisée, par adaptation du protocole décrit par Hjelmgaard et al. (2007) pour la synthèse de l'holothine et de ses dérivés dithiopyrrolones, suivant le schéma présenté sur la Figure 1.4. Le groupement méthyle porté par l'azote cyclique est introduit lors de l'étape (b) en remplaçant la p-méthoxybenzylamine par de la méthylamine (Li et al., 2007). Finalement, le groupement amide de la trifluoroacétyl-pyrrothine (composé **5**) est hydrolysé à reflux dans le méthanol en présence d'HCl aqueux concentré (étape f) pour permettre l'obtention de la pyrrothine (composé **6**) qui est récupérée par filtration sous forme d'une poudre de couleur orangé- brun. Le rendement global est de 3,53 % (Chorin, 2009).

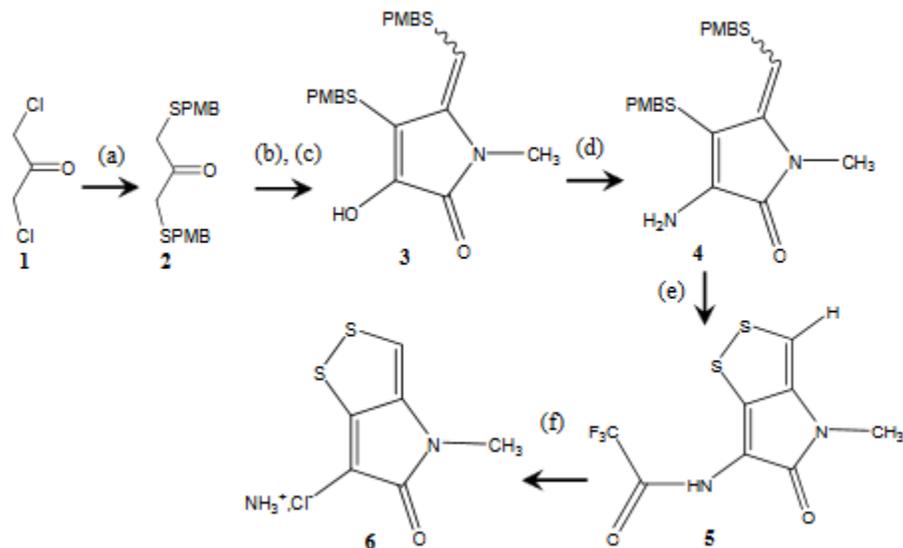


Figure 1.4 : Synthèse de la pyrrothine. – Étapes (a) méthoxyde de sodium (NaOMe, 2eq.), p-méthoxybenzylthiol (PMBS, 2eq.), éthanol, reflux, 100 %, (b) méthylamine (MeNH<sub>2</sub>), Et<sub>3</sub>N, THF, TiCl<sub>4</sub>, heptane, (c) chlorure d'oxalyle (2eq.), Et<sub>3</sub>N, THF, 31,4 %, (d) Acétate d'ammonium, éthanol, reflux, 53,6 %, (e) m-crésol (10 eq.), TFA, reflux, 42,3 %, (f) HCl(aq), MeOH, reflux, 49,6 %.

### 1.2.3.2. Source Biologique

Divers microorganismes produisent des dérivés dithiopyrrolones parmi lesquels existent des bactéries à Gram positif telles que celles du genre *Streptomyces* (*S. thioluteus*, *S. clavuligerus*) et des bactéries à Gram négatif telles que les bactéries marines *Photobacterium halotolerans* productrice de l'holomycine et *Pseudoalteromonas* sp SANK 73390 productrice de thiomarinoles et xenorhabdines (Zhai et al., 2016 ; Huang et al., 2011 ; Wietz et al., 2010 ; Murphy et al., 2011). D'autres sources biologiques de dithiopyrrolones existent notamment des bactéries non mycéliennes comme *Xenorhabdus bovienni*, *Xenorhabdus luminescens*, *Xenorhabdus nematophilus*, et des bactéries mycéliennes telles que *Saccharothrix algeriensis* (Isaacson & Webster, 2000 ; Zitouni et al., 2004 b).

#### 1.2.3.2.1. Biosynthèse des dithiopyrrolones

Les premières recherches menées pour tenter d'expliquer les voies de biosynthèse des dithiopyrrolones datent de 1982. *Streptomyces kasugaensis* était le premier microorganisme utilisé par Furumai en 1982 pour étudier la voie de biosynthèse de l'auréothricine (propionyl-pyrrothine) (Furumai et al., 1982). À l'issue de ses travaux, Furumai émettait l'hypothèse selon laquelle la première étape de synthèse de l'auréothricine est la formation du noyau pyrrothine par l'association de deux cystéines formant ainsi la L-cystine, le précurseur du noyau.

La dernière étape est la formation d'une liaison amide entre un acide organique activé sous forme d'acétyl-CoA et le noyau pyrrothine (Figure 1.5).

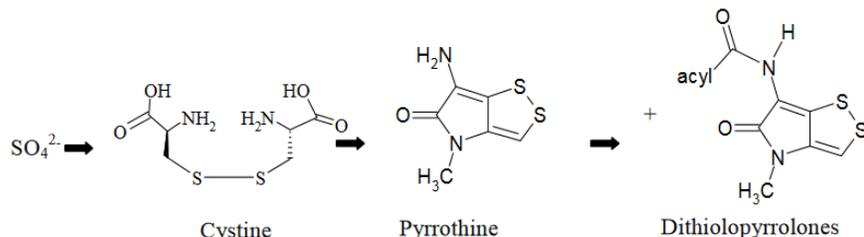


Figure 1.5: Voie de biosynthèse potentielle des dithiopyrrolones d'après Furumai et al. 1982.

Cette hypothèse a été confirmée par les essais de Fuente et al. (2002) près de vingt ans après. Fuente a travaillé sur la biosynthèse de l'holomycine chez *Streptomyces clavuligerus* et a prouvé l'existence d'une enzyme catalysant l'acylation de l'acétyl-CoA avec le noyau holothine. Ensuite, Huang et al. (2011) ont caractérisé génétiquement et biochimiquement le cluster de gènes de la voie de biosynthèse de l'holomycine (hlm). Ce cluster (Figure 1.6) comprend des gènes codant une NRPS multidomaine (Non-Ribosomal Peptide synthase), une thioestérase, une globine, une acétyltransférase, une lantibiotic décarboxylase, une glucose-méthanol-choline oxydoréductase et une acyl-CoA déshydrogénase (Huang et al., 2011).

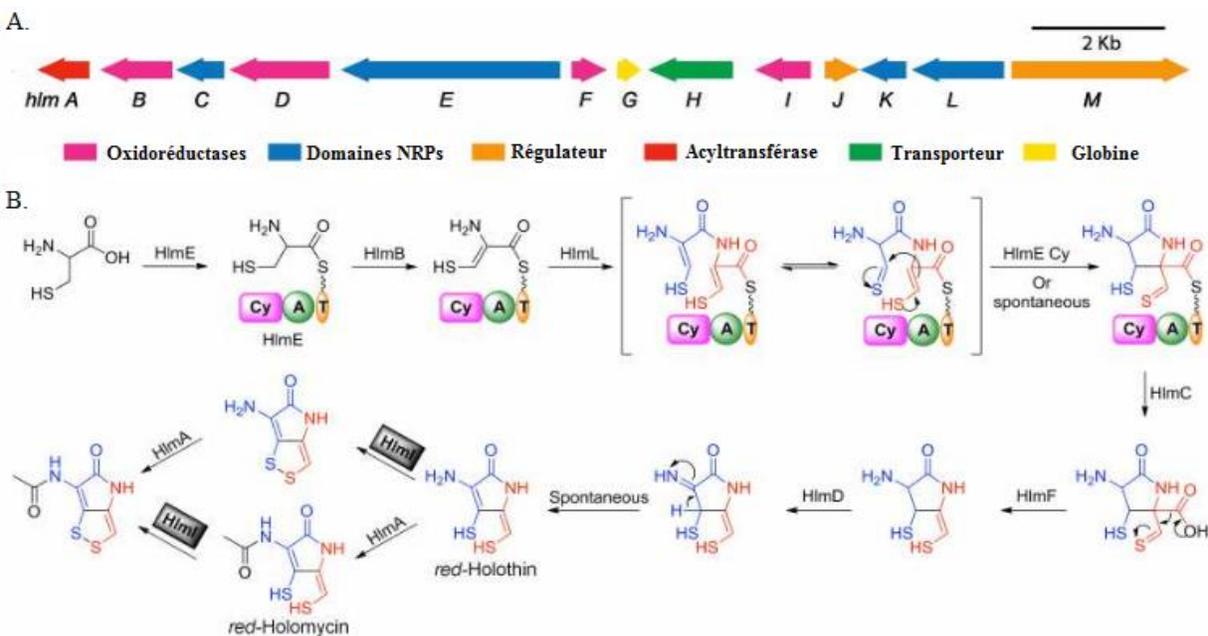


Figure 1.6: Le cluster de gènes de la voie de biosynthèse de l'holomycine chez *S. clavuligerus*. **A**, Les gènes sont colorés selon la fonction. hlmA, acyltransférase; hlmB, acyl-CoA déshydrogénase; hlmC, thioestérase; hlmD, glucose-méthanol-choline oxydoréductase; hlmE, NRPS (Cyclization-Adenylation-Thiolation, Cy-A-T); hlmF, lantibiotic décarboxylase; hlmG, globine; hlmH, major facilitator family transporter; hlmI, thiorédoxine-désulfite oxydoréductase; hlmJ, hlmM, régulateurs transcriptionnels; hlmK, domaine thioestérase inactive; hlmL, domaine de condensation (Li & Walsh, 2011). **B**, la voie de biosynthèse de l'holomycine proposée par Li & Walsh (2011)

Par la suite d'autres microorganismes tels que *Pseudoaltermonas* sp SANK 73390 et *Yersinia ruckeri* ont servi comme modèles pour étudier la voie de biosynthèse de l'holomycine (Qin et al., 2013 ; Murphy et al., 2011).

La comparaison des clusters de gènes de la voie de biosynthèse des dérivés de la pyrrothine chez *Saccharothrix algeriensis* met en évidence des gènes communs montrant que les étapes essentielles pour la synthèse des dérivés dithiopyrrolones sont uniques avec des variations mineures selon le microorganisme. La principale différence entre ces clusters est l'absence chez les bactéries à Gram-négatif de deux gènes l'un codant la thiorédoxine réductase et l'autre codant un domaine de condensation (Figure 1.7) (Zhai et al., 2016).

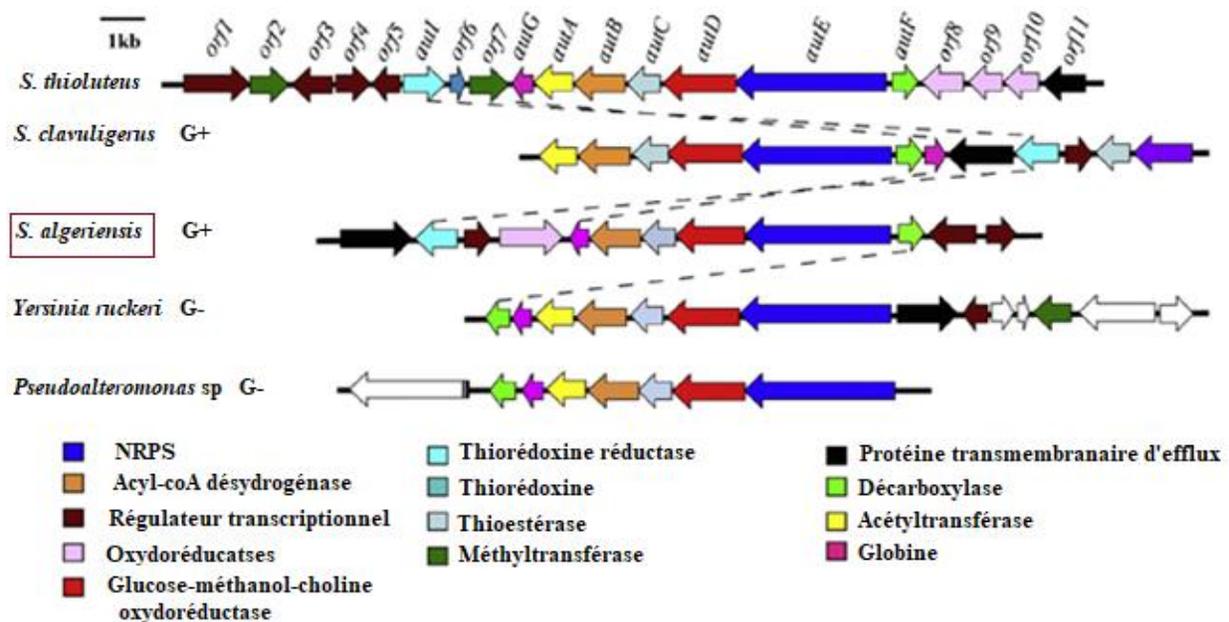


Figure 1.7: Comparaison des gènes de biosynthèse de microorganismes producteurs de dithiopyrrolones (extrait de l'article de Zhai et al., 2016).

Quant à la voie de biosynthèse de la thiolutine par *Saccharothrix algeriensis*, Huang (2015) ainsi que Saker (2014) s'y sont intéressés et ont proposé un cluster nommé dtp (ou thi, comme thioluthine) de 15,2 kb de longueur (Huang et al., 2015 ; Saker et al., 2014). D'après les travaux de Huang (2015), le séquençage du cluster dtp chez *S. algeriensis* révèle la présence de dix gènes notés dtpA à dtpJ qui constituent une cassette génique ayant un fort pourcentage d'homologie avec ceux présents chez les autres microorganismes producteurs de dithiopyrrolones.

Parmi ces gènes, le *dtpH* code pour un régulateur transcriptionnel de la famille XRE « Xenobiotic Response Element » de *Streptomyces mobaraensis* et *dtpG* qui code pour une formimycine A-*N*-formimidoyltransférase dont leurs rôles dans la biosynthèse des dithiopyrrolones reste encore non élucidés (Huang et al., 2015).

Les gènes de ce cluster sont similaires à ceux codant pour l'holomycine sauf que deux gènes codant les acyl-transférases, nommés putativement par Saker ActA et ActB, sont situés en dehors de ce cluster. L'analyse enzymatique réalisée par Saker montre que l'acylation de l'atome en position 4 serait probablement la dernière étape de la voie de biosynthèse de la thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis* (Saker et al., 2014). En outre l'étude du cluster de biosynthèse des dithiopyrrolones par Saker a montré la présence de deux régulateurs transcriptionnels putatifs nommés *thiM* et *thiL* (Tableau 1.7). Le gène *thiM* possède une similarité avec deux types de régulateurs : un régulateur de la famille MerR impliqué dans la résistance au mercure II chez les bactéries à Gram négatif et un régulateur de type LuxR chez *S. clavuligerus* (Saker, 2013). Les régulateurs de la famille MerR sont divisés en deux groupes : un groupe de régulateurs sensibles aux stress oxydatifs (comme SoxR) et un groupe de protéines sensibles aux composés aromatiques et biologiques toxiques. Le gène *thiL* code pour un régulateur de la streptomycine (StrR) qui est notamment connu chez *S. griseus*. StrR joue un rôle d'activateur spécifique du cluster de la biosynthèse de la streptomycine et fait partie de la régulation en cascade du facteur A dirigé par le gène *adpA* (Saker, 2013).

Il est fort probable que le cluster *dtp* chez les souches productrices des dithiopyrrolones-type thiolutine comme *S. algeriensis*, a pour origine un transfert horizontal d'une souche productrice de dérivés dithiopyrrolones-type holomycine. Ce donneur transgénique pourrait contenir une *N*-méthyltransférase avec des spécificités vis-à-vis des substrats tels que la fonction amide *N*-transférase qui pourrait reconnaître l'holomycine et ses dérivés comme étant des substrats non spécifiques pour la production des dérivés type thiolutine. Une raison derrière ce point de vue évolutif est que la *N*-méthylation de l'amide chez les souches productrices augmente la perméabilité membranaire des composés modifiés réduisant ainsi leur toxicité comme cela a été prouvé dans le cas de la gliotoxine et d'autres peptides *N*-méthylés (Huang et al., 2015).

Tableau 1.7: Les gènes du cluster thi de la biosynthèse des dithiopyrrolones par *S. algeriensis* et leurs fonctions (d'après Saker, 2013).

ORF	Homologie entre protéines et origine								Fonction proposée
	<i>S. clavuligerus</i>	Identité/ similarité (%)	<i>X. bovineii</i> SS-2004	Identité/ similarité (%)	<i>Y. ruckeri</i> ATCC 29473	Identité/ similarité (%)	<i>Pseudoalteromonas sp</i> SANK 73390	Identité/ similarité (%)	
<i>thiB</i>	SSCG_03485	72/82	XBJI_1749	54/74	ZP_04616955.1	56/71	YP_004661190.1	54/72	Acyl-coA déshydrogénase
<i>thiC</i>	SSCG_03486	52/65	XBJI_1750	38/56	ZP_04616956.1	32/50	YP_004661189.1	33/52	Domaine thioestérase
<i>thiD</i>	SSCG_03487	62/72	XBJI_1751	47/64	ZP_04616957.1	45/60	YP_004661188.1	44/62	Glucose-Méthanol- Choline Oxydoréductase
<i>thiE</i>	SSCG_03488	64/75	XBJI_1752	45/63	ZP_04616958.1	45/60	YP_004661187.1	44/60	NRPS
<i>thiF</i>	SSCG_03489	63/78	XBJI_1746	52/73	ZP_04616952.1	57/74	YP_004661193.1	54/72	Lantibiotique décarboxylase
<i>thiG</i>	SSCG_03490	63/78	XBJI_1748	58/73	WP_004721321.1	59/67	YP_004661192.1	58/72	Globine
<i>thiH</i>	SSCG_03491	28/32			WP_004721322.1	23/27			Transporteur MFS
<i>thiI</i>	SSCG_03492	69/78							Thiorédoxine réductase
<i>thiJ</i>	SSCG_03493	67/83							Protéine régulatrice
<i>thiK</i>	<i>S. tenjimariensis</i> CAH60155.1	52/67							N-formimidoyl synthase
<i>thiL</i>	<i>S. glaucescens</i>	53/66							Régulateur de la streptomycine
<i>thiM</i>	SCLAV_05211	37/52							Régulateur transcriptionnel de la famille MerR

### 1.2.4. Mécanisme d'action des dithiopyrrolones

Les recherches sur le mécanisme d'action des dithiopyrrolones sont peu nombreuses mais récemment, une étude menée par Chan et al. (2017) propose un schéma hypothétique du mode d'action des dérivés dithiopyrrolones tels que l'holomycine et la thiolutine. D'après cette étude, ces dérivés agissent comme des « prodrug » qui une fois assimilées par le microorganisme sont réduites et chélatent ainsi le zinc, un cofacteur de nombreuses enzymes telles que les métalloenzymes, les aldolases et l'ARN polymérase (Figure 1.8). Ainsi, l'inactivation de ces enzymes aura comme conséquence le blocage de la transcription de l'ARN, la non assimilation du glucose et la perturbation de la respiration (Chan et al., 2017).

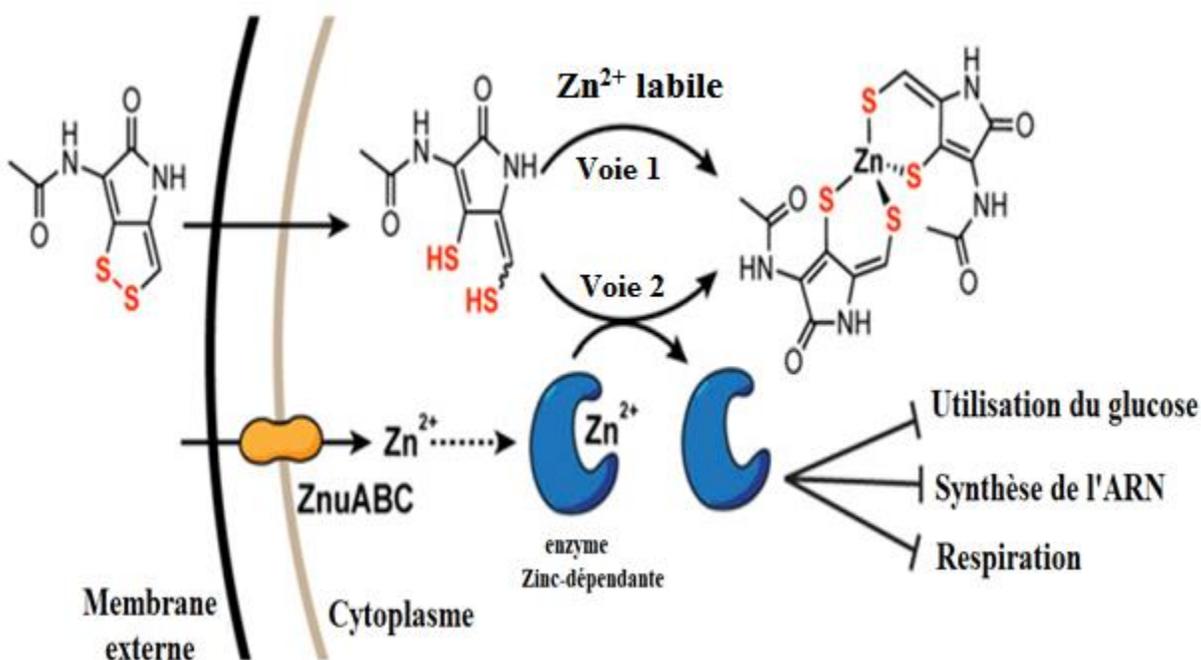


Figure 1.8: Mécanisme d'action des dérivés de dithiopyrrolones (schéma extrait de l'article Chan et al., 2017). L'holomycine est internalisée en tant que prodrug dans le cytoplasme d'un microorganisme cible tel que *E. coli*. Au niveau du cytoplasme, l'holomycine est réduite en red-holomycine par rupture de la liaison disulfure S-S. La red-holomycine est alors capable de chélater le zinc par deux voies possibles : la voie (1) se traduit par une chélation des ions zinc labiles présents dans le cytoplasme, ou la voie (2) par laquelle la red-holomycine chélate le zinc et le retire des sous-groupes d'enzymes zinc-dépendantes ce qui a pour conséquence une inhibition de l'utilisation du glucose, de la synthèse de l'ARN et de la respiration. Ces deux voies contribuent à l'effet inhibiteur de l'holomycine mais la voie 2 est la plus prééminente. En effet, l'holomycine interrompt le transport du zinc via les transporteurs ABC ce qui restreint l'assimilation de cet ion par le microorganisme qui devient ainsi d'autant plus sensible à l'holomycine.

### 1.2.5. Intérêt des dithiopyrrolones

#### 1.2.5.1. Utilisation dans l'agriculture

Nombreuses sont les utilisations des dithiopyrrolones dans le domaine agricole, comme en témoigne le nombre de dépôts de brevets déposés sur les effets des dérivés biocides notamment la thiolutine, les thiomarinols et l'holomycine ([www.uspto.gov/patft](http://www.uspto.gov/patft)).

Le Tableau 1.8 regroupe les principaux effets de la thiolutine sur des agents phytopathogènes attaquant diverses variétés culturales.

En plus de ses propriétés antifongiques contre des mycètes tels que *Venturia inaequalis*, *Puccinia recondita*, *Pyricularia oryzae*, la thiolutine possède des propriétés herbicides contre *Lemna minor*, une mauvaise herbe inhibitrice de la croissance de certaines plantes (Dell et al., 1992). Il est intéressant aussi de noter l'activité larvicide de ce dérivé, comme celle des xénorhabdines, contre *Lucilia sericata*, une larve nuisible à certaines cultures (Nickell & Finlay, 1954).

Tableau 1.8: Utilisation de la thiolutine sur des agents phytopathogènes.

Plante/Biotope	Dose	Pathogène	Maladie	Référence
<b>Feuilles de tabac</b>	0,8-7,2 ppm	<i>Peronospora tabacina</i>	Moisissure bleue	(Grosso, 1954)
<b>Fève</b>	1,2 mg/plante	<i>Botrytis fabae</i>	Tache chocolat	(Meklat, 2004)
<b>Lin</b>	5 mg/100 g de sol	<i>Fusarium oxysporum f.sp. Lini</i>	Fusariose vasculaire	(Meklat, 2004 ; Merrouche et al., 2017)
<b>Pommier</b>	-	<i>Erwinia amylovora</i>	Feu bactérien ou "Fire Blight"	(Winter & Young, 1955)
<b>Tomate</b>	10 ppm	<i>Fusarium oxysporum f.sp. Lycopersici</i>	Fusariose vasculaire	(Gopalkrishnan & Jump, 1952 ; Merrouche et al., 2017)
<b>Vigne</b>	3-25 ppm	<i>Pythium ultimum</i> <i>Plasmopara viticola</i>	Fonte des semis Mildiou	(Dell et al., 1992)
<b>Sol autoclavé</b>	50 ppm	<i>Phytophthora cinnamoni</i>	Pourriture des racines	(Zentmyer, 1955)

#### 1.2.5.2. Utilisation dans le domaine médical

Les dérivés des dithiopyrrolones et surtout la thiolutine, ont fait l'objet de plusieurs études quant à leurs propriétés thérapeutiques dans le traitement des allergies et de la chimioprévention.

Par ailleurs, la thiolutine possède des propriétés antitumorales, à l'instar d'autres dérivés dithiopyrrolones, grâce à son mode d'action inhibant l'intégrine  $\alpha\beta3$ , une protéine essentielle à la croissance des tumeurs et impliquée dans l'adhésion des cellules endothéliales des veines ombilicales (HEVC : Human Umbilical Vein Endothelial Cell).

D'autres propriétés de la thiolutine ont été mises en évidence, notamment son activité antiangiogénique (Minamiguchi et al., 2001), et son rôle préventif contre les effets des molécules cancérigènes sur les cellules épithéliales et celles du colon, de la prostate, de la peau, des reins, du cerveau et des poumons (Webster et al., 2000).

Par ailleurs, la thiomarinole a montré une activité plus forte que celle de la Mupirocine sur le MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) utilisée auparavant dans les hôpitaux (Murphy et al., 2011 ; Gao et al., 2017).

La biosynthèse de ces molécules par des microorganismes tels que *Saccharothrix algeriensis* est une ressource intéressante à exploiter et qui pourrait constituer une alternative à leur synthèse organique complexe, onéreuse et polluante. Parmi les stratégies citées dans la littérature sur l'optimisation de la production des métabolites secondaires par les microorganismes, la modification de la composition chimique des milieux de cultures des microorganismes et l'utilisation des éliciteurs constituent des moyens efficaces, simples et peu onéreux. Nous nous intéressons dans le cadre de cette revue bibliographique aux moyens d'élicitation des métabolites secondaires des *Actinobactéries* et plus particulièrement à l'élicitation chimique.

### 1.3. Élicitation des métabolites secondaires

Il existe plusieurs moyens d'élicitation des métabolites secondaires produits par les microorganismes parmi lesquels l'élicitation biologique, l'élicitation moléculaire et l'élicitation chimique (Abdelmohsen et al., 2015 ; Rutledge et al., 2015 ; Müller & Wink, 2014 ; Wang et al., 2008). L'élicitation biologique fait appel à la co-culture entre microorganismes (bactérie-bactérie, champignon-bactérie ou champignon-champignon) ainsi qu'à l'addition de lysats bactériens dans des différentes cultures de microorganismes (Tableau 1.9).

Tableau 1.9: Liste non exhaustive de métabolites secondaires produits par élicitation biologique ; (P) : espèce productrice ; (I) : espèce inductrice.

Interaction	Métabolite secondaire produit par élicitation	Activité biologique du métabolite	Référence
<b>a) <i>Actinomycetes</i> - <i>Actinomycetes</i></b>			
<i>Streptomyces endus</i> S-522 (P) <i>Tsukamurella pulmonis</i> TP-B0596 (I)	Alchivemycin A	Antibiotique	(Onaka et al., 2011)
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145 (P) <i>Streptomyces albus</i> (I)	Actinorhodine	Antibiotique	(Moody, 2014)
<b>b) <i>Actinomycetes</i> - autre bactérie</b>			
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3 (P) <i>Bacillus subtilis</i> (I)	Undecylprodigiosin	Antibiotique	(Luti & Mavituna, 2011)
<i>Streptomyces coelicolor</i> (P) <i>Myxococcus xanthus</i> (I)	Actinorhodine	Antibiotique	(Pérez et al., 2011)
<b>b) <i>Actinomycetes</i> - champignon</b>			
<i>Aspergillus fumigatus</i> (P) <i>Streptomyces rapamycinicus</i> (I)	Fumicycline A	Antibiotique	(Marmann et al., 2014)
<i>Fusarium tricinctum</i> (P) <i>Streptomyces lividans</i> (I)	Enniatin B1	Antibiotique	(Ola et al., 2013)

L'élicitation moléculaire implique le décryptage des gènes de biosynthèse des métabolites, l'ingénierie ribosomale, la création de souches mutées ainsi que d'autres techniques de génie génétique.

L'élicitation chimique consiste à utiliser des composés chimiques pour l'induction d'un stress physiologique ou métabolique qui permettrait d'activer des gènes silencieux et l'optimisation de la production de métabolites secondaires par les microorganismes. Nous allons nous intéresser aux moyens d'élicitation chimique qui ont été appliqués au cours des travaux de cette thèse.

### 1.3.1. Notion d'éliciteur chimique

Un éliciteur chimique (ou agent de stress) est une molécule chimique de faible taille stimulant des cellules bactériennes pour déclencher des mécanismes de défense chez ces dernières. De ce fait les micro-organismes produisent des métabolites secondaires comme, par exemple, des antimicrobiens. Jusqu'à présent, le mécanisme d'action des éliciteurs chimiques est mieux connu chez les plantes et les champignons que chez les bactéries (Nutzmann et al., 2011 ; Radman et al., 2003). Les connaissances actuelles sur le mécanisme d'élicitation hypothétique chez les bactéries est résumé dans la Figure 1.9.

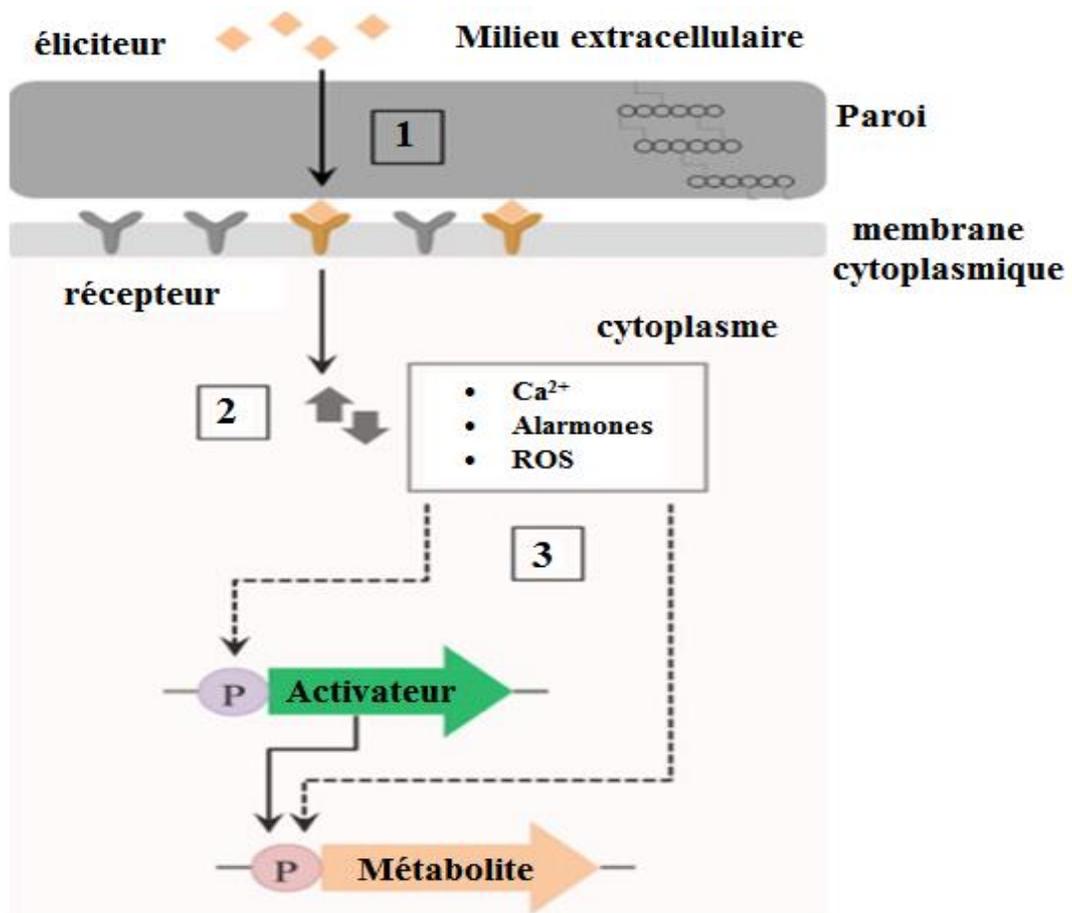


Figure 1.9: Mécanisme d'action hypothétique des éliciteurs chimiques chez les bactéries (extrait de la revue d'Abdelmohsen et al., 2015). (1) Internalisation de l'éliciteur par simple diffusion ou par liaison à un récepteur spécifique ; (2) Déclenchement d'une réponse à l'éliciteur par changement du taux de certaines molécules telles que les ions  $Ca^{2+}$ , les alarmones (exp : la guanosine pentaphosphate ((p)ppGpp)) ou les espèces réactives d'oxygène (ROS) ; (3) Activation du gène d'un métabolite spécifique ou du cluster par des mécanismes inconnus.

L'éliciteur chimique est reconnu par les cellules bactériennes comme un signal chimique en se fixant sur un récepteur au niveau de la membrane cytoplasmique ou par simple diffusion à travers celle-ci (Kawai et al., 2007 ; Murphy et al., 2011).

L'internalisation de l'éliciteur dans le cytoplasme bactérien induit des changements des taux intracellulaires de certains composés tels que les ions calcium (Murphy et al., 2011), les « alarmones » tels que la guanosine pentaphosphate (p)ppGpp (Kawai et al., 2007), et les espèces réactives d'oxygène (Radman et al., 2006).

Ces changements servent comme des signaux intracellulaires pour la régulation des métabolites secondaires par des mécanismes peu connus. En outre, l'éliciteur peut directement influencer la transcription de clusters de synthèse de métabolites secondaires ou induire la transcription des gènes activateurs de clusters cibles (Kawai et al., 2007 ; Tanaka et al., 2010 ; Ochi et al., 2014)

## 1.3.2. Élicitation chimique

Nombreuses sont les études qui mettent en valeur l'effet des composés organiques et inorganiques et les éléments rares sur l'induction de la production de métabolites secondaires par les *Actinobactéries* (Tableau 1.10) (Abdelmohsen et al., 2015).

Tableau 1.10: Liste non exhaustive de métabolites secondaires produits par élicitation chimique.

Éliciteur chimique	Souche	Métabolite secondaire induit	Mécanisme d'élicitation	Référence
Scandium (Sc <sup>3+</sup> )	<i>S. coelicolor</i>	Actinorhodine	Liaison au ribosome ce qui induit une régulation de l'activateur de transcription de l'antibiotique et une diminution du niveau de l'alarmone ppGpp	(Kawai et al., 2007 ; Ochi & Hosaka, 2013)
	<i>S. griseus</i>	Streptomycine		
Scandium et Lanthane	<i>S. coelicolor</i> A3	Actinorhodine	Régulation positive de neuf gènes impliqués dans la voie de biosynthèse	(Ochi & Hosaka, 2013 ; Zhu et al., 2014)
Diméthylsulfoxyde	<i>S. venezuelae</i> ATCC 10712	Chloramphénicol	Altération de la traduction	(Chen et al., 2000) ; Pettit, 2011)
	<i>S. glaucescens</i>	Tetracenomycine		
	<i>S. aureus</i> ATCC 14921	Thiostrepton		
	<i>S. lividans</i>	Prodigiosine		
Diméthylsulfone	<i>S. venezuelae</i> ATCC 10712	Chloramphénicol	inconnu	(Chen et al., 2000)
Butyrate de sodium	<i>S. coelicolor</i>	Actinorhodine	Inhibition des histones désacétylases	(Zhu et al., 2014)
Éthanol	<i>S. venezuelae</i> ISP5230	Jadomycine B	Altération de la perméabilité membranaire, précurseur métabolique	(Doull et al., 1994 ; Pettit, 2011)
	<i>S. glaucescens</i>	Tetracenomycine	Inconnu	
	<i>S. hygrosopicus</i>	Validamycine A	Activation des gènes de la biosynthèse par le biais des espèces réactives de l'oxygène	(Zhou et al., 2012)

La réponse d'élicitation induite par ces composés dépend de la nature et du nombre des voies métaboliques ciblées et de la puissance de leur activation. Le butyrate de sodium et des ions des éléments rares tels que le scandium ( $\text{Sc}^{3+}$ ) et le lanthane ( $\text{La}^{3+}$ ) induisent la production d'actinorhodine par *Streptomyces coelicolor* A3 par la régulation de gènes activateurs de la biosynthèse de ce métabolite (Kawai et al., 2007 ; Ochi & Hosaka, 2013 ; Zhu et al., 2014).

Les solvants tels que l'éthanol, le propanol, le butanol, le diméthylsulfoxyde et la diméthylsulfone ont été étudiés pour leur effet inducteur de production d'antibiotiques chez les *Streptomyces* (Abdelmohsen et al., 2015). Notamment, le diméthylsulfoxyde induit une surproduction de chloramphénicol par l'espèce *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712 lorsqu'il est ajouté dans le milieu de culture à des concentrations allant de 3 à 5 % v/v (Chen et al., 2000). Il est intéressant de noter que l'effet des solvants en tant qu'éliciteur sur les bactéries à Gram positif n'est pas le même que sur celles à Gram négatif en raison de la composition différente de la paroi chez chacun de ces types bactériens (Segura et al., 2012 ; Heipieper et al., 2007).

L'étude du profil d'expression des gènes d'organismes modèles tels que *Escherichia coli* a permis de mieux comprendre l'effet des alcools. Selon cette étude, les alcools tels que l'éthanol et le butanol pourraient induire un stress oxydatif chez les bactéries et modifier la perméabilité membranaire ce qui engendre des modifications au niveau de la croissance et du profil métabolique (Rutherford et al., 2010).

Zhou et al. (2012) ont étudié l'effet de l'ajout de l'éthanol au milieu de culture de *Streptomyces hygroscopicus*, une souche productrice de la validamycine A. Ils ont proposé un schéma de signalisation (Figure 1.10) induit par l'éthanol selon lequel les espèces réactives de l'oxygène (ROS) seraient responsables de l'activation des régulateurs transcriptionnels de la biosynthèse de la validamycine A et de la synthèse du précurseur (sedoheptulose-7-phosphate) de cet antibiotique (Zhou et al., 2012). Étant donné que le stress oxydatif permet de déclencher chez certaines bactéries une surproduction d'antibiotiques, nous allons y consacrer le paragraphe suivant.

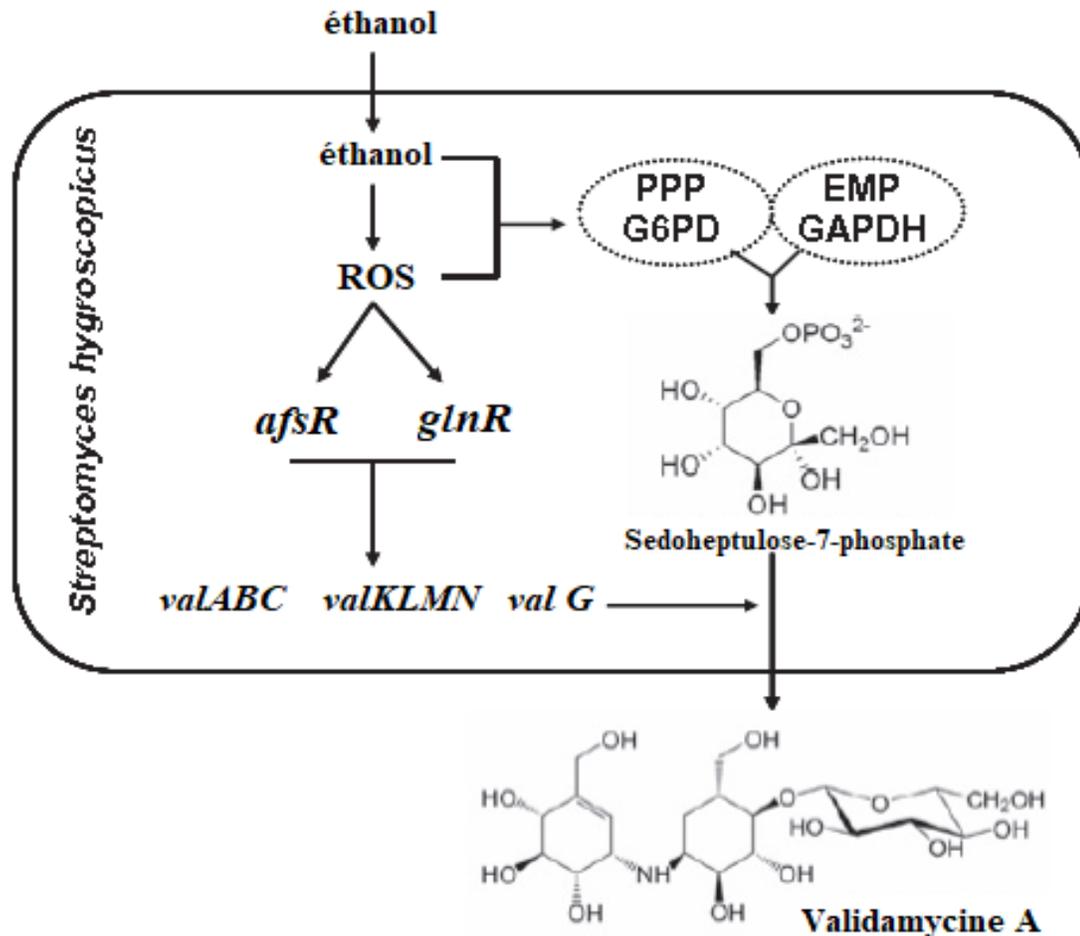


Figure 1.10: Cascade hypothétique du signal de transduction induite par l'éthanol (à 10 mM) chez *S. hygroscopicus* (extrait de l'article de Zhou et al., 2012). La perception par la bactérie des faibles concentrations d'éthanol dans le milieu de culture, génère des espèces réactives d'oxygène (ROS) dans le cytoplasme qui induisent l'activation des régulateurs *afsR* et *glnR*. Ces régulateurs contrôlent la transcription des gènes *valABC*, *valKLMN* et *valG* de la voie de biosynthèse de la validamycine A. Parallèlement, l'addition de l'éthanol au milieu de culture est accompagnée d'une augmentation des réactions métaboliques de la voie pentose-phosphate (PPP pour Pentose Phosphate Pathway) qui produisent la sedoheptulose-7-phosphate, précurseur de la validamycine A. Par conséquent, l'accumulation des précurseurs de la validamycine A et l'activation des gènes de sa biosynthèse sont à l'origine d'une optimisation de la production de la validamycine A par *Streptomyces hygroscopicus*. EMP : voie métabolique d'Embden-Meyerhof-Parnas (voie métabolique d'assimilation du glucose et de production d'énergie), GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, G6PD : Glucose-6-phosphate déshydrogénase.

### 1.3.2.1. Le stress oxydatif chez les bactéries

Le stress peut-être défini comme l'ensemble des conditions qui induisent des changements physiologiques chez les organismes vivants affectant ainsi leur croissance et générant des dommages cellulaires. Dans ces conditions hostiles le fonctionnement optimal des organismes est altéré. En conséquence, les organismes s'adaptent au stress en développant des mécanismes divers de résistance qui ont pour but une acclimatation dans ces nouvelles conditions de vie (Mittler, 2017 ; Booth, 2002).

Il existe deux types de stress environnementaux : biotique et abiotique. Le stress biotique est une forme de concurrence entre les organismes vivants telle que la prédation. Le stress abiotique est un changement physico-chimique des facteurs environnementaux tels que la salinité, la température, les rayons UV, l'oxygène, le pH, la présence de métaux, etc. Chez les bactéries, les réponses aux différents types de stress peuvent-être classifiées en deux catégories : une réponse générale et une réponse spécifique.

La réponse générale au stress est indépendante de la nature du stress et joue un rôle essentiel dans la survie des bactéries dans l'environnement. Elle peut se traduire par la conservation de l'intégrité de l'enveloppe cellulaire, la biogenèse de transporteurs contrôlés par des facteurs cytoplasmiques ou extra-cytoplasmiques ou la modification de la morphologie bactérienne (sporulation, formation de biofilm, acquisition de structures de motilité) (Lushchak, 2011).

La réponse spécifique au stress dépend de la nature du stress. Le stress oxydatif médié par les espèces réactives d'oxygènes (ROS) constitue un exemple de stress qui génère des réponses spécifiques chez les bactéries aérobies. Ces dernières possèdent des systèmes tels que la thioredoxine, la catalase et d'autres enzymes anti-oxydantes qui permettent de neutraliser les ROS et minimiser leurs dommages cellulaires (Mittler, 2017 ; D'Autréaux et al., 2007).

Les principaux ROS générés par l'oxygène chez les bactéries sont l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ ). Ces espèces réactives d'oxygène attaquent tous les constituants cellulaires tels que les lipides, les protéines et les acides nucléiques et provoquent la mort cellulaire (Figure 1.11) (Møller & Sweetlove, 2010).

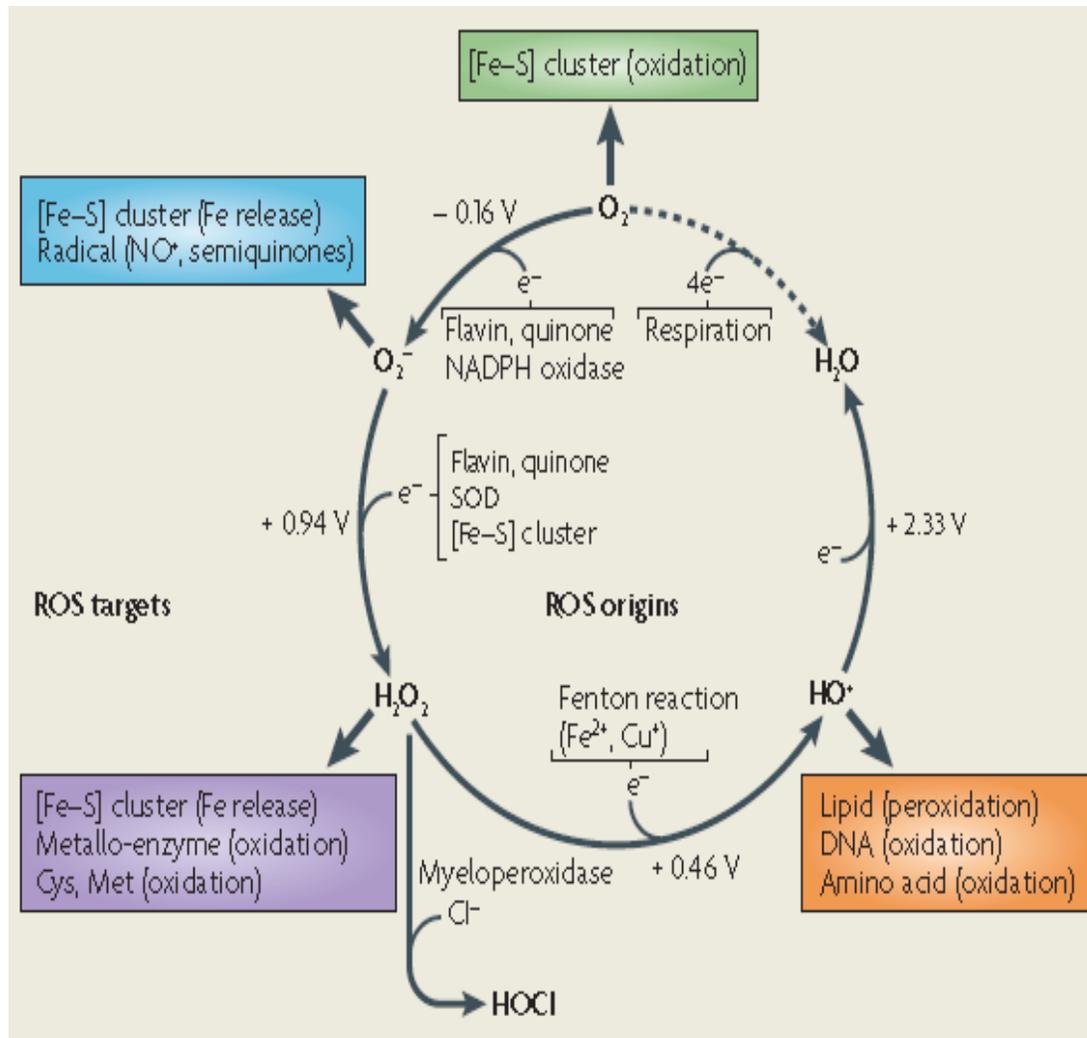


Figure 1.11: Les origines et les cibles des espèces réactives d'oxygène (extrait de l'article D'Autréaux et al., 2007). Les espèces réactives d'oxygène sont le radical hydroxyle, le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde. Ils ont des cibles différentes : le radical hydroxyle attaque les lipides, les acides nucléique et les acides aminés ; le peroxyde d'hydrogène oxyde les métalloenzymes et les résidus cystéines et méthionines et libère le fer des clusters fer-soufre Fe-S ; l'anion superoxyde forme des radicaux toxiques tels que le monoxyde d'azote. L'ensemble de ces modifications physiologiques engendrent des réponses de SOS chez les bactéries. La réponse SOS est un mécanisme de régulation qui permet l'adaptation et l'évolution de la bactérie quand les conditions environnementales l'exigent.

L'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) est produit par des processus enzymatiques impliquant des enzymes, telles que NADPH oxydases ou des oxygénases cytochrome P450 dépendantes (Babior, 2001), ou des processus non enzymatiques médiés par des coenzymes, des flavines ou des groupements Fe-S (Babior, 2000).

Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) peut être formé au cours des différentes réactions comme, par exemple, pendant la réaction de dismutation spontanée du superoxyde ou lors de l'oxydation des protéines à fer, des flavoprotéines et d'autres composés cellulaires réduits (Touati, 2000). De plus, l'auto-oxydation, causée par des rayons UV, des thiols, des catéchols, des flavines, des déshydrogénases, des oxydases et des cytochromes engendre la formation du peroxyde d'hydrogène ainsi que de l'anion superoxyde.

Les radicaux hydroxyles peuvent être produits par la réaction de Fenton entre le peroxyde d'hydrogène et des ions ferreux ou d'autres métaux de transition (D'Autréaux et al., 2007).

#### 1.3.2.1.1. Les mécanismes de défenses contre le stress oxydatif

Les mécanismes de défense des bactéries contre les ROS se traduisent par l'élimination des espèces réactives et le déclenchement des mécanismes généraux de réponse aux stress.

L'élimination des espèces réactives est assurée par des enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD), les catalases (CAT) et les peroxydases. La SOD élimine le radical superoxyde en le transformant en peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène sera ensuite dismuté sous l'action de la catalase en eau et en oxygène. Les catalases assurent la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Les peroxydases décomposent également le peroxyde d'hydrogène (D'Autréaux et al., 2007 ; Mishra & Imlay, 2012).

La protection des résidus cystéines des biomolécules contre l'oxydation est assurée par les thiol-transférases telles que la thiorédoxine et la glutathion réductase qui assurent la réduction des ponts disulfures.

La thiorédoxine est une protéine qui permet le transfert d'atomes hydrogènes vers les résidus cystéines grâce à un système thiorédoxine qui implique deux enzymes : la thiorédoxine peroxydase et la thiorédoxine réductase. Le transfert d'électrons du NADPH grâce à l'action de la thiorédoxine réductase permet la ré-oxydation de la thiorédoxine et la réparation des dommages aux protéines (Arnér & Holmgren, 2000).

#### 1.3.2.1.2. Récepteurs des espèces réactives de l'oxygène chez les bactéries

Les bactéries possèdent des récepteurs spécifiques aux espèces réactives de l'oxygène parmi lesquels les facteurs transcriptionnels SoxR, OxyR et PerR.

SoxR est un facteur transcriptionnel spécifique des ions superoxydes ( $O_2^{\cdot-}$ ). L'oxydation du cluster SoxR  $[2Fe-2S]^+$  par l'anion superoxyde induit un changement conformationnel de SoxR ce qui affecte la liaison de ce dernier à l'opérateur de l'ADN et active la transcription du gène (Figure 1.12.a). La réduction SoxR est assurée par la ferredoxine-NADPH dépendante.

OxyR et PerR sont des facteurs transcriptionnels spécifiques du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et des peroxydes organiques. OxyR et PerR sont des orthologues fonctionnels qui régulent des gènes communs responsables de la production des catalases, de la peroxyrédoxine et d'un régulateur transcriptionnel du métabolisme du fer. En outre, OxyR joue un rôle dans le contrôle de la thiorédoxine (Trx), de la glutathion réductase et de la glutarédoxine (Grx).

PerR agit comme un répresseur alors que OxyR comme un activateur.

L'oxydation d'OxyR par le peroxyde d'hydrogène permet sa fixation à l'ADN et l'activation de la transcription des gènes cibles. La réduction de ce facteur est assurée par la glutarédoxine (Grx) (Figure 1.12.b).

La PerR est aussi sensible au peroxyde d'hydrogène, qui oxyde le cluster  $[4Fe-4S]^{2+}$  de son centre actif en  $[3Fe-4S]^+$ . Ce dernier étant instable, l'ion  $Fe^{2+}$  est libéré. Sous sa forme oxydée, le PerR se détache de l'opérateur, ce qui permet le déclenchement de la transcription (Figure 1.12.c).

Dans l'état de connaissance actuel, les chercheurs considèrent ce facteur comme un répresseur qui une fois oxydée, perd sa fonction, le mécanisme de ré-oxydation mis en jeu est inconnu.

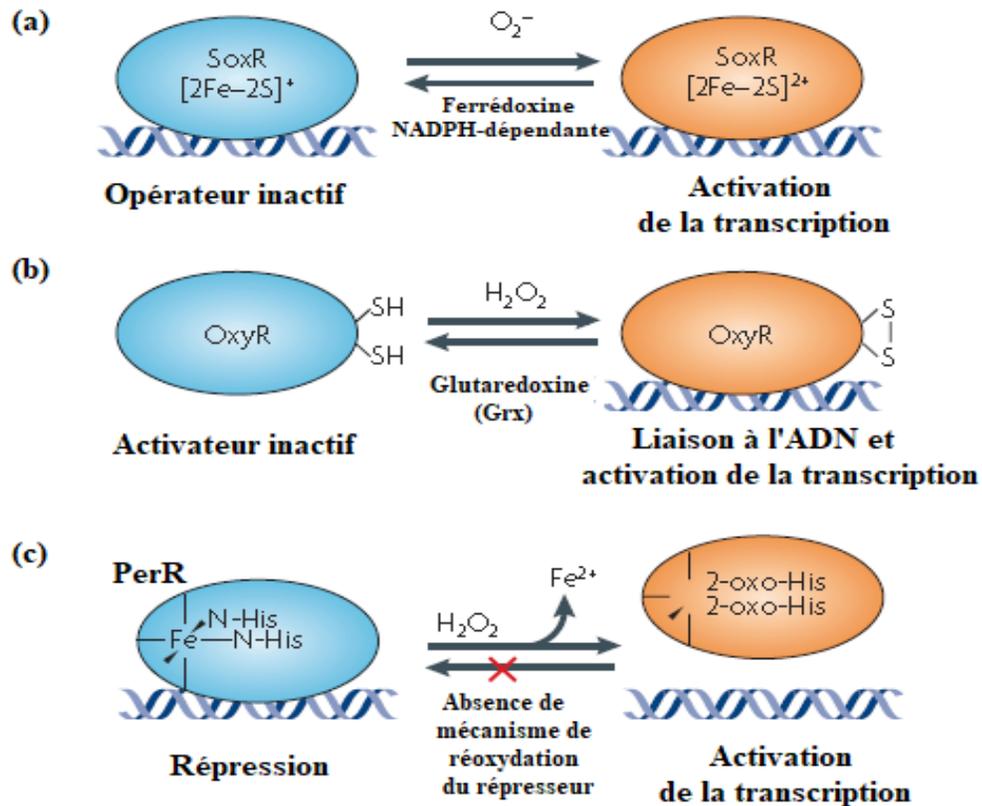


Figure 1.12: Récepteurs bactériens des espèces réactives d'oxygène (extrait de l'article D'Autréaux et al., 2007). (a) L'ion superoxyde active la transcription du facteur SoxR par liaison au site acif. La réduction de SoxR par l'action de la ferrédoxine NADPH-dépendante rend cet opérateur inactif ; (b) le facteur transcriptionnel OxyR est activé par le peroxyde d'hydrogène qui oxyde les fonctions thiols SH en formant un pont disulfure S-S ce qui permet la liaison d'OxR à l'ADN et l'activation de la transcription. Ce facteur est inactivé par réduction du pont disulfure par la glutarédoxine ; (c) PerR est un répresseur transcriptionnel sensible au peroxyde d'hydrogène. En présence du peroxyde d'hydrogène, le fer présent au niveau du site actif de PerR est libéré ce qui active la transcription. Le mécanisme de réoxydation de ce facteur transcriptionnel est inconnu.

À la lumière de ce qui a été présenté, nous retiendrons que la majorité des bactéries aérobies réagissent aux ROS en déclenchant des réponses spécifiques en fonction de la nature de l'espèce oxygénée. De plus, il a été rapporté que le stress oxydatif déclenche l'activation de certaines voies de biosynthèse de métabolites secondaires tels que les antimicrobiens chez les *Actinobactéries* (Zhou et al., 2012). L'effet des espèces réactives de l'oxygène serait alors similaire à des molécules signal qui régulent la transcription des clusters de métabolites secondaires. Un autre type de molécules signaux existe chez les bactéries. Il s'agit des auto-inducteurs du Quorum Sensing auxquels nous consacrerons la partie suivante de ce chapitre.

### 1.3.3. Élicitation chimique par des inducteurs du Quorum Sensing

#### 1.3.3.1. Communication bactérienne : le Quorum Sensing

Chez tous les organismes vivants existe un phénomène biologique fondamental appelé communication intercellulaire qui leur permet d'avoir, en fonction des conditions environnementales ou physiologiques, un comportement adéquat (Hooshangi & Bentley, 2008). Une de ces formes de communication chez les bactéries est le *Quorum Sensing* (QS).

Le QS est un mode de communication inter- et intra-espèces bactériennes reposant sur le principe de production, sécrétion et détection de molécules signaux (appelées auto-inducteurs) au cours de la phase de croissance bactérienne. Lorsque la concentration de ces molécules signaux atteint un seuil critique appelé *quorum* dans le milieu extracellulaire, celles-ci diffusent dans la cellule bactérienne et interagissent avec des régulateurs transcriptionnels contrôlant l'expression de gènes cibles spécifiques (Waters & Bassler, 2005 ; Czajkowski & Jafra, 2009). Grâce à ce processus de signalisation et de régulation génétique, les bactéries sont capables de contrôler des activités physiologiques aussi diverses que complexes comme celles citées ci-dessous (Figure 1.13) qui permettent leur survie dans un environnement complexe (Hooshangi & Bentley, 2008).

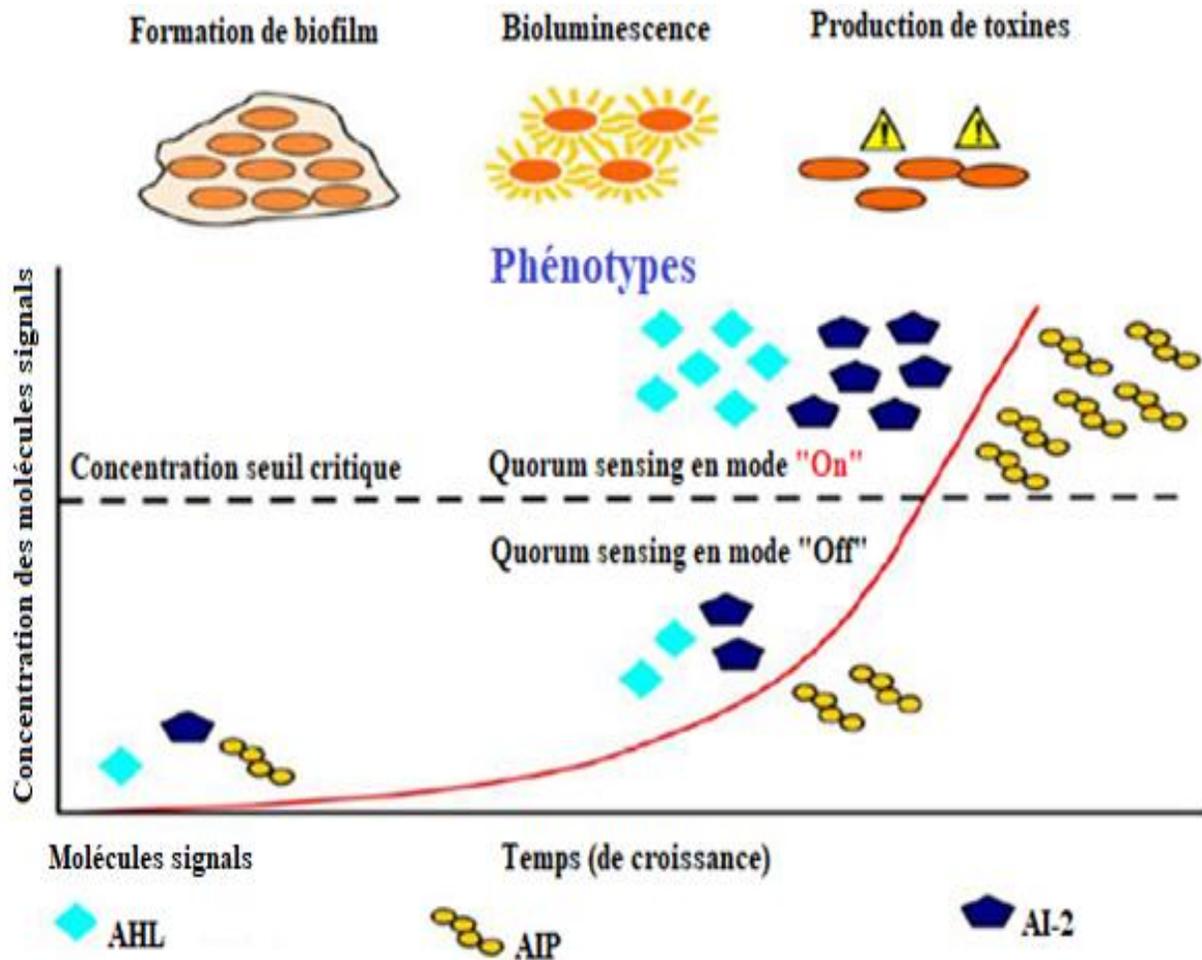


Figure 1.13: Le mécanisme du Quorum Sensing (Schéma extrait de l'article Roy et al., 2011). Selon leur type Gram, les bactéries produisent et sécrètent dans le milieu environnant des molécules autoinductrices de type AIP, AI-2 ou AHL. Pendant la phase exponentielle de croissance, la concentration des autoinducteurs augmente en fonction de la densité de la population bactérienne. À partir d'une concentration seuil critique, appelée «quorum», les bactéries adoptent un comportement physiologique collectif aboutissant selon l'espèce bactérienne : à la formation de biofilms, production de toxines virulentes, bioluminescence ... etc.

### 1.3.3.2. Historique

C'est dans les années 1970 que le premier mécanisme de communication entre les bactéries a été découvert chez *Vibrio fischeri*, une  $\gamma$ -protéobactérie marine vivant en symbiose dans les cellules du calamar *Euprymna scolopes*. Cette bactérie bioluminescente est capable de produire de la lumière dans les cellules de ses hôtes grâce à l'enzyme luciférase capable d'oxyder la luciférine générant ainsi l'émission d'un photon. Cependant, *in vitro* la production de lumière n'est observable que dans une culture à forte densité cellulaire de *Vibrio fischeri*. En effet, c'est lors de la phase exponentielle de croissance qu'il y a induction de la bioluminescence. Une expérience mise en place par Kempner et Hanson en 1968 a permis l'induction de la bioluminescence dans une culture de *Vibrio fischeri* à faible densité cellulaire, après l'ajout de surnageants d'autres cultures à forte densité cellulaire (Kempner & Hanson, 1968). Ceci explique le fait que *Vibrio fischeri* n'est capable de produire de la lumière que dans les cellules des organes de ses hôtes dans lesquelles sa densité cellulaire peut atteindre  $10^{10}$  bactéries/mL (Hastings & Mitchell, 1971).

Kaplan et Greenberg ont défini la notion d'auto-inducteur dans le modèle de régulation de *Vibrio fischeri* (Kaplan & Greenberg, 1985). Plus tard, l'expression *Quorum Sensing* (QS) a été introduite par Fuqua et Winans en 1994 suite à la découverte d'un système de régulation qui contrôle le transfert de plasmide conjugatif Ti chez *Agrobacterium tumefaciens* (Fuqua & Winans, 1994).

### 1.3.3.3. Auto-inducteurs du Quorum Sensing

Le terme d'auto-inducteurs a été employé pour désigner la forte corrélation entre la concentration des molécules signaux et la densité des cellules bactériennes dans le milieu. La concentration seuil en auto-inducteurs une fois atteinte, les bactéries déclenchent de manière coordonnée un changement de leur comportement (Nealson et al., 1970). La définition d'une molécule d'auto-inducteur repose sur quatre critères essentiels (Winzer et al., 2002) :

- i. La molécule est produite à un moment précis de la croissance ou suite à un stimulus environnemental ;
- ii. La molécule se concentre dans le milieu extracellulaire et est reconnue *via* un récepteur spécifique ;
- iii. En-dessus d'une concentration seuil critique, les bactéries adoptent une réponse collective ;

- iv. La réponse collective doit impliquer des mécanismes autres que ceux liés au catabolisme de la molécule.

Les microorganismes perçoivent ces molécules à des concentrations infimes variant du picomolaire (pM) au milli-molaire (mM). Les auto-inducteurs sont classés dans trois groupes : (Hooshangi & Bentley, 2008) :

- AIP : Peptide Auto-Inducteur, spécifique des bactéries à Gram-positif.
- AI-2 : Auto-Inducteur 2, présent chez les deux types bactériens.
- AHL : Acyl Homosérine Lactones (ou HSL), spécifique des bactéries à Gram négatif.

D'autres molécules ont également été rapportées, telles que les quinolones et les dicétopipérazines chez certaines espèces bactériennes à Gram négatif (Pesci et al., 1999 ; Campbell et al., 2009). Les auto-inducteurs du QS sont spécifiques non seulement au type de Gram des bactéries mais aussi à chaque espèce (Kendall & Sperandio, 2007 ; Lasarre & Federle, 2013).

#### 1.3.3.4. Les différentes molécules inductrices du QS

##### 1.3.3.4.1. Peptides

Les oligopeptides sont des auto-inducteurs spécifiques aux bactéries à Gram positif. Ces peptides sont spécifiques pour un récepteur donné. Elles sont libérées dans le milieu extérieur grâce à des transporteurs transmembranaires (Sturme et al., 2002). Diverses structures d'oligopeptides sont identifiées en fonction des genres et espèces bactériens (Tableau 1.11).

Tableau 1.11 : Phénotypes de QS régulés par des oligopeptides.

Espèce	Oligopeptide	Homologues LuxI/LuxR	Mécanisme régulé par le QS	Référence	
<i>Bacillus subtilis</i>	ERGMT	CSF/phrC	Sporulation	(Waters & Bassler, 2005)	
	ASPITRQWGD	ComX	Compétence		
<i>Staphylococcus aureus</i>	AIP-I	AgrBCDA	Virulence	(Lyon et al., 2002)	
	AIP-II				YSTCDFIM
	AIP-III				GVNACSSLF
	AIP-IV				INCDFLL
	YSTCYFIM				

#### 1.3.3.4.2. *Auto-inducteur 2 (AI-2)*

Dans la nature, les bactéries se développent en communautés polymicrobiennes. Les bactéries à Gram positif et à Gram négatif peuvent produire des molécules signaux comme l'auto-inducteur-2 (AI-2) qui peut cibler la communication de certaines espèces microbiennes et ainsi modifier le comportement inter- et intra-espèces (Federle, 2009). Les AI-2 sont des dérivés de la molécule 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione ou DPD, à titre d'exemple le (2S,4S)-2-méthyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofuran-borate (S-THMF-borate) et le (2R,4S)-2-méthyl-2,3,3,4-tetrahydroxytetrahydrofurane (R-THMF) (De Keersmaecker et al., 2006 ; Xavier & Bassler, 2003 ; Waters & Bassler, 2005) dont les structures sont rapportées dans la Figure 1.14).

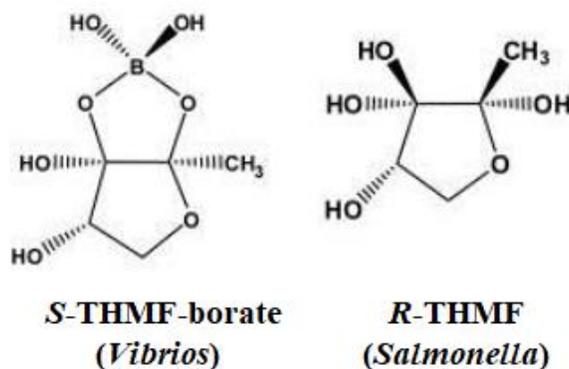


Figure 1.14: Structures de deux AI-2 sécrétés par deux espèces différentes.

L'identification de ce type d'auto-inducteur indique que certaines bactéries appartenant à différentes espèces sont capables de communiquer entre elles. Ainsi, il pourrait être envisageable qu'une molécule puisse cibler la communication et donc le comportement de plusieurs espèces microbiennes (Prajapat & Saini, 2018).

##### 1.3.3.4.2.1. *Mécanisme d'action*

Le principe de ce type de QS repose sur une double régulation de l'expression de gènes cibles par l'intermédiaire de deux types d'auto-inducteurs dont l'un d'eux est un dérivé de l'AI-2. Toutes les AI-2 sont reconnues spécifiquement par des récepteurs formant ainsi des complexes à l'origine de l'activation de gènes cibles. En effet, divers dérivés de DPD sont reconnus par leurs récepteurs spécifiques chez des espèces bactériennes différentes, ce qui met en évidence le langage universel des AI-2 dans la communication intra- et inter-espèces (Xavier & Bassler, 2005 ; Bassler & Losick, 2006).

1.3.3.4.3. *Les Acyl Homosérine Lactone (AHL)*

Les AHL sont retrouvées chez un grand nombre de bactéries à Gram négatif. La structure de ces auto-inducteurs a été identifiée pour la première fois chez la bactérie marine *Vibrio fischeri* (Kempner & Hanson, 1968). Toutes les AHL identifiées jusqu'à présent comprennent un cycle lactone lié par une liaison amide à une chaîne d'acide gras. Les AHL se distinguent par la variation de la longueur de la chaîne, allant de 4 à 18 carbones (Waters & Bassler, 2005), et l'absence ou non d'un radical hydroxy ou oxo en position 3 (Figure 1.15). La diversité des AHL garantirait la spécificité de la signalisation du QS chez les bactéries à Gram négatif (Waters & Bassler, 2005). De plus, les AHL peuvent exister sous forme d'énantiomères dont l'efficacité n'est pas toujours la même. Par exemple, les travaux de McClean en 1997 ont mis en évidence le fait que l'isomère (L) de la 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL est soixante fois plus actif que l'isomère (D) (McClean et al., 1997).

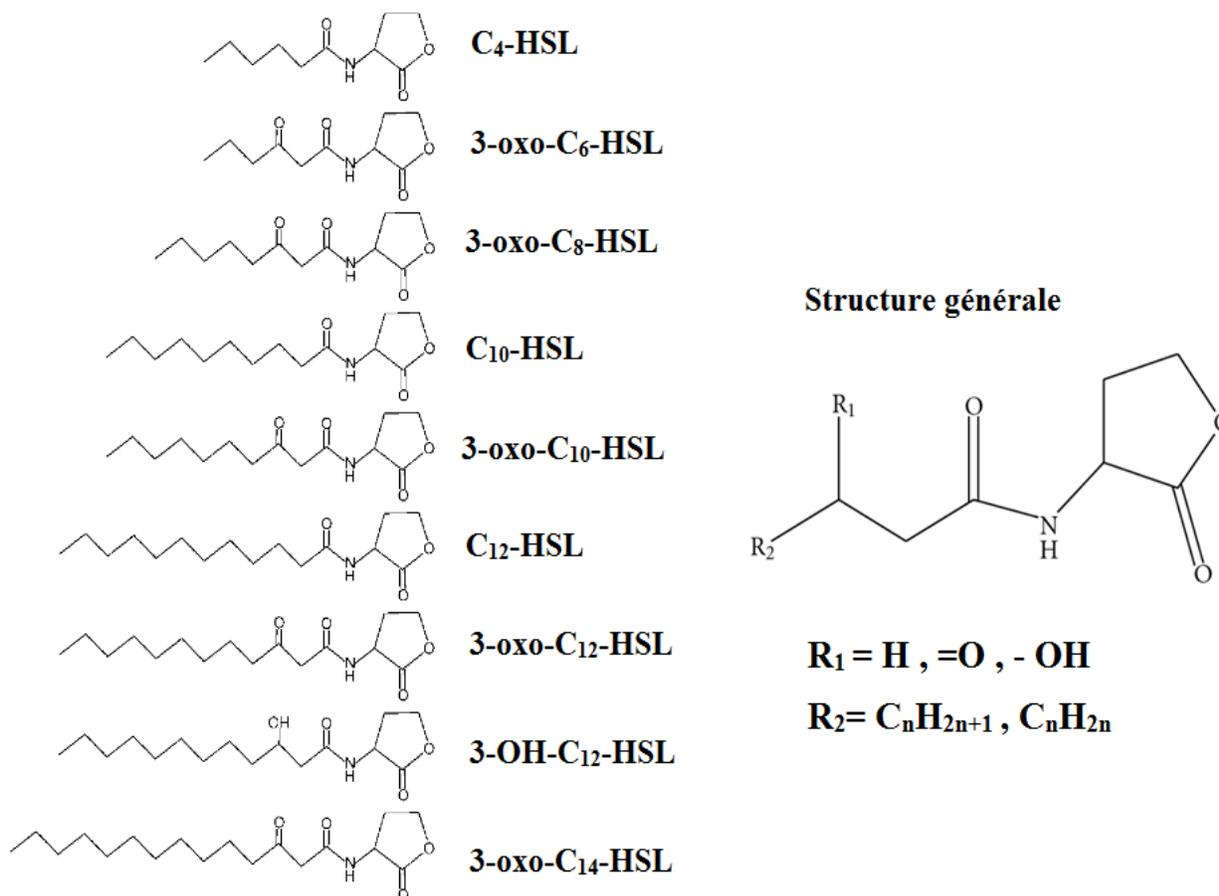


Figure 1.15: Différentes structures d'AHL (d'après Uroz et al. 2005).

#### 1.3.3.4.3.1. Mécanisme d'action des AHL

Un grand nombre de bactéries à Gram négatif communique via un mécanisme QS impliquant trois composants majeurs : l'auto-inducteur (AHL), une synthase (LuxI) et un récepteur (LuxR) qui régulent l'expression de gènes cibles (Miller & Bassler, 2001). Voici un exemple de mécanisme décrit chez *V. fischeri*. Ce système de QS met en jeu un couple de protéines appelées LuxI-LuxR qui contrôlent l'expression d'un groupe de gènes appelé l'opéron luciférase *luxICDABEG*, codant pour la bioluminescence.

LuxI est une AHL synthase qui synthétise l'auto-inducteur : la 3-oxo-hexanoyl-*L*-homosérine lactone (ou 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL) (Eberhard et al., 1981). À faible densité cellulaire, *luxI* est faiblement transcrit ce qui ne permet pas la perception de la 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL par son récepteur spécifique, LuxR.

Lorsque la densité cellulaire atteint l'ordre de 10<sup>11</sup> cellules/mL, la 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL est diffusée dans le milieu extracellulaire jusqu'à atteindre une concentration seuil au-delà de laquelle elle se fixe au facteur de transcription spécifique codé par le gène *luxR*. Le complexe 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL /LuxR ainsi activé se fixe sur la boîte *lux*, le promoteur de l'opéron *luxICDABE*, et régule sa transcription (Kaplan & Greenberg, 1985 ; Engebrecht et al., 1984).

La population bactérienne produit de la lumière grâce au rétrocontrôle positif dû à la présence de *luxI* dans l'opéron : *LuxI* provoque l'augmentation de la production de 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL alors que celle de *luxCABEG* entraîne la production de la lumière (Waters & Bassler, 2005) (Figure 1.16).

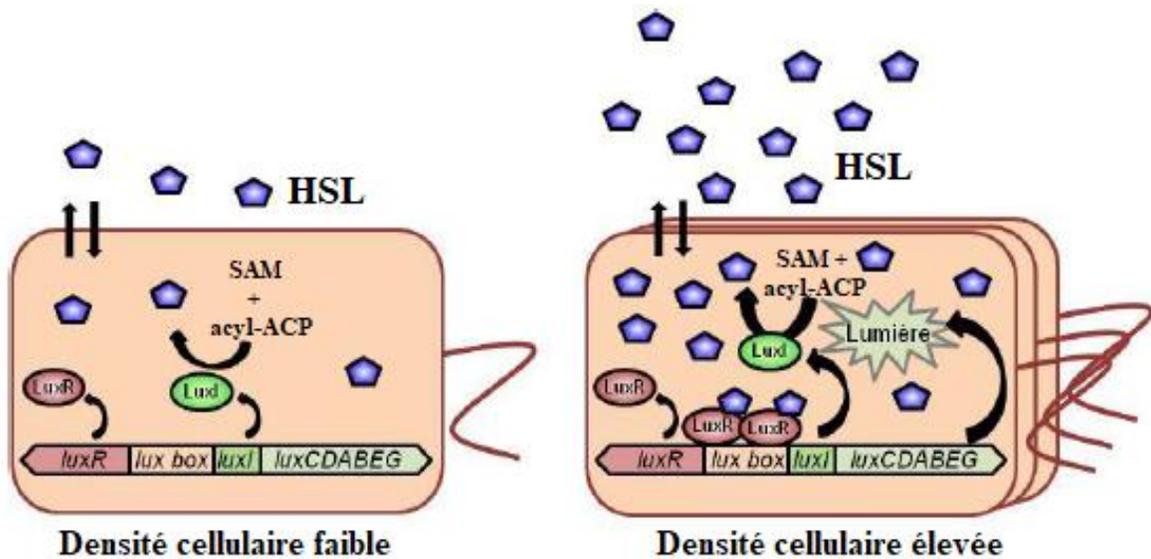


Figure 1.16: Mécanisme du QS chez *Vibrio fischeri* médié par AHL (extrait de l'article de Waters & Bassler, 2005). À faible densité cellulaire, la synthèse des AHL par les précurseurs SAM (S-Adenosyl-Méthionine) et l'acyl-ACP (Acyl Carrier Protein) n'est pas suffisamment importante pour que l'activation de la transcription de l'opéron *luxICDABEG* soit activée. Par contre, quand la densité cellulaire est forte, les AHL se trouvent en plus forte concentration et sont perçues par leurs récepteurs LuxR. Le complexe LuxR-AHL (en duplicat) se fixe sur la boîte *lux* et induit la transcription de l'opéron *luxICDABEG*. Il y a alors une production de AHL et de lumière.

Selon certains auteurs, une grande spécificité de reconnaissance existerait entre les molécules AHL et leurs récepteurs LuxR apparentés (Waters & Bassler, 2005). Elle pourrait provenir d'un phénomène de sélection naturelle favorisant la communication intra-espèces et diminuant les probabilités d'interférences avec les signaux différents des autres espèces. Cependant la communication inter-espèces pourrait exister du fait de l'existence de plusieurs systèmes homologues à LuxI/LuxR au sein d'une espèce voire chez le même organisme (Shiner et al., 2005 ; Prajapat & Saini, 2018).

#### 1.3.3.4.4. Autres autoinducteurs

Parallèlement aux catégories d'auto-inducteurs décrites précédemment, il existe chez les *Actinobactéries* différentes molécules de signalisation (Figure 1.17) : des gamma-butyrolactones, mais aussi les dérivés méthylénomycine furanes (MMF), AI-2 et d'autres analogues d'AHL (Polkade, 2016).

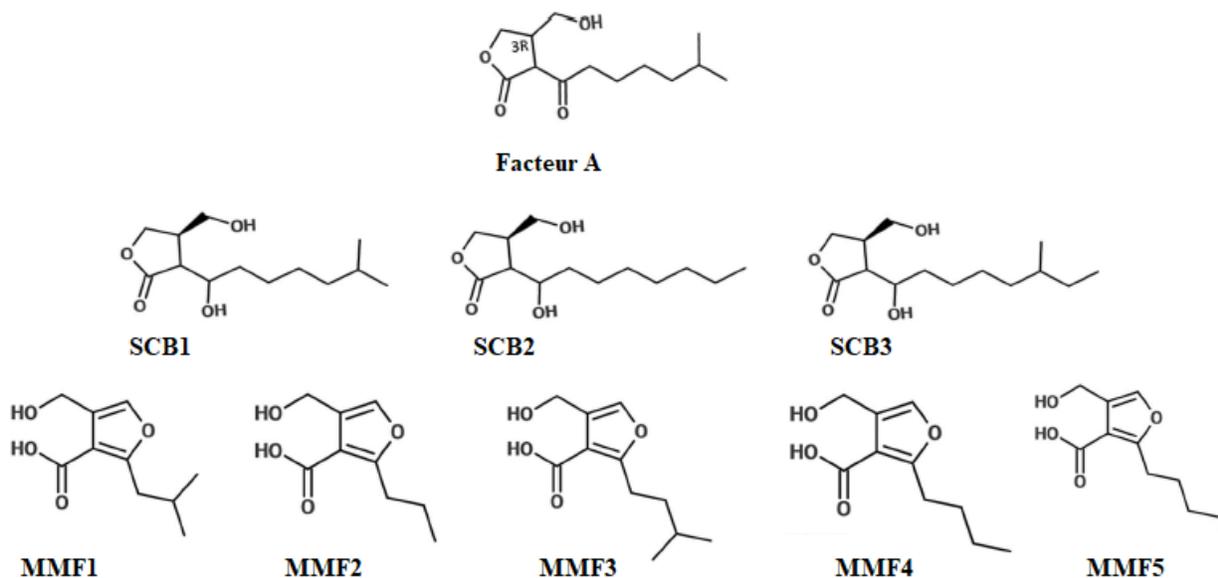


Figure 1.17: Auto-inducteurs produits par les *Actinobactéries* (d'après Polkade et al., 2016).

#### a) Les $\gamma$ -butyrolactones (GBL)

Les GBL sont des molécules signaux spécifiques aux *Actinobactéries*. Jusqu'à présent, quatorze différentes molécules de type 2,3  $\gamma$ -butyrolactone (GBL) produites par sept espèces de *Streptomyces* spp ont été identifiées. Comme les AHL des bactéries à Gram négatif, les GBL diffèrent par la longueur de leur chaîne d'acide gras mais aussi par leur stéréochimie (Polkade et al., 2016 ; Willey & Gaskell, 2011).

Tout comme les AHL, le mécanisme d'action de ces molécules consiste en la liaison à des récepteurs spécifiques pour former un complexe qui va agir comme répresseur d'un cluster de gènes cibles (Recio et al., 2004). À titre d'exemple, chez *Streptomyces hygroscopicus* la biosynthèse de la validamycine A est stimulée et optimisée par l'addition de la 1,4- $\gamma$ -butyrolactone au milieu de culture (Tan et al., 2013).

- **Le Facteur A**

Une des GBL la plus étudiée est le facteur A (A pour autorégulation), identifié avant les AHL (vers 1967). Le facteur A est produit par *Streptomyces griseus* pour contrôler non seulement la différenciation morphologique mais aussi la production de la streptomycine (Ando et al., 1997).

Par ailleurs, le facteur A est impliqué dans la production d'un pigment jaune (le grixazone) par *Streptomyces griseus*. Sa formule chimique est 2-(6<sup>2</sup>-méthylheptanoyl)-3R-hydroxyméthyl-4-butanolide (Figure 1.17).

- **Mécanisme d'action du facteur A**

Le facteur A s'accumule progressivement dans le milieu de culture jusqu'à atteindre un niveau maximal de 25-30 ng/mL (équivalent à 100 nM) durant la mi-phase exponentielle de croissance (Ando et al., 1997). Une fois produit par *S. griseus*, il se lie à une protéine intracellulaire ArpA pour former un complexe qui a pour rôle la désactivation d'un activateur transcriptionnel AdpA. Ce dernier est responsable de l'activation transcriptionnelle de quatre gènes essentiels : le facteur sigma (*adsA*) impliqué dans la différenciation morphologique, un régulateur transcriptionnel impliqué dans la formation des hyphes (*amfR*), un gène clé pour la septation lors de la sporulation (*ssgA*) et le gène activateur de la voie de biosynthèse de la streptomycine (*StrR*) (Horinouchi & Beppu, 1993) (Figure 1.18-a).

Chez *S. coelicolor*, trois GBL ont été isolées et nommées SCB1, SCB2 et SCB3 (Figure 1.18-b). Il s'avère que le SCB1 est impliqué dans la biosynthèse des molécules actinorhodine et undecylprodigiosin. Les SCBs exercent leurs effets à des concentrations dans l'intervalle de 0,25-0,5  $\mu$ M (Takano et al., 2001).

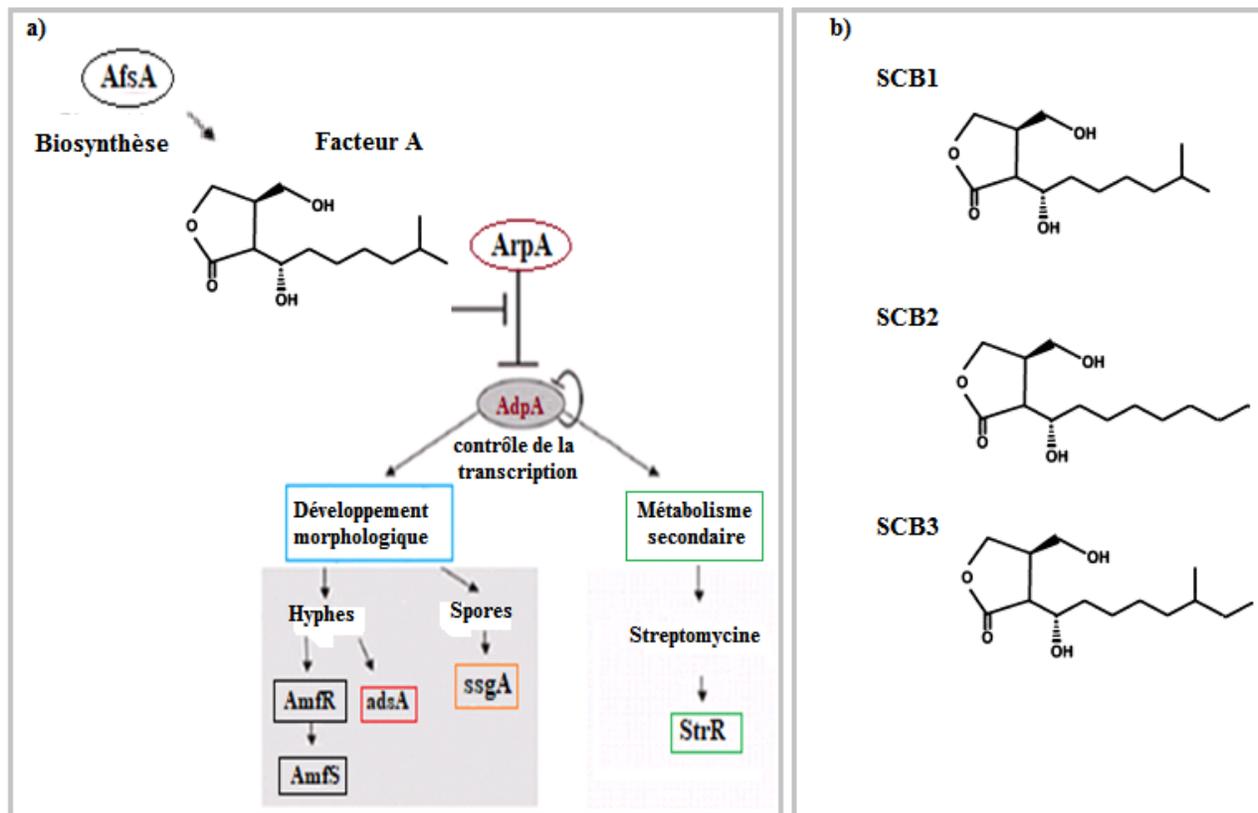


Figure 1.18: Mécanisme d'action du Facteur A (en a) et quelques structures des molécules SCB (en b) (schéma adapté de Kato et al., 2007). (en a) Chez *Streptomyces griseus*, le facteur A se lie à une protéine intracellulaire (ArpA) et contrôle la transcription d'un facteur transcriptionnel AdpA qui régule la transcription des gènes impliqués dans la production de la streptomycine (StrR) et dans la formation des hyphes (AmfR) et des spores (ssgA). (en b) Chez *S. coelicolor*, trois GBL ont été isolées et nommées SCB1, SCB2 et SCB3.

#### b) Méthylénomycine Furane (MMF)

Les MMFs ou MéthylénoMycine Furane sont des molécules analogues aux GBLs (Corre et al., 2008 ; Davis et al., 2009). Elles ont été identifiées chez *Streptomyces violaceoruber* SANK 99570 (Haneishi et al., 1974) puis ultérieurement chez *Streptomyces coelicolor* et *Streptomyces avermitilis*. Contrairement aux GBLs, les MMFs ne sont pas des lactones. Cette classe de molécules signal partage en commun un noyau furane, l'acide 2-alkyl-4-hydroxyméthylfuran-3-carboxylique (AHFCA). Les différents dérivés se différencient par le groupe alkyl en position C2. Cinq MMFs nommés MMF1 à MMF5 ont été identifiées chez *Streptomyces coelicolor* (Figure 1.17).

#### 1.3.3.5. Quorum Sensing chez les *Actinobactéries*

Le phylum des *Actinobactéries* est l'un de plus important dans le domaine des bactéries. Ces microorganismes produisent des métabolites ayant de nombreuses applications dans divers domaines (thérapie humaine, industrie pharmaceutique, agriculture) avec un fort potentiel industriel. Le QS joue un rôle majeur dans la régulation de la production de ces métabolites.

L'état de connaissances sur le QS chez les *Actinobactéries* est synthétisé dans le Tableau 1.12 (Polkade et al., 2016). Dans ces systèmes, des molécules de signalisation de structure diverses ont été décrites comme des gamma-butyrolactones, mais aussi les dérivés méthylénomycine furanes (MMF), AI-2 et d'autres analogues d'HSL.

Parmi les genres de cet embranchement, le système de communication le plus étudié est celui des *Streptomyces*. Les molécules de signalisation GBL ont été décrites dans les années 60, bien avant que le terme Quorum Sensing soit introduit. Depuis, d'autres auto-inducteurs ayant des structures variées ont été identifiés. Récemment, des molécules du type méthylénomycine furane (MMFs) ont été décrites en tant que régulateurs de la production des antibiotiques chez *S. coelicolor* via le QS (Willey & Gaskel, 2011)

Du fait de sa complexité, l'exploration du QS chez les *Actinobactéries* est toujours d'actualité, nécessitant une méthode de recherche systématique et le développement de nouveaux outils d'étude. Par exemple, l'organisation structurale des protéines LuxR des différentes espèces appartenant à ce phylum a été décrite grâce à l'analyse extensive *in silico* de la distribution phylogénique et la diversité fonctionnelle des protéines LuxR (Santos et al., 2012). Lors de cette étude, l'analyse de 991 séquences de protéines provenant de 53 espèces microbiennes a révélé la présence d'au moins un domaine LuxR.

Tableau 1.12: Genres d'*Actinobactéries* chez qui le QS a été démontré par des expériences (Polkade et al., 2016).

<b>Genre</b>	<b>Type du signal</b>	<b>Protéines/ récepteurs impliqués</b>	<b>Phénotypes régulés</b>	<b>Référence</b>
<i>Actinoplanes</i>	type-VB		Métabolites secondaires d'intérêt médical	(Choi et al., 2003)
<i>Amycolatopsis</i>	type-IM2		Métabolites secondaires d'intérêt médical	(Choi et al., 2004)
<i>Bifidobacterium</i>	AI-2	LuxS, homologue LuxR, REC	Formation de biofilm	(Santos et al., 2012 ; Sun et al., 2014)
<i>Kitastospora</i>	GBL	KsbA	Production de bafilomycine	(Choi et al., 2004)
<i>Leifsonia</i>	signal AHL putatif	Homologue LuxR, REC		(Santos et al., 2012)
<i>Micromonospora</i>	type-IM2 avec une longue chaîne C2		Métabolites secondaires d'intérêt médical	(Choi et al., 2003)
<i>Mycobacterium</i>	AMPc et GMPc, ppGpp, di-GMPc et di-AMPc	AAA, CHD, HDc, homologue LuxR, MAP0928, REC, WhiB3	Formation de biofilm et pathogénéité	(Banaiee et al., 2006 ; Takano, 2006 ; Chen & Xie, 2011 ; Santos et al., 2012)
<i>Propionobacterium</i>	AI-2	homologue LuxR, REC	Formation de biofilm et régulation des facteurs de virulence	(Lwin et al., 2014 ; Santos et al., 2012)
<i>Streptomyces</i>	GBLs, MMFs, Facteur A, Facteur-I, IM-2, VB, Facteur PI	AAA, AlpZ, AplW, ArpA, Aur1R, AvrA, BarA, BarB, Brp, CprA, FarA, JadR2, homologue LuxR, MmfR, NcsR2, Orf74, Orf79, Orf82, REC, SabR, SAV2268, SAV2270, SAV3702, ScbA, ScaR, ScbR, SCO6286, SCO6323, Sng, SpbR, TarA, TPR, TylP, TylQ	Production d'antibiotiques (Acide clavulinique, Cephamicine, D-cycloserine, Methylenomycine, Natamycine, Nikkomycine, Nucleoside, Pristinamycine, Streptomycine, Tylosine, Virginamycine), morphogénèse et sporulation	(Recio et al., 2004 ; Takano, 2006 ; Gottelt et al., 2012 ; Santos et al., 2012 ; Willey & Gaskell, 2011)

Certaines espèces de ce phylum présentent une homologie avec les régulateurs du type LuxR (Tableau 1.12), bien que les HSL ne soient pas connues pour interagir avec le QS de ces espèces. Il est à rappeler que les auto-inducteurs des bactéries à Gram négatif ont une composition chimique différente de ceux des bactéries à Gram positif. Dans ce contexte, il a été démontré que la molécule du type C<sub>6</sub>-HSL est capable d'interagir avec le récepteur du régulateur  $\gamma$ -butyrolactone chez *S. coelicolor* (Yang et al., 2009).

À l'instar de nombreuses espèces du phylum des *Actinobactéries*, la description du QS de *Saccharothrix algeriensis* n'a pas encore été rapportée. A l'heure actuelle, d'après l'étude menée par Saker et al. (2013), deux régulateurs putatifs (*thiL* et *thiM*) homologues du type LuxR sont impliqués indirectement dans la régulation de la voie de biosynthèse des dithiopyrrolones chez cette espèce (Saker, 2013). Le régulateur *thiM* possède une forte similarité avec le régulateur de la famille LuxR (*hlmM*) de *S. clavuligerus* alors que *thiL* est un régulateur de la streptomycine (StrR) qui fait partie de la régulation en cascade du facteur A contrôlé par le gène *adpA* chez *S. griseus*.

Pour conclure, le QS semble être répandu parmi de nombreuses espèces microbiennes permettant à ces dernières d'adapter leur comportement. Il sera intéressant d'explorer aussi les possibles systèmes de communication chez *S. algeriensis* susceptibles de réguler la production des dithiopyrrolones.

En se basant sur la diversité du QS, l'utilisation d'auto-inducteurs comme, par exemple, des dérivés d'HSL et de  $\gamma$ -butyrolactone pourraient avoir un effet activateur ou répresseur sur la biosynthèse des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*. Notre stratégie originale pourrait apporter des informations supplémentaires sur les interactions inter-espèces pour optimiser la production de métabolites secondaires d'intérêt.

Par la suite, nous nous sommes intéressés à une autre stratégie d'optimisation des dithiopyrrolones par le biais des outils électrochimiques.

### 1.3.4. Systèmes bio-électrochimiques

L'électro-activité microbienne a été découverte au début du 20<sup>ème</sup> siècle. Ce phénomène permettant de transformer l'énergie chimique d'un substrat en énergie électrique a été étudié surtout dans les années 60. Après une certaine période de baisse d'intérêt, les travaux de recherche ont repris dans les années 2000, avec le développement des piles à combustible microbiennes. Actuellement, les bactéries électro-actives sont définies comme des bactéries capables d'échanger des électrons avec une électrode et ainsi de participer à la génération de courant (Rabaey et al., 2006 ; Rabaey, 2005 ; Rabaey & Verstraete, 2005 ; Lovley, 2008).

#### 1.3.4.1. Mécanismes de transfert des électrons

Les échanges d'électrons avec une surface conductrice peuvent être faits par un mécanisme de transfert d'électrons de type direct ou indirect.

Le mécanisme de transfert indirect d'électrons fait intervenir des médiateurs exogènes généralement solubles (Figure 1.19.A). La bactérie est donc capable de réduire un médiateur qui sera ensuite oxydé au contact de l'électrode générant ainsi du courant. Parmi les médiateurs utilisés par les bactéries, il existe la thionine et le rouge neutre (Kim et al., 2000 ; Park & Zeikus, 2000).

Les transferts directs impliquent un contact direct entre la bactérie et la surface de l'électrode. Les échanges s'effectuent selon les espèces soit par la production de médiateurs endogènes tels que la phénazine produite par *P. aeruginosa* ou par le biais des protéines membranaires tels que les cytochromes c présents à la surface de la paroi (Figure 1.19.B), soit par l'intermédiaire des pili conducteurs qui servent comme des « nano-fils électriques » (Figure 1.19.C) (Bond et al., 2002 ; Gorby et al., 2006).

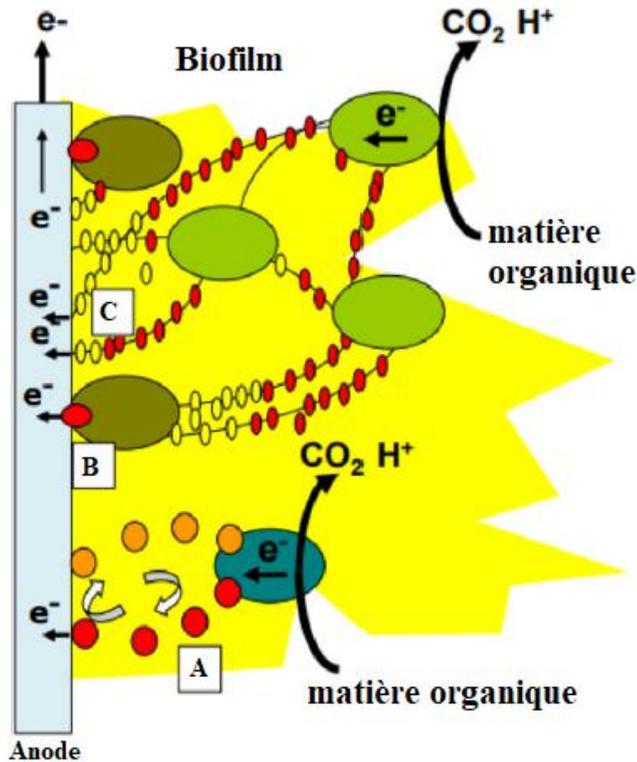


Figure 1.19: Mécanismes impliqués dans le transfert des électrons : (A) Transfert indirect par l'intermédiaire des médiateurs ou des produits de fermentation des matières organiques ; (B) transfert direct via des protéines (cytochromes) ; (C) transfert direct via des pili conducteurs (extrait de l'article de Santoro et al., 2017).

#### 1.3.4.2. Synthèse microbienne électro-assistée

Les bactéries sont capables d'adapter leur système métabolique selon le potentiel induit par les électrodes (Bespalov et al., 1996). Ce comportement bactérien a été décrit comme « energy-taxis » ou énergie-taxie. C'est-à-dire, les bactéries se déplacent sur la surface de l'électrode de façon à ce qu'elles puissent utiliser et consommer le flux d'électrons, d'une façon optimale, dans leur métabolisme énergétique. Ce comportement se retrouve chez de nombreuses espèces telles que *P. aeruginosa*, *E. coli* et *G. sulfurreducens* (Busalmen & de Sánchez, 2005).

Une polarisation adéquate de l'électrode peut imiter un donneur/accepteur redox naturel, et par conséquent, influencer certaines voies métaboliques et des réactions de bioconversion sélectives du substrat. Ces travaux ont servi de modèle pour le développement de divers types de systèmes bioélectrochimiques tels que la synthèse microbienne électro-assistée (Strycharz et al., 2008 ; Gregory & Lovley, 2005).

### 1.3.4.2.1. Principe de la synthèse microbienne électro-assistée

Le procédé de synthèse microbienne électro-assistée est basé sur le principe d'échange du flux d'électrons directement entre certaines bactéries et une électrode (Figure 1.20). En effet, il a été démontré que certains microorganismes sont capables d'adapter leur système de transfert d'électrons en fonction du potentiel d'électrode induit dans le milieu de culture et d'utiliser à leur profit le flux d'électrons, issus de l'électrode, dans leurs voies métaboliques. La synthèse microbienne assistée par électrochimie permet, grâce à l'apport d'énergie électrique, le déroulement des réactions biologiques telles que la bioconversion du fumarate en succinate par des bactéries telles que *G. sulfurreducens* (Gregory et al., 2004 ; Dumas et al., 2008).

Comme illustré dans la Figure 1.20, les bactéries se développent sur la surface de la cathode et consomment le flux d'électrons dans la production de composés multicarbonés ou de méthane. La source de carbone utilisée par ces bactéries est le dioxyde de carbone. Il s'agit donc de bactéries anaérobies. Certains de ces dispositifs utilisent dans le compartiment anodique des bactéries électroactives génératrices de courant à partir de la décomposition de la matière organique présente dans le milieu de culture (Santoro et al., 2017).

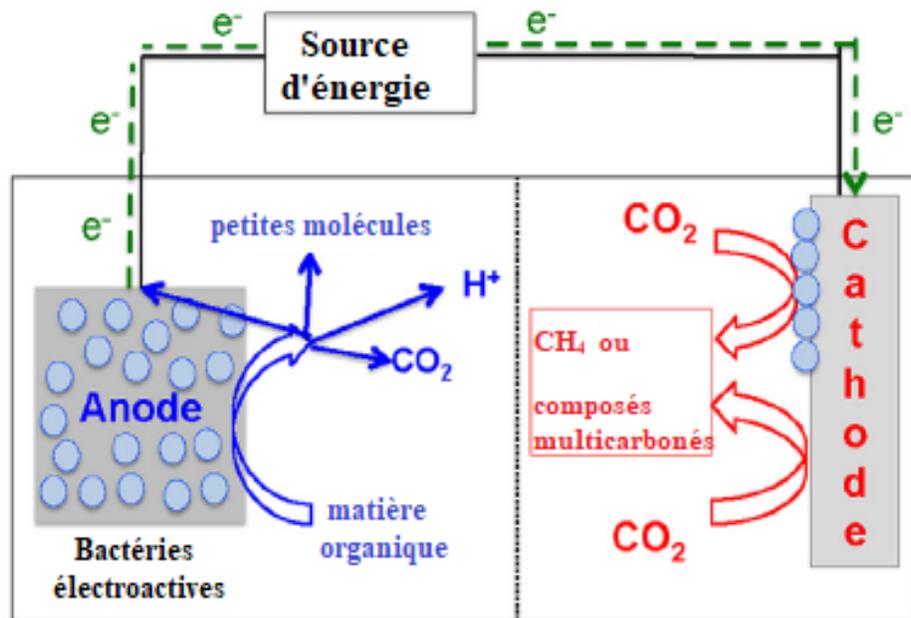


Figure 1.20 : Principe de la synthèse microbienne électro-assistée (extrait de l'article Santoro et al., 2017).

Cette technologie permet la production de composés chimiques spécifiques en utilisant des dispositifs peu coûteux. Elle présente plusieurs avantages :

- Les électrodes utilisées sont en matériaux peu chers, comme le graphite ou l'acier.
- Il n'est pas nécessaire d'utiliser un moyen d'immobilisation des bactéries sur des électrodes. Les bactéries sont capables d'adhérer seules à la surface de l'électrode, parfois par le soutien du potentiel induit.
- Cette synthèse orientée permet d'optimiser les rendements en production par voie microbienne de certains métabolites d'intérêts.
- La source de carbone utilisée par les microorganismes peut provenir du CO<sub>2</sub> des émissions ou des effluents ou des déchets organiques.

De nombreux travaux sur la synthèse microbienne électro-assistée montrent la possibilité de synthèse de composés multicarbonés comme, par exemple, l'acide acétique ou des alcools supérieurs à partir du CO<sub>2</sub> ou des eaux usées (Santoro et al., 2017).

#### 1.3.4.2.2. Paramètres d'optimisation

Plusieurs paramètres affectent la synthèse microbienne électro-assistée. Ils peuvent-être divisés en trois types : (1) les paramètres biologiques, (2) les paramètres du modèle de la cellule électrochimique et (3) les paramètres du procédé (Borole et al., 2011).

Les paramètres biologiques essentiels regroupent la source de l'inoculum, la pureté de la pré-culture, le type Gram des bactéries ainsi que le taux de croissance du biofilm, la composition de sa matrice et la spécificité au substrat.

Les paramètres du modèle sont à titre d'exemple la porosité, la surface et le matériau des électrodes et le type de membrane. Les paramètres relatifs au procédé incluent la température, le pH, la vitesse d'agitation, le système de culture (batch, continu) et les conditions de culture (aérobie, anaérobie) (Borole et al., 2011).

Ainsi pour optimiser l'efficacité du procédé de synthèse microbienne électro-assistée il faut non seulement tenir compte de ces paramètres mais surtout étudier le profil métabolique de la bactérie.

Dans la plupart des cas, la synthèse microbienne électro-assistée est utilisée pour la production des composés multi-carbonés, mais principalement issu du métabolisme primaire. Lors de ces travaux, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet de la présence d'une électrode polarisée dans le milieu de culture de *Saccharothrix algeriensis* afin d'activer son métabolisme secondaire.

Étant donné qu'aucune étude ne s'est intéressée au comportement électrochimique de *Saccharothrix algeriensis*, ces travaux constituent une base pour la compréhension approfondie du métabolisme électroactif de cette espèce.

#### 1.4. Conclusion générale

Nous avons présenté les divers moyens d'optimisation de la biosynthèse de métabolites secondaires d'intérêt par les *Actinobactéries* qui ont été rapportés dans la littérature. L'élicitation chimique par le biais de solvants et d'inducteurs de Quorum Sensing n'a pas fait l'objet de recherche, menée jusqu'à présent, sur la production des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*. Par ailleurs, au vu des avancées de la recherche sur la synthèse microbienne électro-assistée nous avons décidé d'en faire une approche innovante appliquée à la production de biocides. Dans les chapitres suivants, nous présentons les résultats obtenus et mettons l'accent sur leur intérêt dans la mise en place d'un bioprocédé économiquement viable et respectueux pour l'environnement.

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

---

## 2. Microorganisme

La souche *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 (déposée dans la collection DSM sous le numéro 44581) est utilisée dans cette étude (Zitouni et al., 2004 b).

### 2.1. Milieux de cultures microbiennes

#### 2.1.1. International *Streptomyces* Project 2 (ISP2)

Pour la croissance et la sporulation de *S. algeriensis*, le milieu solide ISP2 est utilisé (Shirling & Gottlieb, 1966) est utilisé. La composition de ce milieu est la suivante :

Agar (Biomérieux)	18 g
D(+)-glucose anhydre (Sigma)	4 g
Extrait de levure (Biomérieux)	4 g
Extrait de malt (Bacto)	8 g
Eau distillée	q.s.p.1 L

Le pH est ajusté à 7 avec de la soude (2N) (Prolabo) puis le milieu est autoclavé à 120 °C pendant 20 min.

#### 2.1.2. Milieu semi-synthétique basal (SS)

Pour les essais microbiologiques, le milieu semi-synthétique (SS), mis au point par Bouras et al. (2006), est utilisé. Ce milieu est un mélange de 10 % v/v d'une solution de D(+)-glucose (Prolabo) à 150 g/L (solution A) et 90 % v/v d'une solution B dont la composition est décrite ci-dessous.

Composition de la solution B (pour 900 mL) :

CaCO <sub>3</sub> (Prolabo) (≥ 99,9 %)	5 g
Extrait de levure (Biomérieux)	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Fluka)	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Fluka)	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O (Prolabo)	0,2 g
NaCl (Prolabo)	2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Prolabo)	2 g
Eau distillée	q.s.p 900 mL

Le pH de la solution B est ajusté à 7 avec de la soude (2N) (Prolabo) avant autoclavage à 120 °C pendant 20 min. La solution A est également autoclavée séparément à 120 °C pendant 20 min.

## 2.2. Conservation de la souche

La souche a été stockée sous forme de spores dans des cryotubes contenant du glycérol à 25 % v/v conservés à -20 °C. Le stock de spores a été réalisé suivant le protocole décrit ci-dessous.

### 2.2.1. Production de spores

La suspension microbienne (500 µL) est étalée sur des boîtes de Pétri contenant 20 mL de gélose ISP2 (un milieu dont la composition est décrite dans le paragraphe 2.2.1) à partir d'un aliquot de suspension de spores de la banque de souche déjà existante dans le laboratoire. Les boîtes sont ensuite incubées pendant 7 jours à 30 °C afin d'obtenir un tapis bactérien dense.

### 2.2.2. Récupération et stockage des spores

Pour la récupération des spores, 5 mL d'une solution de Tween 80 à 0,1 % v/v sont déposés dans les boîtes de Pétri. Le tapis bactérien est gratté délicatement avec un râteau stérile pour récupérer les spores dans la solution de Tween. Ensuite, la suspension de spores est récupérée à l'aide d'une pipette et transvasé dans un flacon stérile. Une solution de glycérol à 50 % v/v est ajoutée à la suspension de spores pour obtenir une concentration finale en glycérol de 25 % v/v. Enfin le mélange est vortexé avant d'être réparti dans des cryotubes stériles de 1,5 mL sous un volume final de 1 mL. Les tubes sont stockés par la suite à -20 °C.

### 2.2.3. Comptage des spores

Avant toute manipulation, un cryotube est décongelé à température ambiante. Des dilutions successives au dixième de la suspension de spores sont réalisées jusqu'à la dilution  $10^{-10}$  en utilisant un bouillon de tryptone-sel stérile. Puis 100 µL des dilutions  $10^{-6}$  à  $10^{-10}$  sont ensemencées, en double, sur les boîtes de Pétri contenant gélose ISP2. Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant 7 jours. Par la suite, les colonies sont dénombrées sur les boîtes comportant 30 à 300 colonies. Le nombre de spores par cryotube est exprimé en Unités Formant Colonies (UFC) par mL. Lors de ces études, chaque aliquot de spores utilisé pour la préparation des pré-cultures contenait environ  $10^8$  UFC/mL.

## 2.3. Conditions de culture

### 2.3.1. Pré-culture

Les pré-cultures liquides sont réalisées dans un Erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL du milieu SS. Chaque Erlenmeyer estensemencé avec 1 mL de spores contenant  $10^8$  UFC/mL.

La pré-culture est incubée à 30 °C dans un incubateur (New Brunswick Scientific) pendant 2 jours sous une agitation de 250 rpm.

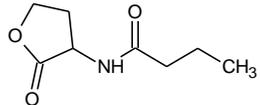
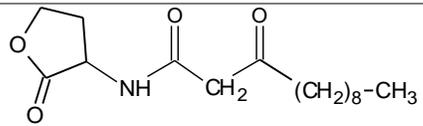
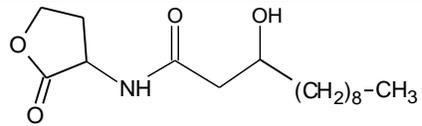
### 2.3.2. Cultures

Pour tous les essais microbiologiques, des Erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL du milieu SS sontensemencés avec 5 mL de pré-culture (un volume égal à 10 % du volume final). Les cultures sont placées dans un agitateur (rota test 74401) sous une agitation de 420 rpm à 28 °C  $\pm$  1 °C. La durée d'incubation est de 3 à 5 jours selon les essais.

### 2.3.3. Préparation des réactifs

La 1,4-gamma-butyrolactone commerciale ( $\geq 99$  %) (Sigma) a été utilisée pour la préparation d'une solution mère à 3,6 g/L avec de l'eau distillée. Les homosérines lactones, dont les structures sont rapportées dans le Tableau 2.1, ont été synthétisées antérieurement au laboratoire (LGC) selon le protocole décrit dans (Chhabra et al., 2003).

Tableau 2.1 : Structures des homosérines lactones testées.

Noms	Abréviation	Masse molaire (g/mol)	Structure
<b><i>N</i>-butyryl-homosérine lactone</b>	C <sub>4</sub> -HSL	171,19	
<b><i>N</i>-(3-oxo-dodécanyloyl)-homosérine lactone</b>	3-oxo-C <sub>12</sub> -HSL	297,39	
<b><i>N</i>-(3-hydroxy-dodécanyloyl)-homosérine lactone</b>	3-OH-C <sub>12</sub> -HSL	299,41	

L'éthanol absolu (> 99 %) (Acros), le butan-1-ol (> 99 %) (Fisher) et le diméthylsulfoxyde (Sigma) ont été utilisés lors des essais.

Les solutions mères des inhibiteurs : le diphénylèneiodonium (DPI) (Sigma) et l'azoture de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) (Sigma) ont été préparées à 0,4 mM (0,13 g/L) pour le DPI et à 0,01 M (0,65 g/L) pour le  $\text{NaN}_3$  avec de l'eau distillée stérile.

## 2.4. Méthodes analytiques

### 2.4.1. Dosage des dithiopyrrolones par HPLC

La quantification des dithiopyrrolones est réalisée par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) sur un appareil Merck-Hitachi (La Chrom, modèle D-7000) piloté par le logiciel multi-HSM (HPLC System Manager). Ce système est composé d'une boucle d'injection de 20  $\mu\text{L}$ , d'une interface D-7000, d'une pompe isocratique L-7100, d'un détecteur UV-visible L-7400 et d'un four (Jetstream 2 plus). Les analyses sont réalisées à un débit de 0,8  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  et la colonne est thermostatée à 30 °C. La colonne est de type Hypersil BDS C18 RP, 250 x 4,6 mm avec la taille des particules de 5  $\mu\text{m}$  (Thermo Scientific) munie d'une pré-colonne. La phase mobile est composée d'un mélange eau distillée/acétonitrile (Acros) (70 : 30 v/v). Les dithiopyrrolones sont détectées et quantifiées à 390 nm. Les échantillons à analyser du surnageant de culture sont filtrés avec un filtre de taille de pores de 0,2  $\mu\text{m}$  (Millipore, Fischer).

#### 2.4.1.1. Quantification des dithiopyrrolones

Étant donné que les différents dérivés de dithiopyrrolones possèdent des coefficients d'extinction molaire très proches ( $\epsilon = 8317 - 9333 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) (Lamari et al., 2002 a), une courbe d'étalonnage est réalisée avec une solution d'holothine pour quantifier l'ensemble des dithiopyrrolones contenues dans les surnageants des cultures.

Les différentes solutions de la gamme d'holothine (2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 ; 15 et 20 mg/L) sont préparées dans un mélange eau distillée/acétonitrile (Acros) 70 : 30 v/v à partir d'une solution mère préparée avec de l'eau distillée.

Dans les conditions utilisées, le temps de rétention des dithiopyrrolones est de 5,3 min. Les solutions de la gamme étalon sont analysées en triplicata. L'erreur de mesure de concentration est inférieure à 5 %. Le coefficient de corrélation linéaire  $R^2$  est de 0,996.

Les moyennes des aires correspondantes aux concentrations de la gamme d'holothine permettent de tracer la droite d'étalonnage (Figure 2.1) qui sera extrapolable aux autres dithiopyrrolones naturellement produites par *S. algeriensis*. La production spécifique des dithiopyrrolones, exprimée en mg/g, est le rapport de la concentration de dithiopyrrolones sur la biomasse.

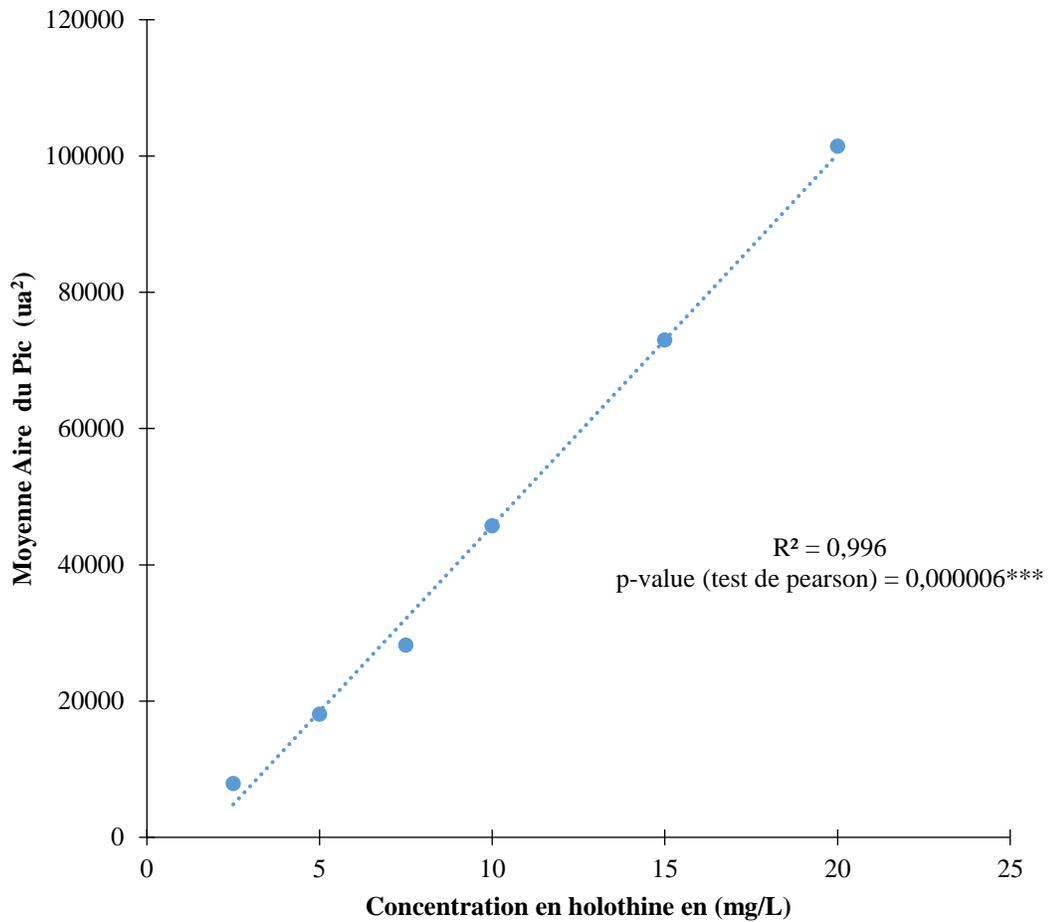


Figure 2.1: Droite d'étalonnage de la gamme d'holothine.

#### 2.4.2. Quantification de la biomasse par mesure du poids sec

La culture est traitée avec 10 mL d'acide chlorhydrique (0,3 N) (Acros) pour éliminer le carbonate de calcium puis filtrée sous vide sur des papiers filtres préalablement pesés. Le reste de la biomasse est récupéré par rinçage à plusieurs reprises avec de l'eau distillée.

Les papiers filtres sont placés dans une étuve à 90 °C pendant 24 h, refroidis puis pesés. La masse sèche est rapportée à un litre de culture selon l'équation 1 :

$$\text{Équation 1 : Matière sèche (g/L)} = ((P_i \text{ (g)} - P_f \text{ (g)}) / (V_p \text{ (L)}))$$

$P_i$  : Poids initial du filtre

$P_f$  : Poids final du filtre

$V_p$  : Volume de culture

#### 2.5. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices et Bactéricides

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des différentes molécules ont été déterminées par microméthode selon les indications du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM 2008) et de l'International Laboratory Standards (ILS, 2008). Dans les 96 puits d'une microplaque stérile à fond rond, 100 µL de milieu de Mueller-Hinton sont déposés. Ensuite, 100 µL de la solution-mère de chaque produit à tester sont déposés dans les premiers puits de 3 lignes (essais en triplicata).

Après homogénéisation, des dilutions au-demi sont réalisées de la colonne 1 à la colonne 10 incluse. L'incubation a été réalisée par dépôt de 100 µL de la suspension mère du microorganisme test ajustée à environ  $10^8$  UFC/mL, dans chaque puit. Les colonnes 11 et 12 servent respectivement de témoin stérilité du milieu et de témoin croissance du microorganisme.

Après cinq jours d'incubation à 30 °C, les CMI sont déterminées comme les plus petites concentrations molaires avec absence de croissance visible. Les Concentrations Minimales Bactéricides (CMB) sont obtenues par repiquage à l'aide de l'ensemenceur multipoint (Denley) de la microplaque de CMI vers un milieu solide ISP2.

Après cinq jours d'incubation à 30 °C, les CMB sont définies comme les plus petites concentrations molaires avec absence de croissance visible ou présence de 3 colonies ou moins.

## 2.6. Matériel électrochimique

### 2.6.1. Cellule électrochimique

La cellule électrochimique (Figure 2.2) spécialement fabriquée par la société AVITEC est composée de deux flacons de 100 mL, soudés à l'aide de silicone. Les flacons sont séparés par une membrane semi-perméable en Nafion® (Ultrax, CMI-7000, Membranes Internationales, USA), qui permet l'échange des ions.

Le compartiment de l'électrode de travail est équipé d'un système d'aération. Le débit d'aération est de 150 mL/min. La cellule est placée dans un bain marie muni d'un thermostat (Fischer Scientific ; polystat 24). La température est maintenue à 30 °C.

Avant toute manipulation, la cellule contenant l'électrode de travail et la contre-électrode a été autoclavée à 120 °C pendant 20 min. Le compartiment de l'électrode de travail est rempli avec 90 mL de milieu SS etensemencé avec 10 mL de préculture de *S. algeriensis*. Le compartiment de la contre-électrode est rempli avec 100 mL de milieu SS. La durée de la culture est de quatre jours.

À la fin de la culture, l'électrode de travail est prélevée et mise dans l'étuve à 90 °C pendant 24 h pour la détermination du poids de la biomasse selon l'équation 1 (§ 2.5.2). Le dosage des dithiopyrrolones est effectué comme décrit dans le paragraphe 2.5.1.

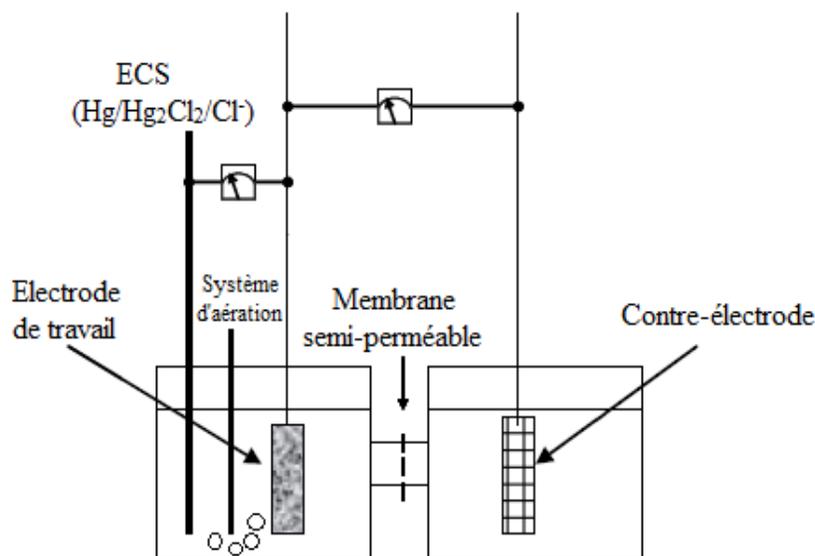


Figure 2.2 : Schéma du montage de la cellule électrochimique.

Le montage utilisé pour les études électrochimiques est un montage à trois électrodes : une électrode de travail (WE), une contre-électrode (CE) et une électrode de référence (Figure 2.2).

### 2.6.2. Électrodes de travail et contre-électrode

Différents matériaux d'électrodes de travail sont utilisés : le feutre de carbone (carbone Lorraine, RVG), la maille de platine et la plaque d'acier inoxydable (Figure 2.3). Les dimensions des électrodes sont de : 1,5 x 2 cm pour le feutre de carbone avec une épaisseur de 1 cm, 1,5 x 1,2 cm pour la maille de platine et 2,5 x 0,9 cm pour la plaque d'acier inoxydable ayant une épaisseur de 0,2 cm. La contre-électrode est un tissu de carbone (Paxitech) de dimension 3 x 2 cm. Aucun traitement préalable à l'utilisation des électrodes n'a été effectué.

### 2.6.3. Électrode de référence

L'électrode de référence utilisée est une électrode au calomel saturée (ECS, Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Cl<sup>-</sup>, Analytical, Radiometer). Elle a été conservée dans une solution saturée de chlorure de potassium (Fluka). Une désinfection à l'alcool et à la flamme a été effectuée au préalable de chaque manipulation.

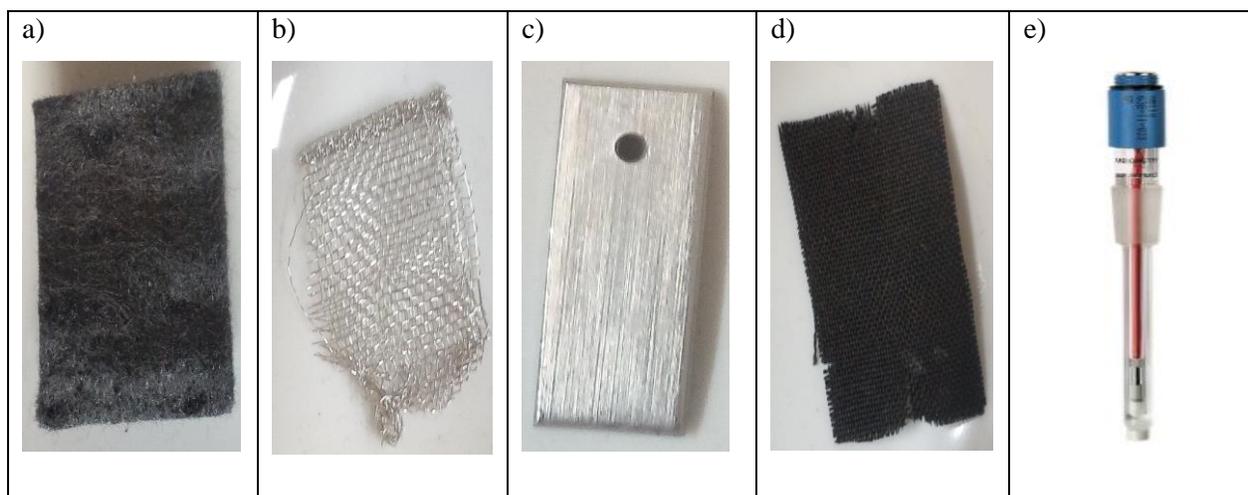


Figure 2.3 : Électrodes utilisées dans cette étude : électrode en feutre de carbone (a), électrode en maille de platine (b), électrode en acier inoxydable (c), contre-électrode en tissu de carbone (d) et une électrode de référence à calomel saturé (ECS) (e).

## 2.7. Technique électrochimique

La chronoampérométrie consiste à imposer un potentiel constant à l'électrode de travail et à suivre la variation du courant au cours du temps. À la surface de cette électrode, les potentiels (vs ECS<sup>1</sup>) testés sont -0,3 ; -0,2 ; 0 ; 0,2 et 0,3V. Les mesures électrochimiques ont été réalisées avec un potentiostat monovoie (Princeton Applied Research) piloté par le logiciel PowerSuite. La réponse enregistrée pendant quatre jours par le potentiostat correspond au courant résultant des réactions électrochimiques ayant lieu à la surface de l'électrode de travail. Les courants enregistrés sont ensuite rapportés à la surface d'une face de l'électrode et exprimés en densité de courant (mA/m<sup>2</sup>).

## 2.8. Microscopie à épifluorescence 3D

La colonisation mycélienne des électrodes est caractérisée par microscopie à épifluorescence 3D (Figure 2.4). Les observations microscopiques ont été effectuées avec l'aide de Monsieur Benjamin ERABLE (CR CNRS) au département BioSyM du Laboratoire de Génie Chimique à l'INP-ENSIACET avec un microscope Carl Zeiss Axio Imager-M2 motorisé en Z et équipé avec une source de lumière (HBO 200) et un filtre Zeiss 09 (excitateur HP450-490, réflecteur FT-10, filtre barrière LP520). Les images sont acquises avec une caméra monochrome numérique (Evolution VF) et traitées avec le logiciel Zen.

Pour pouvoir observer la colonisation mycélienne des électrodes au microscope, les électrodes ont été traitées à l'acridine orange 0,01 % (A6014 Sigma), un fluorochrome cationique lipophile spécifique des acides nucléiques. Les électrodes ont été recouvertes de la solution aqueuse pendant 10 minutes puis rincée à deux reprises avec de l'eau distillée. Avant les observations, les électrodes ont été ensuite laissées pour sécher à température ambiante pendant 15 minutes.

---

<sup>1</sup> Les potentiels sont imposés à l'aide d'un potentiostat par rapport à une électrode de référence au calomel saturée (ECS) par rapport à laquelle tous les potentiels sont exprimés dans la suite. Le potentiel de ECS = + 0,241 V par rapport à l'électrode standard à hydrogène (ESH).

### 2.9. Analyses statistiques des données

Les essais microbiologiques ont été effectués en triplicata de duplicata ou de triplicata ( $n = 6$  ou  $9$ ). Alors que pour les essais électrochimiques, les témoins négatifs ont été réalisés en une seule réplication et les tests à différents potentiels ont été réalisés en une seule ou plusieurs réplifications ( $n \geq 1$ ). Les données des graphiques sont représentées sous la forme de moyenne  $\pm$  écart-type. L'ensemble des analyses statistiques a été effectuée grâce au logiciel R studio (Version 1.0.136-© 2009-2016, Inc).

Les tests statistiques réalisés sur les données sont les tests non paramétriques de Kruskal-Wallis et de Wilcoxon ainsi que le test de comparaison multiple des moyennes de Duncan. Le test de Pearson a été également utilisé pour les corrélations. Les différences par rapport au témoin sont considérées significatives à un seuil de risque de première espèce  $\alpha = 5 \%$ .

Chapitre 3 : Étude de l'effet des éliciteurs chimiques sur la biosynthèse de dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*

Chapitre 3 : Étude de l'effet des éliciteurs chimiques sur la biosynthèse de dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*

---

### 3. Stratégie de travail

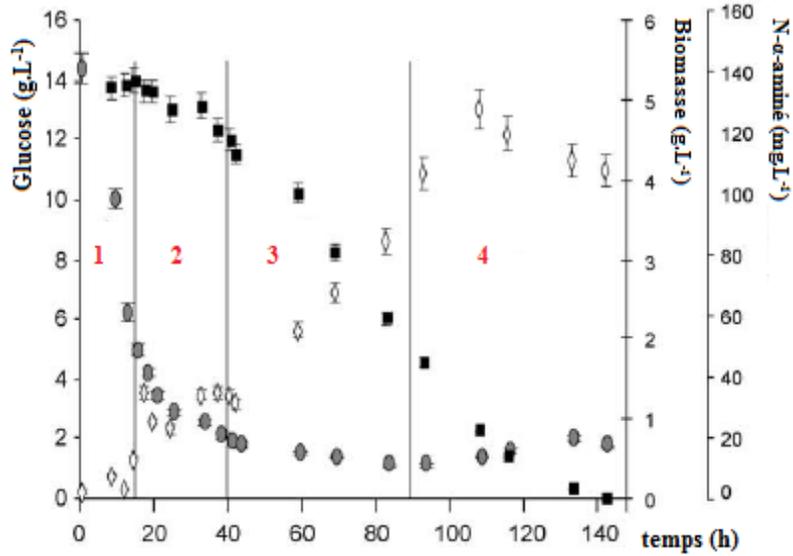
Certains composés chimiques peuvent servir de molécules signal, déclenchant les mécanismes de défense du micro-organisme et permettant la stimulation du métabolisme secondaire et donc de la production des antimicrobiens (cf § 1.3). Lors de ces travaux nous avons étudié l'effet éliciteur de certains composés sur *S. algeriensis*. D'une part, l'effet des auto-inducteurs du type gamma-butyrolactone et homosérine lactone sur la production de dithiopyrrolones a été évalué. D'autre part, nous nous sommes intéressés aux composés chimiques simples comme des alcools (éthanol, butan-1-ol) ou diméthylsulfoxyde.

Les essais ont été réalisés dans un erlenmeyer, avec un milieu de culture semi-synthétique (cf § 2.1.2). Afin de déterminer les conditions optimales pour l'ajout des éliciteurs dans le milieu de culture, une gamme des concentrations a d'abord été testée, pour déterminer la concentration conduisant à une augmentation significative de la production de dithiopyrrolones. Pour les alcools et le DMSO, préalablement aux essais, nous avons évalué leur seuil de toxicité. Ensuite, l'influence du temps d'addition, d'ajouts successifs et/ou combinaison des composés a été étudiée. Pour les alcools, des expériences complémentaires ont été réalisées pour pouvoir identifier leur mécanisme d'action comme éliciteur.

Pour déterminer l'effet du temps d'addition des composés chimiques sur la production de biomasse et de dithiopyrrolones, ceux-ci ont été introduits dans le milieu de culture à différents temps d'incubation. Nous nous sommes basés sur le schéma de croissance (Figure 3.1) de *S. algeriensis* dans un milieu de culture semi-synthétique décrit par (Strub et al., 2008 ; Strub et al., 2010).

Dû au métabolisme diauxique de *S. algeriensis*, la croissance microbienne est divisée en quatre phases : deux phases de croissance intercalées par une phase stationnaire de production de dithiopyrrolones (Figure 3.1). La production des dithiopyrrolones commence après la première phase de croissance c'est-à-dire environ après 15h de culture, lorsque les premiers acides aminés sont consommés, et persiste approximativement pendant 20 h. Après 40 h de culture, la deuxième phase de croissance débute puis la seconde phase de production des dithiopyrrolones coïncide avec la consommation du glucose dans le milieu de culture (après environ 90 h de culture).

a)



b)

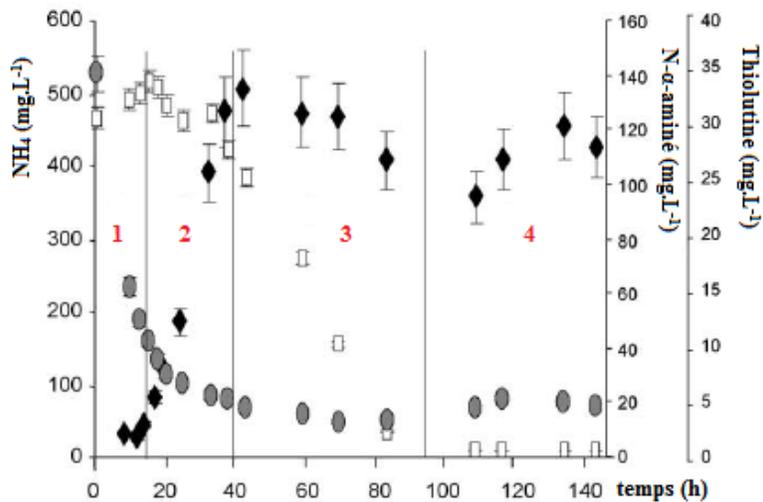


Figure 3.1 : Culture batch de *S. algeriensis* sur milieu semi-synthétique standard, 30 °C, pH 7, 0.5 vvm et 150 rpm. a) Biomasse en ( $\text{g.L}^{-1}$ ) (losanges blancs), azote  $\alpha$ -aminé en  $\text{mg.L}^{-1}$  (ronds gris) et glucose en  $\text{g.L}^{-1}$  (carrés noirs). b) Thiolutine en  $\text{mg.L}^{-1}$  (losanges noirs), azote  $\alpha$ -aminé en  $\text{mg.L}^{-1}$  (ronds gris) et ions ammonium en  $\text{mg.L}^{-1}$  (carrés blancs) (extrait de l'article de Strub et al., 2010).

C'est pourquoi les temps d'addition qui ont été choisis sont : 0 h (début de la 1<sup>ère</sup> phase de croissance exponentielle), 24 h (durant la phase de production des dithiopyrrolones) et 48 h (au début de la 2<sup>ème</sup> phase de croissance exponentielle) après le début de la croissance. Dans les cultures en Erlenmeyer, la production maximale de dithiopyrrolones par *S. algeriensis* est obtenue 72 h après l'inoculation (Bouras et al., 2007).

### 3.1. Effet de la gamma-butyrolactone ( $\gamma$ -butyrolactone, GBL)

#### 3.1.1. Effet de la concentration en GBL

Deux concentrations en  $\gamma$ -butyrolactone (250 et 500  $\mu$ M) ont été testées, parallèlement à la culture témoin. Les concentrations testées 250 et 500  $\mu$ M sont dans l'ordre des concentrations des inducteurs de QS retrouvées dans les milieux naturels (Lowery et al., 2008 ; Shiner et al., 2005). Les résultats après 72 h d'incubation sont présentés sur la Figure 3.2 (a et b).

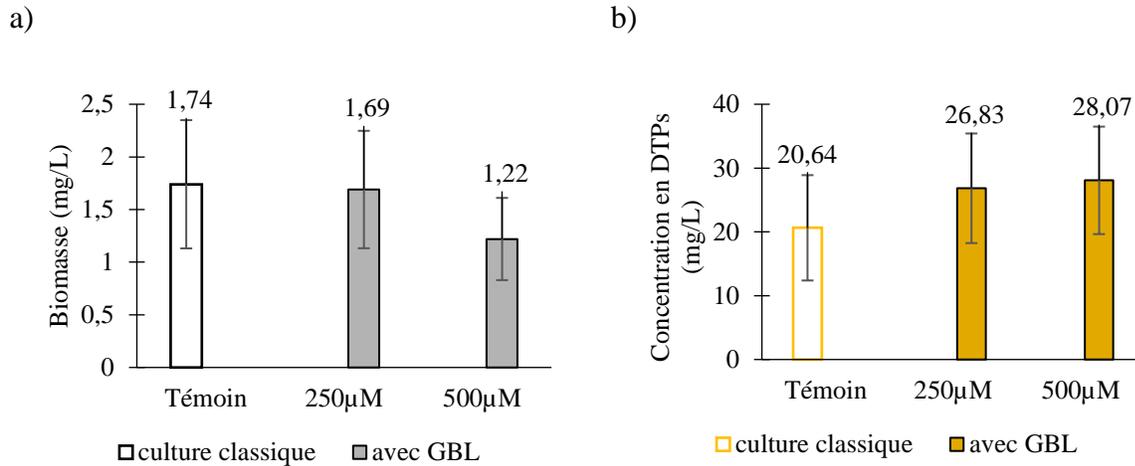


Figure 3.2 : Effet de GBL sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b) (n= 9).

Nous constatons une diminution de la biomasse de 30 % environ seulement en présence de 500  $\mu$ M de  $\gamma$ -butyrolactone en comparaison avec la culture témoin (Figure 3.2.a).

Cette diminution de la biomasse est accompagnée d'une légère augmentation de la concentration en dithiopyrrolones (Figure 3.2.b). Cependant, compte tenu des écart-types, cette augmentation de la concentration en dithiopyrrolones n'est pas significative.

Ainsi, la production spécifique (PS), en dithiopyrrolones, c'est-à-dire le ratio entre la quantité des dithiopyrrolones par gramme de biomasse, augmente de  $11,86 \pm 2,96$  mg/g (culture témoin) pour atteindre  $23,01 \pm 6,80$  mg/g de biomasse, soit le double, dans la culture supplémentée par 500  $\mu$ M de  $\gamma$ -butyrolactone.

### 3.1.2. Effet du temps d'addition de la GBL

En se basant sur les résultats de l'expérience précédente, la concentration en  $\gamma$ -butyrolactone de 500  $\mu$ M a été choisie pour la suite des essais.

La  $\gamma$ -butyrolactone a été ajoutée dans le milieu de culture à 0 h, à 24 h ou à 48 h d'incubation. Les résultats sont présentés dans la Figure 3.3 (a et b). Le test de Kruskal-Wallis suivi par le test de comparaison multiple des moyennes de Duncan ont été réalisés.

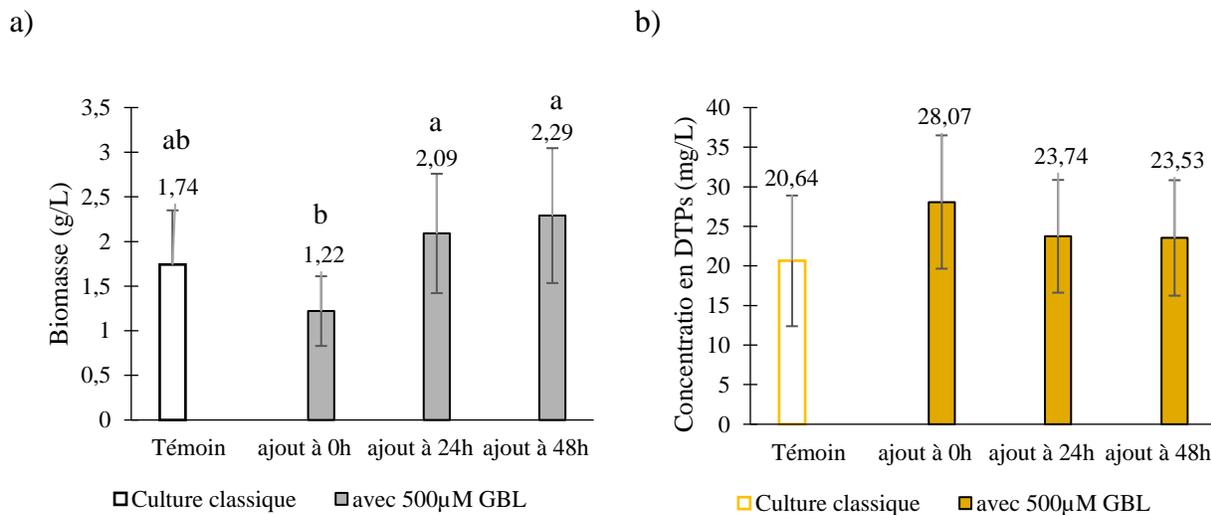


Figure 3.3 : Effet de différents temps d'addition de 500  $\mu$ M de GBL sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b) (n=9). D'après le test de Duncan, deux lettres différentes signifient deux moyennes significativement différentes au seuil de risque  $\alpha = 5$  %.

Tandis que l'ajout de GBL à  $t_0$  conduit à une diminution de la biomasse, les ajouts ultérieurs après 24 h ou 48 h d'incubation de la culture engendrent une légère augmentation de la biomasse (Figure 3.3.a). Dans ces conditions, la biomasse quantifiée de la culture témoin est de 1,74 g/L alors qu'elle est de  $2,09 \pm 0,67$  g/L et  $2,29 \pm 0,76$  g/L respectivement dans les cultures additionnées de  $\gamma$ -butyrolactone.

Néanmoins, l'effet de cet ajout après 24 h ou 48 h d'incubation de la culture sur la concentration en dithiopyrrolones n'est pas significatif (Figure 3.3.b). Contrairement à l'ajout en début de culture, les valeurs des concentrations de dithiopyrrolones dans ces cultures sont de l'ordre de 23 mg/L contre 20 mg/L dans la culture témoin.

### 3.2. Effet des homo-sérines-lactones (HSL)

Les concentrations des HSL qui ont été testées sont 250 et 500  $\mu\text{M}$ . Elles sont dans la gamme des concentrations des inducteurs de QS retrouvées dans les milieux naturels (Lowery et al., 2008 ; Shiner et al., 2005)

#### 3.2.1. Effet de la N-butyryl-Homosérine lactone ( $\text{C}_4$ -HSL)

##### 3.2.1.1. Effet de la concentration en $\text{C}_4$ -HSL

Les évolutions des concentrations en dithiopyrrolones et en biomasse suite à l'ajout de la  $\text{C}_4$ -HSL après cinq jours d'incubation sont présentées sur la Figure 3.4 (a et b). Le test de Kruskal-Wallis suivi par le test de comparaison multiple des moyennes de Duncan ont été réalisés.

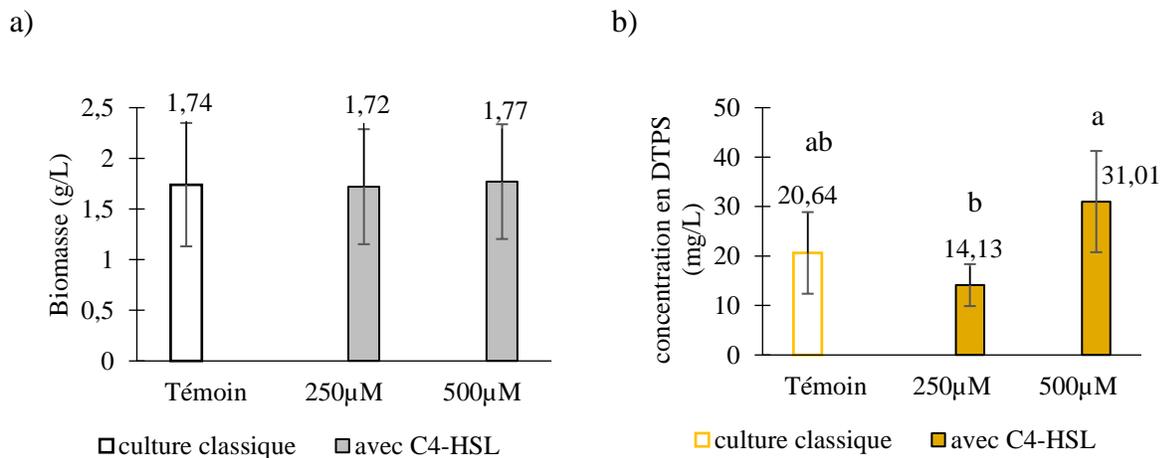


Figure 3.4 : Effet de la  $\text{C}_4$ -HSL sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b) (n=9). D'après le test de Duncan, deux lettres différentes signifient deux moyennes significativement différentes au seuil de risque  $\alpha = 5\%$ .

La production de biomasse n'est pas affectée par l'ajout de la  $\text{C}_4$ -HSL quelle que soit la concentration et reste en quantité similaire à celle du témoin (Figure 3.4.a).

Par contre, la concentration en dithiopyrrolones varie selon la concentration de la  $\text{C}_4$ -HSL : elle diminue en présence de 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{C}_4$ -HSL et reste inférieure à celle du témoin, ( $14,13 \pm 4,24$  mg/L contre  $20,64 \pm 8,25$  mg/L), et elle augmente d'environ 55 % par rapport à la culture témoin avec l'ajout de 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{C}_4$ -HSL pour atteindre ( $31,01 \pm 10,23$  mg/L) (Figure 3.4.b). La production spécifique est de  $17,51 \pm 5,25$  mg/g en présence de 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{C}_4$ -HSL contre  $11,86 \pm 2,96$  mg/g pour le témoin.

### 3.2.1.2. Effet des ajouts successifs de la C<sub>4</sub>-HSL

Certaines bactéries du phylum *Actinobactéries* sont capables de dégrader les HSL par différentes enzymes, comme la lactonase ou l'acylase (Polkade, 2016) et donc d'inhiber leur action d'auto-inducteur. Pour pallier la diminution éventuelle de la concentration des N-acyl-HSL, elles ont été ajoutées dans le milieu de culture par doses successives, correspondantes à  $2,5 \times 10^{-5}$  moles, toutes les 24 h.

Les résultats obtenus, suite à des ajouts successifs de C<sub>4</sub>-HSL soit à 0 h et à 24 h ou à 0 h, 24 h et 48 h d'incubation sur la croissance de la bactérie et sa capacité à produire des dithiopyrrolones après 3 jours d'incubation sont rapportés dans la Figure 3.5 (a et b).

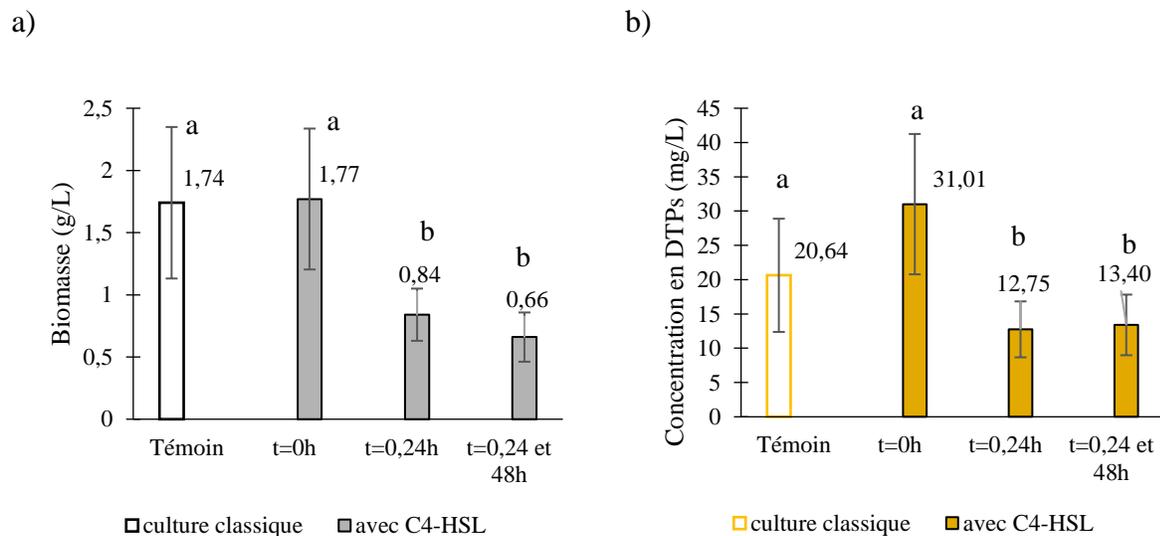


Figure 3.5 : Effet de différents temps d'addition de 500  $\mu$ M de C<sub>4</sub>-HSL sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b) (n=9). D'après le test de Duncan, deux lettres différentes signifient deux moyennes significativement différentes au seuil de risque  $\alpha = 5 \%$ .

Au bout de 3 jours d'incubation, nous pouvons constater que les ajouts successifs de C<sub>4</sub>-HSL engendrent une diminution significative à la fois de la biomasse et de la concentration en dithiopyrrolones. La biomasse quantifiée dans les milieux de cultures supplémentés par des doses successives de C<sub>4</sub>-HSL a diminué d'environ 50 % ( $0,84 \pm 0,21$  g/L et  $0,66 \pm 0,2$  g/L) par rapport à la culture témoin ( $1,74 \pm 0,61$  g/L) ou par rapport à la culture avec un seul ajout de la C<sub>4</sub>-HSL à t<sub>0</sub> (Figure 3.5.a).

Dans ces mêmes conditions, la concentration en dithiopyrrolones dans les milieux supplémentés par la C<sub>4</sub>-HSL est notablement inférieure ( $12,75 \pm 3,57$  mg/L pour un ajout à 0 h et 24 h et  $13,40 \pm 4,02$  mg/L pour un ajout à 0 h, 24 h et 48 h) à celle de la culture témoin ( $20,64 \pm 8,25$  mg/L) ce qui correspond à une baisse d'environ 30 % (Figure 3.5.b). La quantité de dithiopyrrolones est divisée par deux par rapport à un seul ajout de C<sub>4</sub>-HSL à t<sub>0</sub>.

### 3.2.2. Effet de la N-(3-oxo-dodécanoyl)-Homosérine lactone (3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL)

#### 3.2.2.1. Effet de la concentration en 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL

L'effet de l'addition de la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL à deux concentrations différentes 250 et 500 µM sur la biomasse et la concentration de dithiopyrrolones est illustré dans la Figure 3.6 (a et b).

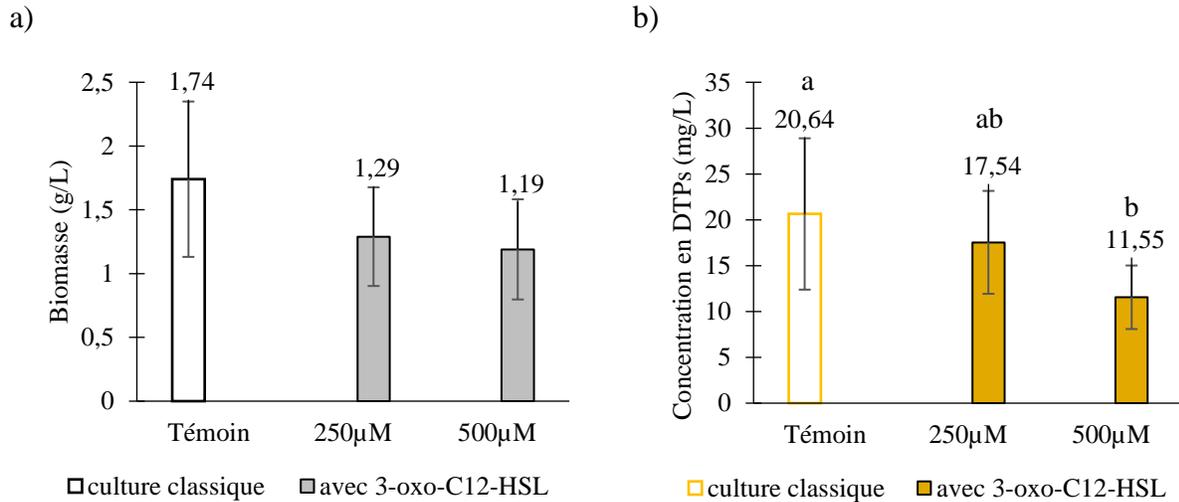


Figure 3.6 : Effet de l'ajout de 250 µM et 500 µM de 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b) (n=9). D'après le test de Duncan, deux lettres différentes signifient deux moyennes significativement différentes au seuil de risque  $\alpha = 5\%$ .

La quantité de biomasse diminue d'environ 30 % affectée par la présence de la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL ( $1,29 \pm 0,39$  g/L et  $1,19 \pm 0,39$  g/L respectivement en présence de 250 µM et 500 µM de 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL contre  $1,74 \pm 0,61$  g/L pour le témoin) (Figure 3.6.a).

La concentration de dithiopyrrolones dans le milieu de culture décroît progressivement avec l'augmentation de la quantité de 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL. Ainsi, en présence de 500 µM de 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL, la concentration des dithiopyrrolones n'atteint que la moitié de la valeur de celle de la culture témoin ( $11,55 \pm 3,47$  mg/L contre 20,64 mg/L) (Figure 3.6.b).

### 3.2.2.2. Effet des ajouts successifs de la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL

Pour les mêmes raisons que celle évoquées dans le cas de la C<sub>4</sub>-HSL, des essais ont été effectués en procédant à des ajouts successifs de la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL. La concentration initiale de la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL dans le milieu de culture a été de 500  $\mu$ M pour rester homogène avec les concentrations utilisées pour les autres molécules de ce type, bien que ce ne soit pas la concentration ayant conduit à la concentration en dithiopyrrolones la plus élevée dans l'étape précédente.

Les résultats obtenus, suite à des ajouts successifs de  $2,5 \times 10^{-5}$  moles de 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL soit à 0 h et à 24 h ou à 0 h, 24 h et 48 h d'incubation sur la croissance de la bactérie et sa capacité à produire des dithiopyrrolones après 3 jours d'incubation, sont rapportés dans la Figure 3.7 (a et b).

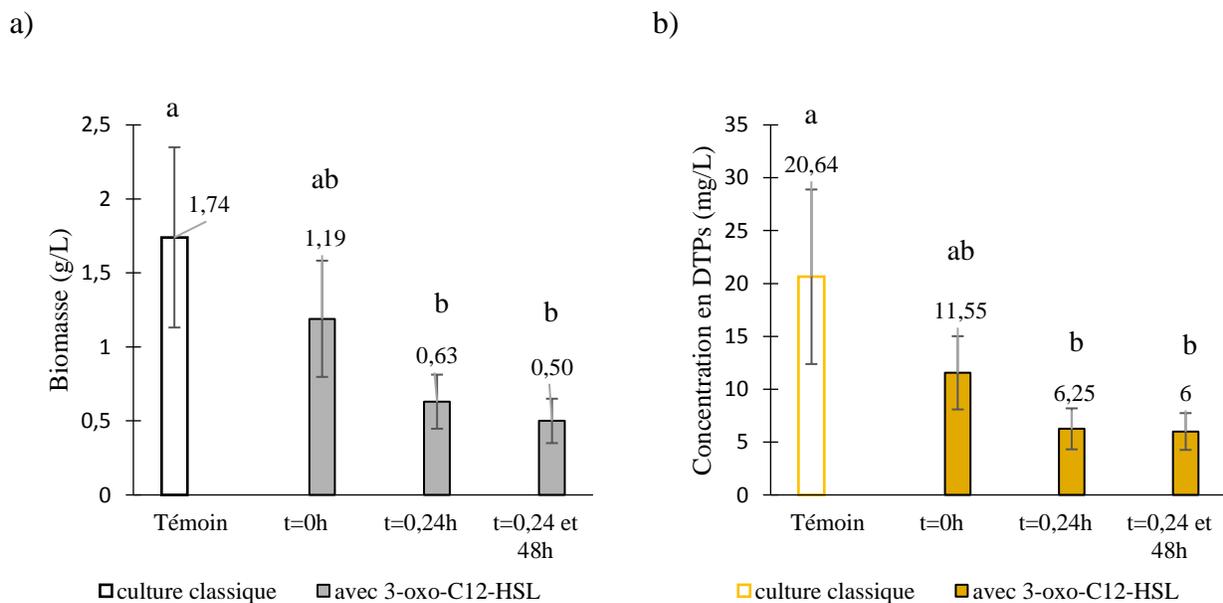


Figure 3.7 : Effet de différents temps d'addition de 500  $\mu$ M de 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b) (n=9). D'après le test de Duncan, deux lettres différentes signifient deux moyennes significativement différentes au seuil de risque  $\alpha = 5 \%$ .

L'ajout de doses successives de 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL à des intervalles de temps de 24 h engendre une diminution, de manière dose-dépendante, à la fois de la concentration en biomasse et des dithiopyrrolones (Figure 3.7 a et b).

La quantité de biomasse est de  $0,63 \pm 0,18$  g/L et  $0,50 \pm 0,15$  g/L respectivement en présence de deux et trois doses de 500  $\mu$ M de 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL contre  $1,74 \pm 0,61$  g/L pour le témoin et  $1,19 \pm 0,39$  g/L pour un ajout à  $t = 0$  h.

Nous remarquons donc une diminution de l'ordre de 70 % de la biomasse et de la concentration en dithiopyrrolones par rapport au témoin dans les différents cas. Cependant, la production spécifique reste similaire à celle du témoin ( $9,92 \pm 2,87$  mg/g et  $12,00 \pm 3,60$  mg/g respectivement en présence d'une, deux ou trois doses de 500  $\mu$ M de 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL contre  $11,86 \pm 2,96$  mg/g pour le témoin).

### 3.2.2.3. Effet des ajouts simultanés et successifs de la C<sub>4</sub>-HSL et la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL

Enfin nous avons testé l'effet de l'ajout simultané de 500 µM de chacun des deux inducteurs du QS, la C<sub>4</sub>-HSL et la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL au début de la culture et ensuite toutes les 24 h. Les résultats sont présentés dans la Figure 3.8 (a et b) (Nous avons rappelé sur le diagramme les résultats obtenus avec la C<sub>4</sub>-HSL et la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL testées séparément).

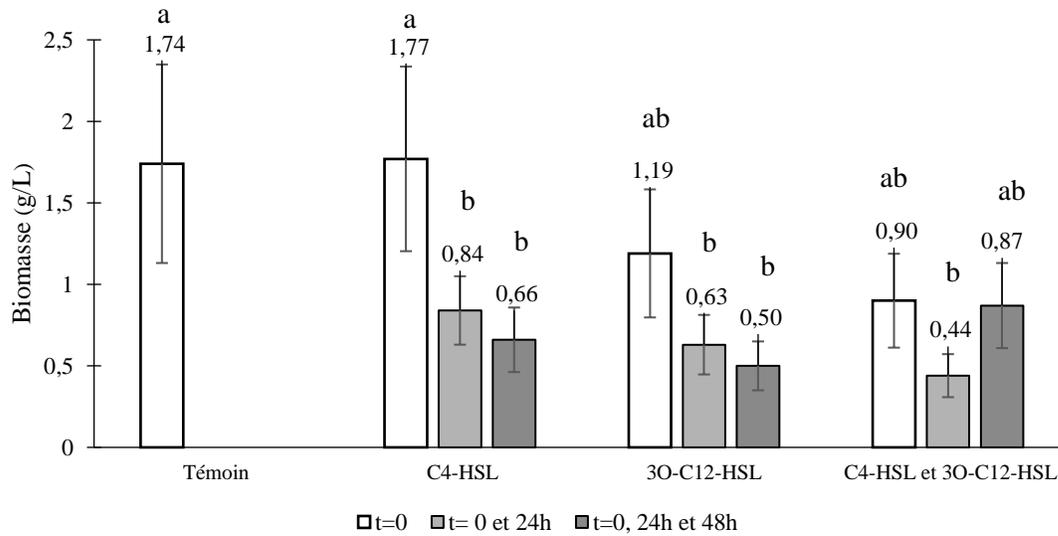
Nous constatons une diminution de la biomasse de 50 % dès le premier ajout simultané des deux homosérines lactones par rapport à la culture classique. Cet effet persiste suite à des ajouts successifs (Figure 3.8.a) et il est plus marqué pour des ajouts à 0 et 24 h.

Cependant, les additions simultanées et successives de ces deux molécules n'engendrent pas une variation significative de la concentration en dithiopyrrolones par rapport au témoin (culture classique). De plus, pour un seul ajout à 0 h nous constatons que le rendement en dithiopyrrolones est inférieur à celui obtenu avec un seul ajout de C<sub>4</sub>-HSL ( $23,19 \pm 7,19$  mg/L contre  $31,01 \pm 10,23$  mg/L) et supérieur à celui obtenu avec un ajout de 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL ( $23,19 \pm 7,19$  mg/L contre  $11,55 \pm 3,47$  mg/L).

Globalement avec 1, 2 ou 3 doses des deux HSL, les quantités de dithiopyrrolones obtenues sont du même ordre de grandeurs. Cependant, il faut noter que ces quantités sont supérieures à celles obtenues avec des doses équivalentes de C<sub>4</sub>-HSL ou de 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL.

Chapitre 3 : Étude de l'effet des éliciteurs chimiques sur la biosynthèse de dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*

a)



b)

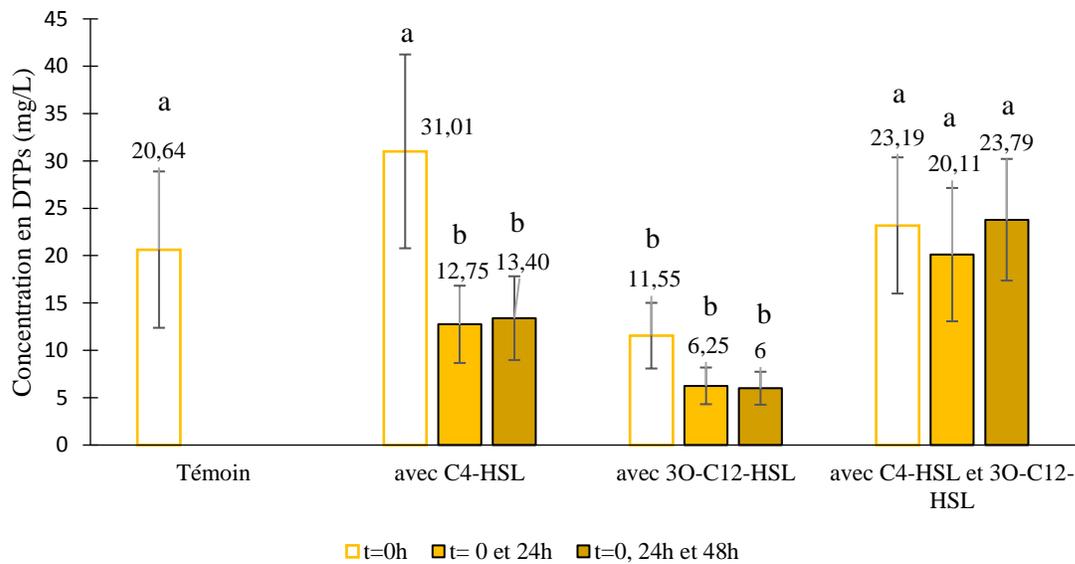


Figure 3.8 : Effet de l'ajout successif et simultané de 500  $\mu$ M de C<sub>4</sub>-HSL et 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b) (n=9). D'après le test de Duncan, deux lettres différentes signifient deux moyennes significativement différentes au seuil  $\alpha = 5 \%$ .

### 3.2.3. Effet de la 3-OH-C<sub>12</sub>-HSL

#### 3.2.3.1. Effet de la concentration en 3-OH-C<sub>12</sub>-HSL

L'effet de l'addition de la 3-OH-C<sub>12</sub>-HSL à 250 et 500 μM sur la production de dithiopyrrolones par *S. algeriensis* et sur sa croissance est présenté sur la Figure 3.9 (a et b).

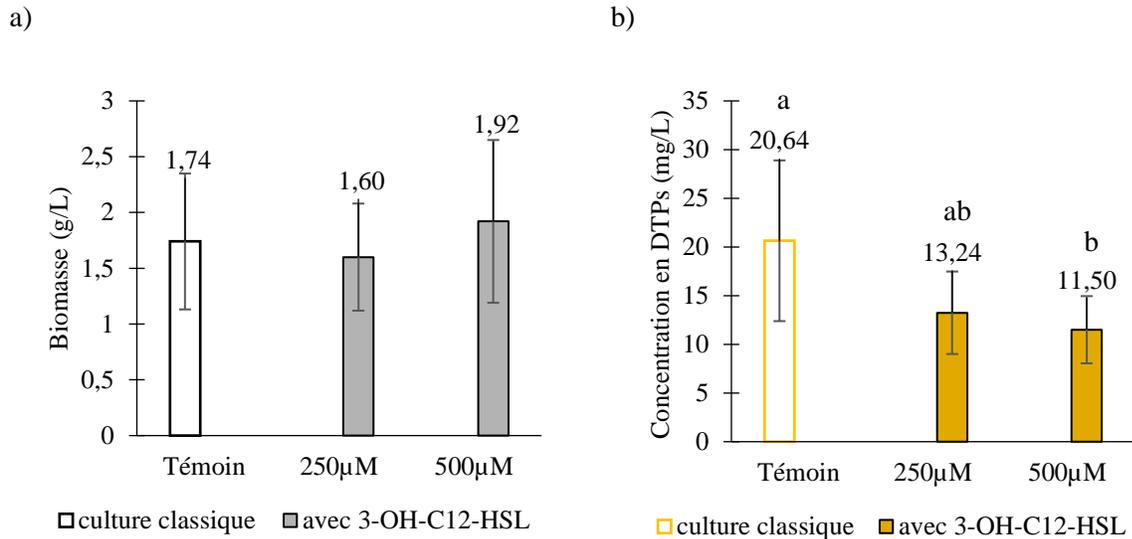


Figure 3.9 : L'effet de l'ajout de 250 μM et 500 μM de 3-OH-C<sub>12</sub>-HSL sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b) (n=9). D'après le test de Duncan, deux lettres différentes signifient deux moyennes significativement différentes au seuil de risque  $\alpha = 5\%$ .

Nous remarquons que l'ajout de cette molécule aux deux doses de 250 et 500 μM n'affecte pas la croissance de la bactérie ( $1,60 \pm 0,48$  g/L et  $1,92 \pm 0,73$  g/L respectivement contre  $1,74 \pm 0,61$  g/L pour le témoin) (Figure 3.9.a).

Par contre, la quantité de dithiopyrrolones diminue et est de  $13,24 \pm 4,24$  mg/L en présence de 250 μM de 3-OH-C<sub>12</sub>-HSL et de  $11,5 \pm 3,45$  mg/L en présence de 500 μM de cette molécule. Ces concentrations sont significativement inférieures respectivement de 30 % et 40 % environ à celle du témoin qui est de  $20,64 \pm 8,25$  mg/L (Figure 3.9.b).

### 3.3. Discussion

#### 3.3.1. Effet de la Gamma-butyrolactone

La molécule de  $\gamma$ -butyrolactone (1,4-butyrolactone) est un analogue structural des molécules signal des bactéries à Gram positif, comme le facteur A. Nous la retrouvons notamment comme molécule inductrice du QS chez les *Streptomyces*, un des genres les plus étudiés du domaine des *Actinobactéries*. Ces espèces sont notamment reconnues pour leur capacité à produire une grande diversité de famille d'antimicrobiens (Kato et al., 2007 ; Cundliffe, 2008).

Dans les conditions de test, nous observons une augmentation de la production des dithiopyrrolones avec un effet dose-dépendant, qui s'accompagne d'une faible diminution de la quantité de biomasse produite (Tableau 3.1). Ainsi, en présence de 500  $\mu$ M de GBL la production spécifique des dithiopyrrolones (concentration en dithiopyrrolones par rapport à la biomasse) augmente d'environ 90 % par rapport au témoin.

Tableau 3.1 : Effet de la concentration et du temps d'addition de la GBL sur la production spécifique des dithiopyrrolones par *S. algeriensis*.

Culture	Temps d'addition	Concentration ajoutée ( $\mu$ M)	[DTPs] (mg/L)	Biomasse (g/L)	PS (mg/g)
Témoin	0 h	-	20,64 $\pm$ 8,25	1,74 $\pm$ 0,61	11,86 $\pm$ 2,96
	0 h	250	26,83 $\pm$ 8,59	1,69 $\pm$ 0,56	15,88 $\pm$ 4,44
GBL	0 h	500	28,07 $\pm$ 8,42	1,22 $\pm$ 0,39	23,01 $\pm$ 6,80
	24 h	500	23,74 $\pm$ 7,12	2,09 $\pm$ 0,67	11,36 $\pm$ 3,40
	48 h	500	23,53 $\pm$ 7,29	2,29 $\pm$ 0,76	10,28 $\pm$ 3,17

Nous avons pu remarquer l'importance du moment de l'ajout de la gamma-butyrolactone dans le milieu de culture. Tandis que son ajout au début de la culture ne favorise que la production des dithiopyrrolones, l'ajout tardif (au bout de 24 h ou 48 h) ne soutient que la production de biomasse, tout en maintenant proportionnellement la production des dithiopyrrolones. Ainsi nous trouvons une production spécifique des dithiopyrrolones identique à celle de la culture témoin.

Nous pouvons supposer que l'ajout à  $t_0$  aura comme conséquence un raccourcissement de la première phase de croissance de la bactérie et un déclenchement précoce de la phase de production des dithiopyrrolones.

Cela pourrait justifier en partie la diminution de la quantité de biomasse et l'augmentation de la concentration en dithiopyrrolones.

Compte tenu de ces résultats, l'effet de la GBL pourrait s'apparenter à l'effet d'un éliciteur chimique en raison de ses effets sur la production de dithiopyrrolones par *S. algeriensis* (Choi et al., 2003 ; Abdelmohsen et al., 2015)

Il sera intéressant d'augmenter la concentration de cette molécule dans le milieu de culture, pour tester des quantités de l'ordre du mM comme cela a pu être rapporté dans la littérature (Tan et al., 2013). Le but serait d'augmenter la production des dithiopyrrolones sans trop diminuer la production de la biomasse.

### 3.3.2. Effets des Homosérines-lactones

Trois molécules de la famille des homosérines lactones ont été testées, la C<sub>4</sub>-HSL, 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL et 3-OH-C<sub>12</sub>-HSL. Il s'agit des inducteurs des bactéries à Gram négatif, plus particulièrement, nous les trouvons comme des molécules signal chez *P. aeruginosa*.

La C<sub>4</sub>-HSL à 500 µM a un effet positif sur la production des dithiopyrrolones qui augmente de 50 % par rapport au témoin (Tableau 3.2). Ces observations suggèrent qu'une concentration élevée de C<sub>4</sub>-HSL pourrait servir comme un inducteur de la biosynthèse des dithiopyrrolones par *S. algeriensis*. L'ajout de la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL diminue la biomasse et, parallèlement, la concentration en dithiopyrrolones avec un effet dose-dépendant (Tableau 3.2). La production spécifique reste identique à celle de la culture témoin.

Le remplacement de groupement oxo de la molécule signal 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL par le groupement hydroxy modifie le comportement du *S. algeriensis* se traduisant par la répression de la production des dithiopyrrolones mais tout en gardant la même quantité de biomasse comme dans le témoin non-supplémenté. Ainsi, en présence de 3-OH-C<sub>12</sub>-HSL la concentration des dithiopyrrolones est diminuée de 50 % par rapport à la culture témoin (Tableau 3.2).

La meilleure production spécifique est obtenue en présence de la C<sub>4</sub>-HSL, ajoutée à 500 µM au début de l'incubation. Ces observations suggèrent qu'une concentration élevée de C<sub>4</sub>-HSL pourrait servir comme un inducteur de la synthèse des dithiopyrrolones par *S. algeriensis*.

Tableau 3.2 : Effet de la concentration et du temps d'addition des homosérines lactone sur la production spécifique de dithiopyrrolones par *S. algeriensis*.

Culture	Concentration ajoutée (μM)	[DTPs] (mg/L)	Biomasse (g/L)	PS (mg/g)
<b>Témoin</b>	-	20,64 ± 8,25	1,74 ± 0,61	11,86 ± 2,96
<b>C<sub>4</sub>-HSL</b>	250	14,13 ± 4,24	1,72 ± 0,57	8,22 ± 2,40
	500	31,01 ± 10,23	1,77 ± 0,57	17,52 ± 5,25
<b>3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL</b>	250	17,54 ± 5,61	1,29 ± 0,39	13,60 ± 4,34
	500	11,55 ± 3,47	1,19 ± 0,39	9,71 ± 2,90
<b>3-OH-C<sub>12</sub>-HSL</b>	250	13,24 ± 4,24	1,6 ± 0,48	8,28 ± 2,48
	500	11,50 ± 3,45	1,92 ± 0,73	5,99 ± 1,79

Les ajouts successifs de la C<sub>4</sub>-HSL n'induisent pas des modifications notables de la production spécifique par rapport à un seul ajout à t<sub>0</sub>. Les quantités de biomasse ainsi que des dithiopyrrolones diminuent proportionnellement en fonction du nombre d'ajouts de C<sub>4</sub>-HSL. Également, dans les cultures supplémentées par les doses successives de 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL la quantité de biomasse diminue de 70 % par rapport au témoin. Par contre, le ratio : concentration des dithiopyrrolones/biomasse reste identique à celui de la culture sans inducteur (Tableau 3.3). La 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL a un effet néfaste sur la croissance de *S. algeriensis*, qui, par contre, garde les mêmes capacités à produire les dithiopyrrolones.

Ces résultats suggèrent que la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL ajoutée à des doses élevées pourrait être toxique vis-à-vis de la bactérie et affecterait ainsi son métabolisme. En effet, comme cela a été décrit dans la littérature, la molécule de 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL peut se décomposer pour donner l'acide tétramique qui possède un pouvoir bactéricide (Figure 3.10) (Kaufmann et al., 2005). Ce produit de dégradation pourrait être à l'origine de la diminution de la quantité de biomasse.

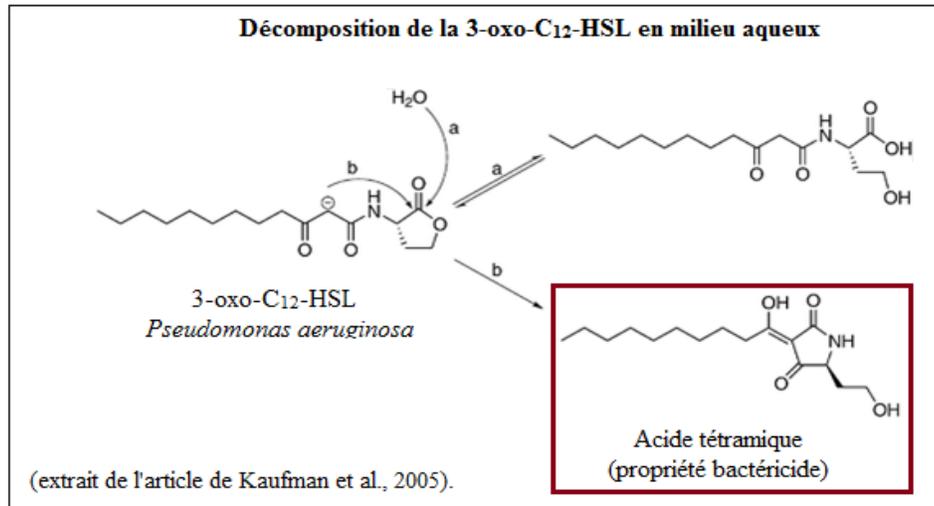


Figure 3.10 : Décomposition de la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL en milieu aqueux (extrait de l'article de Kaufman et al., 2005).

La combinaison des deux inducteurs C<sub>4</sub>-HSL et 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL, mis dans le milieu de culture soit à t = 0 h ou lors des ajouts successifs chaque 24 h, conduit à la diminution de la biomasse de 50 % sans diminuer la concentration des dithiopyrrolones par rapport au témoin sans les inducteurs (Tableau 3.3). Ainsi, la présence des deux molécules pourrait écourter la phase de croissance de *S. algeriensis* et stimulerait la transition vers la phase de la production des dithiopyrrolones.

Tableau 3.3 : Effet des ajouts simultanés et successifs de la C<sub>4</sub>-HSL et de la 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL sur la production spécifique de dithiopyrrolones par *S. algeriensis*.

Culture	Temps d'addition des molécules QS	Concentration ajoutée (µM)	PS (mg/g)
<b>Témoin</b>			11,86 ± 2,96
<b>C<sub>4</sub>-HSL</b>	0 h	500	17,52 ± 5,25
	0 et 24 h	500	15,18 ± 4,55
	0, 24 et 48 h	500	20,30 ± 5,68
<b>3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL</b>	0 h	500	9,71 ± 2,90
	0 et 24 h	500	9,92 ± 2,87
	0, 24 et 48 h	500	12,00 ± 3,60
<b>C<sub>4</sub>-HSL et 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL</b>	0 h	500	25,77 ± 7,47
	0 et 24 h	500	45,70 ± 13,71
	0, 24 et 48 h	500	27,34 ± 7,65

Les additions simultanées et successives de ces deux molécules entraînent une diminution de la biomasse, mais n'engendrent pas une variation significative de la concentration de dithiopyrrolones par rapport au témoin. Il en résulte une augmentation de la production spécifique des dithiopyrrolones supérieure à 250 % par rapport la culture témoin (Tableau 3.3).

Cela met en évidence un effet synergique de la combinaison des deux HSL par rapport à C<sub>4</sub>-HSL seule. Éventuellement, la présence de ces deux inducteurs simultanément pourrait mimer la présence d'une autre bactérie et déclencherait une réaction de défense de *S. algeriensis* influençant son métabolisme secondaire.

Bien que le système de QS ne soit pas encore décrit chez *S. algeriensis*, nos résultats suggèrent que la présence des molécules de type HSL pourrait avoir un impact sur le développement de cette bactérie. Selon la structure de la molécule, nous pourrions contrôler la croissance de la bactérie ainsi que la production des dithiopyrrolones. Ce phénomène a été observé avec une autre souche d'*Actinobactéries*, *S. coelicolor*, dont le récepteur à GBL interagit avec une C<sub>6</sub>-HSL (Yang et al., 2009).

### 3.4. Conclusion

Les molécules choisies pour cette étude sont la gamma-butyrolactone, analogue des auto-inducteurs chez les bactéries à Gram positif et des HSL, du Quorum Sensing des bactéries à Gram négatif. Par la présence de ces molécules nous avons pu modifier la production des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*. L'addition de GBL dans le milieu de culture à t<sub>0</sub>, permet d'augmenter la production spécifique des dithiopyrrolones d'environ 190 %. Cependant, le meilleur résultat a été obtenu par l'ajout simultané des deux HSL, C<sub>4</sub>-HSL et 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL, avec une production spécifique des dithiopyrrolones supérieure de 250 % par rapport à la quantité obtenue avec la culture non-supplémentée.

Il sera intéressant d'approfondir ces travaux pour mieux comprendre le mécanisme d'action de ces molécules.

### 3.5. Influence de solvants organiques sur la production de dithiopyrrolones

#### 3.5.1. Toxicité des solvants

Les CMI (concentration minimale inhibitrice) et CMB (concentration minimale bactéricide) des différents solvants vis-à-vis de *S. algeriensis* ont été évaluées selon le protocole décrit au chapitre 2. Les solvants testés sont l'éthanol, le butan-1-ol, le DMSO. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.4.

Tableau 3.4 : Valeurs des CMI et CMB des solvants.

	CMI (% v/v)	CMB (% v/v)
<b>Éthanol</b>	32 (= 5,48 M)	> 40
<b>Butan-1-ol</b>	4 (= 430 mM)	8
<b>DMSO</b>	> 16 (= 2,25 mM)	>16

La CMI de l'éthanol est de 32 % v/v et la concentration minimale bactéricide est supérieure à 40 % v/v. Le butan-1-ol est plus toxique pour la croissance de *S. algeriensis*, avec des CMI et CMB de l'ordre de 4 % v/v et 8 % v/v respectivement. Pour le DMSO, les concentrations minimales inhibitrice et bactéricide sont supérieures à 16 % v/v.

Par la suite, nous avons testé chaque solvant à des concentrations inférieures aux concentrations minimales inhibitrices correspondantes.

### 3.6. Effet des alcools

#### 3.6.1. Effet de l'éthanol

##### 3.6.1.1. Effet de la concentration de l'éthanol

Les expériences sont menées à des concentrations en éthanol inférieures à la CMI à savoir 32 % v/v correspondant à une concentration de 5,48 M. La gamme de concentrations d'éthanol testée varie de 10 mM à 685 mM ce qui correspond à des pourcentages volumiques de 0,06 % à 4 %.

Les résultats des essais sur l'effet de l'éthanol sur la croissance de la bactérie et sa capacité à produire des dithiopyrrolones après 5 jours d'incubation, sont rapportés dans la Figure 3.11 (a et b).

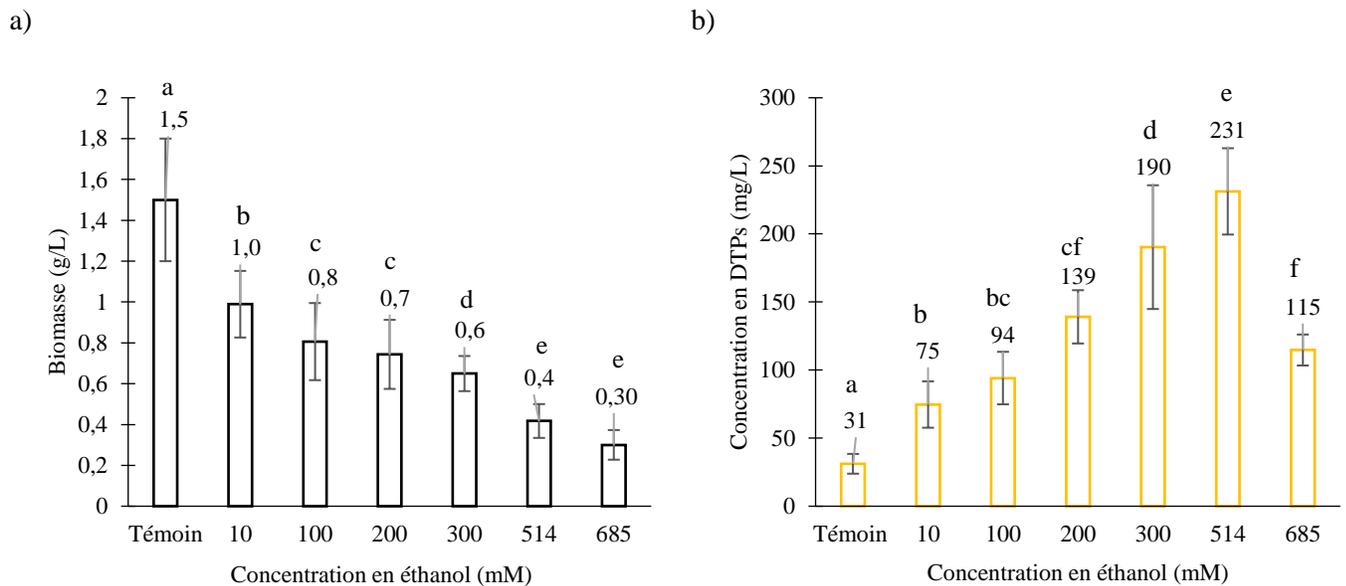


Figure 3.11 : Effet de la gamme d'éthanol sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b) (n=9). D'après le test de Duncan, deux lettres différentes signifient deux moyennes significativement différentes au seuil de risque  $\alpha = 5$  %.

Les résultats montrent que l'ajout d'éthanol affecte la croissance de *S. algeriensis*. Un effet dose-dépendant est observé, ainsi plus la concentration en éthanol est élevée, plus la quantité de biomasse est faible.

Dans les conditions de culture classique, la quantité de biomasse est de  $1,5 \pm 0,45$  g/L, mais déjà en présence de 10 mM d'éthanol, la quantité de biomasse diminue jusqu'à  $0,99 \pm 0,16$  g/L. Toutefois l'éthanol n'affecte significativement la croissance de la bactérie qu'à partir d'une concentration de 100 mM. À cette concentration, la quantité en biomasse est de  $0,8 \pm 0,2$  g/L et pour une concentration de 685 mM (4 % v/v) le rendement est divisé par 5 par rapport au témoin, passant à  $0,30 \pm 0,07$  g/L.

Cette diminution de la biomasse s'accompagne d'une augmentation de la production de dithiopyrrolones et ce de manière dose-dépendante avec la concentration en éthanol.

Dès l'ajout de 10 mM d'éthanol, la concentration en dithiopyrrolones passe à  $74 \pm 17$  mg/L alors qu'elle n'est que de  $31 \pm 7$  mg/L pour la culture témoin. En présence de 300 mM d'éthanol (1,74 % v/v) la concentration de dithiopyrrolones est de  $190 \pm 45$  mg/L, et en présence de 514 mM (3 % v/v) d'éthanol, elle est de  $231 \pm 31$  mg/L. La production de dithiopyrrolones est donc multipliée par un facteur 6 ou 7 respectivement par rapport à la concentration quantifiée pour la culture témoin. Au-delà de cette concentration, la production de dithiopyrrolones diminue pour atteindre des concentrations de l'ordre de  $114 \pm 11$  mg/L restant cependant toujours supérieure au témoin mais mettant en évidence l'impact négatif de fortes concentrations en éthanol.

Ces résultats indiquent que l'éthanol agirait comme un inducteur de stress sur la physiologie de croissance de la *S. algeriensis*. Cette dernière serait capable de s'adapter au stress environnemental en contrôlant sa vitesse de croissance ce qui aurait comme conséquence une biosynthèse importante de métabolites secondaires tels que les dithiopyrrolones.

Ensuite, une étude cinétique de la croissance et de la production de dithiopyrrolones dans différentes conditions de temps d'addition de l'éthanol a été réalisée dans une seconde série d'essais.

### 3.6.1.2. Effet du temps d'addition de l'éthanol

Dans le but d'étudier l'impact de l'ajout de l'éthanol sur les différentes phases de croissance de la bactérie, l'alcool est ajouté à 0 h (début de la 1<sup>ère</sup> phase de croissance), à 24 h (durant la phase de production des dithiopyrrolones) ou à 48 h (au début de la 2<sup>ème</sup> phase de croissance) après le début de la fermentation. La concentration en éthanol sélectionnée pour les tests est de 300 mM (1,74 % v/v) pour des raisons de reproductibilité expérimentale. Premièrement, afin de s'assurer que l'éthanol ne s'est pas évaporé ou n'a pas été dégradé durant l'incubation, la concentration de l'éthanol dans le milieu de culture a été contrôlée à différents temps (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h) de fermentation, en présence ou en absence de *S. algeriensis* (Hamdar et al., 2019). Dans les deux cas, il a été constaté que la concentration en éthanol dans le milieu de culture reste stable jusqu'à 72 h et décroît légèrement par la suite.

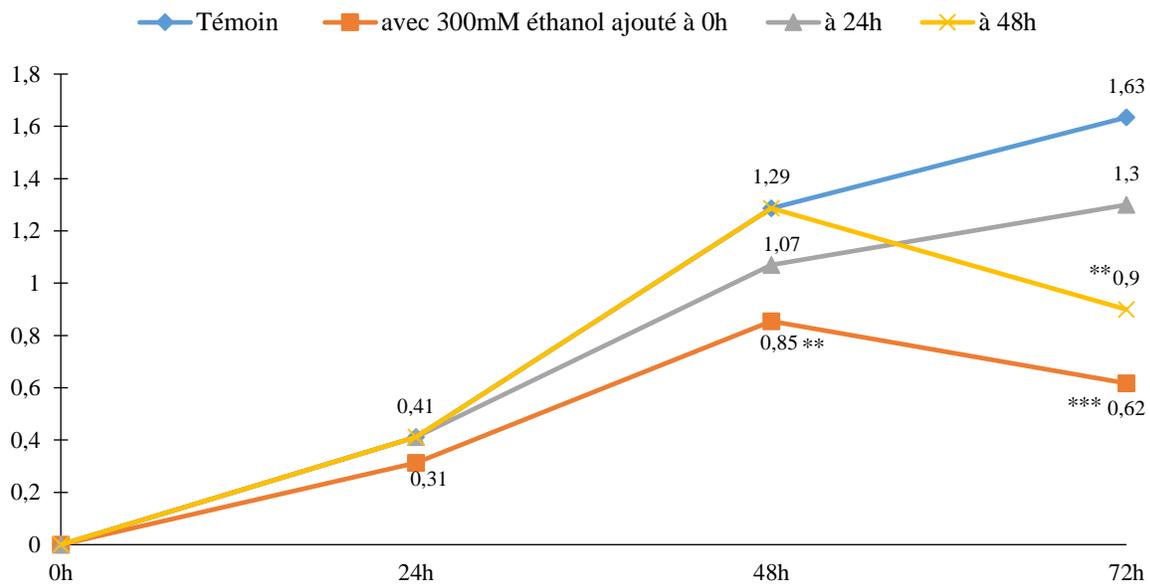
L'évolution de la biomasse et de la concentration en dithiopyrrolones après l'ajout d'éthanol à différents temps, après 72 h d'incubation, sont présentées dans la Figure 3.12 (a et b).

Dans les conditions de culture classique, nous notons une croissance de la biomasse, ainsi les valeurs notées à 24 h, 48 h et 72 h sont respectivement de l'ordre de  $0,40 \pm 0,06$  g/L,  $1,30 \pm 0,08$  g/L et  $1,60 \pm 0,30$  g/L. Après 72 h d'incubation, la production de biomasse est significativement altérée quand l'éthanol est ajouté à 0 h ou 48 h ( $0,62 \pm 0,14$  g/L et  $0,90 \pm 0,10$  g/L respectivement) et beaucoup moins impactée lorsque l'éthanol est ajouté à 24 h ( $1,30 \pm 0,10$  g/L) par comparaison avec la solution témoin ( $1,50 \pm 0,30$  g/L). Cette évolution pourrait s'expliquer par le fait qu'après 48 h d'incubation la bactérie entame sa deuxième phase de croissance, elle est donc plus sensible aux variations de la composition du milieu qui sera altérée par l'addition de l'éthanol. Alors qu'après 24 h d'incubation, la bactérie entame sa production de dithiopyrrolones, une phase pendant laquelle la population bactérienne est probablement moins sensible à l'éthanol ce qui se traduit ainsi par une biomasse plus importante au troisième jour d'incubation.

Quant à la production de dithiopyrrolones, dans les conditions de culture classique, elle évolue en fonction du temps d'incubation pour atteindre son pic à 72 h. Les valeurs relevées dans ces conditions à 24 h, 48 h et 72 h sont respectivement de l'ordre de  $2,2 \pm 0,3$  mg/L,  $14,5 \pm 2,6$  mg/L et  $25 \pm 6,3$  mg/L.

Chapitre 3 : Étude de l'effet des éliciteurs chimiques sur la biosynthèse de dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*

a)



b)

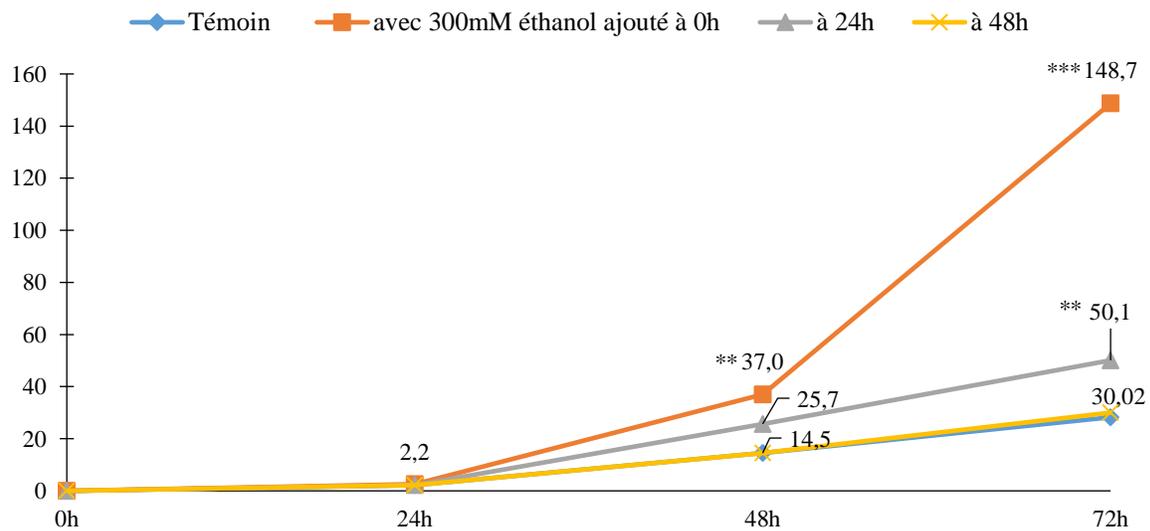


Figure 3.12 : Étude cinétique de l'effet de l'ajout de 300 mM d'éthanol sur la biomasse (a) et la concentration de DTPs (b) (n=9) ; Les astérisques (\*), (\*\*) et (\*\*\*) indiquent une différence significative entre deux moyennes aux seuils de 5 %, 1 % et 0,1 %, respectivement.

L'addition de l'éthanol semble avoir un effet positif très marqué sur la production de dithiopyrrolones lorsqu'il est ajouté au début de l'incubation (0 h). Dans ces conditions, après 48 h de culture, la concentration atteint  $37,00 \pm 10$  mg/L, soit une concentration plus de 2 fois supérieure à celle relevée pour la culture témoin. Cette augmentation est encore plus prononcée après 72 h d'incubation où la concentration de dithiopyrrolones atteint  $148,70 \pm 23$  mg/L (Figure 3.12.b). L'addition de l'éthanol à 24 h ou 48 h n'a pas d'effet significatif sur la production des dithiopyrrolones au bout de 72 h d'incubation. Il semblerait donc que l'ajout de l'éthanol en début de culture induise un raccourcissement de la première phase de croissance de la bactérie et que la production de dithiopyrrolones commence plus tôt, conduisant ainsi à une augmentation de la production de dithiopyrrolones.

L'addition de l'éthanol après 24 h de culture, durant la phase stationnaire, induit une augmentation de la production de dithiopyrrolones qui se traduit par des concentrations de l'ordre de  $26 \pm 2,6$  mg/L et  $50 \pm 15$  mg/L respectivement à 48 h et 72 h d'incubation. Ces valeurs sont significativement supérieures à celles quantifiées dans les conditions classiques. Ceci nous permet de faire l'hypothèse que la 2<sup>ème</sup> phase de croissance peut être soit retardée soit inhibée. Cette supposition s'appuie sur le fait que l'addition d'éthanol à 48 h de culture, durant la seconde phase de croissance a un effet délétère sur la croissance des cellules ce qui se traduit par une forte décroissance de la biomasse, sans effet positif sur la production de dithiopyrrolones. Un phénomène similaire a déjà été rapporté pour des cultures de *Staphylococcus aureus* exposées à de faibles concentrations d'éthanol (Chatterjee et al., 2006). L'éthanol inhibe la croissance et diminue la viabilité des microorganismes. De plus cet effet persiste durablement dans le temps.

3.6.1.3. Effet des ajouts successifs de l'éthanol

Dans le but de tester l'effet de l'induction de stress répétitif sur la capacité de *S. algeriensis* à biosynthétiser les dithiopyrrolones, des essais avec l'éthanol de concentration initiale à 300 mM, et des ajouts successifs de 690 mmoles de ce dernier, ont été réalisés.

Les résultats obtenus, suite à l'ajout successif d'éthanol aux différents temps de culture (0 h, 24 h, 48 h) sur la croissance de la bactérie et sa capacité à produire des dithiopyrrolones après 3 jours d'incubation sont rapportés dans la Figure 3.13 (a et b).

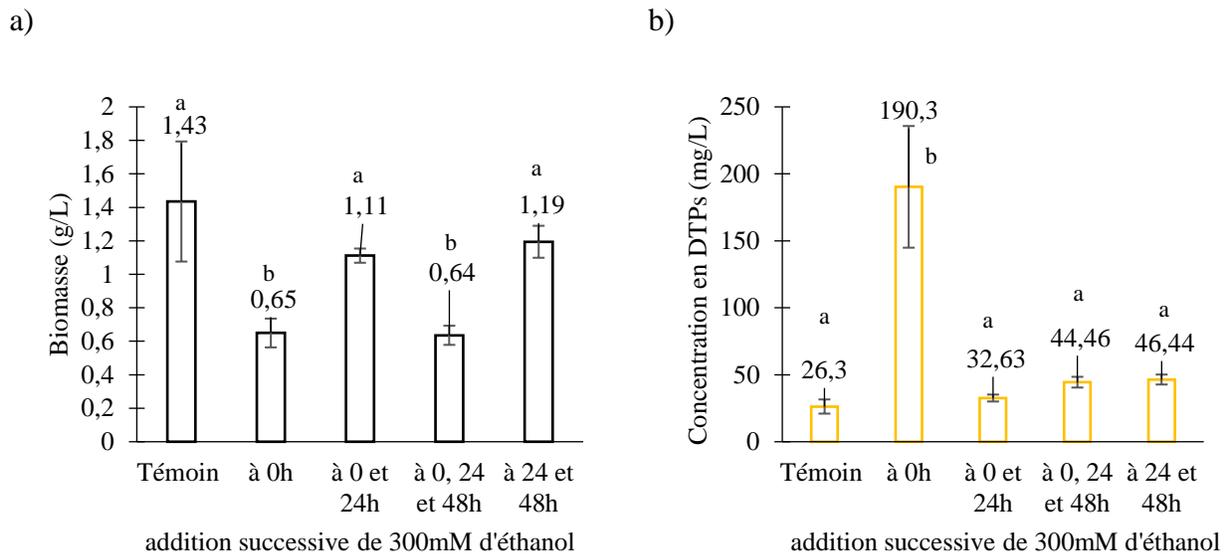


Figure 3.13 : Effet des doses successives de 300 mM d'éthanol à différents temps d'incubation sur la biomasse (a) et la concentration de DTPs (b) (n=9). D'après le test de Duncan, deux lettres différentes signifient deux moyennes significativement différentes au seuil de risque  $\alpha = 5\%$ .

Globalement, nous observons une diminution de la quantité de biomasse par rapport au témoin. Celle-ci est plus marquée si l'éthanol est ajouté à 0 h ( $0,65 \pm 0,09$  g/L) ou à trois reprises à 0 h, 24 h et 48 h ( $0,64 \pm 0,06$  g/L). Par ailleurs, l'ajout successif d'éthanol à deux ou trois doses conduit à une augmentation d'environ 35 % des dithiopyrrolones par rapport au témoin. Cependant, les concentrations obtenues sont 4 à 6 fois inférieures à celle obtenue avec une seule introduction d'éthanol pour atteindre la concentration initiale de 300 mM au temps  $t_0$ . Cela signifie que l'ajout successif de multiples doses d'éthanol affecte non seulement la croissance de la bactérie mais influence aussi sa capacité à biosynthétiser les dithiopyrrolones.

### 3.6.2. Effet du butan-1-ol

#### 3.6.2.1. Effet de la concentration en butan-1-ol

Les expériences sont menées à des concentrations en butan-1-ol inférieures à la CMI c'est-à-dire inférieures à 4 % v/v correspondant à une concentration de 430 mM. Les concentrations choisies sont 10, 50 et 100 mM ce qui correspond respectivement à des pourcentages volumiques de 0,09, 0,45 et 0,9 % v/v. Les résultats des essais sur l'effet du butan-1-ol sur la croissance de la bactérie et sa capacité à produire des dithiopyrrolones après, 5 jours d'incubation, sont rapportés dans la Figure 3.14 (a et b).

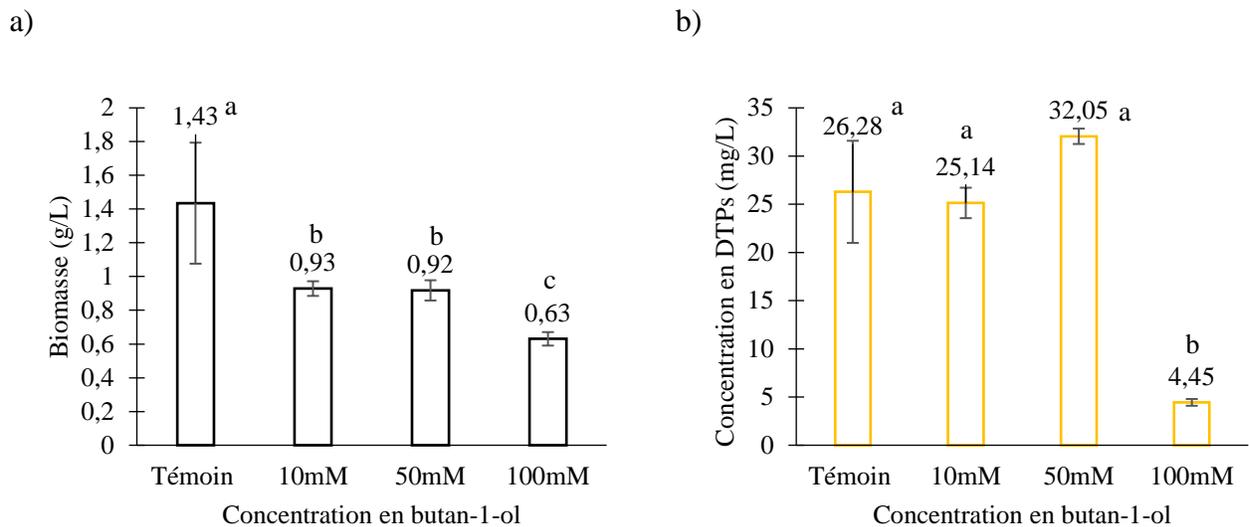


Figure 3.14 : Effet de la gamme de butan-1-ol sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b) (n=9). D'après le test de Duncan, deux lettres différentes signifient deux moyennes significativement différentes au seuil de risque  $\alpha = 5\%$ .

À toutes les concentrations testées, nous observons un impact négatif de la présence de butan-1-ol sur la biomasse avec une diminution significative de l'ordre de 30 % par rapport à la culture témoin. Ainsi les biomasses quantifiées en présence de 10 mM, 50 mM et 100 mM sont respectivement de  $0,93 \pm 0,04$  g/L,  $0,92 \pm 0,06$  g/L et  $0,63 \pm 0,04$  g/L alors qu'elle est de  $1,4 \pm 0,3$  g/L pour la culture témoin.

La concentration en dithiopyrrolones reste stable, à une valeur similaire à celle du témoin, de l'ordre de 30 mg/L en présence de 10 ou 50 mM. Cependant, la concentration en dithiopyrrolones chute drastiquement à  $4,5 \pm 0,4$  mg/L en présence de 100 mM de butan-1-ol. Ces observations indiquent que le butan-1-ol est plus toxique vis-à-vis de *S. algeriensis* que l'éthanol et il en résulte un déclin de l'activité métabolique.

Comme le butan-1-ol est un solvant plus hydrophobe que l'éthanol, il peut pénétrer plus facilement dans la membrane cytoplasmique et l'altérer, interférant ainsi avec les fonctions vitales de la bactérie (Liu & Qureshi, 2009 ; Ingram, 1986).

### 3.6.2.2. Effet des ajouts simultanés de l'éthanol et du butan-1-ol

Afin de déterminer si la présence simultanée d'éthanol et de butan-1-ol pouvait avoir un effet synergique bénéfique pour la biosynthèse de dithiopyrrolones par *S. algeriensis*, des essais ont été effectués en introduisant les alcools pour atteindre des concentrations finales dans le milieu de culture de 300 mM pour l'éthanol et 10 mM ou 50 mM pour le butan-1-ol. Les résultats sont présentés sur la Figure 3.15 (a et b).

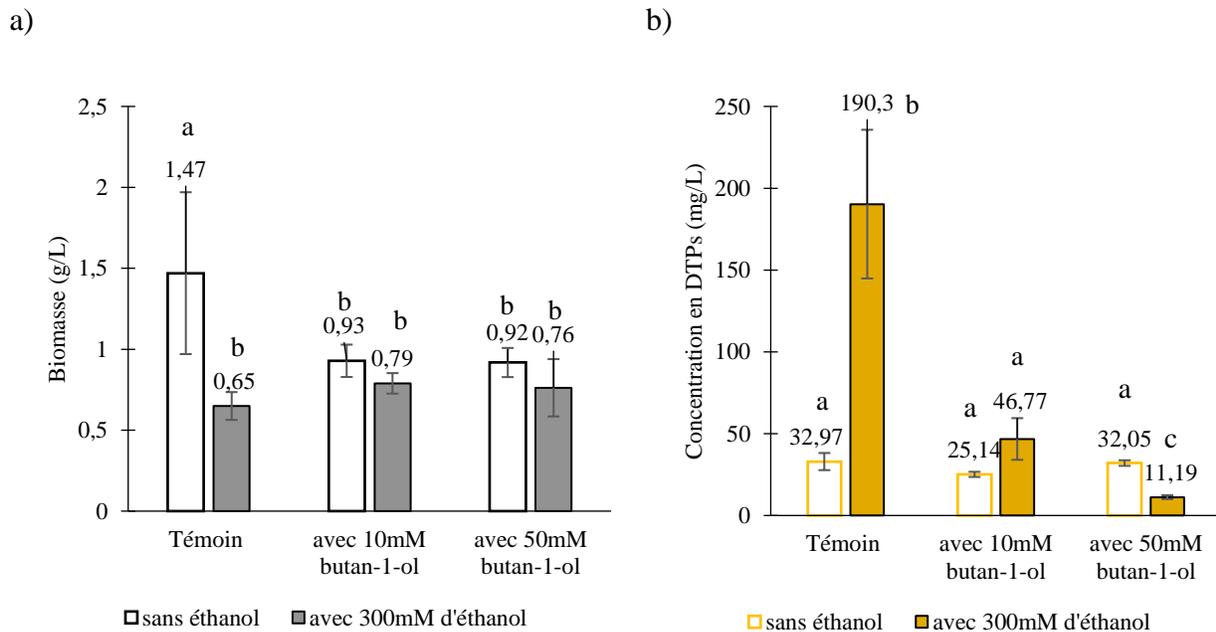


Figure 3.15 : Effet de l'ajout simultané de 300 mM d'éthanol et de deux concentrations de butan-1-ol sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b) (n=9). D'après le test de Duncan, deux lettres différentes signifient deux moyennes significativement différentes au seuil de risque  $\alpha = 5 \%$ .

Après l'addition simultanée des deux alcools la production de biomasse est réduite, quantifiée en moyenne à  $0,79 \pm 0,06$  g/L en comparaison avec la culture témoin en absence d'éthanol mais reste similaire au rendement obtenu en présence de 300 mM d'éthanol seul.

La production de dithiopyrrolones est peu affectée et augmente très légèrement, uniquement en présence de 10 mM de butan-1-ol additionné de 300 mM d'éthanol ( $46,77 \pm 12$  mg/L) par comparaison avec le contrôle en absence d'alcool ( $25 \pm 1,6$  mg/L). Toutefois, nous remarquons une chute drastique, de plus de 75%, de la concentration en dithiopyrrolones dans les milieux contenant 300 mM d'éthanol additionné de butan-1-ol par rapport au milieu contenant 300 mM d'éthanol seul :  $47 \pm 12$  mg/L (en présence de 10 mM de butan-1-ol et 300 mM d'éthanol) et  $11,19 \pm 1,2$  mg/L (en présence de 50 mM de butan-1-ol et 300 mM d'éthanol) contre  $190 \pm 45$  mg/L (en présence de 300 mM d'éthanol seul).

L'ajout simultané de 50 mM de butan-1-ol et 300 mM d'éthanol semble affecter significativement la production de dithiopyrrolones quantifiées alors à  $11,19 \pm 1,2$  mg/L.

### 3.6.3. Effet de l'ajout des inhibiteurs des espèces réactives de l'oxygène (ROS)

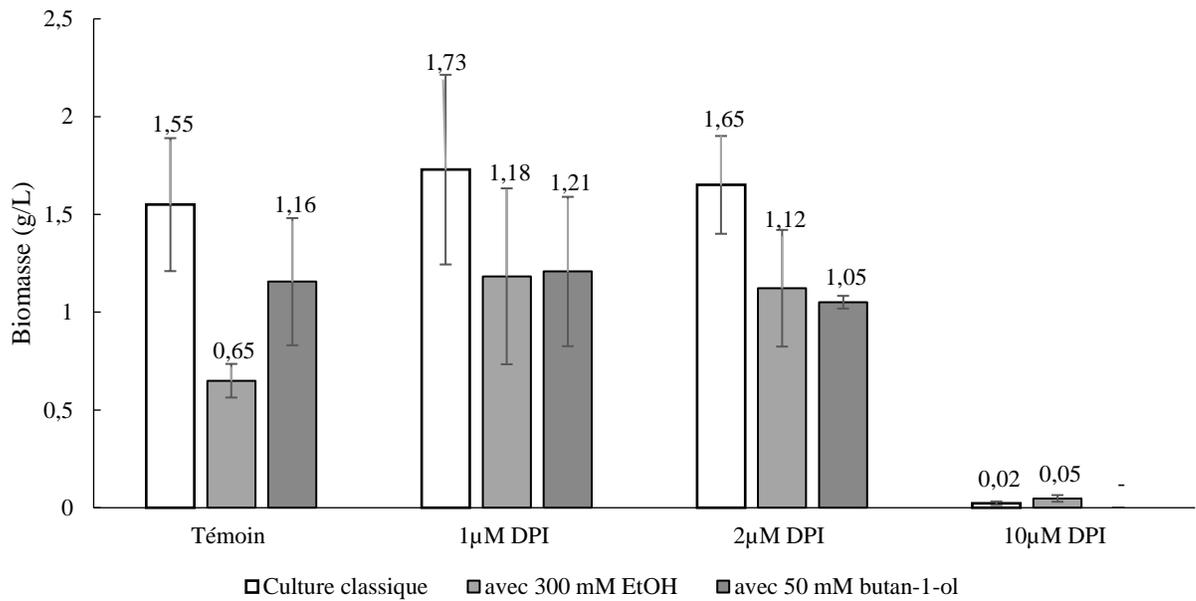
À la suite de ces essais, des expériences complémentaires ont été réalisées pour pouvoir identifier le mécanisme d'action des alcools en tant qu'éliciteurs. Les alcools sont de possibles générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont responsables de changements physiologiques ainsi que métaboliques des bactéries et donc susceptibles de stimuler la production des dithiopyrrolones. Ainsi, afin de valider cette hypothèse, des expériences ont été menées en combinant les alcools et deux inhibiteurs des enzymes génératrices des ROS telles que la NAD(P)H oxydase et les peroxydases. Ces inhibiteurs sont le diphénylèneiodonium (DPI) et l'azoture de sodium ( $\text{NaN}_3$ ).

#### 3.6.3.1. Effet du diphénylène iodonium (DPI) et de l'azoture de sodium ( $\text{NaN}_3$ )

Le DPI est habituellement utilisé en tant qu'inhibiteur non compétitif des NAD(P)H oxydases (Hu et al., 2006 ; Li & Trush, 1998). Dans le but de différencier les processus de production des ROS dépendant des peroxydases, l'inhibiteur  $\text{NaN}_3$  a été utilisé car la NAD(P)H oxydase, est une flavoprotéine qui n'est pas sensible aux azotures (Liszkay et al., 2003 ; Liszkay et al., 2004).

Cependant, antérieurement, il a été démontré que *S. algeriensis* était sensible à l'azoture de sodium. La croissance des bactéries est inhibée par la présence de 0,001 % de  $\text{NaN}_3$  (150  $\mu\text{M}$ ) (Zitouni and al., 2004 b). Aussi, des essais préliminaires ont été effectués afin de choisir des concentrations en DPI et  $\text{NaN}_3$  qui n'affectent pas la croissance de *S. algeriensis*. Le DPI a été ajouté au milieu de culture dans une gamme de concentration allant de 1  $\mu\text{M}$  à 10  $\mu\text{M}$ . Après 5 jours d'incubation à 30 °C, aucun effet sur la production de biomasse ou de dithiopyrrolones n'a été observé pour des concentrations  $\leq 2 \mu\text{M}$  (Figure 3.16 a et b). Ensuite les essais ont été effectués avec des concentrations de 2  $\mu\text{M}$  de DPI ou de  $\text{NaN}_3$  qui ont été ajoutées au milieu de culture à 0 h en présence de 300 mM d'éthanol (1,74 % v/v) (Figure 3.17.a et b) ou de 50 mM butan-1-ol (0,45 % v/v) Figure 3.18 (a et b). Également, l'ajout simultané de 2  $\mu\text{M}$  de ces derniers a été évalué en présence de l'éthanol (Figure 3.17 a et b).

a)



b)

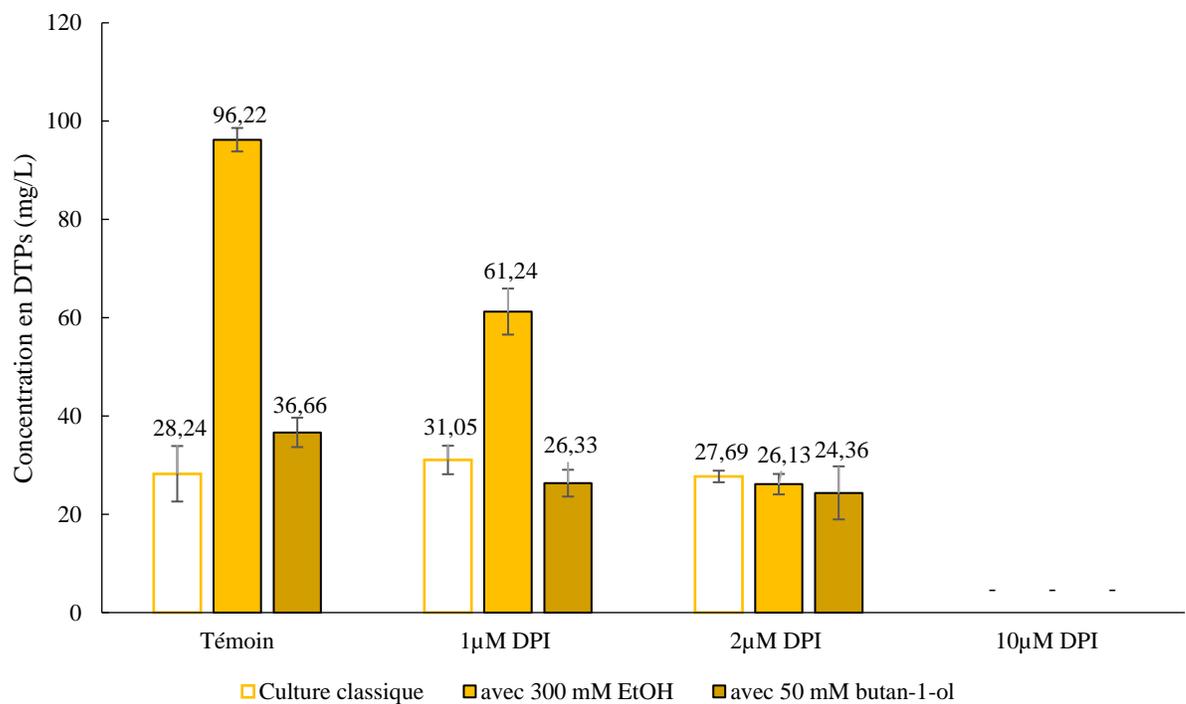
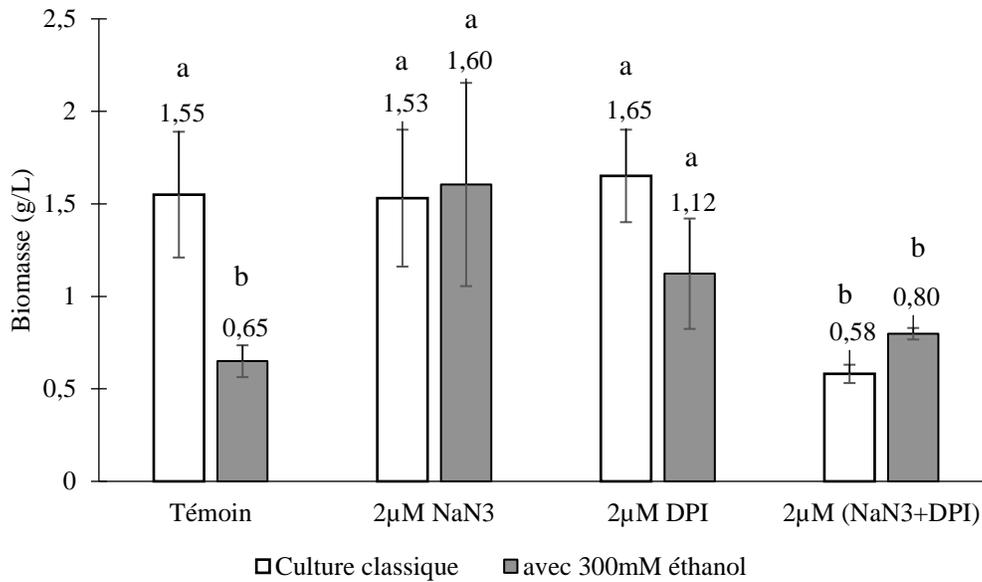


Figure 3.16 : Effet d'une gamme de concentration de DPI sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b) dans différentes conditions de culture (en absence et en présence de l'éthanol ou du butan-1-ol) (n=9).

a)



b)

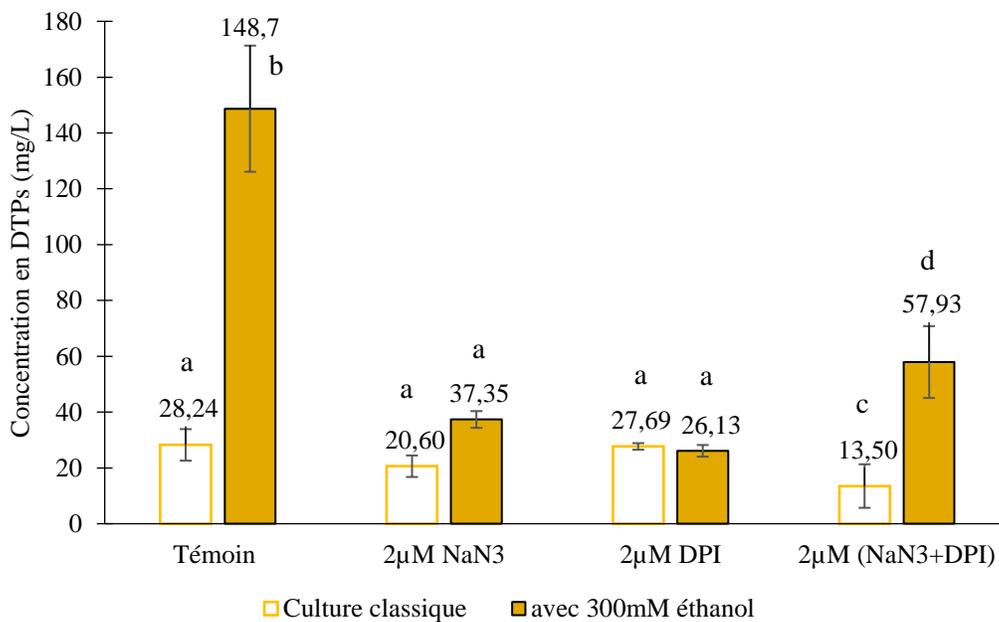
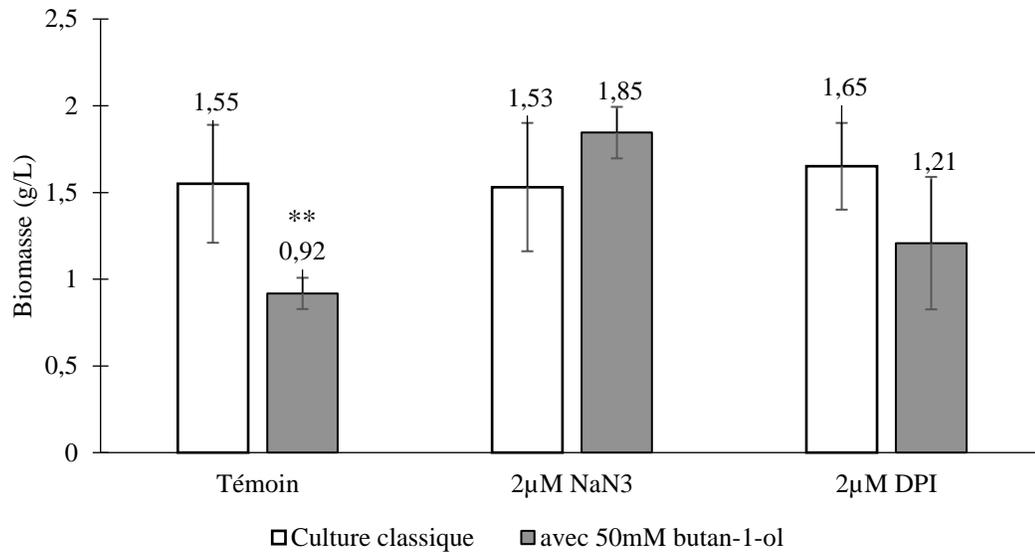


Figure 3.17 : Effet de l'ajout de DPI et NaN<sub>3</sub> seuls et en présence de 300 mM d'éthanol sur la biomasse (a) et sur la concentration en DTPs (b) (n=9). D'après le test de Duncan, deux lettres différentes signifient deux moyennes significativement différentes au seuil de risque  $\alpha = 5\%$ .

En accord avec les observations faites auparavant, dans la culture supplémentée en éthanol (Figure 3.17 a, barres grises) (sans inhibiteur de ROS) la biomasse est réduite de 60 % par comparaison avec la culture témoin, et l'addition de DPI et de NaN<sub>3</sub> (barres grises) séparément permet de restaurer cette production de biomasse qui retrouve la valeur de la culture témoin sans alcool (Figure 3.17 a, témoin barre blanche).

Quant à la production de dithiopyrrolones, la présence de 300 mM d'éthanol (Figure 3.17 b, barres grises) conduit à une augmentation importante de dithiopyrrolones mais cet effet bénéfique est totalement neutralisé par la présence des 2 inhibiteurs (barres grises) et l'on retrouve le niveau de concentration de la culture témoin sans alcool (Figure 3.17.b, témoin barre blanche). L'addition des deux inhibiteurs ensemble, affecte la croissance de la biomasse et la production de dithiopyrrolones contrairement à leur présence simultanée avec l'éthanol.

a)



b)

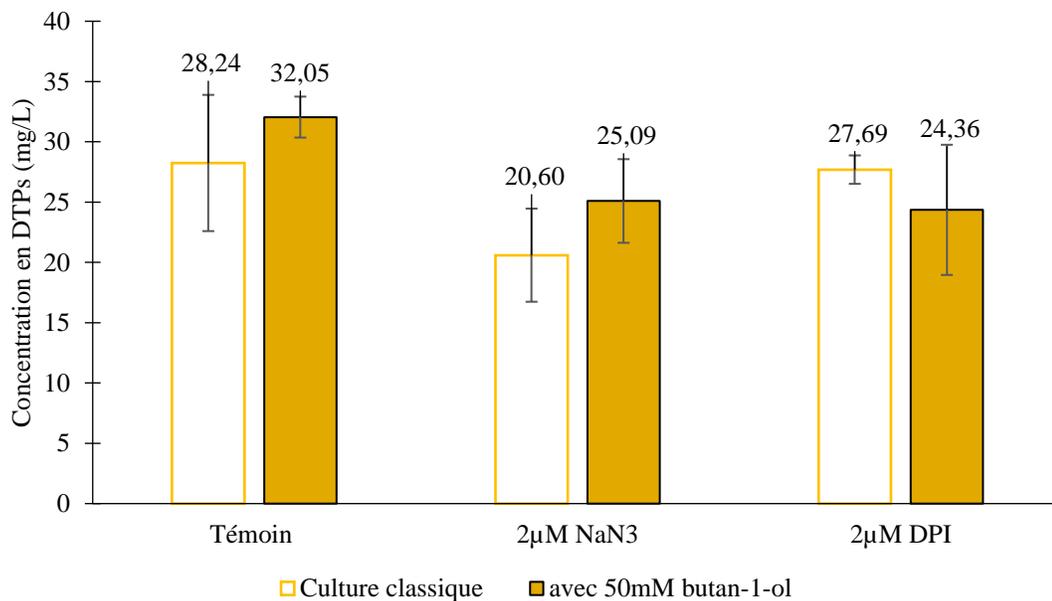


Figure 3.18 : Effet de l'ajout de DPI et NaN<sub>3</sub> seuls et en présence de 50 mM de butan-1-ol sur la biomasse (a) et sur la concentration en DTPs (b) (n=9). Les astérisques (\*\*) indiquent une différence significative entre deux moyennes au seuil de 1 %, les tests non paramétriques de Kruskal-Wallis et de Wilcoxon ont été réalisés.

Les résultats des essais avec le butanol, montrent que l'effet délétère sur la biomasse de ce dernier n'est pas retrouvé en présence de  $\text{NaN}_3$  et de DPI (Figure 3.18 a, barres grises), la quantité de biomasse est d'un niveau équivalent à celui de la culture témoin sans butanol (Figure 3.17 a, témoin barre blanche) :  $1,60 \pm 0,55$  mg/L et  $1,65 \pm 0,25$  mg/L en présence de  $\text{NaN}_3$  et de DPI respectivement contre  $1,55 \pm 0,34$  mg/L pour la culture témoin. Les valeurs de la quantité de dithiopyrrolones dans les conditions de culture en présence des inhibiteurs DPI et  $\text{NaN}_3$  sont similaires à celles du témoin (Figure 3.18 b) (Tableau 3.5).

Tableau 3.5 : Récapitulatif des essais avec des inhibiteurs des ROS en présence d'éthanol ou de butan-1-ol.

Condition de culture	Témoin		2 $\mu\text{M}$ $\text{NaN}_3$		2 $\mu\text{M}$ DPI		2 $\mu\text{M}$ ( $\text{NaN}_3$ +DPI)	
	Biomasse (mg/L)	[DTPs] (g/L)	Biomasse (mg/L)	[DTPs] (g/L)	Biomasse (mg/L)	[DTPs] (g/L)	Biomasse (mg/L)	[DTPs] (g/L)
<b>Seul</b>	$1,55 \pm 0,34$	$28 \pm 5,65$	$1,53 \pm 0,37$	$20 \pm 3,86$	$1,65 \pm 0,25$	$27 \pm 1,18$	$0,58 \pm 0,05$	$13 \pm 7,81$
<b>avec 300 mM éthanol</b>	$0,65 \pm 0,09$	$148 \pm 22,60$	$1,6 \pm 0,55$	$37 \pm 3$	$1,12 \pm 0,3$	$26 \pm 2,08$	$0,8 \pm 0,03$	$57 \pm 2,87$
<b>avec 50 mM butan-1-ol</b>	$0,92 \pm 0,09$	$32 \pm 1,70$	$1,85 \pm 0,15$	$25 \pm 3,47$	$1,21 \pm 0,38$	$24,3 \pm 5,40$	-	-

### 3.7.3. Discussion

Les essais CMI/CMB nous montrent que l'éthanol et le DMSO sont les solvants les moins toxiques pour la croissance de *S. algeriensis* que le butan-1-ol.

#### 3.7.3.1. Effet de l'éthanol

L'addition d'éthanol a un effet bénéfique sur la production de dithiopyrrolones par *S. algeriensis* de façon dose-dépendante. Dans ces conditions nous avons obtenu une concentration maximale des dithiopyrrolones d'environ 200 mg/L après 5 jours de cultures, correspondant à un accroissement de 600 % par rapport au témoin.

De la même manière, Zhou et al. (2012) ont montré que l'addition de l'éthanol à 10 mM a augmenté de 60 % la production de validamycine A par *Streptomyces hygroscopicus* 5008 (Zhou et al., 2012). Également, la supplémentation du milieu de culture de *Serratia marcesens* permet une augmentation d'un facteur 200 de sa capacité à produire la prodigiosine (Cang et al., 2000).

Par contre, il faut faire attention à l'effet cumulatif de l'éthanol qui peut avoir un impact néfaste sur le micro-organisme. Les concentrations supérieures à 3 % diminuent drastiquement la quantité de biomasse et des dithiopyrrolones. Également, partant du fait que les effets sur la biomasse et la production de dithiopyrrolones sont doses-dépendants, nous remarquons que les ajouts fractionnés de 600 mM d'éthanol, que ce soit à 0 h et 24 h ou à 24 h et 48 h, ont un même effet similaire entraînant une légère diminution de la biomasse et des dithiopyrrolones (Tableau 3.6).

Tableau 3.6 : Effet de la concentration et du temps d'addition de l'éthanol sur la production de dithiopyrrolones par *S. algeriensis*.

<b>Temps d'addition</b>	<b>Ethanol (mM)</b>	<b>Biomasse (g/L)</b>	<b>[DTPs] (mg/L)</b>	<b>PS (mg/g)</b>
<b>Témoin</b>	-	1,5 ± 0,45	31 ± 7	21 ± 4,74
<b>0 h</b>	514	0,42 ± 0,08	231 ± 31	550 ± 73,80
<b>0 h</b>	685	0,30 ± 0,07	114 ± 11	380 ± 36,66
<b>0 h et 24 h</b>	2 x 300 = 600	1,11 ± 0,04	32,63 ± 2,59	29 ± 3
<b>0 h et 48 h</b>	2 x 300 = 600	1,19 ± 0,10	46,44 ± 3,71	39 ± 3,11
<b>0 h, 24 h et 48 h</b>	3 x 300 = 900	0,64 ± 0,06	44,46 ± 4	70 ± 6,30

Le même constat peut être fait, si on ajoute 900 mM d'éthanol en 3 doses. Dans tous les cas, nous ne retrouvons pas le même effet avec une seule addition de 514 mM en début d'incubation. Dans ce cas, nous observons une diminution de la biomasse mais une forte augmentation des dithiopyrrolones.

### 3.7.3.2. Effet du butan-1-ol

L'effet de ce solvant est moins marqué que celui de l'éthanol sur la production de dithiopyrrolones en raison de la toxicité de cette molécule vis-à-vis de *S. algeriensis*. Pour des quantités similaires d'éthanol et du butan-1-ol, la production spécifique en dithiopyrrolones est plus faible en présence du butan-1-ol (Tableau 3.7). De plus, la combinaison de ces deux alcools n'entraîne pas d'effet bénéfique sur la production de dithiopyrrolones.

Tableau 3.7 : Comparaison de l'effet des concentrations de l'éthanol et du butan-1-ol sur la production de dithiopyrrolones par *S. algeriensis*.

Concentrations	Biomasse (g/L)		[DTPs] (mg/L)		PS (mg/g)	
	Éthanol	Butanol	Éthanol	Butanol	Éthanol	Butanol
<b>10 mM</b>	0,99 ± 0,16	0,93 ± 0,04	74 ± 17	25,14 ± 1,58	74,74 ± 10	27 ± 4,86
<b>100 mM</b>	1,40 ± 0,36	0,63 ± 0,04	94 ± 19	4,45 ± 0,35	67,14 ± 11	7 ± 1,41

### 3.7.3.3. Mécanisme d'action hypothétique des alcools

Les alcools peuvent agir comme des facteurs de stress sur la physiologie de croissance de la bactérie. Cette dernière serait capable de s'adapter au stress environnemental en contrôlant sa vitesse de croissance ainsi que la biosynthèse des métabolites secondaires.

Les effets de l'éthanol et du butanol ont été décrits dans la littérature, notamment pour leur potentiel générateur de ROS, *via* des enzymes du type oxydoréductase, comme la NAD(P)H oxydase, ou la catalase. La génération de ces ROS induit un stress général chez les bactéries qui affecterait le métabolisme du micro-organisme. Les ROS, par le biais de mécanismes complexes, peuvent agir comme des molécules signal susceptible de déclencher plusieurs mécanismes de défense du micro-organisme. Par exemple, en présence du butan-1-ol les bactéries, telles que *Escherichia coli* et *Clostridium acetobutylicum*, peuvent contrôler la synthèse d'acide gras à longues chaînes pour renforcer l'imperméabilité membranaire (Rutherford et al., 2010 ; Tomas et al., 2004 ; Baer et al., 1987 ; Bowles & Ellefson, 1985).

Nos essais ont pu démontrer que l'éthanol et le butan-1-ol agissent comme des éliciteurs chimiques qui génèrent la production de ROS chez *S. algeriensis*. Par ce moyen la production des dithiopyrrolones peut-être soutenue.

### 3.7.4. Conclusion

Cette étude révèle que les alcools à des concentrations inférieures au seuil de toxicité sont bénéfiques pour soutenir la production des dithiopyrrolones par *S. algeriensis*. La présence d'éthanol dans le milieu de culture à concentration de 3 % (v/v) permet d'obtenir une concentration en dithiopyrrolones de 200 mg/L après 5 jours de culture, correspondant à une augmentation d'environ 600 %.

Nous pouvons supposer l'implication des alcools dans la production des ROS, qui à leur tour peuvent agir en tant que molécules signal, régulant la biosynthèse des dithiopyrrolones chez *S. algeriensis*. Les études supplémentaires de dosages des ROS dans le milieu de culture pourraient confirmer cette hypothèse. Il sera également intéressant de poursuivre les études sur l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des dithiopyrrolones chez *S. algeriensis*.

### 3.8. Effet du diméthylsulfoxyde (DMSO)

Les expériences sont menées à des concentrations en DMSO inférieures à la CMI c'est-à-dire inférieures à 16 % v/v correspondant à une concentration de 2,25 mM. Les concentrations choisies varient de 0,14 à 0,84 mM ce qui correspond à des pourcentages volumiques de 1 à 6 % v/v respectivement.

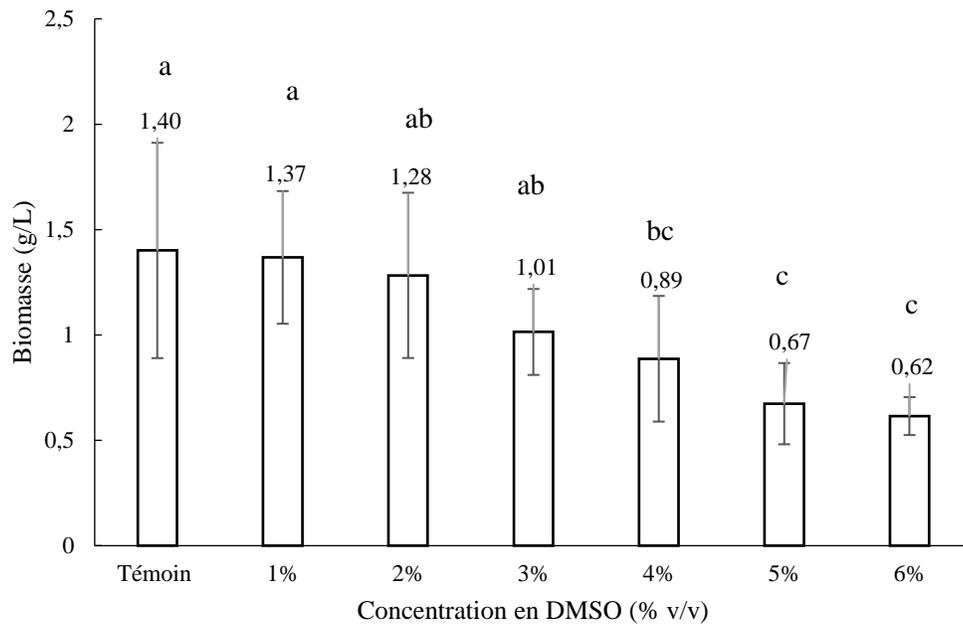
#### 3.8.1. Effet de la concentration en DMSO

L'effet de la variation de la concentration en DMSO, ajouté au début de l'incubation dans le milieu de culture, sur la croissance de *Saccharothrix algeriensis* et la biosynthèse de dithiopyrrolones, après 5 jours d'incubation, est rapporté sur les graphiques de la Figure 3.19 (a et b).

La quantité de biomasse diminue régulièrement en fonction de l'augmentation de la concentration en DMSO passant de  $1,37 \pm 0,51$  g/L pour 1 % v/v DMSO à  $0,62 \pm 0,09$  g/L pour 6 % v/v (Figure 3.19.a). Néanmoins cette diminution n'est significative qu'en présence de concentrations de DMSO supérieures 4 % v/v.

Parallèlement, nous constatons une augmentation progressive de la concentration en dithiopyrrolones jusqu'à 3 % v/v de DMSO et ensuite une décroissance (Figure 3.19.b). Ainsi en présence de 3 % v/v de DMSO, la concentration des dithiopyrrolones est multipliée par un facteur quatre par rapport à la culture classique ( $57,4 \pm 14,35$  mg/L contre  $12 \pm 3,63$  mg/L). Par contre, en présence de 5 et 6 % v/v de DMSO, les concentrations en dithiopyrrolones quantifiées sont significativement inférieures à celle du témoin, et passent à  $6,12 \pm 0,97$  et  $2,25 \pm 0,47$  mg/L respectivement.

a)



b)

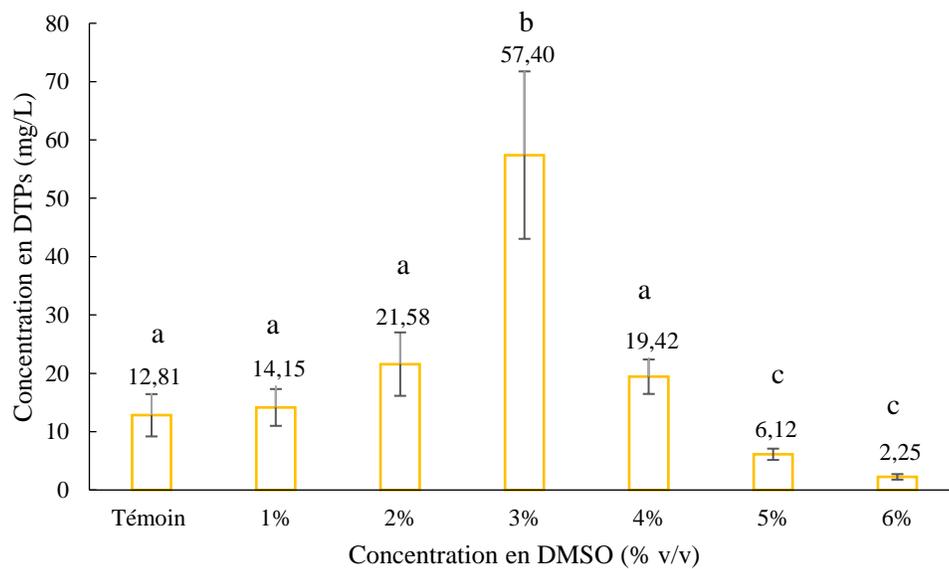


Figure 3.19 : Effet d'une gamme de concentration de DMSO sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b) (n=9). D'après le test de Duncan, deux lettres différentes signifient deux moyennes significativement différentes au seuil de risque  $\alpha = 5\%$ .

### 3.8.2. Effet du temps d'addition du DMSO

De la même manière qu'avec les autres composés, l'impact de l'ajout du DMSO à différents temps d'incubation a été évalué. Le DMSO est ajouté à 0 h, à 24 h et à 48 h après le début de la fermentation. La concentration en DMSO sélectionnée pour les tests est de 3 % v/v. Les résultats de ces essais sont rapportés dans la Figure 3.20 (a et b).

La quantité de biomasse après ajout de DMSO à 24 h ou 48 h, n'est pas significativement diminuée ( $1,16 \pm 0,26$  g/L et  $1,20 \pm 0,12$  g/L respectivement) par rapport au témoin ( $1,40 \pm 0,5$  g/L) et même légèrement supérieure à celle obtenue par une addition de DMSO à 0 h ( $1,01 \pm 0,2$  g/L).

Par contre, la concentration en dithiopyrrolones est divisée pratiquement par 3 après un ajout de DMSO à 24 h et par 4 si l'ajout se fait au bout de 48 h par rapport à un ajout en début d'incubation, pour atteindre des valeurs de l'ordre de  $20,81 \pm 5,15$  mg/L et  $12,31 \pm 3,7$  mg/L, valeurs similaires à celles du témoin dans le dernier cas. Il apparaît nettement que le temps d'addition du DMSO influence plus fortement la synthèse des dithiopyrrolones que la croissance de la bactérie.

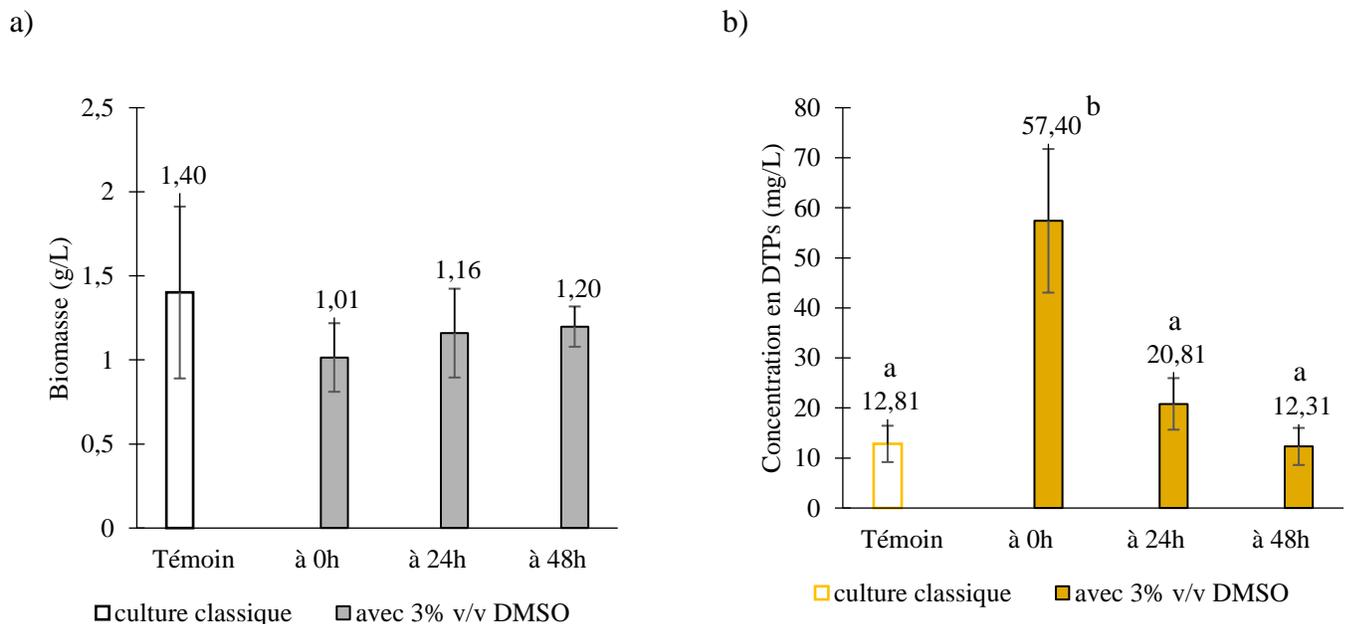


Figure 3.20 : Effet du temps d'addition de 3 % v/v DMSO sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b) (n=6). D'après le test de Duncan, deux lettres différentes signifient deux moyennes significativement différentes au seuil de risque  $\alpha = 5$  %.

### 3.8.3. Effet des ajouts successifs du DMSO

L'effet de l'addition successive de plusieurs doses de DMSO à 24 et 48 h d'une part, 0, 24 et 48 h d'autre part, a également été étudié (Figure 3.21.a et b). La quantité de biomasse est peu affectée par ces ajouts successifs ( $1,54 \pm 0,2$  mg/L pour deux doses et  $1,16 \pm 0,08$  mg/L pour trois doses).

L'addition de DMSO successivement à 24 et 48 h ou à 0, 24 et 48 h engendre une légère augmentation de la concentration en dithiopyrrolones par rapport au témoin ou par rapport à un seul ajout à 24 h ou 48 h mais les valeurs demeurent du même ordre de grandeur qu'après un seul ajout à 24 h ( $18,73 \pm 2,81$  pour deux doses et  $24,8 \pm 2,9$  g/L pour trois doses).

Il est important de noter que seule une addition à 0 h (début de la première phase de croissance) permet d'augmenter significativement la production de dithiopyrrolones, les ajouts uniques ou multiples à des périodes différentes engendrent une diminution importante de la production de dithiopyrrolones.

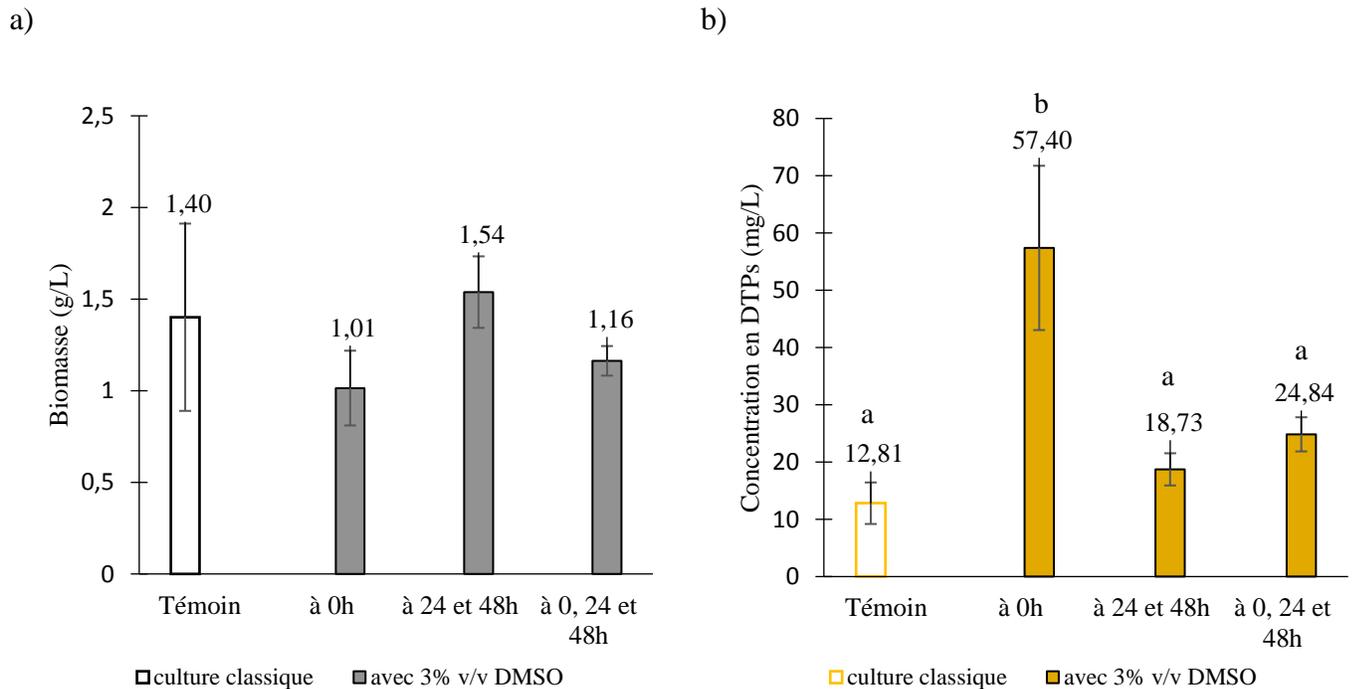


Figure 3.21 : Effet des doses successives de 3 % v/v DMSO à des différents temps d'incubation sur la biomasse (a) et la concentration en DTPs (b) (n=6). D'après le test de Duncan, deux lettres différentes signifient deux moyennes significativement différentes au seuil de risque  $\alpha = 5$  %.

#### 3.8.4. Discussion

Les résultats montrent que l'effet du DMSO sur la croissance de *S. algeriensis* et sa capacité à produire des dithiopyrrolones sont doses-dépendants, avec un faible impact sur la production de biomasse. L'ajout de 3 % v/v de DMSO conduit à la production spécifique de dithiopyrrolones 6 fois plus importante que pour la culture témoin. L'augmentation de la production de dithiopyrrolones n'est donc pas liée à l'augmentation de la biomasse et dans ce cas le DMSO sert donc à promouvoir le métabolisme secondaire.

Ces résultats sont cohérents avec les observations rapportées dans quelques études portant sur l'impact du DMSO en tant qu'éliciteur chez les microorganismes. La production de métabolites secondaires tels que le chloramphénicol, le thiostrepton et la tetranomycine, sont améliorés en présence de faibles concentrations de DMSO par des bactéries du genre *Streptomyces*. (Chen et al., 2000). À titre d'exemple, l'espèce *Streptomyces fradiae* est capable d'augmenter le rendement en tylosine de 200 % en présence de 3 % v/v DMSO (Butler & Cundliffe, 2001).

L'effet de l'ajout successif de 0,6 mL de DMSO (concentration initiale à 3 % v/v) n'affecterait pas la croissance de la bactérie contrairement à la présence de 6 % (v/v) de DMSO dans le milieu de culture et dès le début de l'incubation. Cela pourrait s'expliquer par une capacité adaptative de la bactérie au solvant. Ce constat est d'autant plus vrai que le mécanisme d'action probable de ce solvant ne fait pas intervenir des ROS dans le mécanisme d'élicitation, étant donné que c'est un anti-oxydant. En plus, selon les études sur les effets de ce solvant il est probable que la cible privilégiée est le ribosome ce qui affecte la traduction (Chen et al., 200 ; Butler & Cundliffe, 2001). Toutefois, il est nécessaire de souligner l'effet positif de l'ajout de ce solvant sur la synthèse de dithiopyrrolones notamment à une seule dose au début de l'incubation. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec l'éthanol.

### 3.8.5. Conclusion

Nous avons pu identifier l'effet bénéfique du DMSO dans l'augmentation de la biosynthèse des dithiopyrrolones. En présence de 3 % v/v de DMSO, la production spécifique de dithiopyrrolones est presque 6 fois plus importante que celle du témoin. Le temps est un facteur important pour maximiser la biosynthèse de dithiopyrrolones, le DMSO doit être introduit au début de la phase exponentielle de croissance. Ce n'est que dans ces conditions que *S. algeriensis* adapte son état physiologique et donc sa réponse à l'effet stimulant du DMSO.

Le mode d'action du DMSO n'a pas été élucidé, cependant il est rapporté dans la littérature que le DMSO interfèrerait avec les auto-inducteurs du QS chez certaines bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* (Guo et al., 2016).

Chapitre 4 : Étude de l'effet d'une électrode polarisée sur la biosynthèse des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*.

Chapitre 4 : Étude de l'effet d'une électrode polarisée sur la biosynthèse des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*.

---

#### 4. Introduction

Pour établir les conditions électrochimiques optimales permettant au micro-organisme de profiter du flux d'électrons entre les cellules et l'électrode pour la croissance et /ou la production des dithiopyrrolones, nous avons dû :

- Déterminer le type du matériau et la topographie de l'électrode (platine, acier, carbone... ; de topographie variée) les mieux adaptés à l'adhésion et au développement du micro-organisme ;
- Définir le potentiel d'électrode auquel nous pourrions observer l'échange d'électrons entre l'électrode et le micro-organisme, en utilisant la chronoampérométrie ;
- Évaluer si dans ces conditions la croissance microbienne et / ou la biosynthèse des dithiopyrrolones sont favorisées, par le dosage de la biomasse et des dithiopyrrolones.

#### 4.1. Sélection de l'électrode de travail

Afin de choisir le matériau de l'électrode de travail, le développement de *S. algeriensis* sur six supports de nature et topographie différentes a été testé sur microplaque de 6 puits immergés dans le milieu de culture semi-synthétique pour une durée d'incubation de cinq jours. La quantité de biomasse adhérente sur le support a été évaluée par pesée. Les résultats sont présentés (Tableau 4.1.) sous forme du rapport quantité de biomasse/surface de l'électrode et de pourcentage d'augmentation de masse de l'électrode qui permettent d'évaluer la capacité de développement de la bactérie. En plus, la colonisation mycélienne de la surface a été étudiée à l'aide de la microscopie à épifluorescence.

Sur les supports en acier, très peu de biomasse y est formée ( $0,2 \text{ mg/cm}^2$  sur la plaque d'acier et  $1,7 \text{ mg/cm}^2$  sur la maille d'acier). Une faible colonisation mycélienne y est observée avec une prédominance des hyphes dispersés avec des filaments isolés (Figure 4.1).

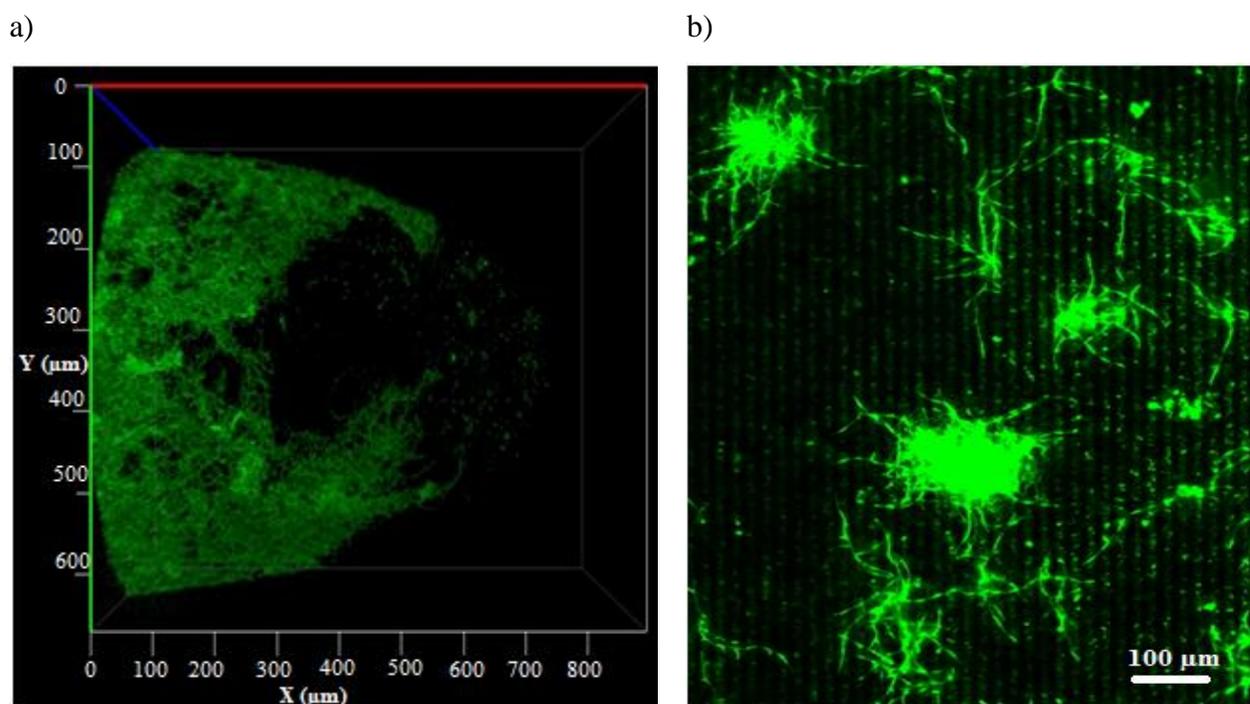


Figure 4.1 : Filaments mycéliens sur maille en acier (a) et sur plaque d'acier (b) par microscopie à épifluorescence 3D.

Alors que sur le platine, le développement est dense ( $2,2 \text{ mg/cm}^2$  sur maille de platine et  $2,9 \text{ mg/cm}^2$  sur plaque de platine). La colonisation mycélienne observée par microscopie prend la forme de pelotes de petits diamètres colonisant la surface des matériaux (Figure 4.2).

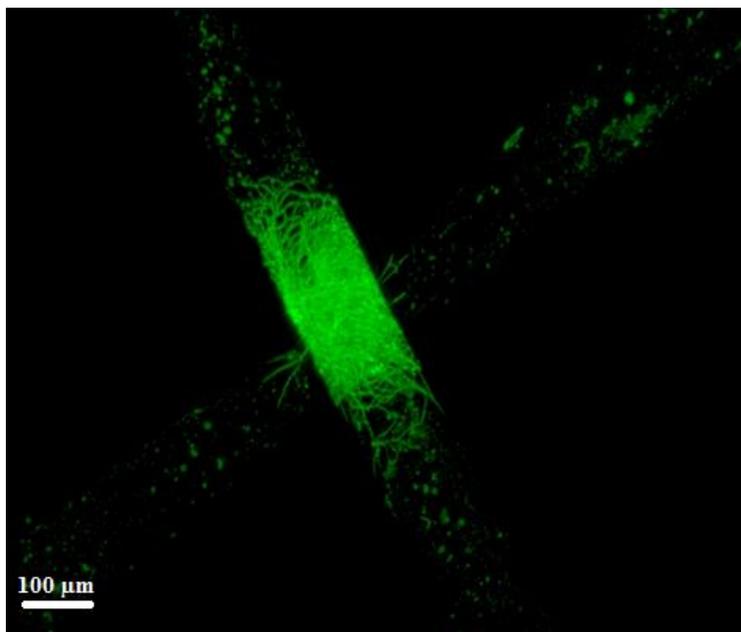


Figure 4.2 : L'agglomérat du mycélium sur maille de platine par microscopie à épifluorescence 3D.

Sur le tissu de carbone, la biomasse développée est de l'ordre de  $2,2 \text{ mg/cm}^3$ . Le mycélium est dense, il prend la forme de petites pelotes et d'amas de mycéliums enchevêtrés entre les fibres du tissu de carbone (Figure 4.3.a).

Le développement bactérien est plus important sur le feutre de carbone ( $12,3 \text{ mg/cm}^2$ ) que sur les autres supports. Une forte densité mycélienne est observée qui prend la forme de pelotes de quelques millimètres de diamètre moyen, observables à l'œil nu, avec des amas de mycéliums dont les filaments s'infiltrent dans les pores du feutre (Figure 4.3.b).

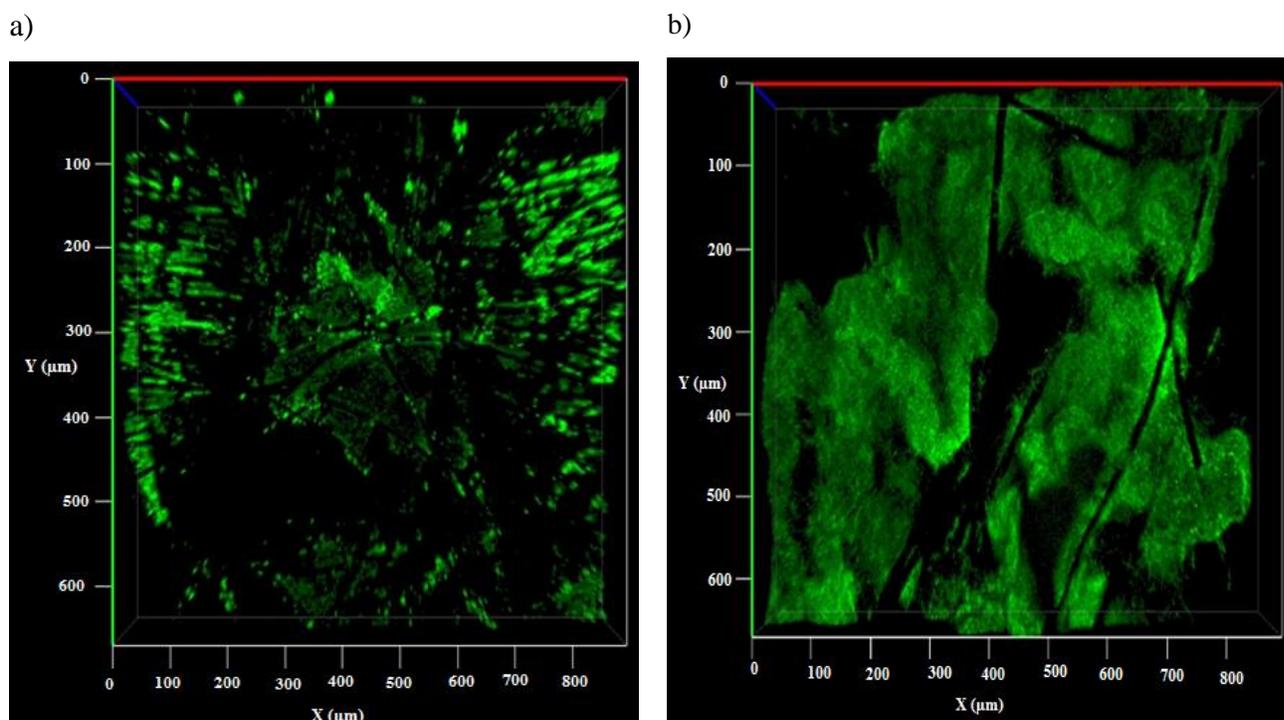


Figure 4.3 : Pelotes sur tissu de carbone (a) et sur feutre de carbone (b) par microscopie à épifluorescence 3D.

Le rapport biomasse/surface ainsi que le pourcentage d'augmentation de la masse des électrodes sont rapportés dans le Tableau 4.1. Ainsi, pour le feutre de carbone ce pourcentage est significativement plus élevé que celui pour les autres supports.

Tableau 4.1 : Résultats du test de croissance de *S. algeriensis* sur différents supports d'électrode.

Type d'électrode	Biomasse/surface (mg/cm <sup>2</sup> )	% d'augmentation de masse
Plaque d' <b>acier</b>	0,2	0,02
Mailles d' <b>acier</b>	1,7	0,6
Plaque de <b>platine</b>	2,9	1,5
Mailles de <b>platine</b>	2,2	1,2
Feutre de <b>carbone</b>	12,3	28
Tissu de <b>carbone</b>	2,2	14

Ces résultats indiquent que le feutre de carbone permettrait une bonne adhésion et une croissance mycélienne de la bactérie, raison pour laquelle il a été retenu pour effectuer l'ensemble des essais sur l'effet de la gamme de potentiel.

## 4.2. Effet du potentiel d'électrode sur le comportement de *Saccharothrix algeriensis*

D'abord, des mesures chronoampérométriques ont été réalisées avec un potentiel d'électrode compris entre - 0,3 et + 0,3 V/ECS pendant 5 jours. Pour chaque condition expérimentale, un témoin négatif, sans micro-organisme, permet d'évaluer l'électro-activité du milieu de culture dans ces conditions. A la fin de chaque manipulation la biomasse adhérente sur l'électrode a été quantifiée par pesée et les dithiopyrrolones ont été dosées par HPLC.

### 4.2.1. Effet des potentiels de + 0,2 et + 0,3 V/ECS

#### i) *En absence de S. algeriensis*

En absence du micro-organisme, au potentiel d'électrode + 0,3 V/ECS, la production du courant est faible de l'ordre de dizaine de mA/m<sup>2</sup> (Figure 4.4). Le profil du chronoampérogramme enregistré à + 0,2 V/ECS est similaire à celui présenté dans la Figure ci-dessous.

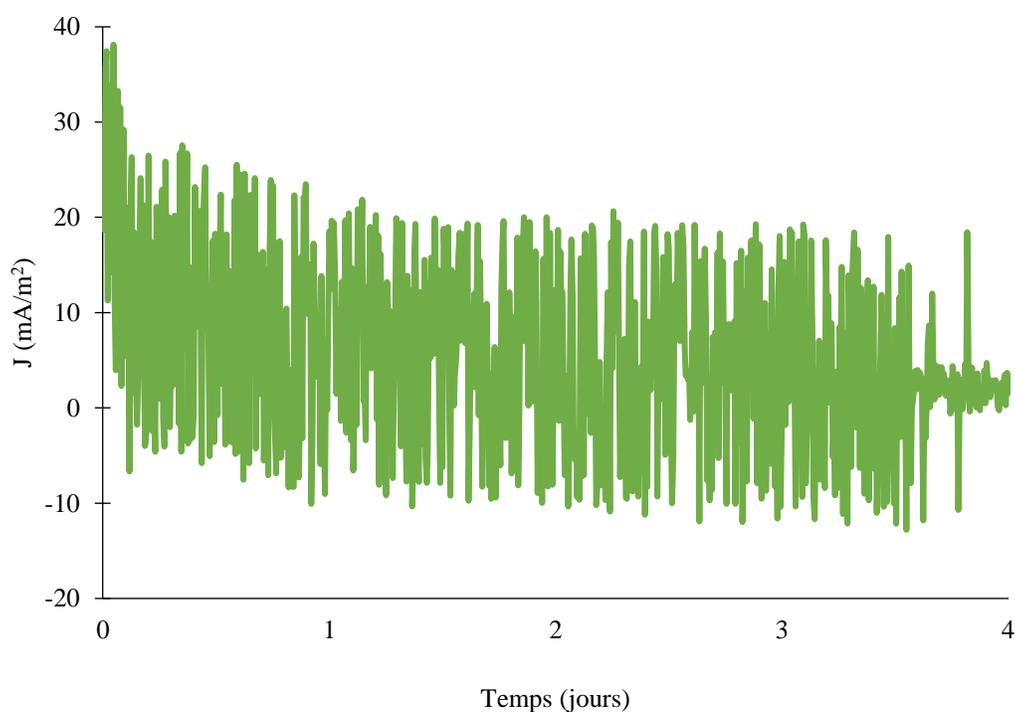


Figure 4.4 : Chronoampérogramme enregistré à + 0,3 V/ECS en absence de culture.

ii) *En présence de S. algeriensis*

En présence de la culture microbienne, à un potentiel d'électrode de + 0,2 V/ECS, la densité de courant augmente progressivement dès la fin du premier jour. Le courant atteint un maximum, environ 150 mA/m<sup>2</sup>, vers le troisième jour de culture. Ensuite la densité de courant diminue drastiquement au cours du 4<sup>ème</sup> jour (Figure 4.5).

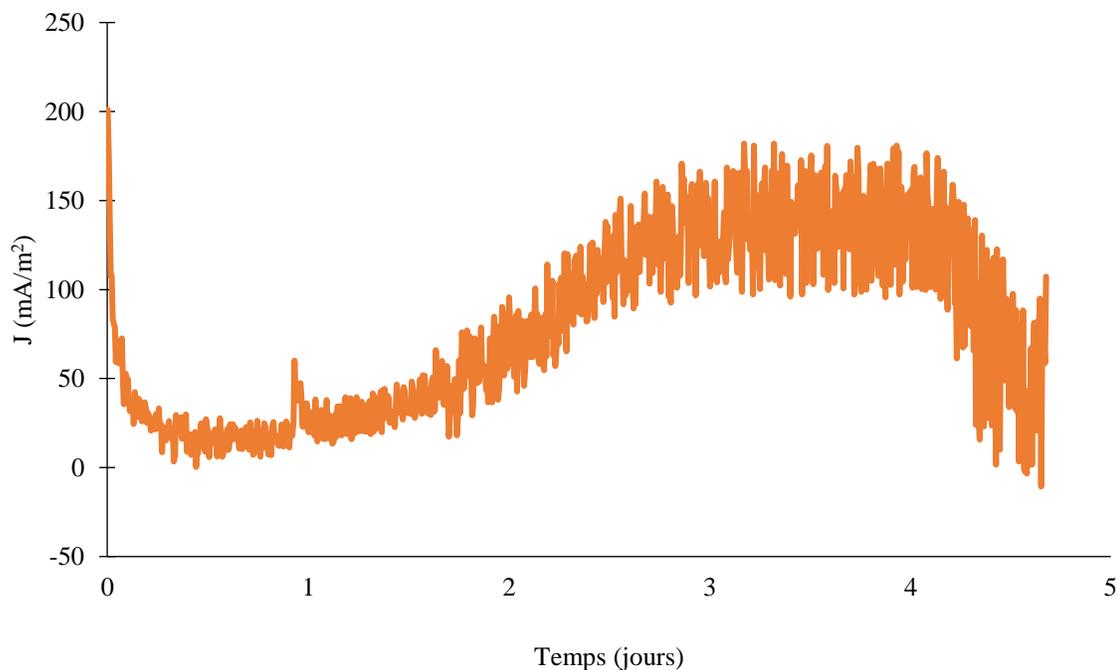


Figure 4.5 : Chronoampérogramme enregistré à + 0,2 V/ECS en présence d'une culture de *S. algeriensis*.

Lorsque l'électrode est polarisée à + 0,3 V/ECS, le chronoampérogramme a une allure similaire, avec une densité de courant qui atteint environ une cinquantaine de mA/m<sup>2</sup> vers les derniers jours de culture (Figure 4.6).

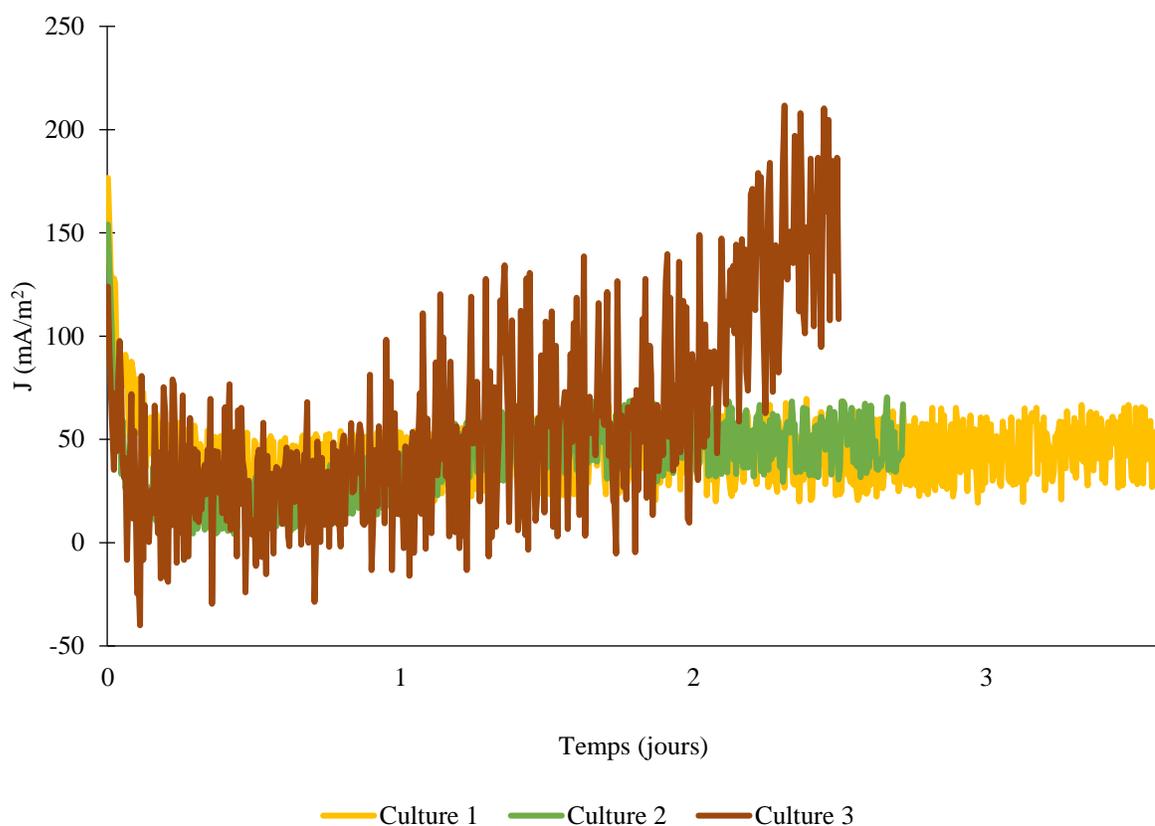


Figure 4.6 : Chronoampérogrammes enregistrés à + 0,3 V/ECS en présence de trois cultures indépendantes de *S. algeriensis*.

Dans ces conditions de polarisation d'électrode, les essais ont été réalisés en triplicata (cultures 1, 2 et 3). Au début de l'incubation, pour les différentes cultures, la densité de courant est d'environ 100 mA/m<sup>2</sup>. Pour toutes les cultures, le courant se stabilise autour d'une dizaine de mA/m<sup>2</sup>. Par la suite, pour toutes les cultures, la densité de courant augmente légèrement pendant le deuxième jour.

#### 4.2.2. Effet du potentiel 0 V/ECS

##### i) *En absence de S. algeriensis*

En absence du micro-organisme, la densité du courant est quasi nulle (Figure 4.7). Dans ces conditions, il n'y a donc pas d'échange électronique entre l'électrode de travail et le milieu de culture.

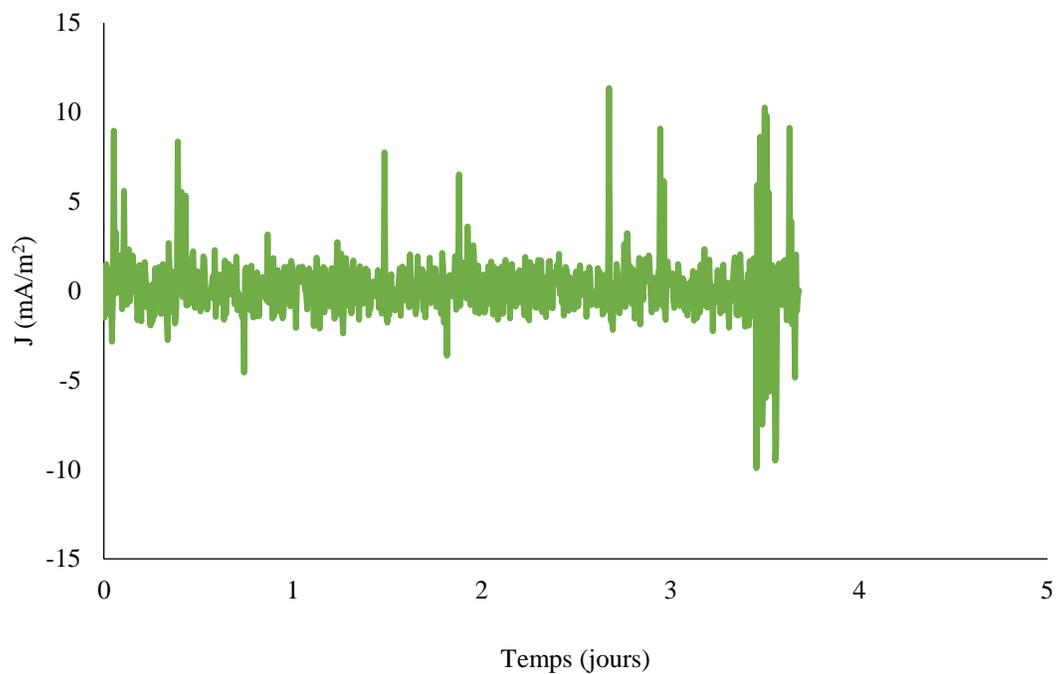


Figure 4.7 : Chronoampérogramme enregistré à 0 V/ECS en absence de culture.

ii) *En présence de S. algeriensis*

En présence du micro-organisme, lorsque le potentiel d'électrode est de 0 V/ECS, une faible variation de la densité de courant est observée (Figure 4.8). Dans la condition Témoin, la densité de courant est nulle.

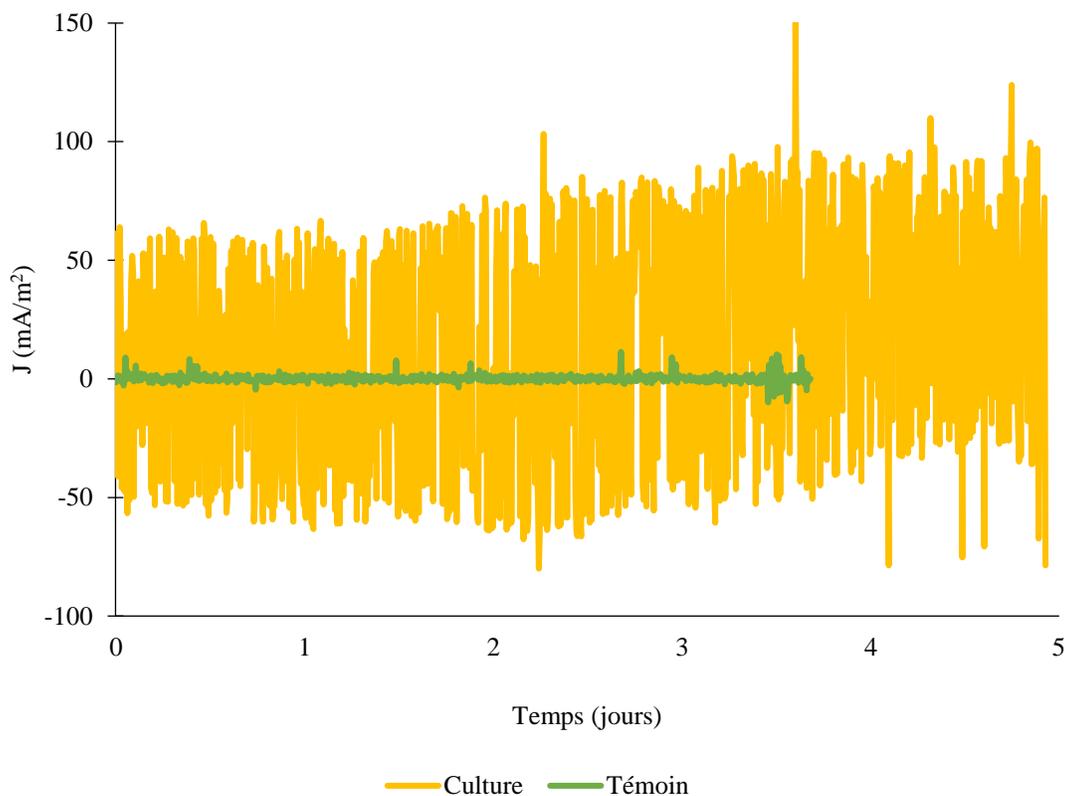


Figure 4.8 : Chronoampérogramme enregistré à 0 V/ECS en présence d'une culture de *S. algeriensis*.

#### 4.2.3. Effet des potentiels de - 0,2 et - 0,3 V/ECS

##### i) *En absence de S. algeriensis*

Pour le potentiel d'électrode à - 0,2 V/ECS la production du courant est très faible, de l'ordre de quelques mA/m<sup>2</sup>, dans le milieu de culture en absence de la culture de *S. algeriensis* (Figure 4.9).

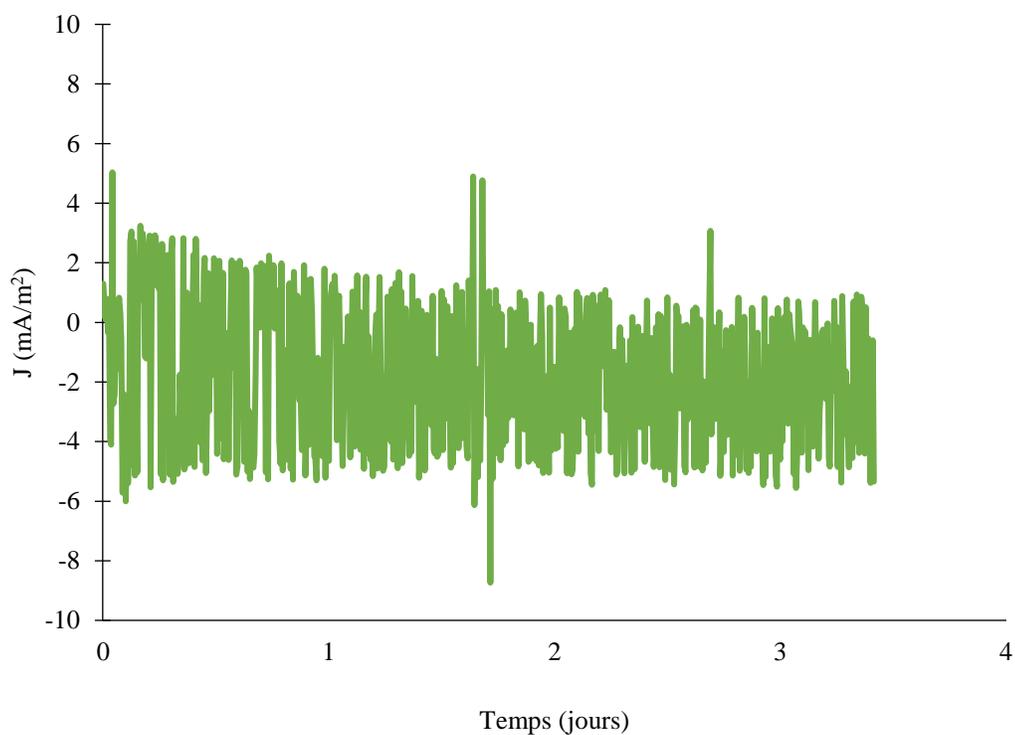


Figure 4.9 : Chronoampérogramme enregistré à - 0,2 V/ECS en absence de culture.

Chapitre 4 : Étude de l'effet d'une électrode polarisée sur la biosynthèse des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*.

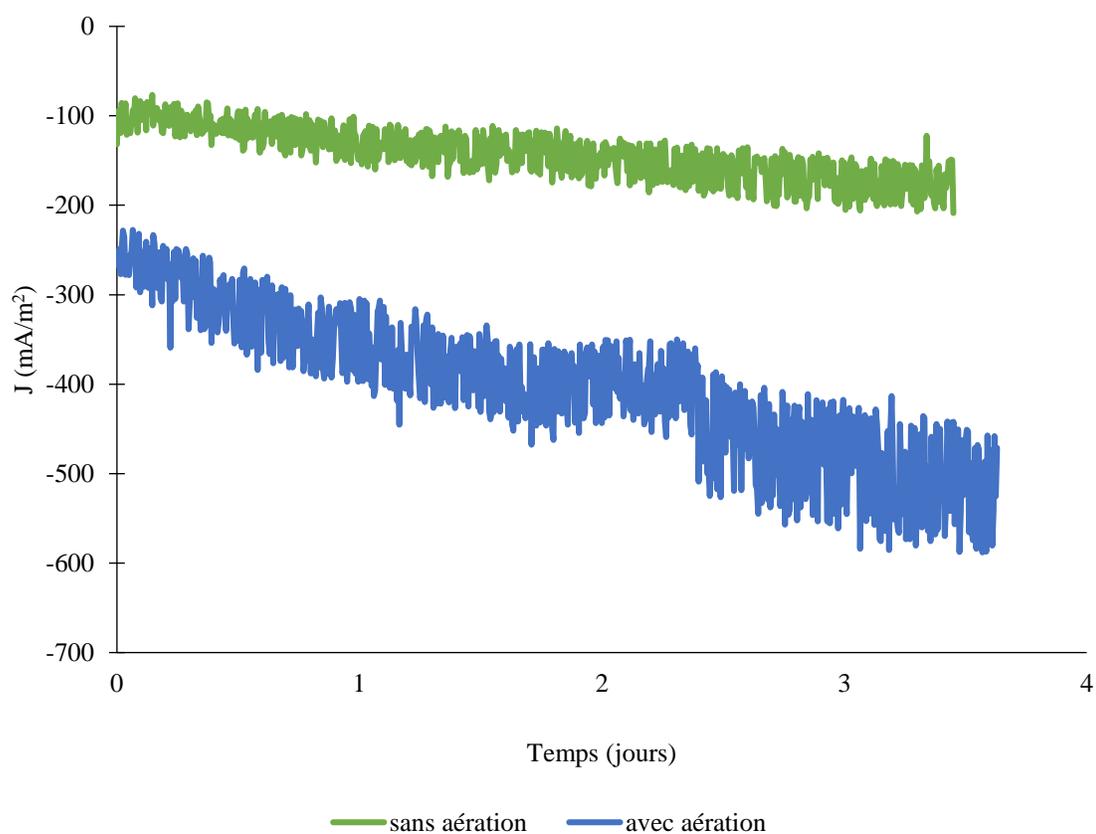


Figure 4.10 : Chronoampérogrammes enregistrés à - 0,3 V/ECS en absence de culture et sans ou avec aération.

Lorsque la polarisation de l'électrode est de - 0,3 V/ECS, la densité de courant au début de la mesure est de -250 mA/m<sup>2</sup> et augmente progressivement avec le temps pour atteindre -600 mA/m<sup>2</sup> vers le 4<sup>ème</sup> jour (Figure 4.10). Au cours d'un essai sans aération du milieu, la densité de courant produit est d'environ -150 mA/m<sup>2</sup>.

ii) *En présence de S. algeriensis*

Dans le milieu avec la culture microbienne en présence de l'électrode polarisée à -0,2 V/ECS (Figure 4.11), une augmentation du courant (réduction) a lieu le 1<sup>er</sup> jour d'incubation avec une intensité maximale d'environ -200 mA/m<sup>2</sup>, puis le courant diminue jusqu'au troisième jour. Ensuite, nous pouvons observer une légère augmentation du courant d'oxydation, avec une intensité de courant de l'ordre de 100 mA/m<sup>2</sup>.

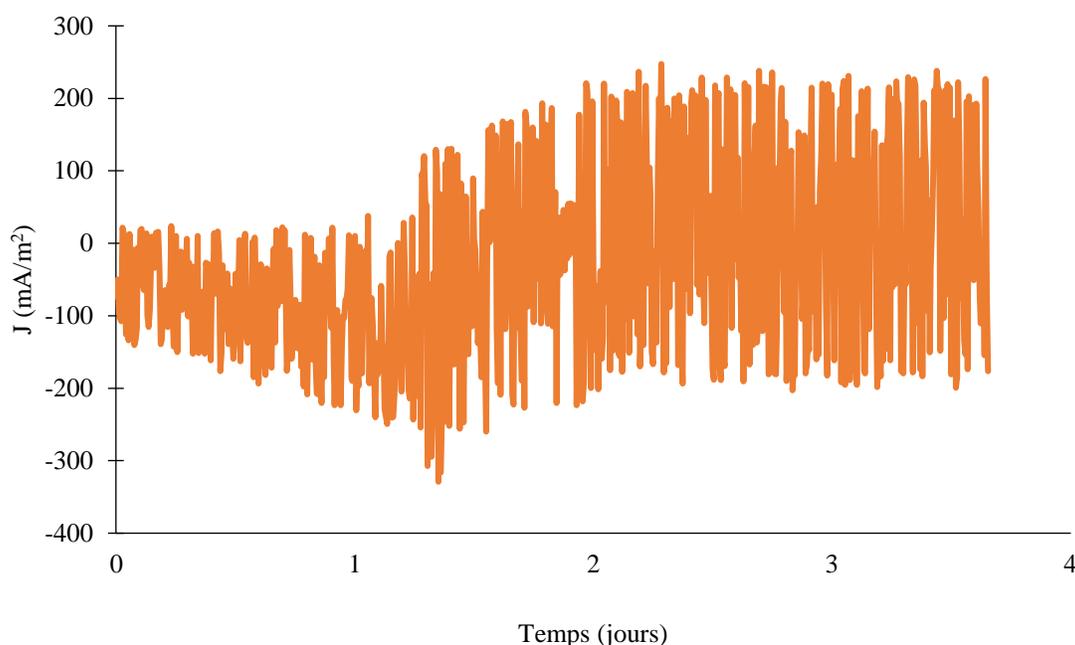


Figure 4.11 : Chronoampérogramme enregistré à -0,2 V/ECS en présence d'une culture de *S. algeriensis*.

À -0,3 V/ECS nous observons également une production de courant, dès le début de l'expérience, au moins trois fois plus accentuée qu'à -0,2 V/ECS (Figure 4.12).

Plusieurs essais ont été réalisés, dans ces conditions de polarisation d'électrode (cultures 1 à 5). Toutes les cultures sont identiques. Au début de l'incubation, pour la plupart des cultures, la densité de courant est supérieure à -300 mA/m<sup>2</sup>. Pour les cultures 2, 3 et 5 une légère augmentation de courant est observée lors des premières heures de culture, avec un maximum de -1000 mA/m<sup>2</sup> pour la culture 3. Par la suite, pour toutes les cultures, la densité de courant diminue pendant le premier jour et se stabilise en dessous de -100 mA/m<sup>2</sup> à la fin du deuxième jour.

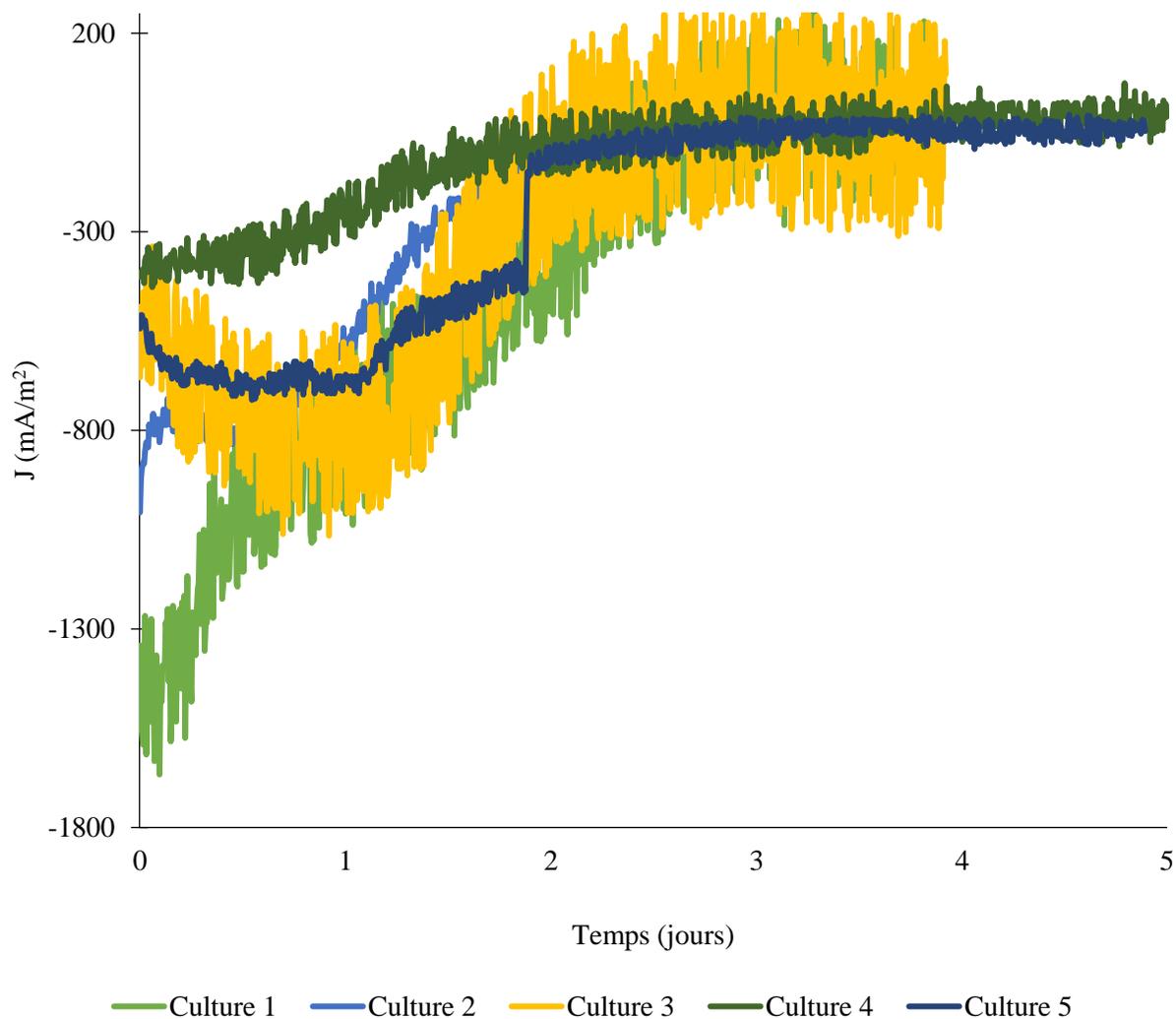


Figure 4.12 : Chronoampérogrammes enregistrés à - 0,3 V/ECS en présence de cinq cultures indépendantes de *S. algeriensis*.

#### 4.2.4. Effet du potentiel de -0,3 V/ECS appliqué après 24 h de culture.

La culture microbienne est laissée dans la cellule électrochimique à incuber pendant 24 h sans polarisation de l'électrode. Puis, le potentiel de - 0,3 V/ECS a été appliqué. Sur la courbe chronoampérométrique (Figure 4.13), nous observons une densité de courant d'environ  $-800 \text{ mA/m}^2$ , qui diminue légèrement les jours suivants.

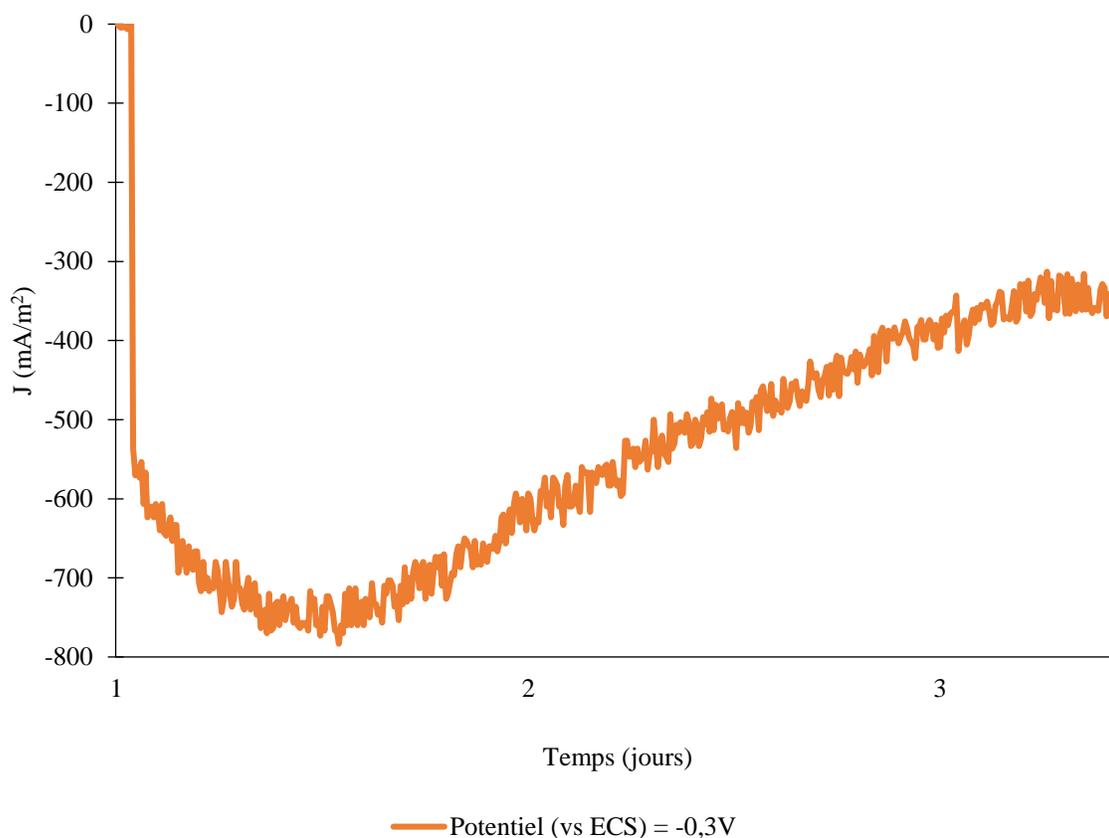


Figure 4.13 : Chronoampérométrie enregistré sur une électrode en feutre de carbone polarisée à  $-0,3 \text{ V/ECS}$  après 24 h de culture.

#### 4.2.5. Quantification de la biomasse et des dithiopyrrolones à différents potentiels

La quantification de la biomasse et des dithiopyrrolones a été réalisée pour différentes conditions, à des potentiels variant de - 0,3 à + 0,3 V/ECS. Les résultats sont rapportés dans la Figure 4.14.

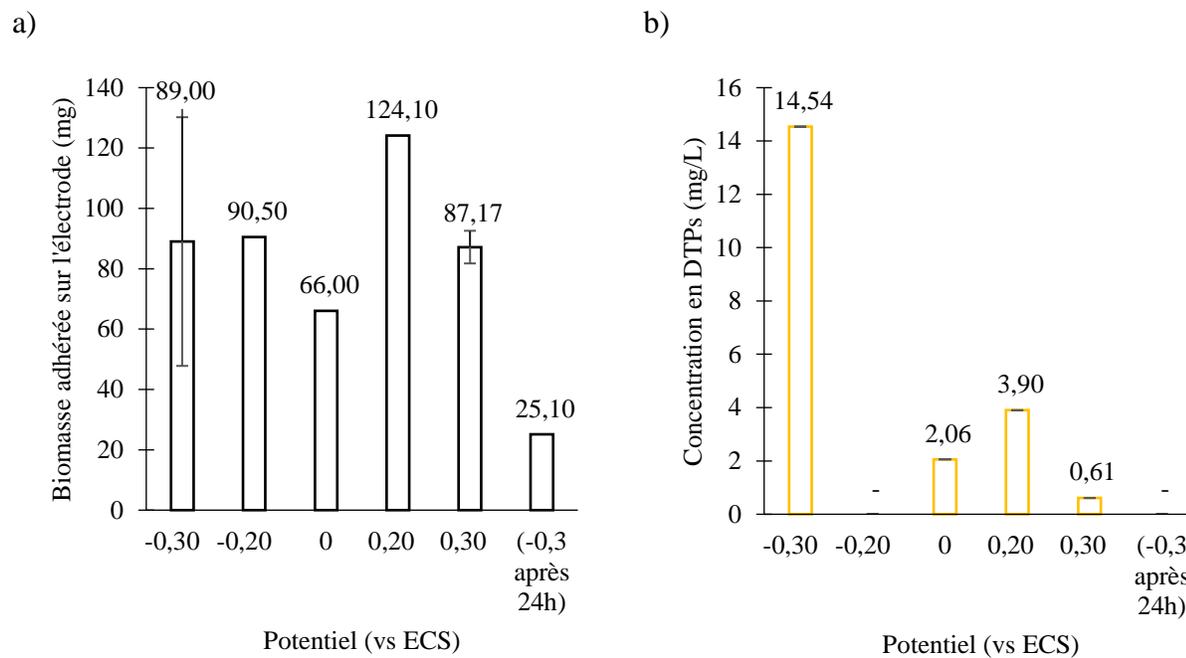


Figure 4.14 : Biomasse déposée sur l'électrode (a) et concentration en dithiopyrrolones (b) en fonction de la polarisation de l'électrode (vs ECS) (n=1, 3 ou 5).

Aux potentiels (vs ECS) de + 0,2 et + 0,3V, la quantité de biomasse développée sur l'électrode de travail est comparable (100 mg environ). Ces valeurs sont similaires aux valeurs développées sous les potentiels de - 0,2 V/ECS (90 mg) et - 0,3 V/ECS (89 mg). À 0 V/ECS, la biomasse sur l'électrode est de 66 mg, plus faible par comparaison aux valeurs obtenues sous les autres potentiels. En outre, la plus faible biomasse quantifiée (25 mg) est sur l'électrode qui a été polarisée à - 0,3 V/ECS qu'après 24 h de culture (Figure 4.14.a).

Quant à la concentration en dithiopyrrolones, elle varie beaucoup en fonction du potentiel appliqué à l'électrode (Figure 4.14.b). À - 0,3 V/ECS, la quantité de dithiopyrrolones est variable (entre 0 et 40 mg/L) alors que si ce potentiel est appliqué après 24 h d'incubation, aucune production de dithiopyrrolones n'est détectée comme c'est aussi le cas à - 0,2 V/ECS.

À 0 V/ECS, la concentration en dithiopyrrolones est de 2,15 mg/L, une valeur légèrement inférieure à celle quantifiée à + 0,2 V/ECS (3 mg/L). Néanmoins, au potentiel + 0,3 V/ECS, les dithiopyrrolones quantifiés sont de l'ordre de 0,6 mg/L.

#### 4.2.6. Études des charges échangées à - 0,3 V/ECS

À partir des chronoampérogrammes obtenus  $I = f(t)$ , la quantité de charges électriques échangée ( $Q$ ) peut être calculée comme l'intégrale de l'intensité du courant ( $I$ ) avec le temps :

$$Q = \int_0^t I dt$$

Dans le Tableau 4.2 ci-dessous la quantité de charges échangées par jour est indiquée pour les cultures en présence de l'électrode en feutre de carbone polarisée à - 0,3 V/ECS. Il s'agit des cultures 1 à 5 dont les résultats sont présentés dans le paragraphe 4.2.3.ii.

Tableau 4.2 : Quantités de charges échangées par jour pour les cinq cultures en présence de feutre de carbone.

	<b>Culture 1</b>	<b>Culture 2</b>	<b>Culture 3</b>	<b>Culture 4</b>	<b>Culture 5</b>
<b>[DTPs] (mg/L)</b>	2,42	0	2,19	39,5	ND
<b>Biomasse/ Surface de l'électrode (mg/cm<sup>2</sup>)</b>	51	51	47	50	45
<b>Temps (jours)</b>	<b>Charge (C)</b>				
<b>1</b>	11,4	9,8	9,5	17,1	8,9
<b>2</b>	6,0	3,8	6,8	12,2	3,6
<b>3</b>	1,4	0,6	0,8	2,0	1,5
<b>Charge totale (C)</b>	18,8	14,2	17,1	31,3	14,0

Chapitre 4 : Étude de l'effet d'une électrode polarisée sur la biosynthèse des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*.

Le premier jour d'incubation, la quantité de charges échangées pour les cultures 1, 2, 3 et 5 est d'environ de 10 Coulombs contre 17,1 Coulombs pour la culture 4.

Le deuxième jour d'incubation, le courant diminue ainsi que la quantité de courant produit. Ceci peut être dû à la formation du mycélium sur la surface d'électrode. Ainsi pour les cultures 1 et 3, la quantité de courant n'est que de 6 Coulombs, et elle est inférieure à 4 Coulombs pour les cultures 2 et 5. Pour la culture 4, la quantité de courant produit le deuxième jour est de 12,2 Coulombs.

Le troisième jour, les électrodes sont recouvertes de biomasse qui doit empêcher le flux électronique. Ainsi, la quantité de charges échangées est très faible, inférieure à 2 Coulombs, dans toutes les expériences.

### 4.3. Investigations sur l'effet du matériau de l'électrode de travail

En présence de l'électrode polarisée à  $-0,3$  V/ECS, nous avons, en plus, testé l'effet du type de l'électrode de travail dans ces conditions électrochimiques sur la capacité de la bactérie à produire des dithiopyrrolones. Quatre électrodes différentes (plaque d'acier, tissu de carbone, feutre de carbone, et maille de platine) ont été testées au potentiel  $-0,3$  V/ECS. Nous observons des différences importantes entre les profils des chronoampérogrammes avec les quatre électrodes.

#### 4.3.1. Électrode en acier

Avec l'acier, aucun échange électronique n'a eu lieu, les chronoampérogrammes du témoin et en présence de la bactérie sont identiques (Figure 4.15). Dans ce cas, la quantité de biomasse adhérente ( $4,2 \pm 1,2$  mg) sur la plaque d'acier ainsi que les quantités de dithiopyrrolones sont très faibles (environ  $1,8$  mg/L).

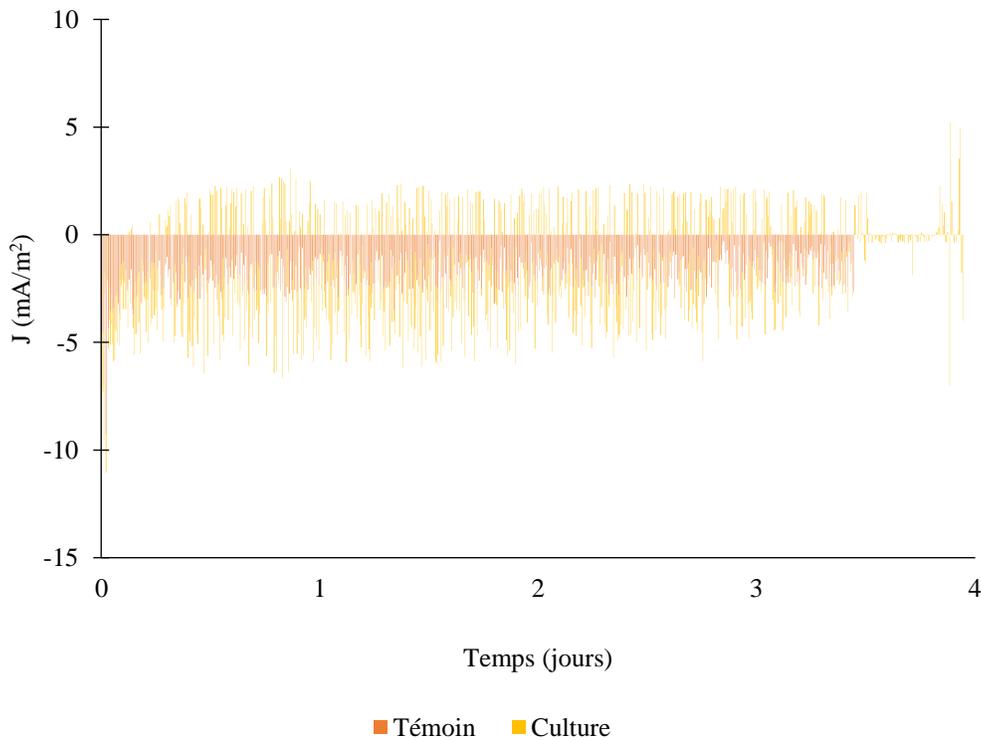


Figure 4.15 : Chronoampérogrammes sur une électrode en plaque d'acier polarisée à  $-0,3$  V/ECS.

#### 4.3.2. Électrodes en carbone

Dès le premier jour d'incubation en présence de l'électrode en tissu de carbone, la densité du courant est d'environ  $-200 \text{ mA/m}^2$  pour la culture 1 et de  $-400 \text{ mA/m}^2$  pour la culture 2. Ensuite cette densité diminue progressivement pour les deux cultures à partir du deuxième jour pour atteindre des valeurs minimales d'environ  $-50 \text{ mA/m}^2$  au dernier jour de culture (Figure 4.16).

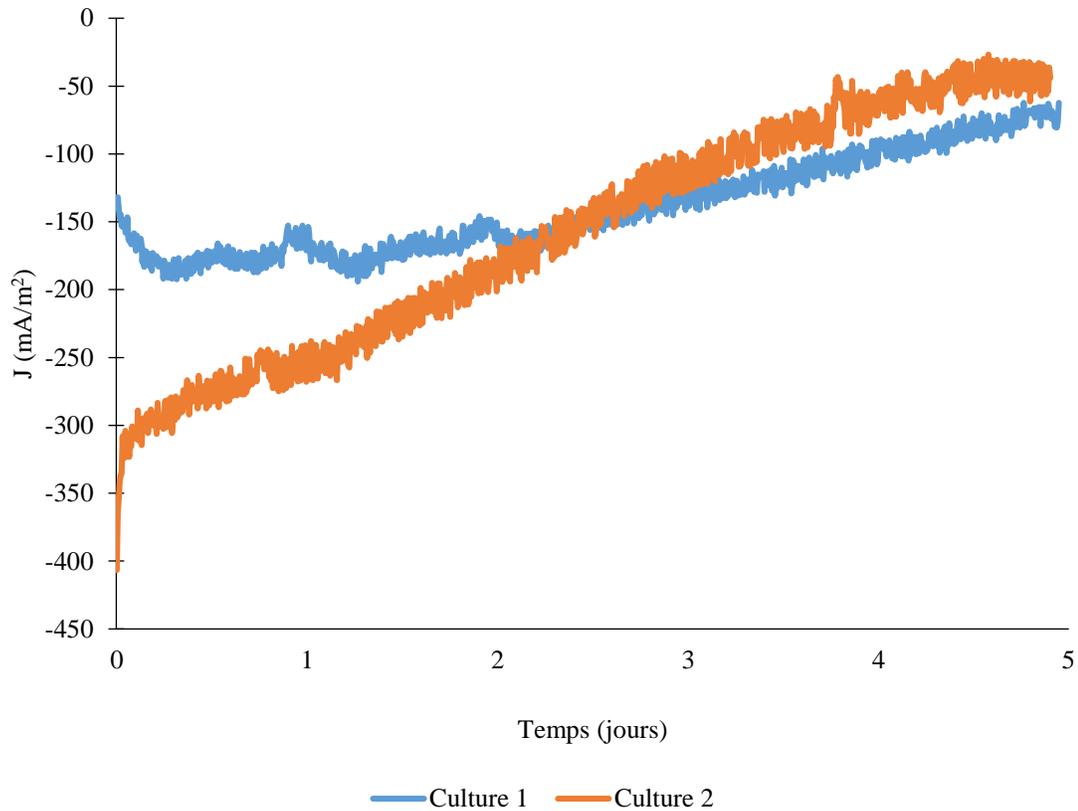


Figure 4.16 : Chronoampérogrammes enregistrés à un potentiel (vs ECS) =  $-0,3 \text{ V}$  avec une électrode en tissu de carbone.

Avec le feutre de carbone, les chronoampérogrammes enregistrés (Figure 4.17) indiquent une valeur initiale de densité de courant supérieure à celle sur tissu de carbone (valeur moyenne d'environ  $-800 \text{ mA/m}^2$ ). Comme sur le tissu de carbone, cette densité diminue progressivement dès le premier jour pour les trois cultures pour se stabiliser vers le troisième jour avec des valeurs moyennes de  $-100 \text{ mA/m}^2$ .

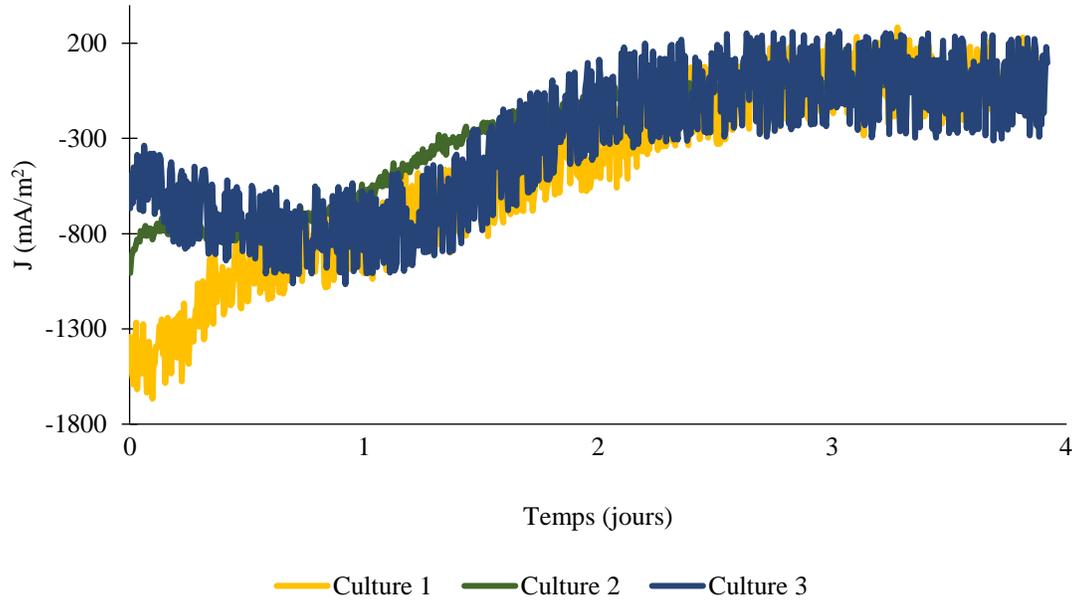


Figure 4.17 : Chronoampérogrammes enregistrés à un potentiel (vs ECS) = -0,3V avec une électrode en feutre de carbone.

La biomasse déposée sur les électrodes en feutre de carbone est en moyenne de  $68 \pm 8$  mg, soit cinq fois plus que sur le tissu de carbone ( $13 \pm 6$  mg) (Figure 4.18.a). La concentration moyenne des dithiopyrrolones, lors de ces trois cultures, est de l'ordre de  $2,3 \pm 0,16$  mg/L, valeur similaire à celle obtenue en présence du tissu de carbone ( $3 \pm 0,4$  mg/L) (Figure 4.18.b).

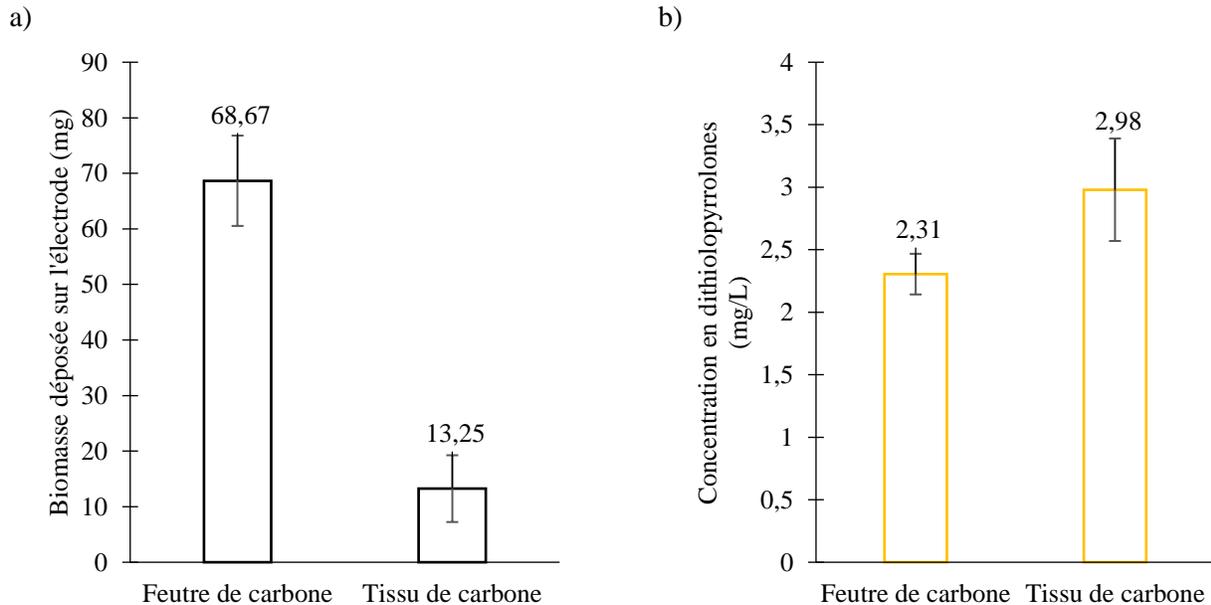


Figure 4.18 : Biomasse déposée sur l'électrode et concentration en dithiopyrrolones (b) en présence des électrodes en feutre et tissu de carbone (n=3).

### 4.3.3. Électrodes en platine

Le chronoampérogramme enregistré en présence d'une électrode en maille de platine pour la culture 1 (Figure 4.19) a une forme similaire à celui enregistré en présence de feutre de carbone (Figure 4.17). La valeur initiale de la densité du courant est d'environ  $-1000 \text{ mA/m}^2$ . Cette densité diminue dès le premier jour pour atteindre des valeurs de quelques  $\text{mA/m}^2$  à partir du deuxième jour. Ces valeurs restent stables jusqu'à la fin de la culture.

Néanmoins, le profil du chronoampérogramme enregistré pour la culture 2 (Figure 4.19) est similaire à celui enregistré en présence de l'électrode en tissu de carbone (Figure 4.16). La valeur initiale de la densité de courant est d'environ  $-200 \text{ mA/m}^2$ . Dès le premier jour cette densité diminue progressivement pour atteindre quelques  $\text{mA/m}^2$  au début du troisième jour.

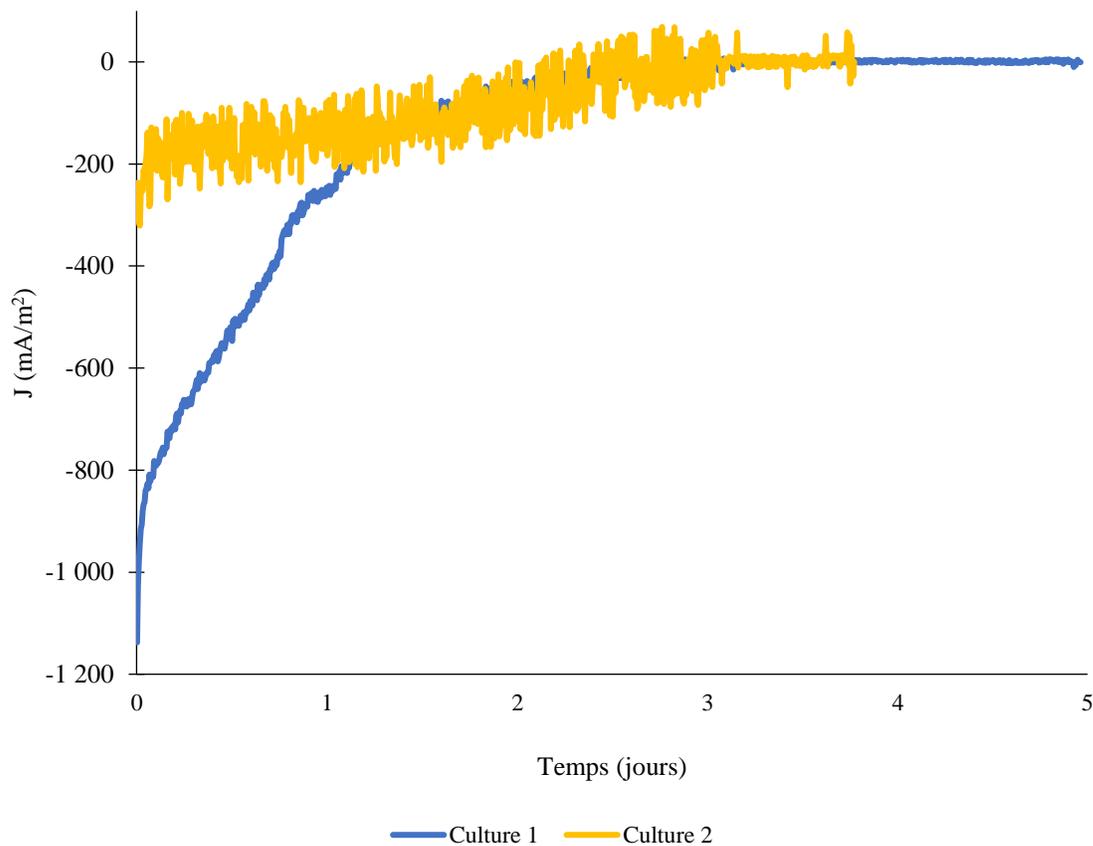


Figure 4.19 : Chronoampérogrammes enregistrés à un potentiel (vs ECS) =  $-0,3\text{V}$  avec des électrodes en maille de platine.

Chapitre 4 : Étude de l'effet d'une électrode polarisée sur la biosynthèse des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*.

Pour la culture 1, la biomasse déposée sur l'électrode en maille de platine est de 175 mg, onze fois plus que pour la culture 2 (16,8 mg) (Figure 4.20.a).

Nous voyons également la différence en concentration des dithiopyrrolones de la culture 1 (24 mg/L) alors qu'aucune trace de dithiopyrrolones n'a été détectée dans la culture 2 (Figure 4.20.b).

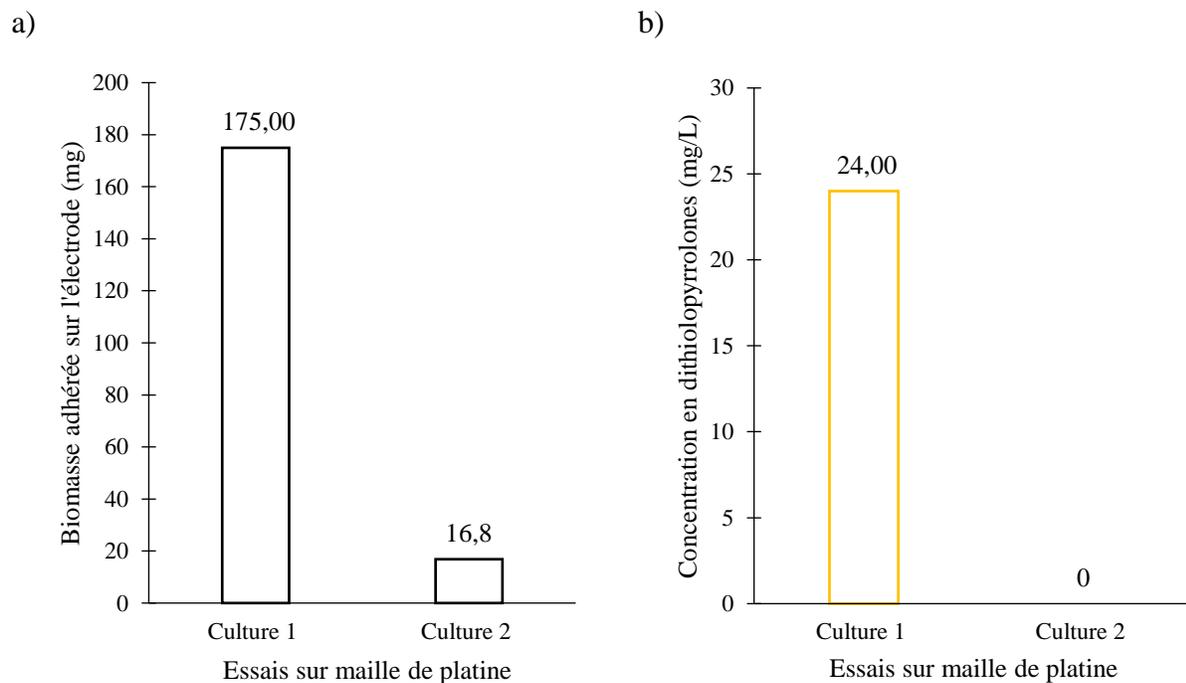


Figure 4.20 : Biomasse déposée sur l'électrode (a) et concentration en dithiopyrrolones (b) en présence des électrodes en platine (n=2).

## 4.4. Discussion

### 4.4.1. Choix du matériau d'électrode

Plusieurs matériaux (plaque d'acier, maille de platine, tissu et feutre de carbone) ont été testés pour la croissance de *S. algeriensis*.

L'acier semblerait être défavorable à l'adhésion et au développement de la bactérie.

Les autres supports permettent une bonne adhésion et un bon développement de la bactérie. Néanmoins, la surface poreuse et tridimensionnelle du feutre de carbone permet une meilleure colonisation mycélienne que sur les autres types d'électrodes.

Ces résultats indiquent que le feutre de carbone serait un bon choix comme électrode de travail pour mener des essais plus approfondis afin d'étudier la relation entre la production de dithiopyrrolones par cette bactérie et le potentiel imposé à l'électrode.

### 4.4.2. Études chronoampérométriques de l'effet du potentiel

Le profil des chronoampérogrammes est variable en fonction du potentiel appliqué à l'électrode de travail. La densité de courant est directement en relation avec le potentiel imposé et le matériau de l'électrode.

Aux potentiels de + 0,2 et + 0,3 V/ECS, la consommation du courant peut avoir plusieurs origines : la première, le flux d'électron peut-être assuré *via* le transfert direct des électrons à partir des cellules adhérentes vers la surface d'électrode ; la deuxième, le micro-organisme produit des métabolites qui sont par la suite oxydés. Nous pouvons donc supposer que dans ces conditions de culture avec des potentiels d'électrode de + 0,2 et + 0,3 V/ECS, les électrons issus du métabolisme oxydatif microbien sont cédés par les micro-organismes à l'électrode.

En absence et en présence de micro-organisme, lorsque le potentiel d'électrode est de 0 V/ECS, il y a peu de variation de courant enregistré sur le chronoampérogramme, il y a donc peu d'échanges électroniques entre la bactérie et l'électrode (Figure 4.8).

Lors de la polarisation de l'électrode à - 0,3 V/ECS, en absence des micro-organismes un courant de réduction est observé (Figure 4.10).

Au cours de l'incubation, l'oxygénation du milieu de culture est assurée par une aération forcée par barbotage. Ainsi, dans ces conditions expérimentales (composition ionique du milieu, polarisation de l'électrode) la réduction de l'oxygène présent dans le milieu de culture, à la surface de l'électrode peut avoir lieu. Comme la densité de courant dépend de la quantité d'oxygène, nous pouvons observer que la densité de courant à - 0,3 V/ECS dans le milieu de culture non-aéré est plus faible que celle du milieu aéré (Figure 4.10). L'augmentation progressive du courant de réduction avec le temps est due à l'évolution électrochimique de la surface d'électrode (activation) améliorant ainsi le transfert d'électrons.

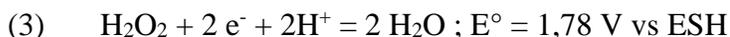
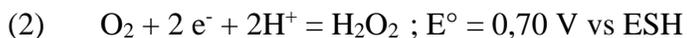
Au potentiel de - 0,3 V/ECS, dans les premières heures d'incubation, l'augmentation de la densité du courant est plus importante en présence du micro-organisme que dans l'expérience témoin avec un milieu aéré et sans la culture microbienne (Figures 4.10 et 4.12). Il est donc envisageable que la réduction de l'oxygène dans le milieu de culture soit catalysée par *S. algeriensis*. Par la suite, après 24 h de culture, l'atténuation de l'intensité du courant est probablement due au développement du mycélium dense sur l'électrode, qui doit progressivement empêcher l'accès de l'oxygène vers la surface d'électrode. Par conséquent, la réduction électrochimique de l'oxygène n'a plus lieu.

En effet, certains micro-organismes à Gram négatif et à Gram positif, adhérents à une surface d'électrode sont capables de catalyser la réduction électrochimique de l'oxygène (Cournet et al., 2010). Cette réduction peut-être catalysée par les enzymes microbiennes telles que la catalase ou d'autres enzymes héminiques de la membrane cellulaire (oxydase, cytochrome).

La réduction de l'oxygène en eau peut avoir lieu soit par la voie directe à quatre électrons (1) ;



ou par la succession des deux étapes de réduction à deux électrons (2 et 3) *via* la formation intermédiaire de peroxyde d'hydrogène.



La cinétique et le mécanisme de la réduction électrochimique de l'oxygène dépendent de plusieurs facteurs tels que la composition ionique de l'électrolyte, le pH et la nature de l'électrode. La réduction de l'oxygène sur les électrodes en carbone se fait par la production de peroxyde. (Kinoshita, 1992). (cf. équations 2 et 3)

Deux hypothèses sont possibles pour pouvoir expliquer la relation entre la réduction de l'oxygène et la production des dithiopyrrolones.

Premièrement, les peroxydes, issus de la réduction d'oxygène, sont des espèces très réactives et ils peuvent induire un stress oxydatif chez les micro-organismes. Ils agissent comme des molécules de signalisation « stressors » qui déclenchent les mécanismes de défense bactériens, parmi lesquels ceux impliqués dans la production des antimicrobiens (cf. § 1.3.2.1).

Deuxièmement, les dithiopyrrolones sont synthétisées par *S. algeriensis* à partir de la cystine (cf § 1.2.3.2). Parmi les différentes étapes, 4 oxydations à deux électrons sont nécessaires pour pouvoir former le noyau bicyclique de la pyrrothine (Li & Walsh, 2011). Pour cela, différentes flavoenzymes sont impliquées. Par exemple, la dithiol oxydase catalyse l'oxydation des thiols pour former le pont disulfure, en utilisant le dioxygène comme co-substrat (Figure 4.21). L'oxygène est réduit en peroxyde d'hydrogène. En présence de l'électrode polarisée, l'équilibre redox de la cellule peut-être modifié favorisant la réduction de l'oxygène et l'oxydation des thiols. Cela pourrait expliquer en partie les variations de la concentration en dithiopyrrolones dans les différentes conditions de culture.

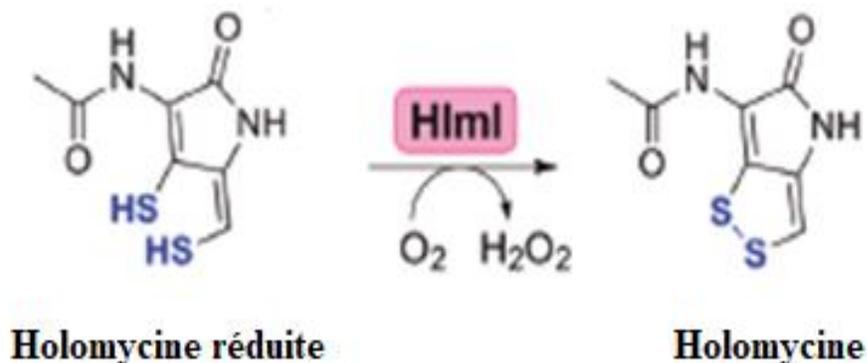


Figure 4.21 : La dithiol oxydase catalyse la formation du pont disulfure des dérivés dithiopyrrolones (Schéma extrait de l'article de Li & Walsh, 2011).

Nous pouvons supposer que *S. algeriensis* pourrait être capable d'utiliser une électrode en feutre de carbone comme donneur d'électrons. Pour mieux comprendre l'origine de cette électro-activité, il est nécessaire d'étudier la cinétique d'adhésion des bactéries sur la surface de l'électrode et de chercher une corrélation entre le recouvrement de la surface et le courant produit. Il est aussi possible que les bactéries produisent un métabolite qui soit responsable de la catalyse de la réduction de l'oxygène (cf § 1.3.4.2.).

#### 4.4.3. Échanges des charges électriques à - 0,3 V/ECS et production de dithiopyrrolones

##### 4.4.3.1. *Électrode en feutre de carbone*

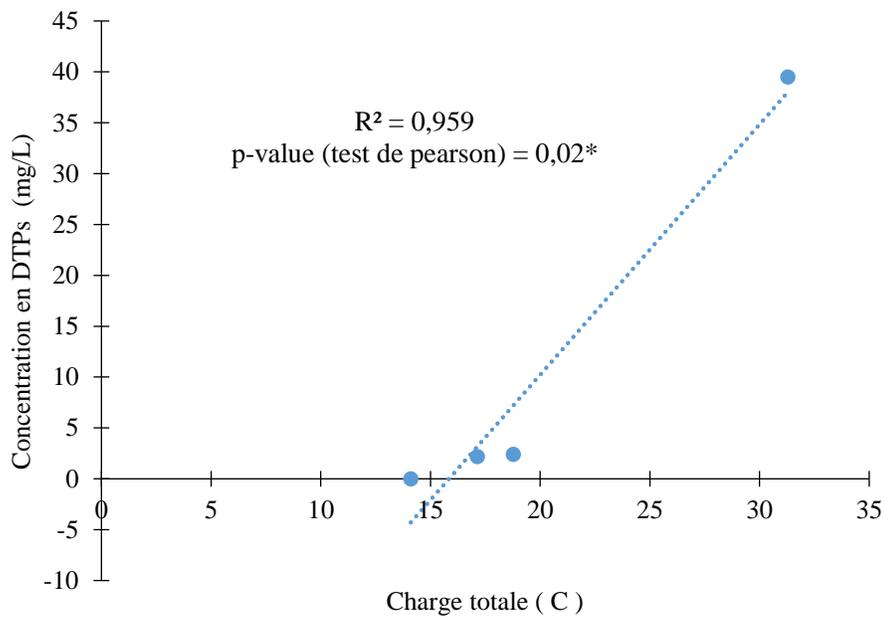
Si nous comparons la somme des charges échangées avec la quantité de dithiopyrrolones produite, il est possible d'établir une corrélation entre la quantité de courant produit les trois premiers jours et la concentration en dithiopyrrolones dans le milieu de culture (Figure 4.22.a). Nous pouvons tracer une droite de la variation de la concentration en dithiopyrrolones (y) en fonction de la charge échangée au cours trois premiers jours (x) :

$$y = 2,4614x - 39,008 \text{ avec } R^2 = 0,959$$

Le coefficient de corrélation de cette droite est de 0,95. Il existe une corrélation significative entre ces deux variables (p-value test de Pearson < 0,05).

Il est intéressant de noter que dans toutes les cultures, la colonisation mycélienne des électrodes est homogène (rapport biomasse/surface varie entre 45 et 52 mg/cm<sup>2</sup>) (Figure 4.22.b). L'absence de corrélation entre la quantité de charge échangées et le rapport biomasse/surface indique que, dans ces conditions de culture, la production de dithiopyrrolones par *S. algeriensis* pourrait être uniquement liée aux échanges électroniques avec l'électrode. Néanmoins, la modélisation de la relation entre la quantité de courant échangée et la concentration de dithiopyrrolones produite par la bactérie nécessite un suivi cinétique de la production de ces dérivés.

a)



b)

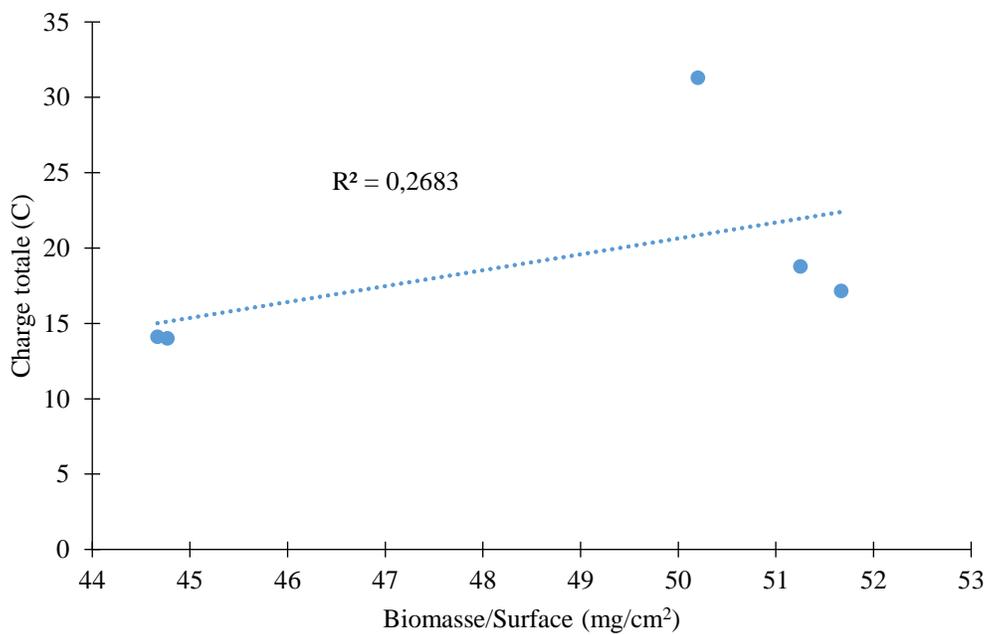


Figure 4.22 : Variation de la concentration en dithiopyrrolones en fonction des échanges électriques entre *S. algeriensis* et l'électrode polarisée à - 0,3 V/ECS (a) ; Variation de la charge totale échangée en fonction de la biomasse déposée sur la surface de l'électrode en feutre de carbone (b).

#### 4.4.3.2. *Électrode en maille de platine*

Nous avons observé que la surface de l'électrode en maille de platine était complètement colonisée par la biomasse et plus rapidement que la surface en feutre de carbone. Nous observons également, que la production de courant diminue plus rapidement en présence de l'électrode en maille de platine qu'avec le feutre de carbone. Ceci peut être dû à la différence de topographie de la surface du feutre de carbone par rapport à celle du platine.

Le platine pouvant catalyser la réduction de l'oxygène (Ramaswamy & Mukerjee, 2012), la production des dithiopyrrolones est probablement soutenue malgré des échanges de charges plus faibles que pour les cultures en présence de l'électrode en feutre de carbone les deux premiers jours (Tableau 4.3).

Tableau 4.3 : Échanges électroniques en présence des électrodes en feutre de carbone et en plaque de platine.

	<b>Culture 4</b> <b>(feutre de carbone)</b>	<b>Culture 2</b> <b>(feutre de carbone)</b>	<b>Culture 1</b> <b>(maille de Platine)</b>
<b>[DTPs] (mg/L)</b>	39,5	0	24,5
<b>Biomasse/surface</b> <b>(mg/cm<sup>2</sup>)</b>	50	51	58
<b>Temps (jours)</b>	<b>Charge (Coulomb)</b>		
<b>1</b>	17,1	9,8	10,5
<b>2</b>	12,2	3,8	2,3
<b>3</b>	2,0	0,6	0,5
<b>Charge totale</b> <b>(Coulomb)</b>	31,3	14,1	13,3

#### 4.4.4. Effet du matériau de l'électrode de travail sur la production des dithiopyrrolones

Avec une électrode de travail en acier, aucun échange électronique n'a eu lieu, les chronoampérogrammes du témoin sans le micro-organisme et de celui en présence de la bactérie sont identiques (Figure 4.15). Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'acier semblerait être défavorable à l'adhésion et au développement de la bactérie, comme nous l'avons indiqué précédemment (§ 4.4.1).

Avec le tissu de carbone peu de courant est produit, cela pourrait être dû à la petite surface du tissu comparée à celle tridimensionnelle du feutre. Les quantités de dithiopyrrolones produites en présence de l'électrode en feutre de carbone peuvent être plus importantes (culture 4) que celles en présence d'une électrode en tissu de carbone (Figure 4.23).

En présence de l'électrode en maille de platine, les résultats sont variables (Figure 4.23) aussi bien pour la quantité de biomasse que pour les dithiopyrrolones. Il est nécessaire d'effectuer davantage d'essais pour mieux comprendre le comportement de *S. algeriensis* dans ces conditions.

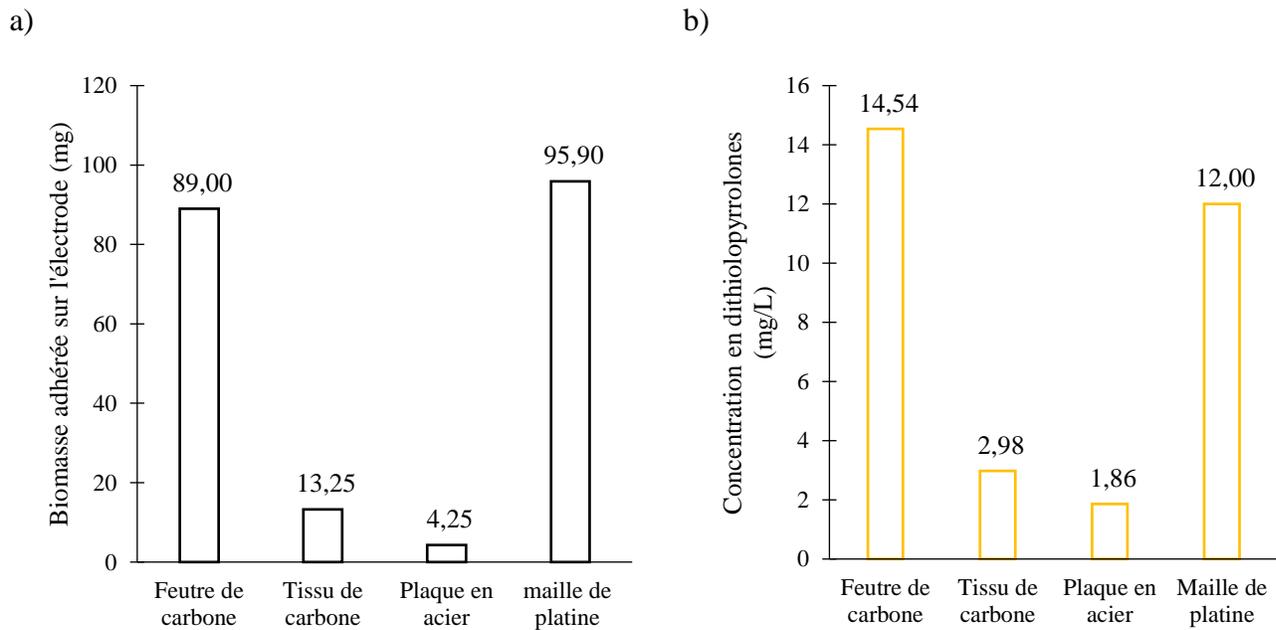


Figure 4.23 : Effet du matériau de l'électrode de travail sur la biomasse (a) et la concentration en dithiopyrrolones (b) produites par *S. algeriensis*.

#### 4.5. Conclusion

Parmi les différents matériaux testés (plaque et maille d'acier, maille de platine, feutre et tissu de carbone), les électrodes en platine et en feutre de carbone sembleraient être les mieux appropriées pour une bonne croissance mycélienne de *S. algeriensis*. De plus, avec ces types d'électrode, les cellules microbiennes pourraient mieux profiter du flux d'électrons.

Aux potentiels d'électrode + 0,2 et + 0,3 V/ECS, nous observons des phénomènes d'oxydation en présence de *S. algeriensis* à partir du deuxième jour de culture. Ces conditions électrochimiques sembleraient être plus propices à la production de biomasse que de dithiopyrrolones.

Au potentiel de - 0,3 V/ECS, la réduction de l'oxygène a lieu, catalysée par la présence de la culture microbienne. Vers le deuxième jour, concordant avec la formation d'un mycélium sur l'électrode, la quantité de courant de réduction diminue progressivement. La concentration en dithiopyrrolones dans le milieu de culture dépendrait de la quantité de charges échangées entre *S. algeriensis* et l'électrode.

Dans la suite, pour mieux comprendre les phénomènes observés et expliquer la relation entre la réduction électrochimique de l'oxygène et la production des dithiopyrrolones, il faudrait d'abord déterminer le rôle du micro-organisme et identifier plus précisément le type de transfert d'électron (direct / via des médiateurs, ...).

Dans ce contexte, il est important d'étudier la cinétique d'adhésion de cette bactérie sur la surface de l'électrode afin d'établir une relation éventuelle avec le courant produit. Cela nécessite donc une analyse de la composition de la biomasse formée sur l'électrode et le suivi de son évolution au cours du temps.

Pour pouvoir contrôler la biosynthèse de dithiopyrrolones électro-assistée, nous devons maîtriser d'une part la formation d'un mycélium dense sur l'électrode et, d'autre part, la période de production de dithiopyrrolones par les bactéries. De nombreuses pistes peuvent être explorées telles que la modification de la rugosité de l'électrode et l'agitation du milieu. Également, l'utilisation des éliciteurs chimiques serait une opportunité intéressante pour stimuler la biosynthèse de ces dérivés en présence d'une électrode polarisée (Chen et al., 2017).

## Conclusion générale et perspectives

---

*Saccharothrix algeriensis* est une bactérie à Gram positif, productrice de dithiopyrrolones. Ce sont des composés à très large spectre d'action. De nombreux travaux décrivent leurs propriétés antibactériennes (particulièrement vis-à-vis des microorganismes à Gram positif), antifongiques et insecticides.

La bioproduction, à grande échelle, de ces composés à partir des microorganismes est souvent difficile à cause des faibles rendements de production et/ou des difficultés d'optimisation des procédés mis en place. Il est donc important de développer des nouvelles stratégies permettant l'exploitation des produits naturels avec une bonne rentabilité économique.

À l'heure actuelle, les études, citées dans la littérature, sur l'optimisation de la production des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*, portent principalement sur les modifications de la composition chimique du milieu de culture. Notre objectif était de développer de nouveaux outils pour améliorer la production de ces dérivés. Dans ce contexte nous nous sommes orientés vers :

- L'utilisation de composés chimiques comme éliciteurs.
- L'utilisation d'une électrode polarisée comme inducteur du métabolisme bactérien.

### Élicitation par des composés chimiques

Les éliciteurs chimiques agissent comme des molécules signal pour déclencher des réactions de défense naturelles du micro-organisme et donc pour stimuler certaines voies métaboliques, comme celles impliquées dans la synthèse d'antimicrobiens. Les composés que nous avons testés sont des analogues d'auto-inducteurs du Quorum Sensing des bactéries à Gram positif et à Gram négatif ainsi que des solvants (éthanol, butan-1-ol, diméthylsulfoxyde).

La gamma-butyrolactone, ajoutée au début de l'incubation, augmente la production des dithiopyrrolones de 190 % sans diminuer la quantité de biomasse de *S. algeriensis*. L'addition simultanée de C<sub>4</sub>-HSL et 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL, augmente la production spécifique de dithiopyrrolones d'environ 250 % par rapport à la culture témoin.

L'éthanol et le diméthylsulfoxyde, ajoutés dans le milieu de culture de *S. algeriensis* à faibles concentrations, permettent d'obtenir des concentrations en dithiopyrrolones plus importante, de 600 % et 300 % respectivement, en comparaison avec la culture témoin.

Afin de déterminer le mode d'action de ces composés dans le soutien de la production des dithiopyrrolones, il serait nécessaire d'approfondir nos connaissances sur la cinétique des différentes phases de croissance de *S. algeriensis* dans ces nouvelles conditions de culture. Nous pourrions également, à l'aide des outils de la biologie moléculaire étudier l'effet de ces molécules sur l'activation de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des dithiopyrrolones chez *S. algeriensis*. Cela permettra d'optimiser le procédé de production de ces dérivés.

L'augmentation de la biosynthèse des dithiopyrrolones par *S. algeriensis* en présence de l'éthanol ou du butan-1-ol est probablement une réponse physiologique au stress oxydatif généré par ces derniers. En effet, les alcools contribuent à la génération enzymatique d'espèces radicalaires oxygénées. Les premiers essais pour vérifier cette hypothèse ont été réalisés, en utilisant des inhibiteurs de la NAD(P)H oxydase et des peroxydases. Des manipulations supplémentaires de dosage des espèces radicalaires générées dans le milieu de culture pourraient nous aider à étayer cette hypothèse.

### Utilisation d'une électrode polarisée dans le milieu de culture

Aux potentiels + 0,2 et + 0,3 V/ECS, en présence de *S. algeriensis*, une augmentation du courant d'oxydation est observée à partir du deuxième jour de culture, avec la colonisation de l'électrode par la bactérie. Dans ces conditions la production de biomasse est soutenue.

Au potentiel - 0,3 V/ECS, dès le début de la culture une production de courant de réduction a lieu. Dans ces conditions, la réduction de l'oxygène a probablement lieu, catalysée par *S. algeriensis*. Par contre, au cours du deuxième jour, la densité du courant est atténuée vraisemblablement à cause du développement du mycélium sur l'électrode. Nous avons pu établir une relation entre les quantités de charges échangées les trois premiers jours de culture et la concentration en dithiopyrrolones.

Également, différents matériaux d'électrode ont été utilisés. Nous pouvons constater que le feutre de carbone et le platine améliorent les échanges électroniques entre *S. algeriensis* et l'électrode polarisée. Ces échanges impactent la capacité de cette bactérie à biosynthétiser les dithiopyrrolones.

Étant donné que la biosynthèse des dithiopyrrolones à partir de la cystine comporte plusieurs étapes de cyclisation et d'oxydation, il est probable que la bactérie utilise le flux d'électrons, généré par la réaction de réduction de l'oxygène, dans certaines étapes de cette biosynthèse. Pour confirmer notre hypothèse et pour mieux comprendre les phénomènes observés, il faudrait d'abord déterminer la relation entre la réduction de l'oxygène sur la surface de l'électrode et la production des dithiopyrrolones (rôle du micro-organisme, type de transfert d'électron).

De façon plus globale, nos études ont montré l'intérêt de l'utilisation des éliciteurs chimiques tels que l'éthanol dans l'optimisation de la production des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*. Néanmoins, le rôle d'une électrode polarisée dans l'optimisation de la biosynthèse de ces dérivés reste encore à élucider.

Dans le futur, nous pourrions envisager d'établir un protocole standardisé permettant de maintenir des conditions de culture optimales et homogènes, afin d'augmenter les rendements de production et d'assurer une qualité constante du produit d'intérêt. Nos objectifs les plus ambitieux correspondent à la mise au point d'un bioréacteur pour cette synthèse.

## Références bibliographiques

---

## Références bibliographiques

Abdelmohsen, U. R., Grkovic, T., Balasubramanian, S., Kamel, M. S., Quinn, R. J., & Hentschel, U. (2015). Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. *Biotechnology Advances*, 33(6), 798–811.

Ando, N., Ueda, K., & Horinouchi, S. (1997). A *Streptomyces griseus* gene (*sgaA*) suppresses the growth disturbance caused by high osmolality and a high concentration of A-factor during early growth. *Microbiology*, 143, 2715-2723.

Arnér, ESJ., & Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry*, 6109, 6102–6109.

Athalye, M., Goodfellow, M., Lacey, J., & White, R. (1985). Numerical classification of *Actinomyces* and *Nocardia*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 35(1), 86.

Babior, B. (2001). The NADPH Oxidase of Endothelial Cells. *IUBMB Life*, 50(4), 267–269.

Babior, B. M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *American Journal of Medicine*, 109(1), 33-44.

Baer, S. H., Blaschek, H. P., & Smith, T. L. (1987). Effect of Butanol Challenge and Temperature on Lipid Composition and Membrane Fluidity of Butanol-Tolerant *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(12), 2854–61.

Banaiee, N., Jacobs, W. R., & Ernst, J. D. (2006). Regulation of *Mycobacterium tuberculosis* *whiB3* in the mouse lung and macrophages. *Infection and Immunity*, 74(11), 6449–6457.

Bassler, B. L., & Losick, R. (2006). Bacterially Speaking. *Cell*, 125(2), 237-246.

Battle-Vilanova, P., Ganigué, R., Ramió-Pujol, S., Bañeras, L., Jiménez, G., Hidalgo, M., Puig, S. (2017). Microbial electrosynthesis of butyrate from carbon dioxide: Production and extraction. *Bioelectrochemistry*, 117, 57–64.

Bespalov, V. A., Zhulin, I. B., & Taylor, B. L. (1996). Behavioral responses of *Escherichia coli* to changes in redox potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(19), 10084–10089.

Bond, D. R., Holmes, D. E., Tender, L. M., & Lovley, D. R. (2002). Electrode-Reducing Microorganisms That Harvest from Marine Sediments, *Science*, 295(5554), 483–485.

## Références bibliographiques

Booth, I. R. (2002). Stress and the single cell: Intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1–2), 19–30.

Borole, A. P., Reguera, G., Ringeisen, B., Wang, Z.-W., Feng, Y., & Kim, B. H. (2011). Electroactive biofilms: Current status and future research needs. *Energy & Environmental Science*, 4(12), 4813.

Boubetra, D., Sabaou, N., Zitouni, A., Bijani, C., Lebrihi, A., & Mathieu, F. (2013). Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil. *Microbiological Research*, 168(4), 223–230.

Boubetra, D., Zitouni, A., Bouras, N., Mathieu, F., Lebrihi, A., Schumann, P., Sabaou, N. (2013). *Saccharothrix saharensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Algerian Saharan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART10), 3744–3749.

Boubetra, D., Zitouni, A., Bouras, N., Schumann, P., Spröer, C., Klenk, H., & Sabaou, N. (2015). *Saccharothrix tamanrassetensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 1316–1320.

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*. Mémoire de magistère en microbiologie. E.N.S de Kouba.

Bouras, N. (2005). *Régulation De La Production D'Antibiotiques Dithiopyrrolones Chez Saccharothrix algeriensis NRRL B-24137*. Thèse de doctorat de l'INP-Toulouse, Université de Toulouse, France.

Bouras, N., Mathieu, F., Sabaou, N., & Lebrihi, A. (2006). Nutritional requirements for the production of dithiopyrrolone antibiotics by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(7), 1423–1429.

Bouras, N., Mathieu, F., Sabaou, N., & Lebrihi, A. (2007). Influence on dithiopyrrolone antibiotic production by organic acids in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochemistry*, 42(6), 925–933.

## Références bibliographiques

- 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*(11), 1244–1252.
- Bouznada, A. K., Bouras, N., Mokrane, S., & Chaabane, F. (2016). *Saccharothrix isguenensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from desert soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *66*(11), 4785–4790.
- Bouznada, K., Bouras, N., Mokrane, S., Chaabane Chaouch, F., Zitouni, A., Pöter, G., Sabaou, N. (2017). *Saccharothrix ghardaiensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, *110*(3), 399–405.
- Bowles, L. K., & Ellefson, W. L. (1985). Effects of butanol on *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, *50*(5), 1165–1170.
- Busalmen, J. P., & de Sánchez, S. R. (2005). Electrochemical Polarization-Induced Changes in the Growth of Individual Cells and Biofilms of *Pseudomonas fluorescens* Electrochemical Polarization-Induced Changes in the Growth of Individual Cells and Biofilms of *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(Atcc 17552), 6235–6240.
- Bush, B. D., Fitch, G. V., Gates, D. A., & Iadex-hccharothrix, K. W. (1993). Carbocyclic nucleosides from a species of *saccharothrix*. *Phytochemistry*, *32*(3), 137–139.
- Butler, A. R., & Cundliffe, E. (2001). Influence of dimethylsulfoxide on tylosin production in *Streptomyces fradiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *27*(1), 46–51.
- Cang, S., Sanada, M., Johdo, O., Ohta, S., Nagamatsu, Y., & Yoshimoto, A. (2000). High production of prodigiosin by *Serratia marcescens* grown on ethanol. *Biotechnology Letters*, *22*(22), 1761–1765.
- Campbell, J., Lin, Q., Geske, G. D., & Blackwell, H. E. (2009). New and unexpected insights into the modulation of LuxR-type quorum sensing by cyclic dipeptides. *ACS Chemical Biology*, *4* (12), 1051–1059.
- Celmer, W. D., & Solomons, I. A. (1955). The Structures of Thiolutin and Aureothricin, Antibiotics Containing a Unique Pyrrolinodithiole Nucleus. *Journal of the American Chemical Society*, *77*(10), 2861–2865.

## Références bibliographiques

Chan, A. N., Shiver, A. L., Wever, W. J., Razvi, S. Z. A., Traxler, M. F., & Li, B. (2017). Role for dithiolopyrrolones in disrupting bacterial metal homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(10), 2717–2722.

Chang, I. S., Moon, H., Jang, J. K., & Kim, B. H. (2005). Improvement of a microbial fuel cell performance as a BOD sensor using respiratory inhibitors. *Biosensors and Bioelectronics*, *20*(9), 1856–1859.

Chatterjee, I., Somerville, G. A., Heilmann, C., Sahl, H. G., Maurer, H. H., & Herrmann, M. (2006). Very low ethanol concentrations affect the viability and growth recovery in post-stationary-phase *Staphylococcus aureus* populations. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(4), 2627–2636.

Chen, S., Jing, X., Tang, J., Fang, Y., & Zhou, S. (2017). Quorum sensing signals enhance the electrochemical activity and energy recovery of mixed-culture electroactive biofilms. *Biosensors and Bioelectronics*, *97*(3), 369–376.

Chen, G., Wang, G.-Y.-S., Li, X., Watres, B., & Davies, J. (2000). Enhanced Production of Microbial Metabolites in the Presence of Dimethyl Sulfoxide. *The Journal of Antibiotics*, *53*(10), 1145–1153.

Chen, J., & Xie, J. (2011). Role and regulation of bacterial LuxR-like regulators. *Journal of Cellular Biochemistry*, *112*(10), 2694–2702.

Chhabra, S. R., Harty, C., Hooi, D. S. W., Daykin, M., Williams, P., Telford, G., Bycroft, B. W. (2003). Synthetic analogues of the bacterial signal (quorum sensing) molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone as immune modulators. *Journal of Medicinal Chemistry*, *46*(1), 97–104.

Choi, S.-U., Lee, C.-K., Hwang, Y.-I., Kinoshita, H., & Nihira, T. (2004). Cloning and Functional Analysis by Gene Disruption of a Gene Encoding a  $\gamma$ -Butyrolactone Autoregulator Receptor from *Kitasatospora setae*. *Journal of Bacteriology*, *186*(11), 3423–3430.

Choi, S. U., Lee, C. K., Hwang, Y. Il, Kinoshita, H., & Nihira, T. (2003).  $\gamma$ -Butyrolactone autoregulators and receptor proteins in non-*Streptomyces* actinomycetes producing commercially important secondary metabolites. *Archives of Microbiology*, *180*(4), 303–307.

## Références bibliographiques

Chorin, A. (2009). *Synthèse enzymatique de nouveaux dérivés dithiopyrrolones par Saccharothrix algeriensis*, Thèse de doctorat de l'INP-Toulouse, Université de Toulouse, France.

Compant, S., Muzammil, S., Lebrhi, A., & Mathieu, F. (2013). Visualization of grapevine root colonization by the Saharan soil isolate *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 using DOPE-FISH microscopy. *Plant and Soil*, 370(1–2), 583–591.

Cournet, A., Délia, M. L., Bergel, A., Roques, C., & Bergé, M. (2010). Electrochemical reduction of oxygen catalyzed by a wide range of bacteria including Gram-positive. *Electrochemistry Communications*, 12(4), 505–508.

Cundliffe, E. (2008). Control of tylosin biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(4), 1485-1491.

Czajkowski, R., & Jafra, S. (2009). Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. *Acta Biochimica Polonica*, 56(1), 1-16.

D'Autréaux, B., & Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 813–824.

De Keersmaecker, S. C. J., Sonck, K., & Vanderleyden, J. (2006). Let LuxS speak up in AI-2 signaling. *Trends in Microbiology*, 14(3), 114–119.

Dell, I., Godfrey, C. R. A., & Wadsworth, D. J. (1992). Total Synthesis of Naturally Occurring 1,2-Dithiolo[4,3- b ]pyrrolones and Related Compounds. In *ACS Symposium Series* (pp. 384–394).

Doull, J. L., Singh, A. K., Hoare, M., & Ayer, S. W. (1994). Conditions for the production of jadomycin B by *Streptomyces venezuelae* ISP5230: Effects of heat shock, ethanol treatment and phage infection. *Journal of Industrial Microbiology*, 13(2), 120–125.

Dumas, C., Basseguy, R., & Bergel, A. (2008). Microbial electrocatalysis with *Geobacter sulfurreducens* biofilm on stainless steel cathodes. *Electrochimica Acta*, 53(5), 2494–2500.

Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Nealon, K. H., & Oppenheimer, N. J. (1981). Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri*. *Biochemistry*, 20(9), 2444–24449.

## Références bibliographiques

Engebrecht, J., And, T., & Silverman, M. (1984). Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence (lux genes/recombinant DNA/complementation/minicells). *Genetics*, *81*, 4154–4158.

Federle, M. J. (2009). Autoinducer-2-based chemical communication in bacteria: Complexities of interspecies signaling. *Contributions to Microbiology*, *16*, 18–32.

Fuqua, W. C., & Winans, S. C. (1994). A LuxR-LuxI type regulatory system activates Agrobacterium Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *Journal of Bacteriology*, *176*(10), 2796–2806.

Furumai, T., Takeda, K., & Okanishi, M. (1982). Function of plasmids in the production of aureothricin .1. Elimination of plasmids and alteration of phenotypes caused by protoplast regeneration in *Streptomyces kasugaensis*. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, *35*, 1367–1373.

Gao, S. S., Wang, L., Song, Z., Hothersall, J., Stevens, E. R., Connolly, J., Willis, C. L. (2017). Selected Mutations Reveal New Intermediates in the Biosynthesis of Mupirocin and the Thiomarinol Antibiotics. *Angewandte Chemie - International Edition*, *56*(14), 3930–3934.

Genilloud, O. (2017). Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. *Natural Product Reports*, *34*, 1203-1232.

Gildemyn, S., Verbeeck, K., Slabbinck, R., Andersen, S. J., PrévotEAU, A., & Rabaey, K. (2015). Integrated production, extraction, and concentration of acetic acid from CO<sub>2</sub> through microbial electrosynthesis. *Environmental Science and Technology Letters*, *2*(11), 325–328.

Gopalkrishnan, K. S., & Jump, J. A. (1952). The antibiotic activity of thiolutin in the chemotherapy of the Fusarium wilt of tomato. *Phytopathology*, *42*, 338–340.

Gorby, Y. A., Yanina, S., McLean, J. S., Rosso, K. M., Moyles, D., Dohnalkova, A., Fredrickson, J. K. (2006). Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(30), 11358–11363.

Gottelt, M., Hesketh, A., Bunet, R., Puri, P., & Takano, E. (2012). Characterisation of a natural variant of the  $\gamma$ -butyrolactone signalling receptor. *BMC Research Notes*, *5*, 1–17.

## Références bibliographiques

Gregory, K. B., Bond, D. R., & Lovley, D. R. (2004). Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration. *Environmental Microbiology*, 6(6), 596–604.

Gregory, K. B., & Lovley, D. R. (2005). Remediation and recovery of uranium from contaminated subsurface environments with electrodes. *Environmental Science and Technology*, 39(22), 8943–8947.

Grosso, J. J. (1954). Control of tobacco blue mold by antibiotics. *Plant Disease Reporter*, 38, 333–334.

Grund, E., & Kroppenstedt, R. M. (1989). Transfer of Five *Nocardioopsis* Species to the Genus *Saccharothrix* Labeda et al. 1984. *Systematic and Applied Microbiology*, 12(3), 267–274.

Guo, Q., Wu, Q., Bai, D., Liu, Y., Chen, L., Jin, S., Duan, K. (2016). Potential use of dimethyl sulfoxide in treatment of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(12), 7159–7169.

Hamdar, A., El Hage, S., El Garah, F., Baziard, G., Roques, C., Lajoie, B. (2019). Yield enhancement strategy of dithiopyrrolone from *Saccharothrix algeriensis* by aliphatic alcohols supplementation. *Process Biochemistry*, 77(2), 18-22.

Hamedi, J., Carmen Montero-Calasanz, M. del, Spröer, C., Mohammadipanah, F., Klenk, H.-P., & Schumann, P. (2015). *Saccharothrix ecbatanensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(12), 4544–4549.

Hastings, J. W., & Mitchell, G. (1971). Endosymbiotic bioluminescent bacteria from the light organ of pony fish. *Biology Bulletin*, 141, 261-268.

Heipieper, H. J., Neumann, G., Cornelissen, S., & Meinhardt, F. (2007). Solvent-tolerant bacteria for biotransformations in two-phase fermentation systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(5), 961–973.

Hjelmgaard, T., & Nielsen, J. (2007). Expedient total synthesis of pyrrothine natural products and analogs, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 5, 344–348.

## Références bibliographiques

Hooshangi, S., & Bentley, W. E. (2008). From unicellular properties to multicellular behavior: bacteria quorum sensing circuitry and applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(6), 550-555.

Horinouchi, S., & Beppu, T. (1993). A-factor and streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64(2), 177–186.

Hozzein, W. N., Li, W. J., Ali, M. I. A., Hammouda, O., Mousa, A. S., Xu, L. H., & Jiang, C. L. (2004). *Nocardiopsis alkaliphila* sp. nov., a novel alkaliphilic actinomycete isolated from desert soil in Egypt. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(1), 247–252.

Hu, F., Huang, J., Xu, Y., Qian, X., & Zhong, J.-J. (2006). Responses of defense signals, biosynthetic gene transcription and taxoid biosynthesis to elicitation by a novel synthetic jasmonate in cell cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(6), 1064–1071.

Hu, Y. T., Zou, P. J., Zhou, Y. G., Liu, Z. H., & Liu, S. J. (2004). *Saccharothrix xinjiangensis* sp. nov., a pyrene-degrading actinomycete isolated from Tianchi Lake, Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), 2091–2094.

Huang, S., Tong Him, M., Qin, Z., Deng, Z., Deng, H., & Yu, Y. (2015). Identification and characterization of the biosynthetic gene cluster of thiolutin. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 15, 277–284.

Huang, S., Zhao, Y., Qin, Z., Wang, X., Onega, M., Chen, L., Deng, H. (2011). Identification and heterologous expression of the biosynthetic gene cluster for holomycin produced by *Streptomyces clavuligerus*. *Process Biochemistry*, 46(3), 811–816.

Ingram, L. O. (1986). Microbial tolerance to alcohols: role of the cell membrane. *Trends in Biotechnology*, 4(2), 40–44.

Isaacson, P. J., & Webster, J. (2000). Antimicrobial activity of *Xenorhabdus* sp. (Enterobacteriaceae), symbiont of the entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* (Rhabditida: Steniermatidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 79(2002), 146–153.

Kaplan, H. B., & Greenberg, E. P. (1985). Diffusion of Autoinducer Is Involved in Regulation of the *Vibrio fischeri* Luminescence System. *Journal of Bacteriology*, 163(3), 1210–1214.

## Références bibliographiques

Kato, J. -y., Funa, N., Watanabe, H., Ohnishi, Y., & Horinouchi, S. (2007). Biosynthesis of  $\gamma$ -butyrolactone autoregulators that switch on secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(7), 2378–2383.

Kaufmann, G. F., Sartorio, R., Lee, S.-H., Rogers, C. J., Meijler, M. M., Moss, J. A., Janda, K. D. (2005). Revisiting quorum sensing: Discovery of additional chemical and biological functions for 3-oxo-N-acylhomoserine lactones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(2), 309–314.

Kawai, K., Wang, G., Okamoto, S., & Ochi, K. (2007). The rare earth, scandium, causes antibiotic overproduction in *Streptomyces* spp. *FEMS Microbiology Letters*, *274*(2), 311–315.

Kempner, E. S., & Hanson, F. E. (1968). Aspects of light production by *Photobacterium fischeri*. *Journal of Bacteriology*, *95*(3), 975–979.

Kendall, M. M., & Sperandio, V. (2007). Quorum sensing by enteric pathogens. *Current Opinion in Gastroenterology*, *23*(1), 10–5.

Kim, B. Y., Brown, R., Labeda, D. P., & Goodfellow, M. (2011). Reclassification of “*Dactylosporangium variesporum*” as *Saccharothrix variisporea* corrig. (ex Tomita et al. 1977) sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *61*(2), 310–314.

Kim, N., Choi, Y., Jung, S., & Kim, S. (2000). Effect of initial carbon sources on the performance of microbial fuel cells containing *Proteus vulgaris*. *Biotechnology and Bioengineering*, *70*(1), 109–114.

Kinoshita, K. (1992). *Electrochemical Oxygen Technology*. Wiley-Interscience, Edition, *Analytica Chimica Acta*. New-York.

Labeda, D. P., Hatano, K., Kroppenstedt, R. M., & Tamura, T. (2001). Revival of the genus *Lentzea* and proposal for *Lechevalieria* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *51*(3), 1045–1050.

Labeda, D. P., & Kroppenstedt, R. M. (2000). Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa: proposal for *Actinosynnemataceae* fam. no . *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *50*(172), 331–336.

## Références bibliographiques

- Labeda, D. P., & Lechevalier, M. P. (1989). Amendment of the Genus *Saccharothrix* Labeda et al. 1984 and Descriptions of *Saccharothrix espanaensis* sp. nov., *Saccharothrix cryophilis* sp. nov., and *Saccharothrix mutabilis* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(4), 420–423.
- Labeda, D., & Testa, R. (1984). *Saccharothrix*: a new genus of the Actinomycetales related to *Nocardiosis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34(4), 426–431.
- Lamari, L. (2006). *Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat. E.N.S de Kouba (Algérie).
- Lamari, L., Zitouni, A., Dob, T., Sabaou, N., Lebrihi, A., Germain, P., Tillequin, F. (2002). New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. II. Physicochemical properties and structure elucidation. *The Journal of Antibiotics*, 55(8), 702–6.
- Lasarre, B., & Federle, M. J. (2013). Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 73–111.
- Li, B., Lyle, M. P. A., Chen, G., Li, J., Hu, K., Tang, L., Webster, J. (2007). Substituted 6-amino-4H-[1,2]dithiolo[4,3-b]pyrrol-5-ones: synthesis, structure-activity relationships, and cytotoxic activity on selected human cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(13), 4601–8.
- Li, B. & Walsh, C. T. (2011). *Streptomyces clavuligerus* HlmI Is an Intramolecular Disulfide-Forming Dithiol Oxidase in Holomycin Biosynthesis. *Biochemistry (Mosc)*, 50, 4615–4622.
- Li, B., Wever, W. J., Walsh, C. T., & Bowers, A. a. (2014). Dithiolopyrrolones: biosynthesis, synthesis, and activity of a unique class of disulfide-containing antibiotics. *Natural Product Reports*, 31, 905–923.
- Li, Y. Q., Liu, L., Cheng, C., Shi, X. H., Lu, C. Y., Dong, Z. Y., Li, W. J. (2015). *Saccharothrix lopnurensis* sp. nov., a filamentous actinomycete isolated from sediment of Lop Nur. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 108(4), 975–981.
- Li, Y., & Trush, M. A. (1998). Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253(2), 295–9.

## Références bibliographiques

Liszky, A., Kenk, B., & Schopfer, P. (2003). Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta*, *217*(4), 658–667.

Liszky, A., Zalm, E. Van Der, & Schopfer, P. (2004). Production of Reactive Oxygen Intermediates (  $O_2^-$  ,  $H_2O_2$  , and OH ) by Maize Roots and Their Role in Wall Loosening and Elongation Growth. *Plant Physiology*, *136*(October), 3114–3123.

Liu, C., Guan, X., Wang, S., Zhao, J., Wang, H., He, H., Wang, X. (2014). *Saccharothrix carnea* sp. nov., an actinobacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *64*(Pt 12), 4033–4037.

Liu, S., & Qureshi, N. (2009). How microbes tolerate ethanol and butanol. *New Biotechnology*, *26*(3–4), 117–121.

Lowery, C. A., Dickerson, T. J., & Janda, K. D. (2008). Interspecies and interkingdom communication mediated by bacterial quorum sensing. *Chemical Society Reviews*, *37*(7), 1337–46.

Lushchak, V. I. (2011). Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *153*(2), 175–190.

Luti, K. J. K., & Mavituna, F. (2011). Elicitation of *Streptomyces coelicolor* with dead cells of *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* in a bioreactor increases production of undecylprodigiosin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *90*(2), 461–466.

Lwin, S. M., Kimber, I., & McFadden, J. P. (2014). Acne, quorum sensing and danger. *Clinical and Experimental Dermatology*, *39*(2), 162–167.

Lyon, G. J., Wright, J. S., Muir, T. W., & Novick, R. P. (2002). Key determinants of receptor activation in the agr autoinducing peptides of *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*, *41*(31), 10095–10104.

Marmann, A., Aly, A. H., Lin, W., Wang, B., & Proksch, P. (2014). Co-cultivation - A powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. *Marine Drugs*, *12*(2), 1043–1065.

## Références bibliographiques

- Martin Embley, T., Samida, J., & Stackebrandt, E. (1988). Reverse Transcriptase Sequencing of 16s Ribosomal RNA from *Faenia rectivirgula*, *Pseudonocardia themtophila* and *Saccharopolysporu hivsuta*, Three Wall Type IV Actinomycetes Which Lack Mycolic Acids. *Journal of General Microbiology*, *134*, 961–966.
- McClellan, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Williams, P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum* : exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones. *Microbiology*, *143*(1 997), 3703–3711.
- Meklat, A. (2004). *Effet des antibiotiques de deux souches d'actinomycètes sur la maladie tache chocolat et l'anthraxose de la fève et sur la fusariose vasculaire du lin*. E.N.S de Kouba.
- 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*(6), 1164–1166.
- Merrouche, R., Bouras, N., Coppel, Y., Mathieu, F., Sabaou, N., & Lebrihi, A. (2011). New dithiopyrrolone antibiotics induced by adding sorbic acid to the culture medium of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *FEMS Microbiology Letters*, *318*(1), 41–46.
- Merrouche, R., Yekkour, A., Lamari, L., Zitouni, A., Mathieu, F., & Sabaou, N. (2017). Efficiency of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 and Its Produced Antifungal Dithiopyrrolones Compounds to Suppress *Fusarium oxysporum*-Induced Wilt Disease Occurring in Some Cultivated Crops. *Arabian Journal for Science and Engineering*, *42*(6), 2321-2327.
- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, *55*(1), 165–199.
- 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. *International Journal of Cancer*, *93*(3), 307–316.
- Mishra, S., & Imlay, J. (2012). Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *525*, 145–160.
- Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, *22*(1), 11–19.

## Références bibliographiques

Møller, I. M., & Sweetlove, L. J. (2010). ROS signalling - specificity is required. *Trends in Plant Science*, 15(7), 370–374.

Moody, S. C. (2014). Microbial co-culture: Harnessing intermicrobial signaling for the production of novel antimicrobials. *Future Microbiology*, 9(5), 575–578.

Müller, R., & Wink, J. (2014). Future potential for anti-infectives from bacteria - How to exploit biodiversity and genomic potential. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(1), 3–13.

Murphy, A. C., Fukuda, D., Song, Z., Hothersall, J., Cox, R. J., Willis, C. L., Simpson, T. J. (2011). Engineered thiomarinol antibiotics active against MRSA are generated by mutagenesis and mutasynthesis of pseudoalteromonas SANK73390. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50(14), 3271–3274.

Murphy, T. M., Nilsson, A. Y., Roy, I., Harrop, A., Dixon, K., & Keshavarz, T. (2011). Enhanced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* after addition of oligosaccharide elicitors. *Biotechnology Letters*, 33(5), 985–991.

Muzammil, S. (2012). *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137: biocontrol properties, colonization and induced systemic resistance towards *Botrytis cinerea* on grapevine and *Arabidopsis thaliana*. Thèse de doctorat, Université de Toulouse, France.

Muzammil, S., Graillon, C., Saria, R., Mathieu, F., Lebrihi, A., & Compant, S. (2014). The Saharan isolate *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* seedlings against *Botrytis cinerea*. *Plant and Soil*, 374(1–2), 423–434.

National Center for Biotechnology Information (NCBI) - Taxonomy. [En ligne] : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy> (consulté le 18 septembre 2018).

Nealson, K. H., Platt, T., & Woodland Hastings, J. (1970). Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System1. *Journal of Bacteriology*, 313–322.

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79, 629-661.

Nickell, L. G., & Finlay, A. C. (1954). Growth modifiers, Antibiotics and Their Effects on Plant Growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2(4), 178–182.

## Références bibliographiques

- Nutzmann, H.-W., Reyes-Dominguez, Y., Scherlach, K., Schroeckh, V., Horn, F., Gacek, A., Brakhage, A. A. (2011). Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(34), 14282–14287.
- Ochi, K., & Hosaka, T. (2013). New strategies for drug discovery: Activation of silent or weakly expressed microbial gene clusters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(1), 87–98.
- Ochi, K., Tanaka, Y., & Tojo, S. (2014). Activating the expression of bacterial cryptic genes by rpoB mutations in RNA polymerase or by rare earth elements. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *41*(2), 403–414.
- Okada, B. K., & Seyedsayamdost, M. R. (2017). Antibiotic dialogues: Induction of silent biosynthetic gene clusters by exogenous small molecules. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*, 19–33.
- Okamura, K., Soga, K., Shimauchi, Y., Ishikura, T., & Lein, J. (1977). Holomycin and N-propionylholothin, antibiotics produced by a cephamycin C producer. *The Journal of Antibiotics*, *30*(4), 334–336.
- Ola, A. R. B., Thomy, D., Lai, D., Brötz-Oesterhelt, H., & Proksch, P. (2013). Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* through coculture with *Bacillus subtilis*. *Journal of Natural Products*, *76*(11), 2094–2099.
- Onaka, H., Mori, Y., Igarashi, Y., & Furumai, T. (2011). Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(2), 400–406.
- Otoguro, M., Tamura, T., Suzuki, K., & Hayakawa, M. (2009). *Saccharothrix violaceirubra* sp nov., isolated from soil and plant litter. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *59*(2009), 1504–1507.
- Pandit, A. V., & Mahadevan, R. (2011). In silico characterization of microbial electrosynthesis for metabolic engineering of biochemicals. *Microbial Cell Factories*, *10*, 1–14.

## Références bibliographiques

Park, D. H., & Zeikus, J. G. (2000). Electricity Generation in Microbial Fuel Cells Using Neutral Red as an Electronophore Electricity Generation in Microbial Fuel Cells Using Neutral Red as an Electronophore, *Applied and environmental microbiology*, 66(4), 1292–1297.

Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., Brana, A. F., Shimkets, L. J., Sevillano, L., & Santamaría, R. I. (2011). Myxococcus xanthus induces actinorhodin overproduction and aerial mycelium formation by Streptomyces coelicolor. *Microbial Biotechnology*, 4(2), 175–183.

Pesci, E. C., Milbank, J. B. J., Pearson, J. P., Mcknight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P., & Iglewski, B. H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of Pseudomonas aeruginosa. *Biochemistry*, 96, 11229–11234.

Pettit, R. K. (2011). Small-molecule elicitation of microbial secondary metabolites. *Microbial Biotechnology*, 4(4), 471–478.

Prajapat, M. K., & Saini, S. (2018). Logic of two antagonizing intra-species quorum sensing systems in bacteria. *BioSystems*, 165(2), 88–98.

Qin, Z., Huang, S., Yu, Y., & Deng, H. (2013). Dithiopyrrolone natural products: Isolation, synthesis and biosynthesis. *Marine Drugs*, 11(10), 3970–3997.

Qing Guo, Y., Hong Dong, D., Chun Fan, M., Bing Lin, Y., Hong Wei, G., & Hui Di, X. (2016). Saccharothrix stipae sp. nov., an actinomycete isolated from the rhizosphere of Stipa grandis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(2), 1017–1021.

Rabaey, K., Van De Sompel, K., Maignien, L., Boon, N., Aelterman, P., Clauwaert, P., Verstraete, W. (2006). Microbial fuel cells for sulfide removal. *Environmental Science and Technology*, 40(17), 5218–5224.

Rabaey, K., & Verstraete, W. (2005). Microbial fuel cells: Novel biotechnology for energy generation. *Trends in Biotechnology*, 23(6), 291–298.

Radman, R., Bland, E. J., Sangworachat, N., Bucke, C., & Keshavarz, T. (2006). Effects of oligosaccharides and polysaccharides on the generation of reactive oxygen species in different biological systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 44(Pt 3), 129–133.

## Références bibliographiques

Radman, R., Saez, T., Bucke, C., & Keshavarz, T. (2003). Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37(1), 91-102.

Ramaswamy, N., & Mukerjee, S. (2012). Fundamental mechanistic understanding of electrocatalysis of oxygen reduction on Pt and non-Pt surfaces: Acid versus alkaline media. *Advances in Physical Chemistry*, 2012, 1-17.

Recio, E., Colinas, Á., Rumbero, Á., Aparicio, J. F., & Martín, J. F. (2004). PI factor, a novel type quorum-sensing inducer elicits pimaricin production in *Streptomyces natalensis*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 41586-41593.

Roy, V., Adams, B. L., & Bentley, W. E. (2011). Developing next generation antimicrobials by intercepting AI-2 mediated quorum sensing. *Enzyme and Microbial Technology*, 49(2), 113-123.

Rutherford, B. J., Dahl, R. H., Price, R. E., Szmidt, H. L., Benke, P. I., Mukhopadhyay, A., & Keasling, J. D. (2010). Functional genomic study of exogenous n-butanol stress in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(6), 1935–1945.

Rutledge, P. J., & Challis, G. L. (2015). Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nature Reviews Microbiology*, 13(8), 509-523.

Sabaou, N., Boudjella, H., Bennadji, A., Mostefaoui, A., Zitouni, A., Lamari, L., & Bennadj, H. (1998). les sols des oasis du sahara algerien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*, 9(2), 147–153.

Saker, S. (2013). *Etude de la voie de biosynthèse des dithiopyrrolones chez Saccharothrix algeriensis NRRL B-24137: approche génétique et enzymologique*. Thèse de doctorat de l'Université de Toulouse, France.

Saker, S., Lebrihi, A., & Mathieu, F. (2014). Identification of two putative acyltransferase genes potentially implicated in dithiopyrrolone biosyntheses in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(3), 787–802.

Santoro, C., Arbizzani, C., Erable, B., & Ieropoulos, I. (2017). Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. A review. *Journal of Power Sources*, 356, 225–244.

## Références bibliographiques

Santos, C. L., Correia-Neves, M., Moradas-Ferreira, P., & Mendes, M. V. (2012). A Walk into the LuxR Regulators of Actinobacteria: Phylogenomic Distribution and Functional Diversity. *PLOS ONE*, 7(10), 1-15.

Schippers, A., Bosecker, K., Willscher, S., & Spro, C. (2002). *Nocardiopsis metallicus* sp. nov., a metal-leaching actinomycete isolated from an. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, (2002), 2291–2295.

Segura, A., Molina, L., Fillet, S., Krell, T., Bernal, P., Muñoz-Rojas, J., & Ramos, J. L. (2012). Solvent tolerance in Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(3), 415–421.

Shiner, E. K., Rumbaugh, K. P., & Williams, S. C. (2005). Interkingdom signaling: Deciphering the language of acyl homoserine lactones. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(5), 935–947.

Shiozawa, H., Kagasaki, T., Kinoshita, T., Haruyama, H., Domon, H., Utsui, Y., Takahashi, S. (1993). Thiomarinol, a new hybrid antimicrobial antibiotic produced by a marine bacterium. Fermentation, isolation, structure, and antimicrobial activity. *The Journal of Antibiotics*, 46(12), 1834–42.

Shirling, E. B., & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), 313–340.

Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfennig, N., & Holt, J. G. (1989). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. (Williams and Wilkins Co., Ed.) (Vol. 4). Baltimore.

Strub, C., Brandam, C., Meyer, X., & Lebrihi, A. (2008). Investigations of *Saccharothrix algeriensis* growth on synthetic media. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(2), 148–153.

Strub, C., Brandam, C., Meyer, X. M., & Lebrihi, A. (2010). A stoichiometric reaction scheme for *Saccharothrix algeriensis* growth and thiolutin production. *Process Biochemistry*, 45(11), 1808–1815.

Strycharz, S. M., Woodard, T. L., Johnson, J. P., Nevin, K. P., Sanford, R. A., Löffler, F. E., & Lovley, D. R. (2008). Graphite electrode as a sole electron donor for reductive dechlorination of tetrachlorethene by *Geobacter lovleyi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19), 5943–5947.

## Références bibliographiques

Sturme, M. H. J., Kleerebezem, M., Nakayama, J., Akkermans, A. D. L., Vaughan, E. E., & De Vos, W. M. (2002). Cell to cell communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, *81*, 233–243.

Sun, Z., He, X., Brancaccio, V. F., Yuan, J., & Riedel, C. U. (2014). Bifidobacteria exhibit LuxS-dependent autoinducer 2 activity and biofilm formation. *PLOS ONE*, *9*(2), 1-8.

Takahashi, A., Hotta, K., Saito, N., Morioka, M., Okami, Y., & Umezawa, H. (1986). Production of novel antibiotic, dopsisamine, by a new subspecies of *Nocardiosis mutabilis* with multiple antibiotic resistance. *Journal of Antibiotics*, *9*(2), 175–183.

Takano, E. (2006).  $\gamma$ -Butyrolactones: Streptomyces signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Current Opinion in Microbiology*, *9*(3), 287–294.

Takano, E., Chakraborty, R., Nihira, T., Yamada, Y., & Bibb, M. J. (2001). A complex role for the  $\gamma$ -butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology*, *41*(5), 1015–28.

Takeuchi, M., Takahashi, S., Enokita, R., Sakaida, Y., Haruyama, H., Nakamura, T., Inukai, M. (1992). Galacardins A and B, new glycopeptide antibiotics. *Journal of Antibiotics*, *45*(3), 297–306.

Tan, G. Y., Bai, L., & Zhong, J. J. (2013). Exogenous 1,4-butyrolactone stimulates a-factor-like cascade and validamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus* 5008. *Biotechnology and Bioengineering*, *110*(11), 2984-2994.

Tanaka, Y., Hosaka, T., & Ochi, K. (2010). Rare earth elements activate the secondary metabolite-biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Antibiotics*, *63*(8), 477–481.

Tomas, C., Beamish, J., Eleftherios, T., & Papoutsakis, E. T. (2004). Transcriptional Analysis of Butanol Stress and Tolerance in *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology*, *186*(7), 2006–2018.

Touati, D. (2000). Iron and oxidative stress in bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *373*(1), 1–6.

## Références bibliographiques

- Tsurumi, Y., Ueda, H., Hayashi, K., & Takase, S. (1995). WS75624A and B, New Endothelin Converting Enzyme Inhibitors from *Saccharothrix* sp. No. 75624 Isolated I . Taxonomy, Fermentation, Isolation, Physico-chemical Properties and Biological Activities. *The Journal of Antibiotics*, (10214), 1066–1072.
- Uroz, Stéphane et al. 2005. “N-Acylhomoserine Lactone Quorum-Sensing Molecules Are Modified and Degraded by *Rhodococcus Erythropolis* W2 by Both Amidolytic and Novel Oxidoreductase Activities.” *Microbiology*, 151(10), 3313-3322.
- Vassilev, I., Hernandez, P. A., Batlle-Vilanova, P., Freguia, S., Krömer, J. O., Keller, J., Viridis, B. (2018). Microbial Electrosynthesis of Isobutyric, Butyric, Caproic Acids, and Corresponding Alcohols from Carbon Dioxide. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6(7), 8485–8493.
- Wang, G., Hosaka, T., & Ochi, K. (2008). Dramatic activation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by cumulative drug resistance mutations. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(9), 2834–2840.
- Wang, Y., Qian, Y., & Liu, Z. (1999). "Two new species of *Lentzea*: *Lentzea flavoverrucosus* sp. nov. and *Lentzea flavoverrucoides* sp. nov." Unpublished, cité dans <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser> (consulté le 18 septembre, 2018).
- Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), 319–346.
- Webster, J., Li, J., & Chen, G. (2000). Anticancer property of dithiopyrrolones. United States Patent.
- Wietz, M., Mansson, M., Gotfredsen, C. H., Larsen, T. O., & Gram, L. (2010). Antibacterial compounds from marine *Vibrionaceae* isolated on a global expedition. *Marine Drugs*, 8(12), 2946–2960.
- Willey, J. M., & Gaskell, A. A. (2011). Morphogenetic Signaling Molecules of the Streptomycetes, *Chemical reviews*, 111(1), 174–187.
- 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.

## Références bibliographiques

- Winzer, K., Hardie, K. R., & Williams, P. (2002). Bacterial cell-to-cell communication: Sorry, can't talk now - Gone to lunch! *Current Opinion in Microbiology*, 5(2), 216–222.
- Xavier, K. B., & Bassler, B. L. (2003). LuxS quorum sensing: More than just a numbers game. *Current Opinion in Microbiology*, 6(2), 191-197.
- Xavier, K. B., & Bassler, B. L. (2005). Interference with AI-2-mediated bacterial cell–cell communication. *Nature*, 437.(7059), 750–3.
- Yan, X., Huang, L. L., Tu, X., Gao, X. N., & Kang, Z. S. (2012). *Saccharothrix yanglingensis* sp. nov., an antagonistic endophytic actinomycete isolated from cucumber plant. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 101(1), 141–146.
- Yang, Y. H., Kim, T. W., Park, S. H., Lee, K., Park, H. Y., Song, E., Kim, B. G. (2009). Cell-free *Escherichia coli*-based system to screen for quorum-sensing molecules interacting with quorum receptor proteins of *Streptomyces coelicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19), 6367–6372.
- Yassin, A. F., Rainey, F. A., Brzezinka, H., Jahnke, K. D., Weissbrodt, H., Budzikiewicz, H., Schaal, K. P. (1995). *Lentzea* gen. nov., a new genus of the order Actinomycetales. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(2), 357–363.
- Zentmyer, G. A. (1955). A Laboratory Method for Testing Soil Fungicides, with *Phytophthora Cinnamomi* as Test Organism. *Phytopathology*, 61(1), 186-189.
- Zhai, Y., Bai, S., Liu, J., Yang, L., Han, L., Huang, X., & He, J. (2016). Identification of an unusual type II thioesterase in the dithiopyrrolone antibiotics biosynthetic pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 473(1), 329–335.
- Zhou, W. W., Ma, B., Tang, Y. J., Zhong, J. J., & Zheng, X. (2012). Enhancement of validamycin A production by addition of ethanol in fermentation of *Streptomyces hygrosopicus* 5008. *Bioresource Technology*, 114, 616–621.
- Zhu, H., Sandiford, S. K., & Van Wezel, G. P. (2014). Triggers and cues that activate antibiotic production by actinomycetes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(2), 371–386.

## Références bibliographiques

Zitouni, A. (1995). *Les genres Nocardiopsis et Saccharothrix (Actinomycetales) dans les sols sahariens: taxonomie numérique; extraction; purification et caractérisation de quelques antibiotiques synthétisés*. Mémoire de magistère en microbiologie. E.N.S. de Kouba (Algérie).

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

Zitouni, A., Boudjella, H., Mathieu, F., Sabaou, N., & Lebrihi, A. (2004 a). Mutactimycin PR, a New Anthracycline Antibiotic from Saccharothrix sp. SA 103. *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 57(6), 367-372.

Zitouni, A., Lamari, L., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Gaouar, A., Labeda, D. P. (2004 b). Saccharothrix algeriensis sp. nov., isolated from Saharan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), 1377–1381.

## Communications et publications scientifiques réalisées

Lajoie B., **Hamdar A.**, Baziard G., Roques C., Mathieu F., Bergel A., (2015). Procédé innovant de production microbienne, de métabolites secondaires d'intérêt, 7ème colloque du Réseau National Biofilm, Toulouse, France. 02-03 décembre. (Poster).

**Hamdar, A.**, El Hage, S., El Garah, F., Baziard, G., Roques, C., Lajoie, B. (2017). Toward the microbial production of new antibiotics from *Saccharothrix algeriensis*. 53<sup>èmes</sup> Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique (RICT). Toulouse, France. 5-7 Juillet. (Poster).

**Hamdar, A.** (2017). Une nouvelle approche pour la production des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*. 8<sup>ème</sup> Colloque du Réseau National de Biofilm (RNB). Clermont-Ferrand, France. 5-6 Décembre. (Communication orale).

**Hamdar, A.**, El Hage, S., El Garah, F., Baziard, G., Roques, C., Lajoie, B. (2019). Yield enhancement strategy of dithiopyrrolone from *Saccharothrix algeriensis* by aliphatic alcohols supplementation. *Process Biochemistry*, 77(2), 18-22. (Short communication).