



Etude de la voie de biosynthèse des dithiopyrrolones chez *saccharotrix algeriensis* NRRL B-24137 : approche génétique et enzymologique

Safwan Saker

► To cite this version:

Safwan Saker. Etude de la voie de biosynthèse des dithiopyrrolones chez *saccharotrix algeriensis* NRRL B-24137 : approche génétique et enzymologique. Autre. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2013. Français. NNT : 2013INPT0125 . tel-04301570

HAL Id: tel-04301570

<https://theses.hal.science/tel-04301570>

Submitted on 23 Nov 2023

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.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Génie des Procédés et de l'Environnement

Présentée et soutenue par :

M. SAFWAN SAKER

le jeudi 12 décembre 2013

Titre :

ETUDE DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DES DITHIOLOPYRROLONES
CHEZ SACCHAROTRIX ALGERIENSIS NRRL B-24137: APPROCHE
GENETIQUE ET ENZYMOLOGIQUE.

Ecole doctorale :

Mécanique, Energétique, Génie civil, Procédés (MEGeP)

Unité de recherche :

Laboratoire de Génie Chimique (L.G.C.)

Directeur(s) de Thèse :

MME FLORENCE MATHIEU

M. AHMED LEBRIHI

Rapporteurs :

Mme VALÉRIE LECLERE, UNIVERSITE LILLE 1

M. STÉPHANE DELAUNAY, UNIVERSITE DE LORRAINE

Membre(s) du jury :

M. STÉPHANE DELAUNAY, UNIVERSITE DE LORRAINE, Président

M. AHMED LEBRIHI, INP TOULOUSE, Membre

Mme CAROLINE STRUB, UNIVERSITE MONTPELLIER 2, Membre

Mme FLORENCE MATHIEU, INP TOULOUSE, Membre

Mme SYLVIE LAUTRU, UNIVERSITE PARIS 11, Membre

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sien de Laboratoire de Génie Chimique (UMR 5503, CNRS-INPT-UPS) dans l'équipe Génie des Systèmes Microbiens à l'École Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (INPT-ENSAT) sous la direction scientifique de Mme Florence MATHIEU.

Une partie de ce travail a été réalisée à l'Institut de Génétique et Microbiologie UMR 8621, université Paris-Sud, dans l'équipe de microbiologie moléculaire des actinomycètes, dirigé par M. Jean-Luc PERNODET.

Au moment où s'achève ce travail, permettez-moi de remercier du fond du cœur, tous ceux et toutes celles qui, pendant cette période de thèse, m'ont dirigée, soutenue, aidée et encouragée.

Qu'il me soit permis d'exprimer ma profonde reconnaissance et mes remerciements les plus sincères à Mme Florence MATHIEU, ma directrice de thèse. D'abord pour le temps qu'elle m'a consacré, sa disponibilité, ses critiques constructives et sa rigueur scientifique qui m'ont été très utiles pour mener à bien ce travail. Je la remercie également pour son encouragement à participer à des manifestations internationales et nationales qui m'ont beaucoup enrichi.

Mes remerciements vont également à mon co-encadrant M. Ahmed LEBRIHI, ses conseils avisés m'ont été précieux pour la rédaction du présent manuscrit. Je le remercie également pour son soutien.

Mes profondes reconnaissances vont également à M. Jean-Luc PERNODET, pour son accueil bienveillant dans son laboratoire, pour l'intérêt qu'il porte à ce sujet, pour ses précieux conseils qui ont été à chaque fois fructueux. Son aide, sa patience, sa disponibilité et ses conseils théoriques et pratiques m'ont beaucoup aidé à réaliser ce travail en confiance. Je tiens également à lui exprimer ma reconnaissance pour l'ambiance amicale qu'il tenait à garder avec l'ensemble des membres de son équipe.

Mes plus vifs remerciements vont aussi à Sylvie LAUTRU, Qu'elle trouve ici toute l'expression de ma reconnaissance pour le temps consacré et pour l'aide qu'elle m'a apporté

pour réaliser ce travail. Je la remercie aussi de tout mon cœur pour la sympathie qu'elle a toujours manifesté à mon égard.

Enfin, je tiens à remercier les gens du Laboratoire de Génie Chimique, département BioSyM, sur le site de l'ENSAT, que ce soient les permanents ou les temporaires qui m'ont accompagné dans une ambiance amicale et m'ont prodigué leur aide et leurs encouragements :

Thierry LIBOZ, José RAYNAL, Nasserline BOURASE, Nasserline SABAOU, Abdelghani ZITOUNI, Youssef ELRAYESS, Daniel CARON, Philippe ANSON, Muhammad Hussnain SIDDIQUE, Elida GASTELUM MARTINEZ, Elodi CHOQUE, Carol VERHEECKE, Coline LOUSTAUNAU, Saima MUZAMMIL, Marion DARRIET, Rachell ELKHOURY, Jean-yves MAZZITELLI, et tout ceux dont le nom m'échappe.

Je voudrais remercier également les gens de l'équipe de microbiologie moléculaire des actinomycètes à l'Institut de Génétique et Microbiologie UMR 8621, université Paris-Sud, dirigé par M. Jean-Luc PERNODET :

Alain RAYNAL, Emmanuelle DARBON, Florence LORIEUX, et Hasna BOUBAKRI

Je remercie également mes amis et leurs familles, surtout, Ahed ALBOUDI, Mohamad DARBOULI, Mouhamad MOUHAMAD, Rami AMOUN, Ali KHOUZAME, Ahmad HASAN, pour leur aide et leur humanité.

Finalement, mon dernier paragraphe est dédié pour remercier l'ange qui est tombé du ciel et qui a changé ma vie. Mes remerciements les plus sincères, les plus chaleureux, les plus nobles et les plus affectueux pour quelqu'un qui m'a aidé à supporter le stress et les moments difficiles, et qui était toujours présent pour m'encourager et me tenir la main pour finir cette thèse.

Je présente ce travail à mon amour **Assala** et à mon petit ange **Hydarah**.

Safwan,
Toulouse
Décembre, 2013

A goal is a dream with deadline

Napoleon Hill

Sommaire

Liste des abréviations.....	1
Introduction générale.....	5
Revue Bibliographique	11
I.1 Les dithiolopyrrolones.....	11
I.1.1 Définition et caractéristiques	11
I.1.2 Spectre d'action des dithiolopyrrolones.....	12
I.1.3 Mode d'action des dithiolopyrrolones	16
I.1.4 Intérêt des dithiolopyrrolones	16
I.1.4.1 Utilisation en agronomie.....	16
I.1.4.2 Utilisation dans d'autres domaines	17
I.1.5 Toxicité des dithiolopyrrolones	18
I.1.6 Source de production des dithiolopyrrolones	18
I.1.6.1 Source chimique	18
I.1.6.2 Source biologique	18
I.2 Les actinomycètes, des bactéries productrices des antibiotiques	23
I.2.1 Les actinomycètes rares	24
I.2.2 Le genre <i>Saccharothrix</i>	25
I.2.3 <i>Saccharothrix algeriensis</i> NRRL-B 24137 : bactérie productrice des dithiolopyrrolones.....	26
I.2.3.1 Caractérisation et position taxonomique.....	26
I.2.3.2 Activité biologique de <i>Sa. algeriensis</i>	27
I.2.3.3 Valorisation agronomique de <i>Sa. algeriensis</i> : Biocontrôle direct contre <i>Botrytis cinerea</i>	28
I.2.3.4 Antibiotiques sécrétés par <i>Sa. algeriensis</i>	30
I.3 Enzymes de synthèse des peptides non ribosomiques (NRPSs) : enzymes clés de la biosynthèse des métabolites secondaires.....	31

I.3.1	Domaines des NRPSs	
I.3.1.1	Les domaines centraux.....	32
I.3.1.2	Les domaines auxiliaires.....	33
I.3.2	Modules des NRPSs.....	34
I.3.3	Les acyltransférases : nomenclature et fonctions métaboliques	34
I.4	Biosynthèse des dithiopyrrolones	36
I.4.1	Cluster de la voie de biosynthèse de l'holomycine chez <i>S. clavuligerus</i>	37
I.4.2	Caractérisation des gènes clés dans le cluster de la voie de biosynthèse de l'holomycine chez <i>S. clavuligerus</i>	39
I.4.2.1	Non Ribosomal Peptide Synthase (NRPS)	39
I.4.2.2	Thiorédoxine-désulfite oxidoréductase (HlmI)	41
I.4.2.3	Acyltransférase (HlmA).....	42
I.5	Régulation de la production des dithiopyrrolones.....	44
I.5.1	Régulation exercée par les milieux de culture	44
I.5.1.1	Influence de l'acide aminé	45
I.5.1.2	Influence de l'acide organique.....	46
I.5.1.3	Production «à la carte» des nouvelles dithiopyrrolones par <i>Sa. algeriensis</i>	47
I.5.2	Régulation génétique non-spécifique.....	49
I.5.2.1	Interaction entre les voies de biosynthèses des métabolites secondaires	49
I.5.2.2	Rôle d'une protéine « rhodanese-like »	50
I.5.2.3	Rôle d'un régulateur de l'arginine (argR).....	51
II.	Matériel et Méthodes	53
II.1	Microorganisme	53
II.1.1	Conservation de la souche	53
II.1.1.1	Production de spores	53
II.1.1.2	Récupération et stock des spores	53
II.1.1.3	Comptage des spores	53
II.2	Milieux et conditions des cultures microbiennes	54

II.2.1	Milieux de culture	54
II.2.1.1	ISP2.....	54
II.2.1.2	Milieu semi-synthétique basal (SS)	54
II.2.1.3	Milieu semi-synthétique supplémenté	55
II.2.2	Conditions de culture	55
II.2.2.1	Pré-cultures	55
II.2.2.2	Cultures.....	56
II.3	Méthodes analytiques	56
II.3.1	Mesure du poids sec.....	56
II.3.2	Dosage des dithiopyrrolones dans le milieu de culture Par HPLC.....	56
II.3.3	Quantification des dithiopyrrolones.....	57
II.3.4	Dosage des protéines.....	58
II.3.5	Préparation d'un extrait cellulaire de <i>Sa. algeriensis</i>	58
II.3.5.1	Préparation de la biomasse	58
II.3.5.2	Extraction des protéines totales	58
II.3.5.3	Extraction des protéines totales en vue de la purification	58
II.3.6	Purification partielle des activités pyrrothine <i>N</i> -acyltransférases.....	59
II.3.6.1	Précipitation au sulfate d'ammonium.....	59
II.3.6.2	Chromatographie d'interactions hydrophobes (HIC)	60
II.3.6.3	Chromatographie d'échange d'anions(AEC).....	62
II.3.7	Electrophorèse Native-PAGE	63
II.3.8	Dosage des activités pyrrothine <i>N</i> -acyltransférases.....	64
II.3.8.1	Dosage des activités dans l'extrait protéique	64
II.3.8.2	Dosage des activités dans le gel Native-PAGE	64
II.3.9	Grandeurs de suivi de la purification	65
II.4	Les manipulations génétiques.....	65
II.4.1	Préparations et manipulations de l'ADN	65
II.4.2	Extraction des ARN totaux	66
II.4.2.1	Quantification de l'ADN et de l'ARN.....	66
II.4.3	PCR (Polymerase Chain Reaction)	66
II.4.3.1	Protocole	66
II.4.4	La Réverse Transcription (RT)-PCR	67

II.4.5 La PCR quantitative (qPCR).....	67
II.5 Traitement des données.....	68
RÉSULTATS	69
CHAPITRE I: Identification et caractérisation, <i>in silico</i>, du cluster de la voie de biosynthèse des dithiolopyrrolones chez <i>Saccharothrix algeriensis</i> NRRL-B 24137	71
I.1 L'analyse des séquences des domaines enzymatiques du cluster <i>thi</i>	75
I.1.1 Les gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse	75
I.1.1.1 NRPS (ThiE).....	75
I.1.1.2 Acyl CoA déshydrogénase (ThiB).....	78
I.1.1.3 Lantibiotic décarboxylase (ThiF).....	79
I.1.1.4 Thioestérase (ThiC)	80
I.1.1.5 Glucose methanol choline oxydo-réductase (ThiD)	81
I.1.1.6 Thiorédoxine oxidoréductase (ThiI)	82
I.1.2 Les gènes potentiellement impliqués indirectement dans la biosynthèse	84
I.1.2.1 N-formimidoyl synthase (ThiK)	84
I.1.2.2 Globine (ThiG)	85
I.1.2.3 Transporteur de la famille MFS (ThiH).....	86
I.1.2.4 Régulateur de la famille XRE (ThiJ)	88
I.1.2.5 Régulateur transcriptionnel de la famille MerR (ThiM).....	89
I.1.2.6 Régulateur de Streptomycine (ThiL)	90
CHAPITRE II: Etude de la voie de biosynthèse des dithiolopyrrolones chez <i>Saccharothrix algeriensis</i> NRRL B-24137	92
II.1 Introduction.....	93
II.2 Project article I: Study of potential thiolutin biosynthetic gene cluster in <i>Saccharothrix algeriensis</i> NRRL B-24137	95
II.3 Conclusion	126
CHAPITRE III: Identification de deux gènes codant pour des acyltransférases putatives potentiellement impliquées dans la biosynthèse des dithiolopyrrolones chez <i>Saccharothrix algeriensis</i> NRRL B-24137	128
III.1 Introduction	129

III.2	Article II: Identification of two putative acyltransferase genes potentially implicated in dithiolopyrrolone biosyntheses in <i>Saccharothrix algeriensis</i> NRRL B-24137	137
III.3	Conclusion.....	164
CHAPITRE IV:	Caractérisation de deux pyrrothine <i>N</i> -acyltransférases intracellulaires dans l'extrait brut de <i>Saccharothrix algeriensis</i> NRRL B-24137	168
IV.1	Introduction	169
IV.2	Article III: Enzymatic synthesis of dithiolopyrrolone antibiotics using cell-free extract of <i>Saccharothrix algeriensis</i> NRRL B-24137 and biochemical characterization of two pyrrothine <i>N</i> -acyltransferases in this extract	171
IV.3	Conclusion.....	194
Conclusion générale et perspectives		197
Références bibliographiques		204

Liste des abréviations

A : Domaine d'Adénylation

ACP: Acyl Carrier Protein

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

Ala : Alanine

AMPc : 3', 5'-Adénosine MonoPhosphate cyclique

aq: Aqueux

ARN: Acide RiboNucléique

ARNm: Acide Ribonucléique messenger

ARNr: Acide Ribonucléique ribosomal

ATP: Adenosine 5'-TriPhosphate

BAC: Bacterial Artificial Chromosome

BEt : Bromure d'Ethidium

BSA: Sérum Albumine Bovin

C: Domain de Condensation

CoA: Coenzyme A

Cy: Domain de Cyclization

Cys: Cystéine

DI: diamètre interne

DL₅₀: Dose létale 50, dose entraînant la mort de 50 % des individus

DMF: DiMéthylFormamide

DMSO: DiMéthylSulfOxide

DTT: DiThioThréitol

DTPs : DiThioloPyrrolones

E : Domaine d'Epimérisation

EDTA: Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique

EI-MS: Spectrométrie de Masse par Impact Electronique

ϵ : Coefficient d'extinction molaire ou absorptivité molaire

éq.: Equivalent

ESI-MS: Spectrométrie de masse avec ionisation par électrospray

EtOH: Ethanol

F: Point de Fusion

FISH: Fluorescence In Situ Hybridization
 FP: Facteur de Purification
 GlcNAc: N-acetylglucosamine
 kb: Kilo paire de bases
 LAL: Large ATP-binding regulators of the LuxR family
 LC-MS: Chromatographie Liquide couplée à la spectrométrie de masse
 MeOH: Méthanol
 Met: Méthionine
 MOPS: Acide 3-(N-morpholino) propanesulfonique
 mm : millimètre
 mM : milli Molaire
 MRSA: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*
 MS: Masse Sèche
 m/z: Rapport masse sur charge
 NADPH: Nicotine Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
 NRPS : NonRibosomal Peptide Synthase
 ORF : Open Reading Frame (Phase ouverte de lecture)
 PAGE: « PolyAcrylamide Gel Electrophorèses »
 PCP : Peptidyl Carrier Protein
 PCR : Polymerase Chain Reaction
 pI : Point Isoélectrique
 ppGpp : guanine 5'-diphosphate, 3'-diphosphate
 PKS: PolyKetide Synthase (Polycétone synthase)
 PKS/NRPS: Hybrid polyketide/nonribosomal peptide synthase
 PMB: p-Méthoxybenzylamine
 PVDF: Polyfluorure de vinylidène
 ppm: Partie par million
 q.s.p.: Quantité suffisante pour
 R: Rendement
 Rf: Rapport frontal
 RMN: Résonnance Magnétique Nucléaire
 rpm: Rotation par minute
 S : *Streptomyces*

Sacc : *Saccharomyces*
Sa : *Saccharothrix*
SARP: Streptomyces Antibiotic Regulatory Protein
Ser: Sérine
SS: semi-synthétique
SS: semi-synthétique
T : dérivé de Thiolation (PCP)
TCA: Acide trichloroacétique
TFA: Acide TriFluoroacétique
THR: Thréonine
Tr: Temps de rétention
Tris: Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TYR: Tyrosine
U.A.: Unité d'Absorbance
UFC: Unité Formant Colonie
UV: Rayonnement UltraViolet
VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

Introduction générale

Introduction générale

Imaginez-vous comment votre vie aurait pu être sans la présence des antibiotiques ? Comment une simple infection ou une simple blessure pourrait se transformer en septicémie mortelle. A l'heure actuelle, il est difficile d'imaginer cela, c'est presque inimaginable, même pour la génération de nos parents. Pourtant, si nous revenons au début du XIXème siècle, où il n'y avait ni antibiotique ni cure miraculeuse, les traitements utilisés alors étaient limités à l'utilisation de poisons comme la strychnine. Qu'est-ce donc que ce produit miraculeux qu'on appelle antibiotique?

D'abord, le mot antibiotique est dérivé de la langue grecque et signifie *anti* (contre) et *bios* (la vie). Paul Vuillemin, élève de Louis Pasteur, a inventé le terme « antibiose » en 1889 pour décrire le processus par lequel la vie pourrait être utilisée pour détruire la vie. Cependant, c'est Selman Waksman qui a inventé le terme « antibiotique » en 1945. A l'origine, le terme s'appliquait uniquement aux composés dérivés d'organismes vivants et qui sont capables de tuer ou d'inhiber la croissance bactérienne. Le terme a été élargi pour inclure aussi les médicaments antimicrobiens synthétiques. Les antibiotiques naturels appartiennent aux groupes de composés connus comme des métabolites secondaires. Ils sont généralement fabriqués à faible taux spécifique, et ne sont pas considérés comme essentiels à l'organisme qui les produit, au moins en culture pure. Dans leur milieu naturel, ces antibiotiques sont indispensables pour les organismes qui les produisent. Les antibiotiques peuvent être considérés comme les armes chimiques du monde microbien (Demain & Fang, 2000). Lorsque les antibiotiques, comme la pénicilline, ont été introduits dans les années 1940, une victoire a été déclarée contre les maladies infectieuses.

Malheureusement la magie de l'antibiotique s'est dissipée. L'énorme consommation d'antibiotiques et leurs utilisations irrégulières ont permis aux bactéries infectieuses de développer un mécanisme de résistance aux antibiotiques déjà utilisés. Ceci a conduit à la ré-émergence de maladies autrefois contrôlées, telles que les infections bactériennes qui représentent, une fois de plus, l'une des plus grandes menaces pour la santé humaine (Cohen, 2000).

Afin de lutter contre ce nouveau défi que représentent ces souches pathogènes résistantes aux antibiotiques, la production de nouvelles molécules « bio-actives » contre ces pathogènes actuellement disponibles fait de plus en plus l'objet de projets de recherche interdisciplinaires. Ces antibiotiques pourraient aussi aider ou remplacer les traitements chimiques pour les maladies des plantes et les protéger contre les organismes pathogènes. C'est dans ce contexte s'est déroulée notre étude.

Saccharothrix algeriensis NRRL B-24137 est une bactérie filamenteuse dite rare qui appartenant au groupe des actinomycètes. Comme tous les actinomycètes, *Sa. algeriensis* est une importante productrice de métabolites secondaires. Elle produit des molécules de la famille des dithiolopyrrolones (DTPs) qui présentent des activités antibactériennes, antifongiques et anticancéreuses intéressantes (Webster *et al.*, 2000 ; Oliva *et al.*, 2001 ; Minamiguchi *et al.*, 2001). Cette bactérie a également montré une étonnante capacité à produire une grande diversité de dithiolopyrrolones et à adapter sa production au milieu de culture. Cependant, peu de travaux permettent d'expliquer la grande flexibilité de ce microorganisme dans l'usage de différents substrats pour la synthèse des dithiolopyrrolones. De plus, il y a peu de connaissances sur la voie de biosynthèse des dithiolopyrrolones. Seule une hypothétique voie a été proposée par Furumai *et al.* (1982), dans la quelle, la L-cystine a été identifiée comme un précurseur potentiel du noyau pyrrothine. La présence d'une activité enzymatique acétyltransférase dans les extraits cellulaires de *S. clavuligerus* productrice de l'holomycine a par ailleurs été confirmée (de la Fuente *et al.* 2002). Cette activité catalyse la formation d'une liaison amide entre l'holothine et un acide organique activé sous forme d'un acyl-CoA pour former le produit final, l'holomycine. Cependant, l'enzyme responsable de cette activité n'a pas encore été purifiée. Bien que, l'activité biologique des dithiolopyrrolones dépende de la nature de leurs radicaux variables, la production biologique des dithiolopyrrolones doit donc être mieux contrôlée (rendement accru, dirigée vers la synthèse du composé choisi) et permettre de générer une plus grande diversité de dérivés pour représenter une véritable alternative à la synthèse chimique.

Dans ce contexte, l'identification de la voie de biosynthèse des dithiolopyrrolones semble donc intéressante afin de produire une grande diversité de dithiolopyrrolones, avec une variété de radicaux R1 et R2, et des activités biologiques innovantes mais aussi avec de meilleur index thérapeutique (ratio de la dose efficace sur la dose toxique).

L'objectif principal de ce travail de thèse est donc l'étude de la voie de biosynthèse des dithiopyrrolones chez *Sa. algeriensis* et ainsi d'approfondir les connaissances sur la biosynthèse des dithiopyrrolones. Ces connaissances doivent ensuite permettre, à long terme, de produire des dithiopyrrolones par voie biologique (enzymatique ou microbiologique) avec un rendement accru et surtout de contrôler la nature des radicaux variables des dithiopyrrolones formées.

Fin 2009, au démarrage des travaux de thèse, grâce à la disponibilité de la séquence génomique de *S. clavuligerus*, producteur d'une dithiopyrrolone semblable à la thiolutine, l'holomycine, nous avons cherché à identifier la voie de biosynthèse de l'holomycine. Nous avons repéré un cluster dans lequel deux gènes ont été choisis pour vérifier leur implication dans la biosynthèse de l'holomycine. Le premier gène code pour une NRPS (Non Ribosomal Peptide Synthase) qui catalyse la première étape de cette voie, soit la condensation de deux molécules de cystéine. Le deuxième gène code pour une acétyltransférase qui catalyse l'acylation du noyau holothine pour former l'holomycine. Nous avons alors construit chez *S. clavuligerus* deux mutants déficients pour ces gènes. Au cours de l'étape de vérification de la non-production d'holomycine chez ces mutants, le cluster de gènes de la voie de biosynthèse de l'holomycine chez *S. clavuligerus* a été malheureusement dévoilé par d'autres chercheurs aux Etats-Unis (Li & Walsh, 2010) à la fin de l'année 2010. Cette étude s'est basée sur la même approche que la nôtre en réalisant un mutant pour le gène NRPS (Li & Walsh, 2010). Au début de l'année 2011, Hung *et al.* (2011) ont également dévoilé cette voie en se basant sur les mêmes approches. Dans ce contexte scientifique, nous avons abandonné le travail sur cette voie de biosynthèse, et les résultats de ces travaux ne seront pas présentés dans ce manuscrit.

L'identification de la voie de biosynthèse de la thiolutine chez notre bactérie *Sa. algeriensis* a été donc reprise suivant deux approches une génétique et l'autre enzymologique. Les travaux de thèse sont présentés dans ce manuscrit de la manière suivante :

Une synthèse bibliographique présente les connaissances actuelles sur les dithiopyrrolones, leur structure, leur intérêt, leur mode d'action et la source de production. Puis, la souche, *Saccharothrix algeriensis*, est décrite comme souche productrice de ces antibiotiques. Enfin, la biosynthèse et la régulation de la production de ces antibiotiques est présentée.

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

La présentation et la discussion des résultats sont décomposées en **quatre chapitres**. Trois parmi eux sont présentés sous forme d'article, précédé par une introduction et suivi d'une conclusion.

Dans **le premier chapitre**, le génome de *Sa. algeriensis* a été séquencé pour la première fois, puis une analyse bioinformatique a été réalisée en utilisant le cluster de gène de l'holomycine chez *S. clavuligerus* comme référence. Cette analyse bioinformatique a conduit à identifier un cluster potentiellement impliqué dans la biosynthèse de la thiolutine (nommé *thi*) homologue au cluster *hlm* trouvé chez *S. clavuligerus*. La recherche de chaque gène dans ce cluster sur les bases de données a permis de vérifier la fonctionnalité potentielle de ces gènes.

Dans **le deuxième chapitre**, l'implication de ce cluster dans la biosynthèse de la thiolutine a été envisagée. Une approche génétique basée sur la construction des mutants déficients aux gènes clés dans ce cluster a été suivie. Malheureusement, aucune tentative n'a réussi et aucun mutant n'a pu être obtenu. L'expression hétérologue de ce cluster dans d'autres souches hôtes non productrices n'a pas permis de produire ni la thiolutine ni l'un de ces intermédiaires, malgré l'intégration de la totalité de ce cluster. Une autre stratégie a donc été adoptée en se basant sur l'expression des gènes clés dans ce cluster sur deux milieux différents, à savoir : le milieu SS qui favorise la production de la thiolutine et le milieu TSB sur lequel aucune dithiopyrrolone n'a jamais été détectée. Puis, une corrélation entre la production de la thiolutine et l'expression de ces gènes a été établie.

L'approche enzymologique a été ensuite envisagée dans **le troisième chapitre**. L'identification des enzymes acyltransférases impliquées dans la biosynthèse des dithiopyrrolones a été reprise suivant deux méthodes. La première s'est basée sur une analyse bioinformatique permettant d'identifier, dans le génome de *Sa. algeriensis*, le gène homologue à *hlmA* qui code pour une acétyltransférase chez *S. clavuligerus*. La deuxième s'est basée sur la purification des enzymes proposées par Chorin *et al.* (2010), puis la réalisation d'un microséquençage des protéines partiellement purifiées permettant finalement l'identification de(s) gène(s) qui code(nt) cette ou ces enzyme(s). Au final, l'expression de ces gènes et les deux activités acyltransférases ont été suivies dans le but d'établir une corrélation

entre elles qui permettrait de vérifier l'implication des ces enzymes dans la formation des dithiolopyrrolones.

Finalelement, dans **le quatrième chapitre**, nous avons déterminé les paramètres cinétiques des deux activités acyltransférases dans l'extrait brut de *Sa. algeriensis*.

Une **conclusion générale** reprend les principales avancées de ce travail et s'ouvre sur des perspectives.

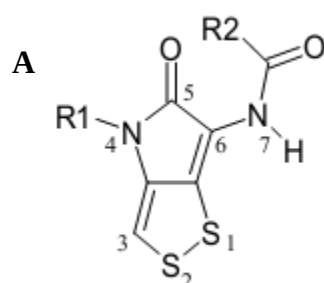
Revue Bibliographique

Revue Bibliographique

I.1 Les dithiopyrrolones

I.1.1 Définition et caractéristiques

Les dithiopyrrolones sont des molécules hétérocycliques associant un cycle pyrrolone et un cycle dithiol (**Figure 1A**). Ces dérivés 1,2 bi-hétérocycle-dithiolo-[4,3-b]-pyrrol-5(4H)-one, sont également connus sous le nom de pyrrolinonodithiole ou pyrrolinodithiole (Celmer & Solomons, 1955).



B

$R_1 = H$ La famille de l'holothine

$R_1 = CH_3$ La famille de la pyrrothine

Figure 1: A la structure générale des dithiopyrrolones. B les deux grandes familles des dithiopyrrolones

Les dithiopyrrolones d'origine biologique peuvent être subdivisées en deux grandes familles selon le radical R_1 porté par l'atome d'azote N° 4 ; la famille de la pyrrothine avec un groupement CH_3 et la famille de l'holothine avec au atome d'hydrogène H (**Figure 1B**). Grâce au radical R_2 porté par l'azote N° 7, plusieurs dérivés peuvent se trouver sous chaque famille comme par exemple l'acétyl-pyrrothine (thiolutine), la benzoyl-pyrrothine, la sinsiol-pyrrothine l'acétyl-holothine (holomycine) et l'hexanoyl-holothine et la thiomarinol.

Les dithiopyrrolones ont une couleur grâce au noyau pyrrolinonodithiole et aux radicaux portés (R_1 ou R_2), allant du jaune à l'orange, au vert et au noir (Eisenman *et al.*, 1953 ; Schachtner *et al.*, 1999). Leur solubilité est généralement très bonne dans le chloroforme et le diméthylsulfoxyde, bonne dans le dichlorométhane et le méthanol, de moyenne à bonne dans l'acétate d'éthyle, le n-butanol, l'éthanol et l'acétone, le benzène et modérée dans l'eau et très faible dans le n-hexane et l'éther diéthylique.

La thiolutine, qui représente le principal dérivé de la famille des pyrrothines, découverte par Tanner *et al.* (1952), est thermostable une heure à 100 °C. Elle résiste à des pH acide ou neutre, mais elle est instable en solution alcaline. La thiolutine a un point de fusion à 243-245 °C, un point de décomposition à 273-276 °C. Elle absorbe dans le visible avec une couleur jaune les longueurs d'ondes d'absorption maximale sont: 205-219, 287-311 et 386-406 nm (Celmer *et al.*, 1952; Celmer & Solomons, 1955; Lamari *et al.*, 2002b; Yamagish.S *et al.*, 1971).

I.1.2 Spectre d'action des dithiopyrrolones

La famille des dithiopyrrolones possède une forte activité bactériostatique contre une large variété de bactéries Gram-positives et Gram-négatives, des levures, des champignons filamenteux (Celmer *et al.*, 1952; Lamari *et al.*, 2002a; Ma *et al.*, ; Merrouche *et al.*, 2009; Merrouche *et al.*, 2011). Le spectre d'action des composés dithiopyrrolones dépend cependant de la nature des radicaux variables R1 et R2. Généralement, les dithiopyrrolones sont plus actives contre les bactéries Gram-positives, et moins contre les champignons et les levures, les bactéries Gram-négatives sont le plus résistantes à l'exception de *Klebsiella pneumoniae* pour certains dérivés (**Tableau 1**). Selon ce tableau, les dithiopyrrolones peuvent se diviser en deux groupes par rapport à leurs activités contre les bactéries Gram-positives et les champignons, les plus actives sont la thiolutine, l'ISP, la BUP, la SEP, la TIP et le formyl-pyrrothine ces CMI sont de 0,2 à 10 et de 2 à 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pour les bactéries et les champignons respectivement. Par contre, le crotonyl-pyrrothine, sorbyl-pyrrothine, 2Hexonyl-pyrrothine, 2Methyl-3-pentenyl-pyrrothine, valeryl-pyrrothine et isovaleryl-pyrrothine sont moins actives.

Ainsi, l'holomycine ne semble pas posséder d'activité antifongique, en particulier contre *Saccharomyces cerevisiae*, contrairement à la thiolutine, l'ISP, la BUP, la SEP et la TIP (CMI comprise entre 2 et 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$). L'holomycine semble par contre présenter une meilleure activité contre les bactéries Gram-négatives, en particulier *Escherichia coli* qui est peu sensible aux dithiopyrrolones produits par *Sa. algeriensis* : comme la thiolutine et les dérivés, TIP, SEP, BUP et ISP (Oliva *et al.*, 2001, Lamari *et al.*, 2002). Les thiomarinols ont présenté une forte activité contre les bactéries Gram-négatives (CMI comprise entre 0.01 et 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$) et une remarquable activité contre *Staphylococcus aureus* avec une CMI de moins

de 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Murphy *et al.*, 2011; Shiozawa *et al.*, 1993; Shiozawa & Takahashi, 1994; Shiozawa *et al.*, 1995; Shiozawa *et al.*, 1997).

Au sein des pyrrothines (R1 CH₃, R2 variables) les activités antimicrobiennes et en particulier antifongiques s'avèrent aussi variables. Ainsi, l'activité antifongique contre *Sacc. cerevisiae*, *Mucor ramanianus*, ou encore *Fusarium culmorum* s'avère plus importante pour la SEP et la TIP que pour la thiolutine (CMI 2 à 5 fois plus faibles) (Lamari *et al.*, 2002). De la même manière, la butyryl-holothine semble présenter une activité antibiotique contre *Corynebacterium diphtheriae* bien plus importante que l'holomycine (CMI 10 fois plus faible) (Gaeumann *et al.*, 1961). De plus, cette classe d'antibiotique présente des activités protozoïcides, larvicides et insecticides (Cole & Rolinson, 1972; McInerney *et al.*, 1991a; Seneca *et al.*, 1952). En outre, les dithiopyrrolones peuvent exceptionnellement exercer une action anti-allergique (Stahl *et al.*, 1988), et inhiber l'agrégation des plaquettes (Ninomiya *et al.*, 1980).

De plus, des dithiopyrrolones, synthétisées chimiquement, auxquelles des groupements type alkyl (C1-C18), aralkyl (C7-C18), cycloalkyl (C3-C18), aryl (C6-C18), et heterocyclic (C3-C18) sont ajoutés confèrent à ces molécules des activités biologiques. Ces activités peuvent être utilisées lors de la prévention et le traitement d'infections microbiennes telles que l'infection par le VIH, et pour le traitement des troubles sanguins tels que la neutropénie. En particulier, ces composés sont aussi utilisés dans la préparation de médicaments destinés à augmenter les globules blancs chez l'homme et les animaux, bien que les tests soient réalisés jusqu'à maintenant sur les souris et dans la préparation de médicaments auxiliaires pour inhiber la diminution du nombre de globules blancs au cours d'une radiothérapie ou d'une chimiothérapie (Guo *et al.*, 2008; Guoping & Quanhai, 2009). L'activité anticancéreuse des dithiopyrrolones a aussi été envisagée, surtout pour la thiolutine. Ainsi, il a été rapporté que la thiolutine est capable d'inhiber l'adhésion de certaines cellules endothéliales (Human Umbilical Veins Endothelial Cells) à la vitronectine (Minamiguchi *et al.*, 2001). Par ailleurs de nombreuses dithiopyrrolones sont cytotoxiques pour certaines lignées cellulaires cancéreuses, en particulier les cellules cancéreuses du colon, du cerveau et du sein (Webster *et al.*, 2000). Enfin, les données toxicologiques sur les dithiopyrrolones sont très peu abondantes dans la littérature ce qui impose une limitation sur leur usage thérapeutique.

Tableau 1: Concentrations minimales inhibitrices (CMI $\mu\text{g mL}^{-1}$) des dithiopyrrolones produites par *Sa. algeriensis* obtenues et de l'holomycine produit par *S. clavuligerus* sur différents germes cibles (Lamari, 2006; Merrouche *et al.*, 2009; Merrouche *et al.*, 2011; Oliva *et al.*, 2001)

Organisme testé	Thiolutine	Holomycine	SEP	TIP	BUP	ISP	Crotonyl pyrrothine	Sorbyl pyrrothine	2Hexonyl pyrrothine	2Methyl-3-pentenyl pyrrothine	Valeryl Pyrrothine	Isovaleryl pyrrothine	Formyl pyrrothine
Gram+	2		1	4	5	20	75	20	>100	20	20	40	2
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC6633)													
<i>Bacillus coagulans</i> (CIP6625)													
<i>Listeria monocytogenes</i> (CIP82110)	<0.2		<0.2	0.5	1	3	75	30	>100	20	20	40	2
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC9314)	<0.2		1	1	2	<0.2	30	10	75	75	40	100	3
<i>Staphylococcus aureus</i> (CIP7625)	20	4	50	40	40	75	30	10	>100	100	75	100	2
Gram-							>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (no.2410LB)													
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536													
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (CIP82.91)	1		1	5	1	5	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Salmonella enterica</i> (CIP81.3)	>100		>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CIPA22)	>100	64	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100

<i>Pseudomonas syrianga</i> No 1882	100		>100	100	100	>100							
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> No 2410	100		>100	100	100	>100							
Champignons							>100	30	>100	2	20	75	50
<i>Aspergillus carbonarius</i> (M333)													
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp.lini (Foln3)													
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp.lini (Foln3-5)	40		20	20	40	40					50	75	30
<i>Fusarium moniliforme</i>							>100	75	>100	5	>100	75	>100
<i>Fusarium equiseti</i>	10		10	20	10	10	50	20	75	30	20	50	10
<i>Fusarium culmorum</i>	10		4	5	10	20	50	50	50	30	20	40	10
<i>Fusarium graminearum</i>	10		4	10	10	10	>100	50	>100	30	75	100	40
<i>Mucor ramannianus</i> (NRRL1829)	10		2	4	5	5	5	20	40	50	10	30	10
<i>Penicillium sp.</i>	20		20	10	20	30							
<i>Alternaria sp.</i>	20		20	5	20	20							
Levures	20		20	20	20	30	>100	50	50	2	20	75	75
<i>Candida albicans</i> (IPA200)													
<i>Saccharomyces erevisiae</i> (ATCC4226)	10	Inactive	2	2	3	10	30	50	30	10	10	20	75

Plus la valeur de CMI est base plus l'activité antimicrobienne est forte. SEP, Senecieryl-pyrrothine; TIP, Tigloyl-pyrrothine; BUP, Butanoyl-pyrrothine; ISP, Iso-buturyl-pyrrothine

I.1.3 Mode d'action des dithiopyrrolones

Plusieurs modes d'action des dithiopyrrolones sont proposés dans la littérature en fonction des organismes cibles. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la thiolutine à 20-40 μM réduit la synthèse d'ARN en inhibant les ARN polymérases I, II, et III ADN-dépendantes (Adams & Gross, 1991). Ainsi, l'inhibition de la transcription confère à la thiolutine son activité antibiotique bactériostatique.

Des études approfondies, *in vivo*, sur le mode d'action de la thiolutine et de l'holomycine ont montré que la synthèse d'ARN est inhibée au niveau de l'étape d'élongation (Khachatourians & Tipper, 1974a; Khachatourians & Tipper, 1974b; Oliva *et al.*, 2001). Cependant, *in vitro*, l'ARN polymérase n'est pas inhibée par la thiolutine et l'holomycine (Oliva *et al.*, 2001; Sivasubramanian & Jayaraman, 1976). Ces résultats suggèrent que la thiolutine et l'holomycine pourraient être des « prodrugs », c'est-à-dire des molécules qui sont transformées au sein de la cellule en molécules actives qui sont elles directement inhibitrices de l'ARN polymérase (Oliva *et al.*, 2001). D'autres modes d'action de la thiolutine ont été rapportés, elle pourrait : inhiber la traduction (Jimenez *et al.*, 1973), amplifier les réponses aux stress (Adams & Gross, 1991; Grigull *et al.*, 2004), affecter les systèmes de transport (Joshi *et al.*, 1982; Bergmann, 1989) et bloquer la dégradation des ARN messagers chez la levure (Pelechano & Perez-Ortin, 2008).

I.1.4 Intérêt des dithiopyrrolones

I.1.4.1 Utilisation en agronomie

Les résultats d'utilisation de la thiolutine dans le domaine agronomique sont assez prometteurs. Le **Tableau 2** présente quelques exemples sur l'utilisation de cet antibiotique pour protéger les plantes contre certaines maladies. Ainsi, il a été rapporté que la thiolutine, à 50 ppm, ajoutée au sol déjà autoclavé, a une action fongicide totale sur un protiste de la classe des Oomycètes, *Phytophthora cinnamomi*, qui provoque chez les plantes infectées des symptômes de pourriture des racines (Zentmyer, 1995). Merrouche (2001) a également montré que l'utilisation de la thiolutine à raison de 5 mg pour 100 g de sol, fait baisser la population des agents pathogènes *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*, de 113 et de 8,5 fois respectivement. La thiolutine est un inhibiteur de la

croissance de certaines plantes (mauvaises herbes) comme *Lemna minor* (Nickell *et al.*, 1954). La thiolutine est aussi signalée avoir une activité herbicide et une activité contre les champignons supérieurs (Schaffner, 1954). Bien que les activités antifongiques semblent intéressantes, peu de travaux sur ces molécules ont été référencés. Malgré tout, l'existence de ces travaux démontre l'intérêt des industriels pour l'usage des dithiopyrrolones dans le domaine agronomique. Surtout dans le cadre du Plan Ecophyto 2018, qui vise la réduction des intrants chimiques.

Le nombre de dépôts de brevets (quasiment quarantaine des brevets jusqu'à 2013, www.uspto.gov/patft/) traduit l'importance des dithiopyrrolones (particulièrement la thiolutine, l'holomycine et les thiomarinols) dans le domaine de l'agriculture et la pharmacologie.

Tableau 2: L'utilisation de la thiolutine dans le domaine agronomique

La plante	Dose	Le pathogène	Maladie	Référence
Tomate	10 ppm	<i>Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici</i>	Fusariose vasculaire	(Gopalkrishnan & Jump, 1952)
Pommier	-	<i>Erwinia amylovora</i>	Feu bactérien	(Winter & Young, 1955)
Feuilles de tabac	0,8-7,2 ppm	<i>Peronospora tabacina</i>	Moisissure bleue	(Grosso, 1954)
Vigne	3-25 ppm	<i>Plasmopara viticola</i> <i>Pythium ultimum</i>	Mildiou Fonte des semis	(Dell I. <i>et al.</i> , 1992)
Fève	1,2 mg / plante	<i>Botrytis fabae</i>	Tache chocolat	(Meklat, 2004)

I.1.4.2 Utilisation dans d'autres domaines

Dans la chimoprévention, la thiolutine a un rôle préventif contre les effets carcinogènes secondaires des substances utilisées lors des traitements des cancers de cellules épithéliales chez les souris (Arnold *et al.*, 1995). Un effet identique a été aussi constaté pour les cellules des poumons, du colon, de la prostate, de la peau, des reins et du cerveau (Webster *et al.*, 2000). De plus, l'auréothricine, la thioaurine et la thiolutine ont également montré, *in vitro*, la capacité d'inhiber l'adhésion de HUVEC (Human umbilical vein endothelial cell), ce qui signifie que ces molécules possèdent des propriétés antiangiogéniques qui pourraient être utilisées dans la thérapie antitumorale. (Minamiguchi *et al.*, 2001). Récemment, Fukuda *et al.* (2011) ont montré que la thiomarinole produite par *Pseudoalteromonas sp* SANK 73390

présente une activité antibiotique plus importante que l'antibiotique d'usage clinique la Mupirocine contre la souche *Staphylococcus aureus* Methicillin Résistante (MRSA), et plus intéressante contre une autre souche MRSA déjà résistante à la Mupirocine.

I.1.5 Toxicité des dithiopyrrolones

Les deux dithiopyrrolones les plus étudiées, la thiolutine et l'holomycine, sont des antibiotiques toxiques pour les animaux vu leur DL₅₀ (dose nécessaire pour tuer la moitié des individus testés). Elle est de 5-10 mg/Kg en sous-cutanée et de 10 mg/Kg par voie orale chez la souris (Seneca *et al.*, 1952; Vondaehn.W *et al.*, 1969).

I.1.6 Source de production des dithiopyrrolones

I.1.6.1 Source chimique

Dès 1963, Schmidt et Geiger ont réussi à synthétiser chimiquement la thiolutine, l'auroéthricine et l'holomycine (Schmidt & Geiger, 1963). Depuis, différentes approches ont été utilisées pour la synthèse chimique totale des dithiopyrrolones (Buchi & Lukas, 1964; Ellis *et al.*, 1977; Hagio & Yoneda, 1974), 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 rapportées plus récemment (Hjelmgaard *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007). Les travaux de Hjelmgaard *et al.* (2007) fournissent ainsi une voie de synthèse en six étapes permettant de synthétiser différentes dithiopyrrolones (R1 H, R2 variable) grâce à l'acylation de l'intermédiaire holothine et à l'aide de chlorures d'acyle.

La voie de synthèse en six étapes de Li *et al.* (2007) permet quant à elle de diversifier à la fois les radicaux R1 et R2 fixés sur le noyau pyrrolinonodithiole mais nécessite l'usage de l'acétate de mercure, composé à la fois toxique et polluant. Finalement, Chorin *et al.* (2009) ont pu synthétiser la pyrrothine en utilisant la même méthode décrite par Hjelmgaard *et al.* (2007) en effectuant des légères modifications.

I.1.6.2 Source biologique

Le **Tableau 3** présente les sources biologiques d'obtention des dithiopyrrolones. Les bactéries Gram-positives et filamenteuses notamment le genre *Streptomyces* représentent la plus ancienne source biologique des dithiopyrrolones. La thiolutine a en effet été isolée,

pour la première fois, à partir d'une culture de *Streptomyces albus* par Tanné *et al.* (1950). Depuis, des nombreux dérivés des dithiolopyrrolones ont été isolés à partir de cultures bactériennes. Des bactéries non mycéliennes telles que *Xenorhabdus bovienii*, *X. luminescens* et *X. nematophilus* ou encore une bactérie marine telle que *Alteromonas rava*, ont été rapportées productrices de différents dérivés de dithiolopyrrolones (Isaacson & Webster, 2002; McInerney *et al.*, 1991a; McInerney *et al.*, 1991b; Webster *et al.*, 2002).

Des études réalisées par Lamari *et al.* (2002b) montrent la présence des dithiolopyrrolones dans le milieu de culture de souches d'actinomycètes autres que le genre *Streptomyces*. Ainsi, des antibiotiques de la famille des dithiolopyrrolones ont été isolés à partir d'une culture liquide de *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 dans le milieu ISP2. Depuis, différents dérivés des dithiolopyrrolones (20 dérivés) ont été isolés à partir d'un surnageant de culture de *Sa. algeriensis* sur un milieu semi-synthétique liquide supplémenté par des acides organiques ou des acides aminés. Parmi ces 20 dérivés, une dizaine a été identifiée et caractérisée (Bouras, 2005; Bouras *et al.*, 2006a; Bouras *et al.*, 2006b; Bouras *et al.*, 2007; Mack *et al.*, 2007; Merrouche *et al.*, 2009; Merrouche *et al.*, 2011). Ainsi, *Sa. algeriensis* est la seule bactérie capable de produire *in vivo* une telle diversité de dithiolopyrrolones. A ce jour, *Sa. algeriensis* a démontré une étonnante capacité à produire de nombreuses dithiolopyrrolones et à adapter sa production en fonction de la composition du milieu de culture.

Récemment, deux bactéries marines Gram-négatives, *Photobacterium halotolerans* S2753 (Wietz *et al.*, 2010) et un agent pathogène des poissons, *Yersinia ruckeri* ATCC 29473 (Qin *et al.*, 2013), ont montré une capacité à produire l'holomycine. De plus, une autre bactérie marine *Pseudoalteromonas sp* SANK 73390 est recensée comme productrice des différents dérivés de l'holothine comme les thiomarinols et les xenorhabdins (Fukuda *et al.*, 2011; Murphy *et al.*, 2011; Wietz *et al.*, 2010).

Tableau 3: Caractéristiques de différentes dithiopyrrolones d'origine biologique

Antibiotique	Formule et PM	R ₁	R ₂	Espèces productrices	Références
Pyrrothine	C ₆ H ₆ N ₂ OS ₂ PM: 186	CH ₃	H-N-H	<i>Streptomyces</i> sp.	Furumai <i>et al.</i> , 1982 ; Oliva <i>et al.</i> , 2001.
Thiolutine (syn.: acétyl-pyrrothine, acéto-pyrrothine, farcinicine).	C ₈ H ₈ N ₂ O ₂ S ₂ PM: 228	CH ₃	H-N-CO-CH ₃	<i>Streptomyces thioluteus</i> , <i>S. celluloflavus</i> , <i>S. albus</i> , <i>S. pimprina</i> , <i>S. kasugaensis</i> , <i>S. luteoreticuli</i> , <i>Saccharothrix algeriensis</i> .	Celmer et Solomons, 1955; Celmer et Solomons, 1963; Yamagishi <i>et al.</i> , 1971; Lamari <i>et al.</i> , 2002a,b.
Auréothricine (syn.: propionyl-pyrrothine, propio-pyrrothine).	C ₉ H ₁₀ N ₂ O ₂ S ₂ PM: 242	CH ₃	H-N-CO-CH ₂ -CH ₃	<i>Streptomyces kasugaensis</i> , <i>S. pimprina</i> , <i>S. farcinicus</i> , <i>S. thioluteus</i> , <i>S. luteoreticuli</i> , <i>S. celluloflavus</i> , <i>S. cyanoflavus</i> , (et aussi synthétisé	Umezawa <i>et al.</i> , 1949; Celmer <i>et al.</i> , 1952; Celmer et Solomons, 1955; Yamagishi <i>et al.</i> , 1971; Juhl et Clark, 1990; Naik <i>et al.</i> , 2001.
Iso-buturyl-pyrrothine (syn.: iso-butyro-pyrrothine, 2-methylpropanoyl-pyrrothine).	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₂ S ₂ PM: 256	CH ₃	H-N-CO-CH(CH ₃) ₂	<i>Streptomyces pimprina</i> . <i>Saccharothrix algeriensis</i> , (et aussi synthétisé chimiquement)	Bhate <i>et al.</i> , 1960; Lamari <i>et al.</i> , 2002a,b.
Sénécioyl-pyrrothine (syn.: 3-méthyl-2-butenoyl-pyrrothine).	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂ S ₂ PM: 268	CH ₃	H-N-CO-CH=C(CH ₃) ₂	<i>Saccharothrix algeriensis</i>	Lamari <i>et al.</i> , 2002a,b.
Tigloyl-pyrrothine	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂ S ₂ PM: 268	CH ₃	H-N-CO-C(CH ₃)=CH(CH ₃)	<i>Saccharothrix algeriensis</i>	Lamari <i>et al.</i> , 2002a,b.
Benzoyl-pyrrothine	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₂ S ₂ PM: 290	CH ₃	H-N-CO-C ₆ H ₅	<i>Saccharothrix algeriensis</i>	Lamari <i>et al.</i> (Résultats non publiés).
2-méthyl-pentanoyl-pyrrothine	C ₁₃ H ₁₉ N ₂ O ₂ S ₂ PM: 299	CH ₃	H-N-CO-CH ₃ -(CH ₂) ₂ -CH- (CH ₃) ₂	<i>Saccharothrix algeriensis</i>	Lamari <i>et al.</i> (Résultats non publiés).
Valeryl-pyrrothine	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ OS ₂ PM: 270	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	<i>Saccharothrix algeriensis</i>	(Merrouche <i>et al.</i> , 2009)
Iso valeryl-pyrrothine	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ OS ₂ PM: 270	CH ₃	CH(CH ₃)(CH ₂ CH ₃)	<i>Saccharothrix algeriensis</i>	(Merrouche <i>et al.</i> , 2009)
Formyl-pyrrothine	C ₇ H ₆ N ₂ OS ₂ PM: 213	CH ₃	H	<i>Saccharothrix algeriensis</i>	(Merrouche <i>et al.</i> , 2009)

Crotonyl-pyrrothine	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₂ S ₂ PM: 254	CH ₃	CH=CH(CH ₃)	<i>Saccharothrix algeriensis</i>	(Merrouche et al. 2011)
Sorbyl-pyrrothine	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂ S ₂ PM: 280	CH ₃	CH=CH-CH=CH(CH ₃)	<i>Saccharothrix algeriensis</i>	(Merrouche et al., 2011)
2-hexonyl-pyrrothine	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂ S ₂ PM: 282	CH ₃	CH=CH-CH ₂ CH ₂ CH ₃	<i>Saccharothrix algeriensis</i>	(Merrouche et al., 2011)
2-Methyl-3-pentenyl-pyrrothine	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂ S ₂ PM: 282	CH ₃	CH=C(CH ₃)(CH ₂ CH ₃)	<i>Saccharothrix algeriensis</i>	(Merrouche et al., 2011)
Pentanoyl-pyrrothine	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₂ S ₂ PM: 284	CH ₃	N-H-CO-(CH ₂) ₃ -CH ₃	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. luminescens</i> , <i>X. bovienii</i> .	Webster et al., 2002.
Holomycine (syn.: déméthyle-thiolutine, acétyl-holothine).	C ₇ H ₆ N ₂ O ₂ S ₂ PM: 214	H	H-N-CO-CH ₃	<i>Streptomyces</i> sp. P6621, <i>S. griseus</i> , <i>S. clavuligerus</i> , <i>S. pimprina</i> , <i>Photobactérie halotolerans</i> , <i>Yersinia ruckeri</i> <i>Pseudoalteromonas</i> sp	Okamura et al., 1977; De la Fuente et al., 2002, Fukuda et al., 2011; Qin et al., 2013; Wietz et al., 2010
Propionyl-holothine	C ₈ H ₈ N ₂ O ₂ S ₂ PM: 228	H	H-N-CO-CH ₂ -CH ₃	<i>Streptomyces</i> P6621, (et aussi synthétisé chimiquement).	Okamura et al., 1977.
Xénorhabdine I (syn.: hexanoyl-holothine).	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₂ S ₂ PM: 270	H	H-N-CO-(CH ₂) ₄ -CH ₃	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. luminescens</i> , <i>X. bovienii</i> .	(Forst & Nealson, 1996; Li et al., 1996; Webster et al., 2002)
Xénorhabdine II (syn.: 5-methylhexanoyl-holothin).	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₂ S ₂ PM: 284	H	H-N-CO-(CH ₂) ₃ -CH-(CH ₃) ₂	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. luminescens</i> , <i>X. bovienii</i> .	(McInerney et al., 1991a; McInerney et al., 1991b; Paik et al., 2001; Webster et al., 2002).
Xénorhabdine III (syn.: octanoyl-holothine).	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₂ S ₂ PM: 298	H	H-N-CO-(CH ₂) ₆ -CH ₃	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> .	(McInerney et al., 1991a; McInerney et al., 1991b; Webster et al., 2002)
Xénorhabdine IV	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₂ S ₂ PM: 284	CH ₃	H-N-CO-(CH ₂) ₄ -CH ₃	<i>Xenorhabdus</i> spp.	(McInerney et al., 1991a; McInerney et al., 1991b; Paik et al., 2001; Webster et al., 2002)
Xénorhabdine V (syn.: 5-methylhexanoyl-pyrrothine).	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₂ S ₂ PM: 298	CH ₃	H-N-CO-(CH ₂) ₃ -CH-(CH ₃) ₂	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. luminescens</i> , <i>X. bovienii</i> .	(McInerney et al., 1991a; McInerney et al., 1991b; Paik et al., 2001; Webster et al., 2002)

Xénorhabdine VI (<i>syn.</i> : 3-methylbutanoyl-pyrrothine).	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O ₂ S ₂ PM: 270	CH ₃	H-N-CO-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. luminescens</i> , <i>X. bovienii</i> .	(McInerney <i>et al.</i> , 1991a; McInerney <i>et al.</i> , 1991b; Webster <i>et al.</i> , 2002)
Xénorhabdine VII (<i>syn.</i> : butanoyl-pyrrothine, butyropyrrothine).	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₂ S ₂ PM: 256	CH ₃	H-N-CO-(CH ₂) ₂ -CH ₃	<i>Xenorhabdus nematophilus</i> , <i>X. luminescens</i> , <i>X. bovienii</i> , <i>Saccharothrix algeriensis</i>	(Lamari <i>et al.</i> , 2002a,b., Webster <i>et al.</i> , 2002)
Déméthyle thiolutine (holomycine)	C ₈ H ₈ N ₂ O ₂ S ₂ PM: 228	H	CH ₃	<i>S. clavuligerus</i> , <i>Photobactérie halotolerans</i> S2753, <i>Yersinia ruckeri</i>	(Qin <i>et al.</i> , 2013; Wietz <i>et al.</i> , 2010)
Xanthidrol (dérivé de la Xénorhabdine I).	C ₂₄ H ₂₂ N ₂ O ₃ S ₂ PM: 450	Xanthidryl	H-N-CO-(CH ₂) ₄ -CH ₃	Transformation chimique de la Xénorhabdine I.	(Mc Inerney <i>et al.</i> , 1991)
Thioaurine (<i>syn.</i> : orosomycine ou antibiotique vD 844)	C ₇ H ₆ N ₂ O ₂ S ₂ PM: 214	H	CH ₃ -N-CHO	<i>Streptomyces</i> sp.	(Laskin & Lechevalier, 1984)
Antibiotique vD 846	C ₆ H ₄ N ₂ O ₂ S ₂ PM: 200	H	H-N-CHO	<i>Streptomyces</i> sp.	(Laskin & Lechevalier, 1984)
Thiomarinole A	C ₃₀ H ₄₄ N ₂ O ₉ S ₂ PM: 640	H	H-N-CO-C ₂₅ H ₄₀ O ₇	<i>Alteromonas rava</i> , <i>Pseudoalteromonas</i> sp	(Fukuda <i>et al.</i> , 2011; Shiozawa <i>et al.</i> , 1993; Shiozawa & Takahashi, 1994)
Thiomarinole B	C ₃₀ H ₄₄ N ₂ O ₁₁ S ₂	H	H-N-CO-C ₂₅ H ₄₀ O ₉	<i>Alteromonas rava</i>	(Shiozawa <i>et al.</i> , 1995)
Thiomarinole C	C ₃₀ H ₄₄ N ₂ O ₈ S ₂ PM: 624	H	H-N-CO-C ₂₅ H ₄₀ O ₆	<i>Alteromonas rava</i>	(Shiozawa <i>et al.</i> , 1995)
Thiomarinole D	C ₃₁ H ₄₆ N ₂ O ₉ S ₂ PM: 654	H	H-N-CO-C ₂₆ H ₄₂ O ₇	<i>Alteromonas rava</i>	(Shiozawa <i>et al.</i> , 1997)
Thiomarinole E	C ₃₂ H ₄₈ N ₂ O ₉ S ₂ PM: 668	H	H-N-CO-C ₂₇ H ₄₄ O ₇	<i>Alteromonas rava</i>	(Shiozawa <i>et al.</i> , 1997)
Thiomarinole F	C ₃₀ H ₄₂ N ₂ O ₉ S ₂ PM: 638	H	H-N-CO-C ₂₅ H ₃₈ O ₇	<i>Alteromonas rava</i>	(Shiozawa <i>et al.</i> , 1997)
Thiomarinole G	C ₃₀ H ₄₄ N ₂ O ₈ S ₂ PM: 624	H	H-N-CO-C ₂₅ H ₄₀ O ₆	<i>Alteromonas rava</i>	(Shiozawa <i>et al.</i> , 1997)

I.2 Les actinomycètes, des bactéries productrices des antibiotiques

Dans le Manuel de Bergey de 1994, l'Ordre des actinomycètes fut défini comme regroupant des bactéries Gram-positives qui tendent à former des filaments ramifiés pouvant être assez développés pour former un véritable mycélium. Chez les actinomycètes, le pourcentage en Guanine + Cytosine est plus élevé que celui des bactéries non mycéliennes (GC % supérieur à 55 %).

Les actinomycètes sont les plus prolifiques de tous les microorganismes en tant que producteurs d'antibiotiques. Jusqu'à ces dernières années, 45 % des molécules bioactives découvertes sont produites par les actinomycètes (**Figure 2**). Ainsi, deux tiers des quelques 16500 antibiotiques isolés sont produits par des actinomycètes et surtout par le genre *Streptomyces* (**Tableau 4**). Les actinomycètes représentent la plus grande source d'antibiotiques naturels utilisés notamment en thérapie humaine (Bergey, 1989).

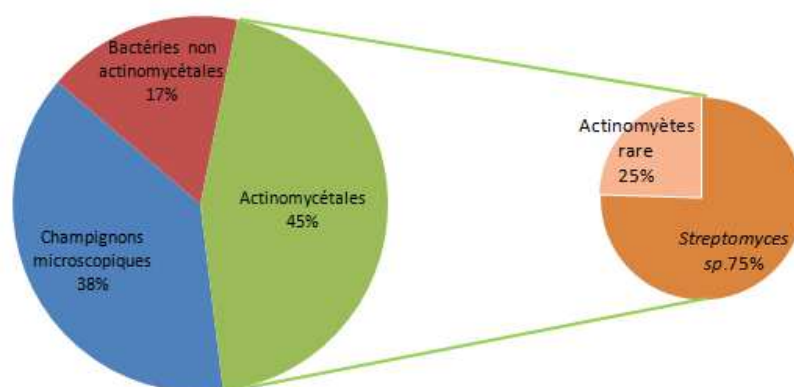


Figure 2. Origine des produits microbiens bioactifs (Berdy, 2005)

L'actinomycine, antibiotique antitumoral, est le premier antibiotique isolé à partir d'une souche d'actinomycète (Waksman & Woodruff, 1940). De nombreuses autres molécules sont également élaborées par ces microorganismes. Certaines ont une activité antitumorale (carcinostatine, adriamycine, anthramycine, daunomycine, anthracycline, etc.), herbicide, antiparasite comme l'antimalaria (distamycine), anticoccidienne, insecticide (avermectine, polyoxines, mylébémycine, etc.), antivirale (mutactimycines) et acaricide (altemicidines) (Choi *et al.*, 1998; Lombardi & Crisanti, 1997; Perry *et al.*, 1990; Raty *et al.*, 2002).

Les enzymes sont, après les antibiotiques, les produits les plus importants sécrétés par les actinomycètes. Certaines sont utilisées dans l'industrie agroalimentaire (glucose isomérase) et dans celle des détergents (protéases) (Moreira *et al.*, 2002). Les glycosidases jouent un rôle important dans la dégradation des biomasses végétales (amylases et xylanases), animales et fongiques (chitinases). D'autres enzymes peuvent avoir des applications médicales (neuraminidases, cholestérol oxydase), ou vétérinaires, comme additif nutritionnel pour le bétail (Oestergaard & Sjoeholm, 2001). Umezawa *et al.* (1988) ont rapporté qu'une molécule produite par *S. tsukubaensis* possède une activité immunosuppressive semblable à celle de la cyclosporine, utilisée dans la chirurgie de la transplantation des organes.

Tableau 4: Nombre approximatif de produits microbiens bioactifs d'après Berdy (2005) : molécules possédant une activité antimicrobienne et/ou une activité antitumorale et/ou une activité antivirale

Source	Antibiotiques	Autre métabolites bioactifs	Total des métabolites bioactifs	Métabolites utilisés (en thérapie humaine)	Métabolites inactifs
Bactéries (autres)	2900	900	3800	10-12(8-10)	3000-5000
Actinomycétales	8700	1400	10100	100-120 (70-75)	5000-10000
<i>Streptomyces sp.</i>	6550	1080	7630		
Actinomycétales rare	2250	220	2470		
Champignons	4900	3700	8600	30-35 (13-15)	2000-15000
Total	16500	6000	22500	140-160 (100)	20000-25000

I.2.1 Les actinomycètes rares

Dans le but d'augmenter les chances de découvrir de nouveaux métabolites secondaires pour lutter contre le nombre croissant de souches résistantes aux antibiotiques actuellement utilisés, des recherches se focalisent notamment sur l'exploitation de la diversité microbienne issue d'écosystèmes extrêmes. En effet, de nombreux milieux naturels sont encore inexplorés ou sous-explorés et donc, peuvent être considérés comme une ressource abondante pour l'isolement de nouveaux microorganismes (Tiwari & Gupta, 2012). Les actinomycètes sont responsables de la production de plus de la moitié des molécules bioactives (Berdy, 2005). Plus de 10 % de ces métabolites secondaires sont isolés à partir de ce qu'on appelle les actinomycètes «rares», qui comprennent les familles des *Micromonosporaceae* (par exemple *Micromonospora* et *Actinoplanes*), *Pseudonocardiaceae*

(par exemple *Amycolaptosis* et *Saccharopolyspora*), *Thermomonosporaceae* (par exemple *Actinomadura*), *Nocardiaceae* (par exemple *Nocardia*) et *Streptosporangiaceae* (par exemple *Streptosporangium*) (**Figure 3**).

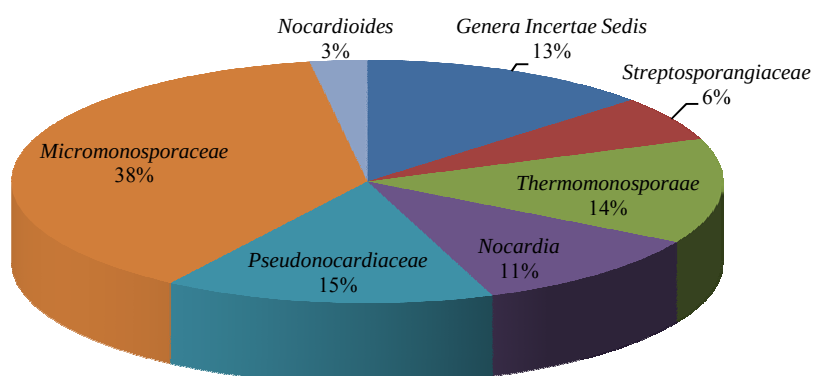


Figure 3. Distribution relative des souches productrices de métabolites secondaires bioactifs parmi les actinomycètes rares (Lazzarini et al., 2000)

L'utilisation du terme «rare» n'est pas une indication relative à leur abondance dans l'environnement, mais surtout à leur fréquence d'isolement à l'aide des méthodes conventionnelles, ce qui est beaucoup plus faible par rapport au genre *Streptomyces*. L'importance de ces souches est démontrée par la découverte de nombreux succès d'agents antibactériens, tels que l'érythromycine de *Saccharopolyspora erythraea* ou la vancomycine à partir d'*Amycolatopsis orientalis* (Lazzarini et al., 2000).

I.2.2 Le genre *Saccharothrix*

Labeda et al. (1984) ont utilisé *Saccharothrix australiensis* comme espèce type afin de décrire pour la première fois le genre *Saccharothrix*. Ce genre a été précédemment classé dans la famille des *Pseudonocardiaceae* (Embley et al., 1988), puis il a été reclassé dans une nouvelle famille, celle des *Actinosynnemataceae* (Labeda & Kroppenstedt, 2000) sur la base des parentés phylogénétiques. Le genre est décrit comme étant morphologiquement similaire à *Nocardiopsis* mais s'en distingue par ses constituants cellulaires. Après la création du genre, et en se basant sur l'analyse des constituants cellulaires et de la taxonomie numérique, plusieurs espèces ont été décrites par la suite, dont certaines proviennent de reclassement à partir d'autres genres tels que *Nocardiopsis* et *Nocardia*, (Grund & Kroppenstedt, 1989; Labeda, 1986; Labeda & Lechevalier, 1989). Ces dernières années, sur la base de la composition cellulaire, trois espèces du genre *Saccharothrix* ont été transférées dans d'autres

genres: *waywayendensis* et *aerocolonigenes*, rattachées à *Lentzea*, genre crée par (Yassin *et al.*, 1995) et *flava* rattachée à *Lechevalieria*, genre crée par (Labeda *et al.*, 2001).

I.2.3 *Saccharothrix algeriensis* NRRL-B 24137 : bactérie productrice des dithiopyrrolones

I.2.3.1 Caractérisation et position taxonomique

Sa. algeriensis a été isolée en 1992 à partir d'un échantillon de sol prélevé de la palmeraie d'Adrar (oasis du Sud-ouest algérien). Initialement, elle a été rattachée au genre *Nocardiopsis* (Boudjella, 1994) et reclassée par la suite dans le genre *Saccharothrix* (Zitouni, 1995). L'analyse des constituants cellulaires a montré que la souche possède le chimiotype III E et des phospholipides de type P IV. La glycine et les acides mycoliques sont absents. Une analyse phylogénétique basée sur l'analyse de l'ARN 16S et sur le taux d'hybridation ADN-ADN a ensuite indiqué que la souche appartenait à une nouvelle espèce nommée *Sa. algeriensis* dont elle est la souche type (Lamari *et al.*, 2002a; Lamari *et al.*, 2002b; Zitouni *et al.*, 2004a). Celle-ci a été déposée dans deux collections mondiales: NRRL et DSM sous le numéro d'accèsion B-24137 et 44581, respectivement (Zitouni *et al.*, 2004b). La position taxonomique de *Saccharothrix algeriensis* NRRL-B 24137 est indiquée dans le **Tableau 5**.

Tableau 5 : Position taxonomique de *Saccharothrix algeriensis*

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

Au niveau morphologique, *Sa. algeriensis* forme un mycélium du substrat d'une couleur jaune vif à jaune-marron suivant le milieu de culture utilisé. Elle forme un abondant mycélium aérien jaune orangé (sur milieu ISP2, ISP5 et milieu Bennett). Celui-ci se fragmente en spores sous formes ovoïdes ou de bâtonnets non motiles. Des pigments solubles

de même couleur sont abondamment sécrétés. *Sa. algeriensis* peut se développer sur une gamme de températures comprises entre 18 et 45 °C mais pas au-delà de 48 °C et sur une gamme de pH comprise entre 5 et 9.

I.2.3.2 Activité biologique de *Sa. algeriensis*

Le **Tableau 6** regroupe les activités biologiques de *Sa. algeriensis* sur le milieu ISP2 contre les bactéries Gram-positives, Gram-négatives, les levures et les champignons filamenteux (Lamari, 2006). L'activité antibiotique est globalement plus importante contre les bactéries à Gram positif (à l'exception d'*Enterococcus faecalis*) que celles à Gram négatif (à l'exception de *Klebsiella pneumoniae*). *Pseudomonas aeruginosa* est la seule bactérie testée montrant une absence totale de sensibilité à *Sa. algeriensis*. Enfin, l'activité antifongique de *Sa. algeriensis* est particulièrement marquée notamment envers les champignons filamenteux phytopathogènes et toxinogènes.

Tableau 6: Activité biologique de *Sa. algeriensis* sur le milieu ISP2 (Lamari, 2006)

Espèce cible	Activité antibiotique	Espèce cible	Activité antibiotique
Champignon filamenteux			
Bactérie Gram +			
<i>Micrococcus luteus</i>	+++	<i>Rhizoctoria solani</i>	++
<i>Bacillus subtilis</i>	++	<i>Bothrytis cinerera</i>	++
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Ciceri</i>	+
		<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Lentis</i>	+
Bactérie Gram -			
<i>Alcaligenes faecalis</i>	+	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>Lini</i>	+
<i>Escherichia coli</i>	++	<i>Aspergillus niger</i>	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+++	<i>Verticillium</i> sp.	++
<i>Proteus mirabilis</i>	+	<i>Geothrichum candidum</i>	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	++
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	<i>Fusarium culmorum</i>	+
<i>Serratia Marcescens</i>	+	<i>Fusarium graminearum</i>	+
		<i>Pithium irregulare</i>	++
Levures			
<i>Candida albicans</i>	+	<i>Penicillium</i> sp.	++
<i>Debaryomyces subglossus</i>	+	<i>Penicillium purpureum</i>	++

<i>Kluyveromyces lactis</i>	+	<i>Mucor ramannianus</i>	+++
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	<i>Thielaviopsis neocaledoniae</i>	+++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	++	<i>Sclerotium sclerotiorum</i>	++
		<i>Alternaria sp.</i>	++

L'activité a été déterminée par la méthode des stries croisées sur ISP2. L'intensité de l'activité antibiotique est en fonction de la zone d'inhibition en mm : Pas de zone, -, Zone de 2 à 9 mm, +, de 10 à 19 mm, ++, >19 mm +++

I.2.3.3 Valorisation agronomique de *Sa. algeriensis* : Biocontrôle direct contre *Botrytis cinerea*

Au cours de ces dernières décennies, de nombreuses études ont montré que les métabolites secondaires, notamment des antibiotiques et des substances volatiles produites par les bactéries du sol, sont des facteurs clés dans l'élimination des agents pathogènes chez les plantes. Dans ce contexte, l'utilisation de *Sa. algeriensis* pour la lutte biologique contre *B. cinerea* qui infecte les plantes et plus particulièrement la vigne, a été envisagée pour la première fois par (Muzammil, 2012; Muzammil *et al.*, 2013). D'abord, le biocontrôle exercé par *Sa. algeriensis* contre *B. cinerea* est mis en évidence *in vitro* : *Sa. algeriensis* présente sur milieu solide PDA (Potato Dextrose Agar) une zone d'inhibition contre *B. cinerea*. Cette zone, qui était rouge/orange, indique que *Sa. algeriensis* a secrété certaines molécules bioactives pigmentées et antifongiques. Les expériences préliminaires ont indiqué que ces molécules n'appartiennent pas à la famille des dithiopyrrolones (la principale famille d'antibiotiques produite par *Sa. algeriensis*).

Le biocontrôle exercé par *Sa. algeriensis* contre *B. cinerea* est décrit en utilisant la vigne et la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. En effet, l'incubation de racines de ces plantes avec les spores de *Sa. algeriensis* (5.10^7 UFC/mL) a diminué l'infection des feuilles de ces plantes par *B. cinerea* (**Figure 4**). La technique microscopique DOPE-FISH (Double Labeling of Oligonucleotide Probes for Fluorescence In Situ Hybridization (Stoecker *et al.*, 2010) a permis de localiser cette bactérie dans les différentes parties de ces plantes, après l'inoculation des racines avec les spores. Il a été observé que la souche colonise la zone des poils racinaires, la zone d'élongation des racines ainsi que le site d'émergence de la racine. Il a été constaté que la souche pouvait se trouver sous formes de mycélium et de spores pendant la colonisation des surfaces de racines. *Sa. algeriensis* a été visualisée à l'intérieur de

l'endorhize des racines de la plante, donc il est clair que les bactéries franchissent la rhizoplane (Compant *et al.*, 2013).

Sa. algeriensis peut se trouver à l'intérieur des racines (endophyte), et elle peut également passer à travers le rhizoderme jusqu'au cortex cortical. Cependant, *Sa. algeriensis* colonise plusieurs couches de cellules corticales, mais pas le système vasculaire. Ainsi, il a été suggéré que *Sa. algeriensis* était limitée dans la partie intérieure de la racine (Muzammil, 2012). Cependant, certaines bactéries bénéfiques peuvent coloniser les parties supérieures de la plante alors que d'autres sont limitées à certaines parties de racine uniquement (Compant *et al.*, 2010).

Suite à l'absence de *Sa. algeriensis* sur la partie aérienne des plantes testées il a été constaté que le biocontrôle exercé par cette bactérie contre *B. cinerea* se fait via un type d'induction de mécanisme de défenses naturelles chez ces plantes.

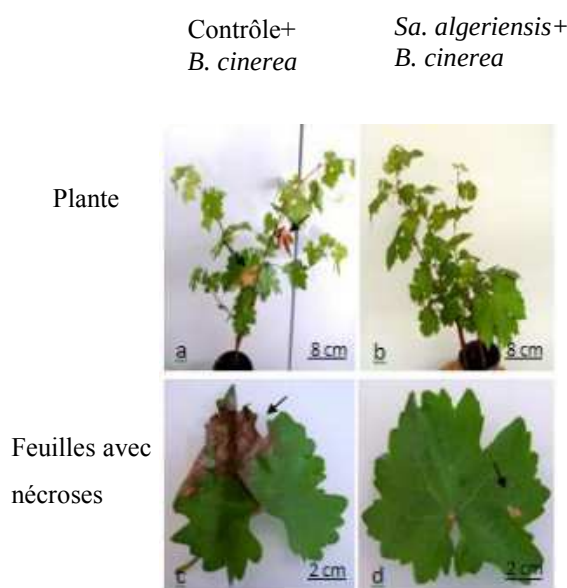


Figure 4. Photos de symptômes de *B. cinerea* la vigne (a) contrôle avec *B. cinerea* et sans *Sa. algeriensis*, (b) vigne inoculée avec des spores de *Sa. algeriensis* et ensuite inoculée avec *B. cinerea*, c et d sont les photos des feuilles des ces plantes. L'inoculation est réalisée en immergeant des racines de vigne dans la suspension de spores (5.10^7 UFC/mL) pendant trois minutes, 10 jours après les feuilles sont infectées par *B. cinerea* (3 μ L of $6,5.10^5$ conidies/mL)

I.2.3.4 Antibiotiques sécrétés par *Sa. algeriensis*

L'identification des antibiotiques produits par *Sa. algeriensis* a été envisagée pour la première fois par Zitouni (1995). Ses études ont montré que l'extrait au dichlorométhane du filtrat de culture de *Sa. algeriensis* déposé sur CCM donnait deux taches jaune vive et actives contre les bactéries. Après purification par HPLC et analyses spectroscopiques, la structure chimique de ces molécules a été déterminée. Ces antibiotiques font parti du groupe des dithiopyrrolones qui sont des hétérocycles contenant des atomes de soufre et d'azote (Lamari *et al.*, 2002a,b). L'antibiotique principal a été identifié à la thiolutine (syn. acétyl-pyrrothine, acéto-pyrrothine, farcinicine). *Sa. algeriensis* est le seul taxon de *Saccharothrix* à produire des antibiotiques de la famille des dithiopyrrolones. Depuis, des autres dithiopyrrolones ont été isolées et identifiées à partir du milieu de culture de *Sa. algeriensis* (Figure 5).

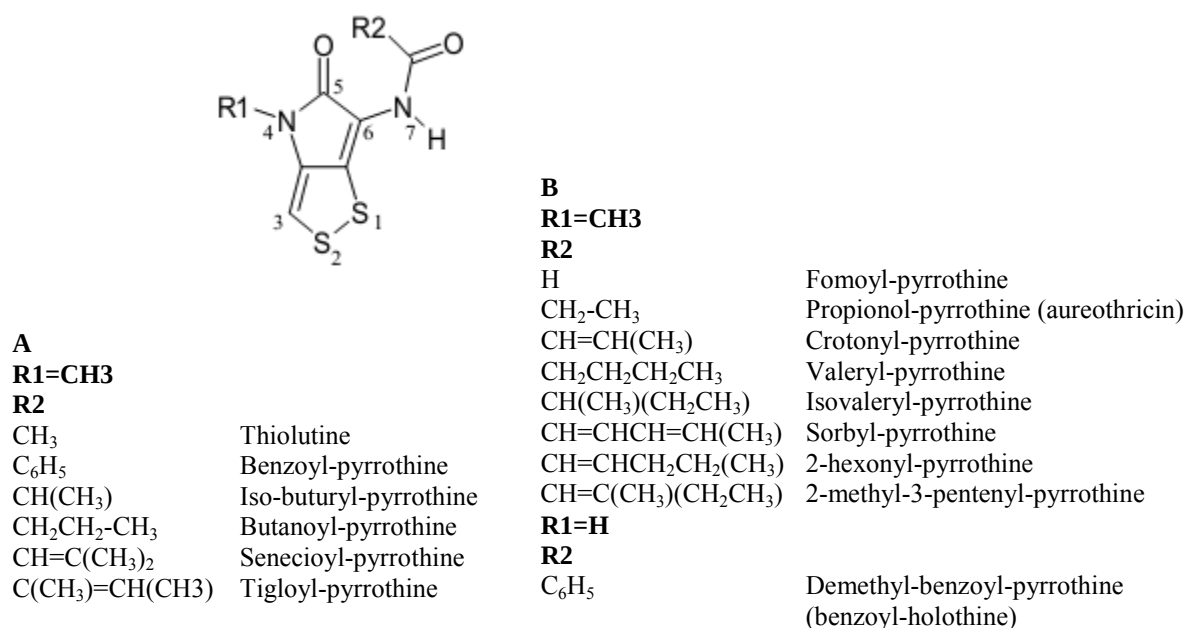


Figure 5. Structure des dithiopyrrolones produites par *Sa. algeriensis*. A produits naturels (Lamari *et al.*, 2002a), B produits par PDB (Precursor-Directed Biosynthesis)(Bouras *et al.*, 2008; Merrouche *et al.*, 2009; Merrouche *et al.*, 2011)

I.3 Enzymes de synthèse des peptides non ribosomiques (NRPSs) : enzymes clés de la biosynthèse des métabolites secondaires

Les NRPSs (Non-Ribosomal Peptide Synthases) sont des enzymes multifonctionnelles organisées en modules et responsables de la synthèse des peptides. Chaque module possède plusieurs activités catalytiques (domaines) qui fonctionnent de manière coordonnée pour diriger la synthèse d'un peptide (**Figure 6**).

Lors de la synthèse des peptides, les acides aminés ou les substrats peptidiques sont d'abord activés par un domaine d'Adénylation, domaine A, puis ils sont liés de manière covalente à un domaine PCP, Peptidyl Carrier Protéine (ou T domaine). Ensuite, ces peptides en élongation sont livrés au domaine de condensation (domaine C) en aval, où la formation de la liaison peptidique se produit. Finalement, le peptide est catalysé par un domaine ThioEstérase (domaine TE) qui permet de libérer le produit final (Mitchell *et al.*, 2012).

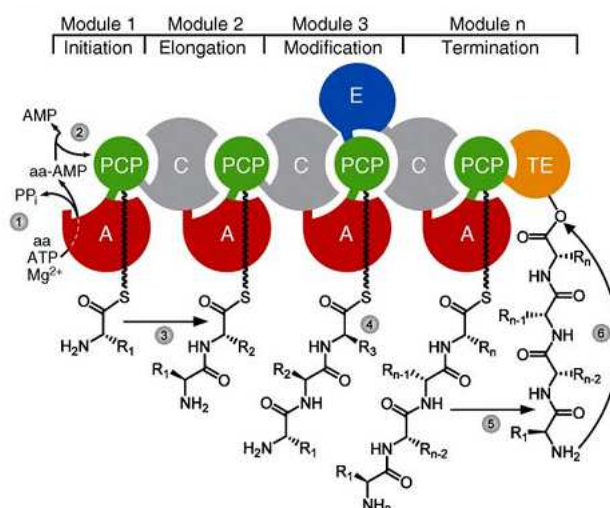


Figure 6. Synthèse des peptides non ribosomiques. (1) L'acide aminé est activé sous forme aminoacyl-AMP par le domaine d'adénylation (A). (2) Le transfert de l'acide aminé activé sur le domaine PCP. (3) La condensation de l'acide aminé associé au PCP. (4) La possibilité de modifications de l'acide aminé, par exemple, par un domaine d'épimérisation (E). (5) La transestérification de la chaîne peptidique associée au domaine PCP vers le domaine TE. (6) La libération de produit catalysé par le domaine TE, soit par une hydrolyse soit par une macrocyclisation (Strieker *et al.*, 2010)

Malgré la diversité structurelle des NRPs, leur mode de synthèse est hautement conservé. Classés en trois catégories, la biosynthèse des NRPs peut se produire de manière linéaire (de type A), itératif (Type B), ou non-linéaire (de type C) (Mootz *et al.*, 2002). Les NRPSs qui catalysent cette formation de NRPs sont classées en trois catégories en fonction des domaines qui les composent : les domaines centraux, les domaines auxiliaires et les domaines d'initiation et de terminaison.

I.3.1 Domaines des NRPSs

I.3.1.1 Les domaines centraux

Les domaines centraux des NRPSs sont représentés par les domaines d'adénylation A, de PCP et de condensation C. Le domaine A, d'environ 550 aa, à la fois sélectionne, active et transfère l'acide aminé vers le domaine PCP. Le domaine PCP, d'environ 80-100 aa, attache les précurseurs, et finalement le domaine C, d'environ 450 aa, catalyse la formation de la liaison peptidique (Hur *et al.*, 2012).

Initialement, le domaine A reconnaît et active les acides aminés en deux étapes. Tout d'abord, il se lie sélectivement à l'acide aminé apparenté et le transforme en un produit intermédiaire l'aminocyl adénylé en utilisant de l'ATP. Ensuite, le substrat adénylé subit une attaque nucléophile par le thiol sur le bras 4'-phosphopantéthéine du domaine PCP, en formant un thioester lié à l'aminocyl-S-PCP (**Figure 7**).

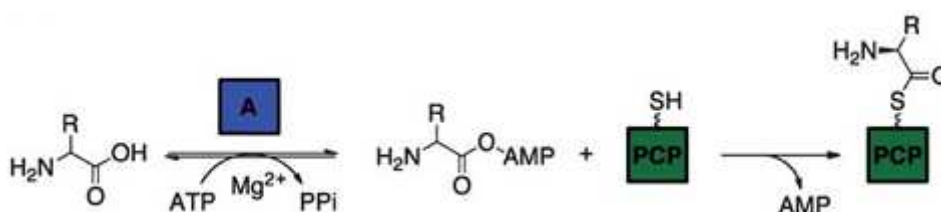


Figure 7. Réaction d'adénylation dans NRPS

Les domaines PCP sont sous forme d'enzymes *apo*. Elles sont converties en enzymes *holo* suite à une modification post-traductionnelle réalisée par une phosphopantéthéinyle transférase (PPTase) (Lambalot *et al.*, 1996).

Les précurseurs de synthèse de NRPs (acides aminés libres ou chaîne peptidique) sont condensés par le domaine de condensation C, c'est une grande enzyme monomérique

située à l'extrémité N-terminale de chaque module d'élongation et qui catalyse la formation de liaisons peptidiques des deux substrats aminoacyles liés à des modules adjacentes, les PCP (Stachelhaus *et al.*, 1998). Les domaines C des NRPSs partagent le motif conservé HHXXXDG avec la famille des acyltransférases, comme par exemple la chloramphénicol acétyltransférase. Ce motif est censé jouer un rôle dans la formation de liaisons amides (Leslie, 1990).

1.3.1.2 Les domaines auxiliaires

Les modifications lors de la synthèse d'un peptide non ribosomiques sont effectuées par les domaines auxiliaires. Ces modifications sont généralement responsables de la diversité des NRPs finaux. Certaines de ces modifications incluent l'épimérisation (E), la cyclisation (Cy), l'oxydation (Ox), le méthyl-transférase (MT), la glycosylation, l'halogénéation, et la lipidation.

Le domaine d'épimérisation d'environ 450 acides aminés permet d'incorporer des acides aminés de type D. La présence de ces s acides aminés représente l'une des caractéristiques la plus originale pour les peptides non ribosomiques, et elle donne à ces produits naturels leurs conformations uniques (Peypoux *et al.*, 1999). L'incorporation de ces acides aminés peut se produire soit par une épimérisation, *in situ*, de l'atome C α d'un acide aminé de type L lié à la PCP lors de l'élongation peptidique. Ou bien par une activation directe d'un acide aminé D, produit par une racémase externe, par un domaine A, tel que le domaine A dans la NRPS de la fusaricidine (Keating *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2008).

L'incorporation d'hétérocycles, comme l'oxazoline et le thiazoline dans la vibriobactine et l'anguibactine respectivement, a été réalisée par le domaine de cyclisation Cy. De plus, des études approfondies sur la sélectivité du substrat du domaine Cy ont montré que le domaine Cy présente une forte spécificité pour son substrat donneur par apport à son domaine de condensation.(Sieber & Marahiel, 2005). Après hétérocyclisation, la thiazoline / oxazoline peut être soit oxydée en thiazole/ oxazole, comme on l'observe dans le thiostrepton, et l'épothilone, par un domaine d'oxydation (Ox) (Schneider *et al.*, 2003), soit réduit par un domaine de réduction (R) pour former la thiazolidine / oxazolidine, comme dans la pyochéline (Reimann *et al.*, 2001). Il a également été rapporté que le domaine C peut être remplacé par le domaine d'hétérocyclisation (Cyc) qui catalyse à la fois la formation de la liaison peptidique et la cyclisation des résidus, cystéine (Cys), sérine (Ser), et thréonine (Thr)

(Rausch *et al.*, 2007). Les domaines Cyc sont structurellement liés aux domaines C et sont supposés être une évolution spécialisée des domaines C (Keating *et al.*, 2002).

D'autres domaines auxiliaires peuvent se trouver dans les NRPSs comme le domaine *N*- and *C*-methyltransférase. Plusieurs peptides non ribosomiques sont constitués d'acides aminés méthylés *N*-et *C*, qui sont responsables de la bioactivité du produit naturel et donnent la conformation structurelle pour des réactions ultérieures dans la voie de biosynthèse, comme on l'observe dans les synthétases des cyclosporine et pyochéline (Patel & Walsh, 2001; Weber *et al.*, 1994).

I.3.2 Modules des NRPSs

Les domaines centraux et les domaines auxiliaires sont principalement impliqués dans les étapes d'élongation de la biosynthèse des NRPs. Par conséquent, l'assemblage enzymatique de NRPs est généralement entouré par un module d'initiation et un de terminaison. Dans le module d'initiation (également nommé module de chargement), se trouve souvent un module comportant deux domaines Adénylation (A) et Thiolation (T) (Fischbach & Walsh, 2006). Dans certains cas, le module d'initiation peut avoir une organisation à trois domaines C-A-T. Ces domaines se rencontrent souvent dans les chaînes peptidiques qui possèdent des peptides *N*-acylés, tels que la plipastatine (Steller *et al.*, 1999).

Généralement, les modules de terminaison de NRPS contiennent un domaine thioestérase (TE) est responsable de la libération de la molécule par une hydrolyse. Cette réaction peut générer un acide aminé libre, comme lors de la biosynthèse de β -lactame, ou dans le TE qui peut favoriser la cyclisation intramoléculaire de la molécule pour donner lieu à un cycle lactone, comme par exemple dans la biosynthèse de macrolides (Fischbach & Walsh, 2006).

I.3.3 Les acyltransférases : nomenclature et fonctions métaboliques

Les acyltransférases (EC 2.3) sont des enzymes responsables du transfert d'un groupement acyl d'un composé « donneur » vers un composé « accepteur ». Ce transfert est souvent associé à la formation d'une liaison ester ou amide (sauf pour EC 2.3.3). Ces enzymes sont nommées suivant le schéma : « donneur : accepteur groupe transférase », les

noms formés de la façon suivante sont aussi acceptés : « accepteur groupe transférase » ou « donneur groupe transférase ».

Trois sous-classes existent dans la famille acyltransférase (IUBMB, en ligne) :

-EC 2.3.1 forme un groupe qui est responsable du transfert des groupes autres que les groupes amino-acyls. Beaucoup de ces enzymes peuvent se trouver dans cette sous famille comme par exemple la N-acétylglutamate synthase qui participe à la synthèse de l'arginine (EC 2.3.1.35, (Marvil & Leisinger, 1997). Les acyltransférases les plus importantes sont celles qui interviennent dans le métabolisme secondaire qui participent à la synthèse de nombreuses molécules bioactives comme la molécule taxol, un anticancéreux (Walker *et al.*, 2002), la pénicilline G (EC 2.3.1.164, Tobin *et al.*, 1990) ou la céphalosporine C (Gutierrez *et al.*, 1992).

-EC 2.3.2 regroupe les aminoacyltransférases comme la D-glutamyltransférase responsable de la formation de 5-glutamyl-D-glutamyl-peptide en reliant la L(ou D)-glutamine avec le D-glutamyl-peptide.

-EC 2.3.3 fait l'objet de sous-classes spécifiques qui catalysent la conversion du groupement acyl- en alkyl- au cours du transfert. Un exemple typique est la citrate synthase (EC 2.3.3.1) (Gottschalk, 1969) qui participe au métabolisme carboné central.

Les implications de différentes acétyltransférases dans la biosynthèse d'antibiotiques produits notamment par les bactéries du genre *Streptomyces* sont largement répandues. Chez *S. clavuligerus*, une ornithine-acétyltransférase semble agir comme un modulateur de la biosynthèse de l'acide clavulanique (de la Fuente *et al.*, 2004). Une arylamine N-acétyltransférase (NAT) responsable de la N-acétylation de l'acide 3-amino-hydroxybenzolic exogène chez *S. griseus* peut être impliquée dans le métabolisme des composés xénobiotiques (Suzuki *et al.*, 2007). Enfin, certains *Streptomyces* producteurs d'antibiotiques peuvent modifier enzymatiquement leurs propres antibiotiques pour éviter leur toxicité. Dans plusieurs cas, l'acétylation a été identifiée comme un mécanisme de résistance aux antibiotiques notamment chez les actinomycètes (Kobayashi *et al.*, 1987 ; Cundliffe 1989 ; Botterman *et al.*, 1991). Elle intervient notamment dans les résistances au chloramphénicol (Zaidenzaig *et al.*, 1979) et aux aminoglycosides (Shaw *et al.*, 1993).

I.4 Biosynthèse des dithiopyrrolones

Furumai *et al.* (1982) ont proposé pour la première fois une voie de biosynthèse potentielle de la propionyl-pyrrothine (auréothricine) produite par *Streptomyces kasugaensis*. La L-cystine a alors été identifiée comme précurseur potentiel du noyau pyrrothine. La formation de la liaison amide entre la pyrrothine et un acide organique activé sous forme d'un acyl-CoA a été proposée comme l'étape finale de la synthèse des dithiopyrrolones. Vingt ans après, de la Fuente *et al.* (2002) a mis en évidence l'existence d'une activité enzymatique catalysant l'acylation de l'holothine avec de l'acétyl-CoA chez *S. clavuligerus*. Le cluster de gènes de la voie de biosynthèse de l'holomycine (*hlm*) a été récemment identifié chez *S. clavuligerus* et caractérisé biochimiquement et génétiquement (Huang *et al.*, 2011; Li & Walsh, 2010). L'analyse détaillée d'*hlm* sera présentée dans le prochain paragraphe. Chez une autre bactérie, *Pseudoalteromonas* sp SANK 73390, le cluster de la voie de biosynthèse des dérivés de l'holothine (les xenorhabdins et les thiomarinoles) a été identifié. La voie de biosynthèse des thiomarinoles semble beaucoup plus complexe que celle de l'holomycine chez *S. clavuligerus*. En effet, elle contient deux clusters bien distincts, *tmp* pour la biosynthèse de l'acide marinolic et *hol* pour la biosynthèse de l'holothine (Fukuda *et al.*, 2011) (**Figure 8**). Un seul gène codant pour une NRPS a été caractérisé dans le cluster *hol*, mutant déficient pour ce gène a perdu sa capacité à produire les dérivés de l'holothine, mais les auteurs n'ont pas proposé une voie concernant la formation du noyau holothine.

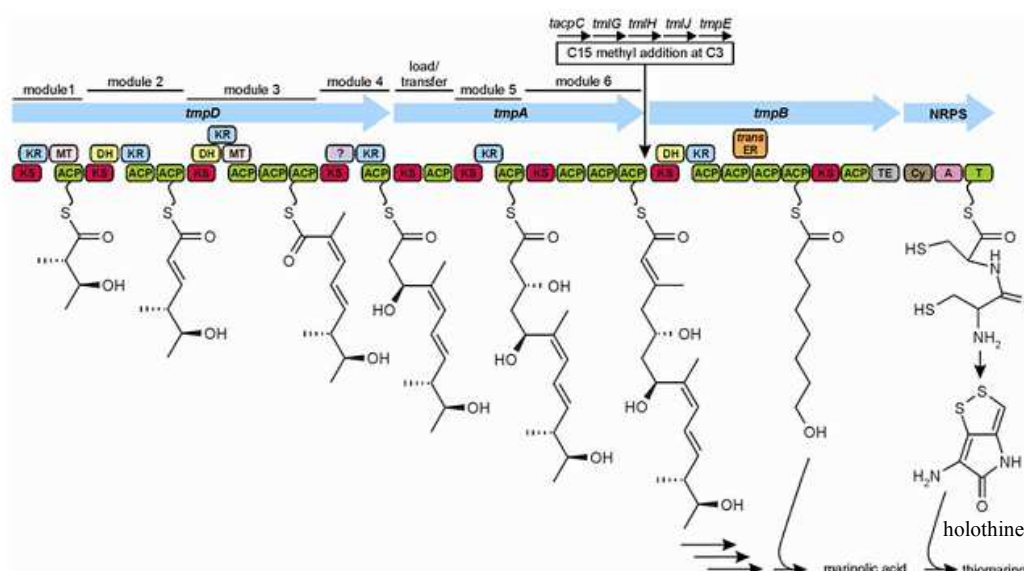


Figure 8. Schéma proposé pour la voie de biosynthèse de la thiomarinole (Fukuda *et al.*, 2011)

Très récemment, Qin *et al.* (2013) ont identifié le cluster de la voie de biosynthèse de l'holomycine chez une bactérie marine, Gram-négative, *Yersinia ruckeri*. Cette voie est très semblable à celle de la biosynthèse de l'holomycine chez *S. clavuligerus* proposée par Li & Walsh (2010) et Huang *et al.* (2011).

La comparaison des trois clusters chez les trois bactéries précédentes (**Figure 9**) montre la présence de sept gènes communs qui codent pour; une NRPS multi-domaines, une thioestérase, une acyl-CoA déshydrogénase, une glucose-méthanol-choline oxydoréductase; une lantibiotic décarboxylase, une acétyltransférase et une globine. La différence principale entre ces clusters est l'absence chez les bactéries Gram-négatives d'un gène qui code pour une thiorédoxine réductase et d'un gène qui code pour un domaine de condensation. Le rôle essentiel de la thiorédoxine réductase est déjà rapporté chez *S. clavuligerus* par contre le rôle du domaine de condensation est toujours inconnu chez ces bactéries.

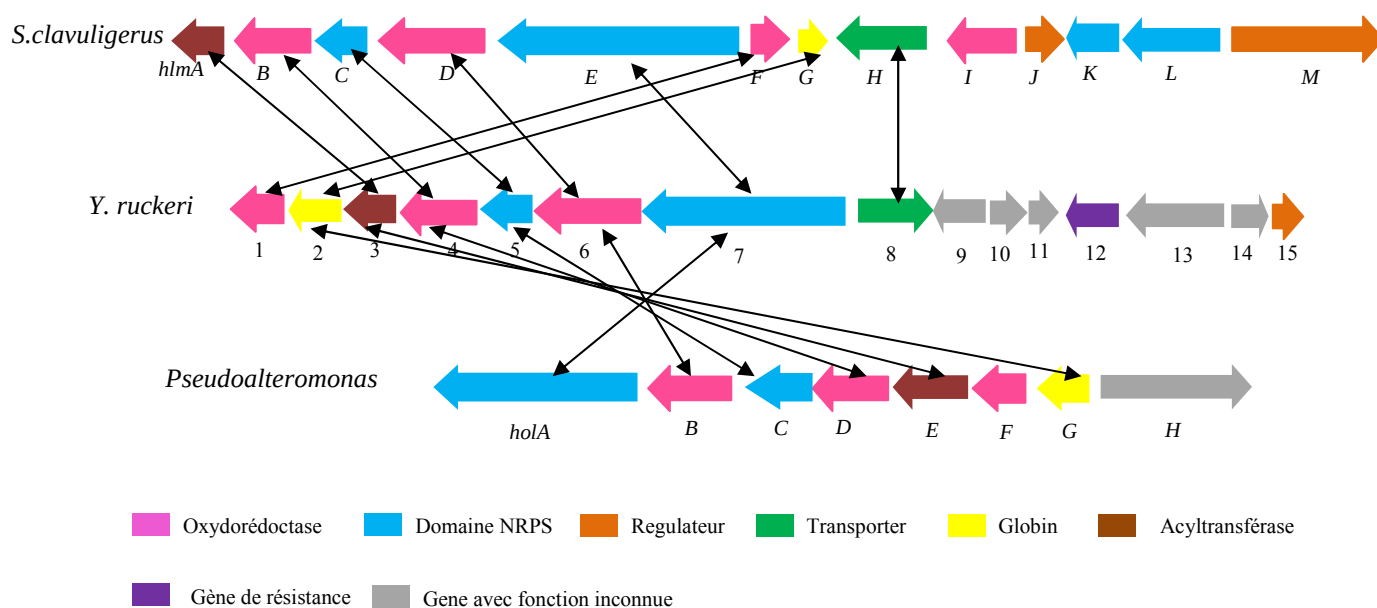


Figure 9. Comparaison des clusters de gènes de la voie biosynthèse des dérivés de l'holothine chez *S. clavuligerus*, *Y. ruckeri* et chez *Pseudoalteromonas* (Fukuda *et al.*, 2011; Li & Walsh, 2010; Qin *et al.*, 2013)

I.4.1 Cluster de la voie de biosynthèse de l'holomycine chez *S. clavuligerus*

Le cluster de la voie de biosynthèse de l'holomycine chez *S. clavuligerus* se compose de 12 gènes selon Hung *et al.* (2011), ou de 13 gènes selon Li & Walsh (2011), couvrant une

région d'environ 17.6 kb et annotés de *hlmA* à *hlmM* (**Figure 10A**). Ce cluster se décompose en 6 catégories de fonctions : Oxydoréductase (*hlmB*, acyl-CoA déshydrogénase; *hlmD*, glucose-méthanol-choline oxydoréductase; *hlmF*, lantibiotic décarboxylase; *hlmI*, thiorédoxine-désulfite oxydoréductase), NRPS (*hlmC*, thioestérase; *hlmE*, NRPS mutlidomaine; *hlmK*, thioestérase inactive; *hlmL*, domaine de condensation), Régulateur (*hlmJ* et *hlmM*, régulateurs de transcription), Acyltransférase (*hlmA*, acétyltransférase), Transporteur (*hlmH*, major facilitator family transporter), Globine (*hlmG*, globine). La différence entre les deux auteurs est l'annotation des gènes *hlmJ*, *hlmK*, *hlmL* et *hlmM* (Tableau 7). Pour le gène *hlmM*, il n'a pas été identifié chez Hung *et al.* (2011). Martin *et al.* (2012) confirment l'annotation de Li & Walsh (2011) et la présence de 13 gènes dans le cluster en se basant sur la zone SPT (Start Point Transcription). Cependant, la fonction des gènes *hlmJ* à *hlmM* n'est pas encore identifiée.

Tableau 7: Différence d'annotation des gènes entre Li *et al.*, (2011) et Hung *et al.*, (2011)

Numéros d'accession	Gènes selon Li & Walsh (2011)	Fonction	Gènes selon Hung <i>et al.</i> (2011)	Fonction
SCLAV_5276	<i>hlmJ</i>	Régulateur	<i>homJ</i>	Thioestérase
SCLAV_5277	<i>hlmK</i>	Thioestérase	<i>homK</i>	Domaine de condensation
SCLAV_5278	<i>hlmL</i>	Domaine de condensation	<i>homL</i>	Régulateur de transcription
SCLAV_5279	<i>hlmM</i>	Régulateur de transcription LuxR		

Bien que, l'ordre, les étapes et les gènes ne soient pas encore tous caractérisés, une voie de biosynthèse de l'holomycine a été proposée (**Figure 10B**). Dans cette voie, la cystéine qui représente le précurseur direct du noyau pyrrothine, est activée via une NRPS codée par *hlmE* pour former la cystéine-S-HlmE. Cette dernière subit une déshydrogénation via une acyl-CoA déshydrogénase codée par *hlmB*. Un doute sur la formation du dipeptide-S-HlmE reste encore à éclaircir. Ainsi, la formation de la liaison peptidique L-Cys-L-Cys, peut-être, catalysée par le domaine de condensation codé par *hlmL*, cependant la formation de cette liaison par le domaine de cyclisation HlmE reste possible (Li & Walsh 2010). La libération de la chaîne peptidique se fait par un domaine thioestérase codé par *hlmC*. Une putative phosphopantothénocystéine décarboxylase (PPC-DC) codée par *hlmF* catalyse la décarboxylation de l'intermédiaire. Ainsi, un mutant déficient pour ce gène n'a pas pu produire l'holomycine, ce qui indique le rôle clé de ce gène dans la biosynthèse de

l'holomycine. Une nouvelle classe de thiorédoxine oxydoréductase codée par *hlmI*, qui utilise l'O₂, responsable de la formation du pont disulfure intramoléculaire de l'holomycine, a été caractérisée (Li & Walsh, 2011). L'activité acyltransférase codée par *hlmA* responsable de l'incorporation du groupe acyl sur le noyau holothine a été également purifiée et caractérisée. Une incertitude reste encore sur l'ordre d'intervention de ces 2 gènes.

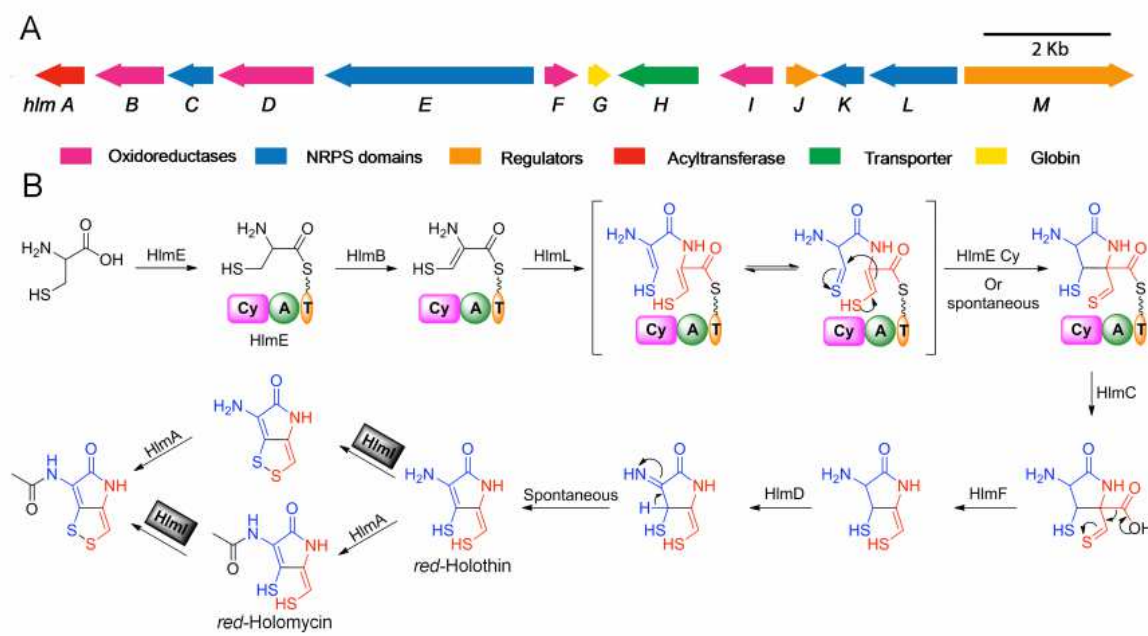


Figure 10. Le cluster de gènes de la voie de biosynthèse de l'holomycine chez *S. clavuligerus*. **A**, Les gènes sont colorés selon la fonction. *hlmA*, acyltransférase; *hlmB*, acyl-CoA déshydrogénase; *hlmC*, thioestérase; *hlmD*, glucose-méthanol-choline oxydoréductase; *hlmE*, NRPS (Cyclization-Adenylation-Thiolation, Cy-A-T); *hlmF*, antibiotique décarboxylase; *hlmG*, globine; *hlmH*, major facilitator family transporter; *hlmI*, thiorédoxine-désulfite oxydoréductase; *hlmJ*, *hlmM*, transcriptionnel régulateurs; *hlmK*, domaine thioestérase inactive; *hlmL*, domaine de condensation (Li & Walsh, 2011). **B**, la voie de biosynthèse l'holomycine proposée par Li & Walsh (2011)

I.4.2 Caractérisation des gènes clés dans le cluster de la voie de biosynthèse de l'holomycine chez *S. clavuligerus*

I.4.2.1 Non Ribosomal Peptide Synthase (NRPS)

Certaines molécules bioactives d'origine microbienne sont des peptides non ribosomiques (NRPs) comme la pénicilline et la céphalosporine (Fischbach & Walsh, 2006).

Dans le cas de l'holomycine, le cluster de gènes *hlm* code pour un seul multi-domaine NRPS (*hlmE*) (**Figure 11**). Cette enzyme comprend trois domaines ; cyclization (Cy), Adénylation (A), et Thiolation (T ou PCP pour «peptidyl carrier protein») avec l'ordre suivant Cy-A-T. Le domaine Cy peut avoir une double fonction associant à la fois la formation de la liaison peptidique et ensuite la cyclisation des motifs thiazolyle (Miller *et al.*, 2002a). Les deux domaines C-terminaux sont la thiolation (T) et l'adénylation (A).

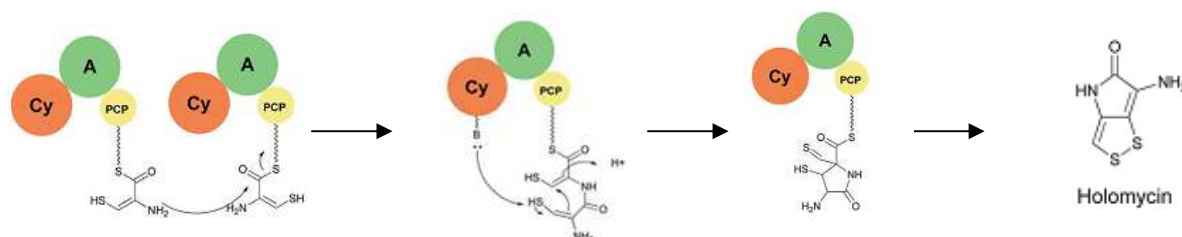


Figure 11. Réactions catalysées par une NRPS, ayant un module Cy-A-PCP, au cours de la biosynthèse de l'holomycine (Condurso & Bruner, 2010)

Grâce aux études bioinformatiques et notamment grâce à la prédiction de la spécificité des acides aminés du domaine A (<http://www.nii.res.in/searchall.html>) de diverses NRPS, il est possible de prévoir la spécificité du domaine d'adénylation pour HlmE (**Tableau 8**).

Tableau 8: Prédiction de la nature de l'incorporation d'acides aminés selon la séquence du site actif du domaine A d'une NRPS (Stachelhaus *et al.*, 1999)

Domaine	Positions du site actif du domaine A de NRPS										Similarité %
	235	236	239	278	299	301	322	330	331	517	
Asp	D	L	T	K	V	G	H	I	G	K	30
Thr	D	F	W	N	I	G	M	V	H	K	30
Ser	D	V	W	H	L	S	L	I	D	K	30
Cys	D	L	Y	N	L	S	L	I	W	K	70
HlmE	D	L	Y	N	D	A	L	Y	W	K	

Ainsi, selon ce tableau, le domaine d'adénylation (A) de HlmE présente une similarité de 70 % avec le site de reconnaissance de la cystéine (Huang *et al.*, 2011), ceci est en accord avec les essais précédents qui montrent que la L-cystéine est un précurseur intervenant dans la biosynthèse des dithiolopyrrolones (Furumai *et al.*, 1982). Le domaine A montre une forte

affinité pour la L-Cys par rapport aux autres acides aminés protéinogéniques, dont le L-Ser, L-Ala et L-Met (Figure 12).

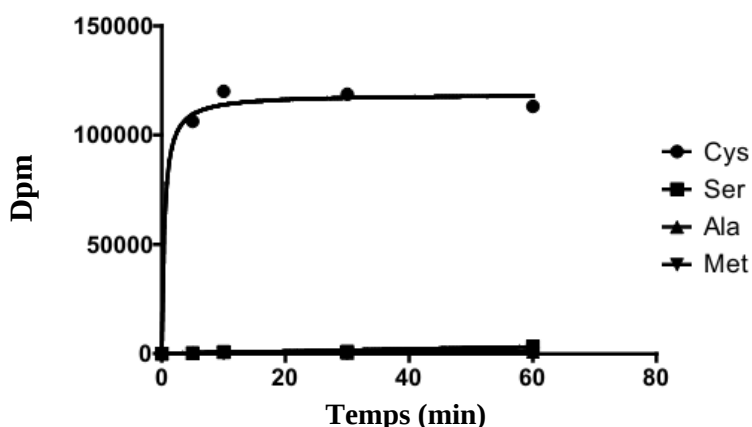


Figure 12. Dosage d'échange ATP³²-PPi de HlmE recombinante pour l'activation de la L-Cys, L-Ala, L-Ser, L-Met (Li & Walsh, 2010)

La caractérisation cinétique de cette protéine avec l'acide aminé L-Cys a indiqué qu'un fort échange est compatible avec la L-Cys comme substrat physiologique (K_m de 1 mM et K_{cat} de 98 min⁻¹) (Li & Walsh, 2010). Le domaine N-terminal de HlmE présente une forte homologie avec d'autres domaines d'hétérocyclisation connus (Cy), comme Curf, trouvé dans la biosynthèse de la curacin A (41 % d'identité et 58 % de similarité), TugD, trouvé dans la biosynthèse de la thuggacin (45 % d'identité et 59 % de similarité), et le CtaC, trouvé dans la biosynthèse de la cystothiazole A (43% d'identité et 61 % de similitude) (Buntin *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2004; Feng *et al.*, 2005).

Les trois autres protéines NRPS trouvées dans ce cluster de gènes sont HlmC pour un domaine thioestérase; HlmL pour un domaine de condensation, et HlmK pour un domaine thioestérase silencieux, cette annotation est proposée par Li & Walsh (2011).

I.4.2.2 Thiorédoxine-désulfite oxidoréductase (HlmI)

Il est rare, pour les produits naturels d'origine bactérienne, de contenir une liaison disulfure. Le mécanisme de la formation des ponts disulfures dans ces produits n'est pas complètement élucidé. Une étude récente a indiqué qu'une DEPH, une oxydoréductase dépendante du FAD, est impliquée dans la formation de liaisons disulfures dans la molécule

FK228 produite par la bactérie du sol, *Chromobacterium violaceum* numéro 968 (Wang *et al.*, 2009). DEPH est une nouvelle sous-classe de la superfamille des protéines thiorédoxine qui contient un motif redox, CPYC, domaine conservé lié au FAD, et un domaine de liaison dépendant du NADP⁺/NADPH.

Chez *S. clavuligerus* un des gènes du cluster *hlmI* a été annoté comme une thiorédoxine réductase putative, avec 36 % d'identité et 55 % de similarité avec DEPH. La délétion de ce gène a donné un mutant incapable de synthétiser l'holomycine ce qui confirme son implication dans la voie de biosynthèse de l'holomycine chez *S. clavuligerus* (Huang *et al.*, 2011). Des études *in vitro* menées par (Li & Walsh, 2011) ont indiqué qu'une thiorédoxine réductase de type dithiol oxydase, HlmI, est bien responsable de la formation du pont disulfure à partir de dithiol. Fait intéressant, la suppression de *hlmI* a entraîné une perte importante de la production de l'holomycine mais pas totale. La quantité d'holomycine alors détectée est supposée être formée par l'oxydation spontanée. Cette délétion a considérablement augmenté la sensibilité du mutant envers l'holomycine, ce qui signifie que *hlmI* joue aussi un rôle important dans l'auto-protection (Li *et al.*, 2012).

Le cluster de gènes de la voie de biosynthèse des dérivés de l'holothine a également été identifié à partir de la bactérie marine *Pseudoalteromonas sp* SANK 73390 (Fukuda *et al.*, 2011). Cependant l'enzyme analogue à la dithiol oxydase (thiorédoxine réductase) n'est pas trouvée dans ce cluster ce qui suggère que cette bactérie a un autre mécanisme de formation des liaisons disulfures. Une absence similaire a également été observée dans le cluster de gènes de l'holomycine chez la bactérie Gram-négative *Yersinia ruckeri*, ce qui peut suggérer que le mécanisme de formation des liaisons disulfures est différent dans les bactéries Gram-négatives (Qin *et al.*, 2013).

I.4.2.3 Acyltransférase (HlmA)

A ce jour, aucun mutant *S. clavuligerus* n'a été réalisé pour ce gène, mais la forme surexprimée et purifiée de la protéine codée par ce gène a déjà été obtenue. Cette protéine a pu convertir, *in vitro*, l'holothine en holomycine et en certains dérivés, en utilisant différents acyl-CoA comme groupes donneurs (Li & Walsh, 2010). A part l'holomycine, aucun autre dérivé obtenu, tels que l'hexanoyl-holothine, l'octanoyl-holothine et le palmitoyl-holothine (**Figure 13A**), n'est encore produit *in vivo* par *S. clavuligerus*. Des dérivés dithiolopyrrolones ont aussi été obtenus par voie enzymatique chez *Sa. algeriensis* à partir d'un extrait brut en

utilisant comme substrat la pyrrothine à la place de l'holothine et différents acyl-CoA comme groupes donneurs (Chorin, 2009). Il est très intéressant de signaler que HlmA, surexprimée et purifiée, a pu produire en très faible quantité seulement du benzoyle-holothine (**Figure 13A**). En revanche, même avec de l'extrait brut, *Sa. algeriensis* montre cette capacité (**Figure 13B**) (Chorin *et al.*, 2009). Ceci tend à montrer la différence entre les 2 systèmes acyltransférases impliqués dans la biosynthèse des dithiopyrrolones chez ces 2 bactéries.

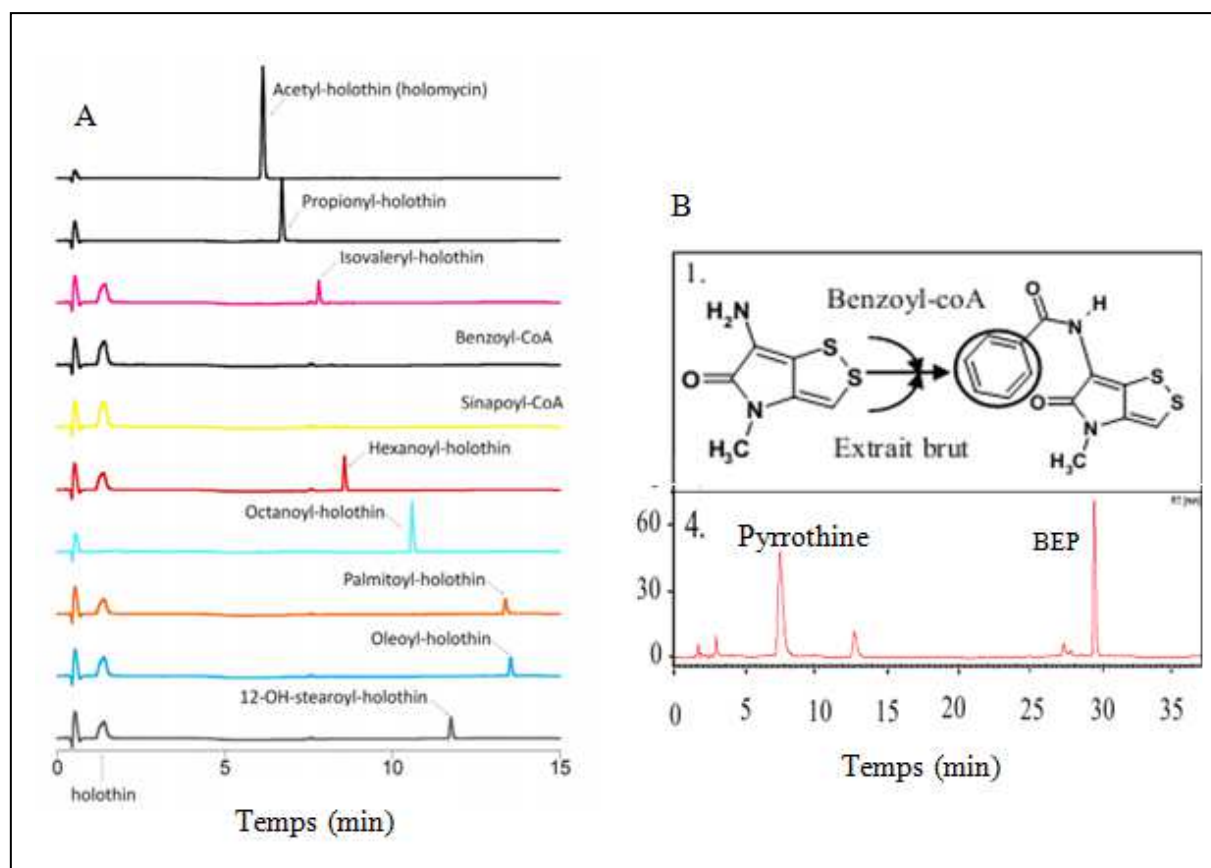


Figure 13. A, activité acyltransférase de HlmA. La carte montre les chromatogrammes de produits issus de l'acylation de l'holothine en présence de : acétyl-CoA, propionyl-CoA, isovaleryl-CoA, benzoyl-CoA, sinapoyl-CoA, hexanoyl-CoA, octanoyl-CoA, palmitoyl-CoA, oleoyl-CoA et stearoyl-CoA (Li & Walsh, 2010). **B, Chromatogramme du produit issu de l'acylation de la pyrrothine par l'extrait brut de *Sa. algeriensis* en présence de benzoyl-CoA (Chorin *et al.*, 2009)**

I.5 Régulation de la production des dithiopyrrolones

I.5.1 Régulation exercée par les milieux de culture

Bien que la production des dithiopyrrolones par les bactéries soit découverte depuis longtemps, aucune étude n'a été réalisée sur l'optimisation de production de ces antibiotiques ou sur l'influence du milieu de culture, jusqu'aux essais réalisés par Bouras *et al.* (2005). Ces auteurs ont étudié pour la première fois l'effet de la composition du milieu de culture sur la croissance de *Sa. algeriensis* et la production des dithiopyrrolones. Depuis, plusieurs travaux (Bouras, 2005; Bouras *et al.*, 2006a; Bouras *et al.*, 2006b; Bouras *et al.*, 2007; Bouras *et al.*, 2008; Chorin *et al.*, 2009; Merrouche *et al.*, 2009; Merrouche *et al.*, 2011; Strub *et al.*, 2008) ont été réalisés toujours sur la même bactérie dans le but de :

- Mieux comprendre les mécanismes de régulation de la production des dithiopyrrolones
- Améliorer la production des dithiopyrrolones
- Influencer la nature des dithiopyrrolones synthétisés et orienter la production vers un dérivé donné.

Dans un premier temps, plusieurs milieux complexes ont été utilisés (Bouras, 2005; Lamari, 2006) puis un milieu appelé semi-synthétique (SS) (car sa composition est presque totalement déterminée) a été utilisé (Bouras, 2005; Lamari 2006). Ce milieu contient (par litre d'eau distillée) 10 g de D(+) glucose, 2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g de NaCl, 0,5 g de KH_2PO_4 , 1 g de K_2HPO_4 , 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 g d'extrait de levure et 5 g de CaCO_3 . Le glucose s'est avéré être une meilleure source de carbone par rapport à la dextrine et l'amidon pour la production des dithiopyrrolones (Lamari, 2006). Le carbonate de calcium peut à la fois tamponner le milieu et favoriser la croissance et la production des dithiopyrrolones. Cet effet est peut-être lié à sa capacité de disperser les pelotes de mycélium, ce qui améliore les transferts de matière (Lamari, 2006).

Strub (2008) a étudié l'utilisation de MOPS au lieu de CaCO_3 pour faciliter à la fois la détermination de la masse sèche et le travail en fermenteur (milieu SS-MOPS). Ce milieu stimule la croissance de *Sa. algeriensis* puisqu'il permet d'obtenir $2,25 \text{ g L}^{-1}$ de MS après 150 h de culture par apport de $1,67 \text{ g L}^{-1}$ pour CaCO_3 . Enfin, la recherche d'un milieu complètement synthétique pour la croissance de *Sa. algeriensis* a été bien approfondi par

Strub (2008). Dans cette étude, l'optimisation de sources de carbone a été envisagée. La composition du milieu est celle du SS-MOPS sauf pour l'extrait de levure qui a été substitué tour à tour par des acides aminés, des bases azotées et des oligoéléments. En effet, sans extrait de levure (milieu SS-ELneg), la croissance de *Sa. algeriensis* s'avère très faible : la MS est inférieure à $0,5 \text{ g L}^{-1}$ après 150 h de culture. L'ajout d'acides aminés au milieu SS-ELneg a permis d'améliorer la croissance par rapport à un milieu sans extrait de levure, notamment l'uracile a permis d'obtenir une MS de $1,35 \text{ g L}^{-1}$ par rapport à $0,32 \text{ g L}^{-1}$ sans uracile. Ainsi l'ajout de TYR, SER, THR, CYST et de MET, simultanément, à une concentration de 5 mM chacun, permet d'atteindre une MS maximale de $1,51 \text{ g L}^{-1}$ après 150 h. Cependant, cette biomasse maximale reste inférieure à celle obtenue sur le milieu SS-MOPS ($2,25 \text{ g L}^{-1}$) (Strub, 2008).

Ainsi, aucun milieu synthétique ne peut supporter une croissance aussi forte et rapide que le milieu SS-MOPS n'a pu être trouvé. Par conséquent les études physiologiques menées sur *Sa. algeriensis* ont été réalisées sur des milieux semi-synthétiques, SS ou SS-MOPS, comportant 2 g L^{-1} d'extrait de levure (Bouras, 2005; Strub, 2008).

I.5.1.1 Influence de l'acide aminé

L'influence de l'ajout d'acides aminés dans le milieu SS sur la production des dithiopyrrolones par *Sa. algeriensis* a été bien étudiée notamment l'ajout des acides aminés soufrés (Bouras *et al.*, 2006b). Ses essais se sont basés sur l'idée que ces acides aminés soufrés peuvent représenter un précurseur direct pour le noyau des dithiopyrrolones, la pyrrothine. L'effet différent de ces acides aminés sur la production de différents dérivés de dithiopyrrolones complique l'idée sur leur rôle comme précurseurs directs. Par exemple, à une concentration de 5 mM, la L-cystine a augmenté la production spécifique de la thiolutine de 20 fois, à la même concentration la L-cystéine a diminué cette production de 0.35 fois. La production spécifique de butyryl-pyrrothine (BUP) a diminué de 10 fois à 5 mM de L-cystine et a augmenté de 20 fois avec 5 mM de L-cystéine. La production spécifique de tigloyl-pyrrothine (TIP) est diminuée de 10 fois et de 0.35 fois par l'ajout de 5 mM de L-cystéine et de L-cystine respectivement (Bouras *et al.*, 2006a). Par ailleurs, avec des concentrations à partir de 10 mM, ces acides aminés ont un effet inhibiteur sur la production de ces dithiopyrrolones. Cet effet différent montre que ces acides aminés soufrés peuvent posséder

d'autres rôles autres que celui de précurseurs du noyau pyrrothine, comme par exemple un rôle de régulateurs en tant que sources de carbone et d'azote.

Finalement, la découverte de la voie de biosynthèse de l'holomycine chez *S. clavuligerus*, où la cystéine représente le précurseur direct du noyau pyrrothine a permis d'exclure l'hypothèse sur le rôle de la cystine comme précurseur direct (Li & Walsh, 2010). Par ailleurs, cela n'a pas permis de fournir plus d'information sur le rôle régulateur de ces acides aminés.

I.5.1.2 Influence de l'acide organique

L'hypothèse faite sur la dernière étape de formation des dithiolopyrrolones, qui comprend l'acylation du noyau pyrrothine à partir d'acides organiques présents dans le milieu de culture activés sous forme d'acyls-CoA, a permis de développer une stratégie. Cette stratégie est basée sur l'idée que la nature des acides organiques ajoutés au milieu de culture peut jouer un rôle de précurseurs potentiels des différents dérivés de dithiolopyrrolones. En effet, la nature de l'acyl-CoA incorporé sur le noyau pyrrothine détermine la nature du groupement R₂ des dithiolopyrrolones synthétisées.

L'effet des acides organiques sur la nature et le niveau de production des dithiolopyrrolones a donc fait l'objet de travaux réalisés par Bouras *et al.* (2007, 2008). Dans ces études, environ 90 acides organiques ont été testés. L'ajout de certains acides organiques au milieu de culture influence la production des dithiolopyrrolones déjà produites sur le milieu SS basal. Cette influence est très variable suivant le dérivé dithiolopyrrolone considéré (Bouras *et al.*, 2007). Parmi les acides organiques qui ont montré un effet positif significatif sur la production des dithiolopyrrolones deux grands cas se distinguent :

-Modèle N°1 : la structure de l'acide organique correspond au radical R₂ de la dithiolopyrrolone dont la production est favorisée. Suivant ce modèle, l'ajout d'acide butyrique et d'acide tiglique ont permis de multiplier respectivement par 14,9 et 7,4 la production spécifique de butanoyl-pyrrothine (BUP) et de tigloyl-pyrrothine (TIP). Par contre, l'ajout d'acide acétique n'a pas montré d'effet significatif sur la production de thiolutine.

-Modèle N° 2 : l'acide organique n'est pas le précurseur direct de la dithiolopyrrolone dont la synthèse est stimulée et sa structure ne correspond pas au radical R₂. Suivant ce

modèle, l'ajout d'acide sorbique a permis de multiplier la production spécifique de BUP par 118. La production spécifique d'iso-buturyl-pyrrothine a été multipliée par 21,6 en présence d'acide crotonique.

Par ailleurs, certains dérivés peuvent être obtenus par l'ajout des différents acides organiques dans le milieu de culture. Par exemple, les productions spécifiques de SEP et de BUP ont été fortement stimulées par l'ajout des acides valérique et méthacrylique respectivement. Dans ces deux cas, il est possible d'émettre des hypothèses quant aux voies métaboliques permettant de convertir l'acide organique ajouté, en précurseur direct de la dithiolopyrrolone dont la production est augmentée. Ainsi, certaines voies métaboliques bactériennes (notamment du catabolisme des acides aminés branchés) pourraient permettre la conversion des acides valérique et méthacrylique en sénéciol-CoA et buturyl-CoA respectivement (Zhang *et al.*, 1999) et directement incorporés sur le noyau pyrrothine.

Très récemment, la conversion de L-phénylalanine, de l'acide cinnamique et de l'acide benzoïque en benzoyl-CoA a été signalée pour la première fois chez *S. maritimus* (Noda *et al.*, 2012) (**Figure 14**). Cela peut, peut-être, expliquer la stimulation de la production de BEP chez *Sa. algeriensis* quand le milieu SS supplémenté par les trois composants précédents.

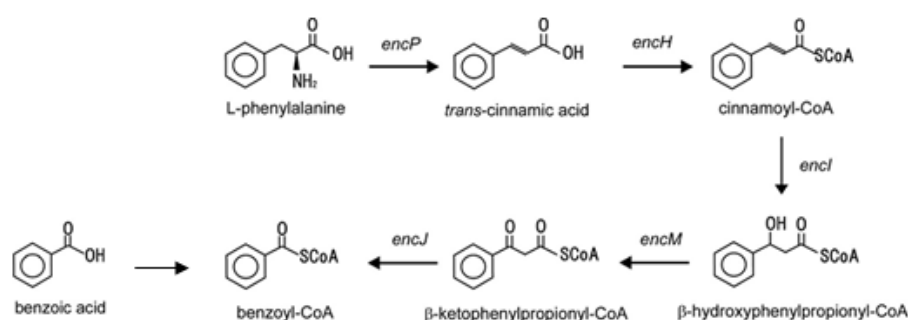


Figure 14. Voie proposée de la biosynthèse de benzoyl-CoA à partir de la L-phénylalanine et de l'acide benzoïque chez *Streptomyces maritimus* (Noda *et al.*, 2012)

I.5.1.3 Production «à la carte» des nouvelles dithiolopyrrolones par *Sa. algeriensis*

Des nouveaux dérivés de dithiolopyrrolones sont produits par *Sa. algeriensis* grâce à l'ajout de certains acides organiques dans le milieu de culture. Ces dérivés n'étaient pas

détectés en absence de ces acides. Six nouvelles dithiopyrrolones ont ainsi été isolées du surnageant de *Sa. algeriensis* sur le milieu SS supplémenté en acides organiques à 5 mM dont trois sont des dithiopyrrolones correspondants à l'incorporation directe de l'acide organique ajouté au milieu de culture. La valéryl-pyrrothine a été obtenue par l'ajout d'acide valérique directement précurseur de cette dithiopyrrolone (Bouras *et al.*, 2008; Merrouche *et al.*, 2009). La déméthyl-benzoyl-pyrrothine (ou benzoyl-holothine) a été produite en présence d'acide benzoïque, et la sorbyl-pyrrothine a été produite par l'ajout d'acide sorbique (Merrouche *et al.*, 2011). L'acide sorbique stimule également la production de la crotonyl-pyrrothine, 2-hexanoyl-pyrrothine et le 2-méthyl-3-pentenyl-pyrrothine.

Le procédé qui dirige cette incorporation directe de ces acides sur le noyau pyrrothine est déjà connu sous le nom de PDB pour « Precursor-Directed Biosynthesis » qui contrôle la production des métabolites secondaires et permet d'obtenir de nouveaux métabolites bioactifs. Lam *et al.* (2001) ont utilisé cette méthode pour synthétiser des fluoroindolocarbazoles différentes chez *Sa. aercolonigenes*. La limitation principale de ce procédé est le catabolisme du précurseur ajouté. En effet, l'ajout de tous les acides organiques ne mène pas à la production de la dithiopyrrolone correspondante. Par exemple, l'ajout d'acide cinnamique ne permet pas la production de la cinnamoyl-pyrrothine. La transformation de L-phénylalanine chez *Streptomyces maritimus* en acide cinnamique, qui à son tour, donne le benzoyl-CoA (**Figure 15**) représente un bon exemple de la limitation de ce procédé (Noda *et al.*, 2012).

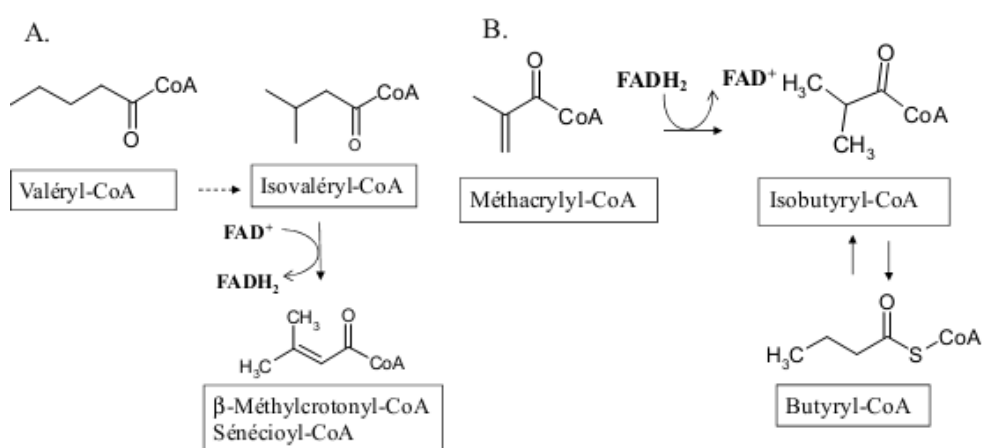


Figure 15. Voies métaboliques potentielles pour la conversion des acides gras d'après Zhang *et al.* (1999). A. Conversion du valéryl-CoA en sénéciol-CoA – B. Conversion du méthacrylyl-CoA en butyryl-CoA

I.5.2 Régulation génétique non-spécifique

I.5.2.1 Interaction entre les voies de biosynthèses des métabolites secondaires

Les régulations génétiques non spécifiques des dithiolopyrrolones ont été découvertes pour la première fois, par hasard, lors de l'étude de la voie de biosynthèse de l'acide clavulanique chez *S. clavuligerus* (**Figure 16**). L'interruption de 3 gènes différents, *cyp* (codant pour le cytochrome P450) ORF12 et ORF15, qui semblent être impliqués dans la conversion de l'acide clavaminique en clavaldehyde ou dans les étapes de sécrétion de l'acide clavulanique, a augmenté la production jusqu'à 250 fois de l'holomycine par rapport à la souche sauvage qui produit 11µg/mg d'ADN (de la Fuente *et al.* 2002). La raison pour laquelle la quantité d'holomycine produite a été augmentée chez les mutants n'est pas encore connue, mais une hypothèse a été proposée pour expliquer cette augmentation comme une induction par l'acide clavulinique ou un de ses intermédiaires. Cette hypothèse est supportée par le fait que les mutants bloqués aux niveaux de *ceaS* ou *bls*, des gènes impliqués dans les premières étapes de biosynthèse (**Figure 16**), ne produisent ni l'acide clavulinique ni ses intermédiaires, et sont incapables de produire l'holomycine. De plus, la souche sauvage *S. clavuligerus*, qui produit une faible quantité d'acide clavulanique et qui n'accumule pas assez d'intermédiaires, produit également une faible concentration d'holomycine.

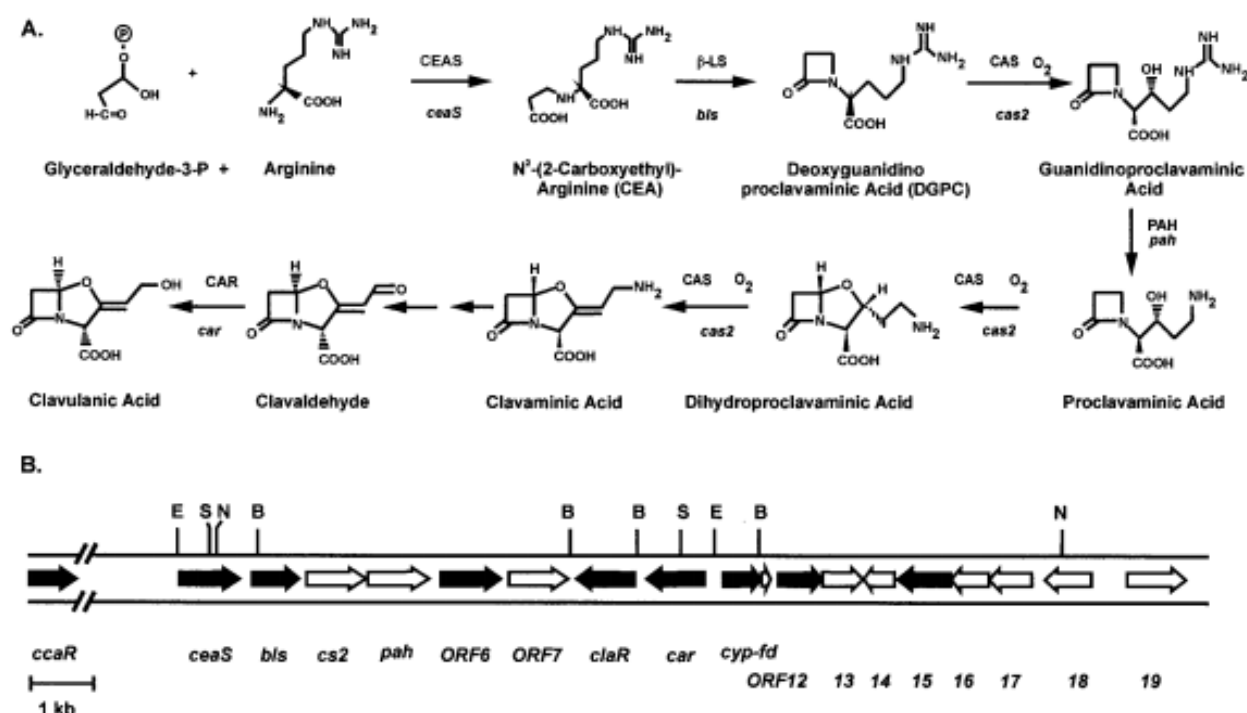


Figure 16 . A, la voie de biosynthèse de l'acide clavulanique, les produits intermédiaires connus et les gènes codant pour les différentes enzymes. B, organisation du cluster de gènes de l'acide clavulanique (de la Fuente *et al.*, 2002)

Par contre, tous les mutants producteurs d'holomycine ont montré une activité enzymatique holomycine synthase (acétyltransférase) beaucoup plus importante que les mutants non producteurs et la souche sauvage. Cela peut être dû à l'effet de l'acide clavulinique ou à l'un de ses intermédiaires qui induisent le gène codant pour cette enzyme ou qui améliore son activité, ce qui permet d'augmenter la production de l'holomycine. Le rôle du gène ORF15 (nommé après *oppA2*) est devenu plus précis après l'identification de la voie de biosynthèse de l'holomycine, *hlm*, chez *S. clavuligerus* (Li & Walsh, 2010). Robles-Reglero *et al.* (2012) ont comparé l'expression de tous les gènes du cluster *hlm* chez la souche sauvage et la souche mutée *S. clavuligerus oppA2::aph* (la souche *S. clavuligerus oppA2::aph* est la souche déficiente pour le gène ORF15 qui produit 250 fois plus d'holomycine (Lorenzana *et al.*, 2004)). Par rapport à la souche sauvage, *S. clavuligerus oppA2::aph* a montré un niveau d'expression beaucoup plus élevé pour les gènes : *hlmA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*, *H*, *I* et *hlmL*, une expression légèrement inférieure pour *hlmK* et pas de différence significative pour la transcription des deux gènes régulateurs putatifs, *hlmM* et *hlmJ* (Robles-Reglero *et al.*, 2012). Par conséquent, il est clair maintenant que l'interruption du gène ORF15 active le cluster *hlm* responsable de la biosynthèse d'holomycine, mais le mécanisme de cette activation n'est pas encore connu.

I.5.2.2 Rôle d'une protéine « rhodanese-like »

La caractérisation protéomique du mutant *S. clavuligerus oppA2::aph* a indiqué une surproduction d'une protéine qui a été identifiée comme rhodanese-like. Les rhodaneses sont normalement des enzymes mitochondriales eucaryotes qui catalysent la dismutation de l'anion thiosulfate ($S_2O_3^{2-}$). Au cours de cette réaction, l'un des deux atomes de soufre est oxydé en sulfite alors que l'autre est réduit en sulfure. La seule rhodanese étudiée chez un actinomycète est celle de *Saccharopolyspora erythraea* (Donadio *et al.*, 1990), codée par un gène nommé *cysA*. La suppression de ce gène chez *S. erythraea* donne un mutant auxotrophe incapable de croître sur un milieu contenant des sulfites ou du sulfate de sodium comme seules sources de soufre et qui nécessite l'ajout de méthionine, de cystéine ou de thiosulfate pour pouvoir croître. Les études transcriptionnelle du mutant *S. clavuligerus oppA2::aph* ont montré une surexpression du gène *rhlA* qui code cette protéine. Néanmoins, le rôle de cette protéine

rhodanese-like reste étrange. Des doubles mutants *S. clavuligerus oppA2::aphΔrhIA* ont fortement baissé la production d'holomycine, et à des niveaux moindres de la céphamycine C et de l'acide clavulanique par rapport à la souche parentale. Il a été proposé que le gène *rhIA* code pour une rhodanese impliquée dans la formation du pont S-S dans la molécule d'holomycine (éventuellement à travers un intermédiaire sulfocysteine). Mais la baisse de production d'acide clavulanique, même si ce dernier ne contient pas de soufre dans sa structure, infirme cette hypothèse. Donc une autre hypothèse a été émise, l'enzyme rhodanese-like pourrait être impliquée dans l'oxydo-réduction des ponts disulfures par un mécanisme similaire à celui des thiosulfate sulfurtransférases et pourrait exercer un effet général dans les cellules et plus particulièrement dans la formation de l'holomycine (Nardiz *et al.*, 2011).

I.5.2.3 Rôle d'un régulateur de l'arginine (*argR*)

Chez les bactéries, la biosynthèse de l'arginine est régulée par un régulateur universellement conservé, ArgR, qui régule l'expression des gènes de biosynthèse de l'arginine, ainsi que d'autres gènes importants pour le métabolisme de la cellule.

L'interruption d'*argR* chez *S. clavuligerus* NP1 a donné un mutant nommé CZR. *S. clavuligerus* NP1 est un mutant partiellement bloqué de la biosynthèse de céphamycine C mais qui présente un mode de croissance et de différenciation normal (de la Fuente *et al.*, 2004; Rodriguez-Garcia *et al.*, 2000; RodriguezGarcia *et al.*, 1997). Le mutant CZR présente des changements phénotypiques complexes au niveau de la croissance et de la production des antibiotiques et notamment la production de l'holomycine (Yin *et al.*, 2012). Ainsi, cette mutation montre une surexpression des enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'holomycine. Les cinq protéines surexprimées dans CZR sont, HlmB pour une acyl-CoA déshydrogénase, HlmD pour une glucose-méthanol-choline oxydoréductase, HlmF pour une protéine de biosynthèse de l'antibiotique, HlmG pour une globine et HlmI pour une thiorédoxine-disulfure réductase. D'autres enzymes sont également surexprimées chez ce mutant notamment les enzymes impliquées dans la biosynthèse d'acétyl-CoA et de cystéine comme la protéine RhIA, impliquée dans la formation de la cystéine (Nardiz *et al.*, 2011), précurseur direct de l'holomycine). Une hypothèse a été également proposée, la surproduction de l'holomycine est probablement due à des effets secondaires de la surproduction de l'arginine. Cette accumulation d'arginine pourrait entraîner une accumulation d'un intermédiaire de la voie de biosynthèse de l'acide clavulanique dans les cellules.

Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

II.1 Microorganisme

Saccharothrix algeriensis NRRL B-24137 (= DSM 44581) isolée à partir d'un échantillon de sol Saharien de la palmeraie d'Adrar, est utilisée dans cette étude (Lamari *et al.*, 2002a; Lamari *et al.*, 2002b).

II.1.1 Conservation de la souche

La souche est stockée sous forme de spores, conservées à -20 °C dans le glycérol à 20 % (v/v). Le stock de spores (banque de travail) est réalisé suivant le protocole décrit ci-dessous.

II.1.1.1 Production de spores

Des boîtes de Pétri contenant 30 mL d'ISP2 (la composition est présentée dans le paragraphe II.2.1) sontensemencées avec 50 µL de suspension de spores (récupéré de la banque de souche de notre laboratoire). Après étalement de l'inoculum au râteau, les cultures solides sont incubées 7 jours à 30 °C.

II.1.1.2 Récupération et stock des spores

Cinq mL d'une solution de Tween 80 à 0,1 % sont ajoutés dans les boîtes de Pétri. Les spores sont grattées à l'aide d'un râteau et récoltées dans la solution de Tween. La suspension de spores est ensuite filtrée sur coton cardé puis le filtrat obtenu est centrifugé pour éliminer le liquide. Le culot de spores est resuspendu dans une solution de glycérol stérile à 20 % (v/v) dans l'eau distillée. Le mélange est vortexé et réparti dans des cryotubes. Les tubes sont conservés à -20 °C.

II.1.1.3 Comptage des spores

Après 24 h de congélation à -20 °C, un cryotube conservé à -20 °C est décongelé. Des dilutions successives au 1/10 de la suspension de spores sont réalisées dans l'eau jusqu'à 10⁻¹⁰. Les dilutions 10⁻⁶ à 10⁻¹⁰ sontensemencées en double sur des boîtes ISP2 en étalant 100 µL de la suspension avec un râteau. Les boîtes sont incubées 7 jours à 30 °C. Les colonies sont

dénombrées sur les boîtes comportant 30 à 300 colonies. Le nombre de spores est exprimé en Unités Formant Colonies (UFC) par mL. La suspension de spores puis diluée afin d'avoir 10^7 UFC/mL

II.2 Milieux et conditions des cultures microbiennes

II.2.1 Milieux de culture

II.2.1.1 ISP2

Les cultures solides en Boîte de Pétri de *Sa. algeriensis* sont réalisées sur milieu ISP2 (International Streptomyces Project 2) préconisé par Shirling & Gottlieb (1966) pour la croissance et la sporulation des actinomycètes. Ce milieu est composé de :

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

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

II.2.1.2 Milieu semi-synthétique basal (SS)

Les études physiologiques sont réalisées sur un milieu semi-synthétique (SS) mis au point dans notre laboratoire pour la croissance et la production des dithiolopyrrolones (Bouras *et al.*, 2006a). Un litre de ce milieu de culture est constitué de 100 mL de solution A et de 900 mL de solution B.

Solution A:

- D (+) Glucose anhydride (Acros) 15 g
- Eau distillée 100 mL q.s.p

Solution B:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Prolabo) 2 g

NaCl (Sigma) 2 g

KH_2PO_4 (Acros) 0,5 g

K_2HPO_4 (Acros) 1 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Acros) 0,2 g

Extrait de levure (Difco) 2 g

CaCO_3 (Merck) 5 g

Eau distillée 900 mL q.s.p

Le pH de la solution B est ajusté à 7 avec du NaOH 2N. Les deux solutions A et B sont autoclavées séparément 20 min à 120 °C. La solution A est ajoutée à la solution B après stérilisation.

II.2.1.3 Milieu semi-synthétique supplémenté

L'effet de l'acide benzoïque sur la production des dithiolopyrrolones, l'expression enzymatique et l'expression des gènes sont étudiés en ajoutant cet acide au milieu semi-synthétique (SS) à 1,25 mM. Une solution concentrée 10X de cet acide est autoclavé séparément puis un volume est ajouté stérilement au milieu de culture avant inoculation afin d'avoir une concentration finale de 1,25 mM. L'effet de l'ajout des précurseurs directs potentiels du benzoyl-CoA sur la production de BEP et sur l'activité benzoyltransférase a été étudié en ajoutant les molécules suivantes au milieu SS : l'acide cinnamique, la L-phénylalanine, l'acide benzoïque, l'acide shikimique à une concentration finale 5 mM et le benzoyl-CoA à une concentration finale de 0,05 mM.

II.2.2 Conditions de culture**II.2.2.1 Pré-cultures**

Les pré-cultures liquides sont réalisées dans des Erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL du milieu souhaité. Chaque Erlenmeyer estensemencé avec 10^7 UFC/mL. Les Erlenmeyers sont incubés à 30 °C et sous une agitation de 240 rpm pendant 48 h.

II.2.2.2 Cultures

Pour toutes les études cinétiques, des Erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL du même milieu de pré-culture sont ensemencés avec un volume de pré-culture égal à 10 % du volume utile (volume de milieu). Les cultures sont incubées à 30 °C sous une agitation de 240 rpm. Pour de la production de biomasse nécessaire à la purification de l'activité pyrrothine *N*-acyltransférase, les cultures sont réalisées dans Erlenmeyers de 500 mL contenant 150 mL de milieu.

II.3 Méthodes analytiques

II.3.1 Mesure du poids sec

Au fur et à mesure de la cinétique de croissance, 5 à 15 ml de la culture sont prélevés et mis dans des tubes appropriés. Les tubes sont ensuite centrifugés à 10,000 x g pendant 15 min. Le culot est lavé deux fois par HCl (0,35 M) afin d'éliminer le CaCO₃, et une dernière fois avec de l'eau distillée. Par la suite, les cellules sont récupérées sur un filtre en nitrate de cellulose de 0,45 µm préalablement pesé. Le filtre est ensuite placé à l'étuve à 105 °C pendant 24 heures, refroidi au dessiccateur pour quelques minutes puis pesé à nouveau. La concentration en biomasse est calculée à partir de la différence de masse du filtre avant et après séchage à l'étuve sur le volume du prélèvement. Elle représente la moyenne de triplicata. Le poids sec est rapporté au litre de volume de fermentation (exprimé en gramme de matière sèche par litre de milieu de culture).

II.3.2 Dosage des dithiolopyrrolones par HPLC

Les analyses par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) sont réalisées sur un système Bio-Tek Instruments (Milan, Italie) composé d'un injecteur automatique 465 muni d'une boucle d'injection de 80 µL, d'un dégazeur, d'un système de pompe 525, d'un détecteur UV-vis 545V à barrette de diode et d'un four thermostaté 582. La phase mobile est composée d'un mélange eau ultrapure/acétonitrile (grade HPLC). Les analyses sont réalisées suivant la méthode présentée dans le **Tableau 9** à un débit de 0,8 mL min⁻¹ et la colonne est thermostatée à 25 °C. Les dithiolopyrrolones sont détectées et quantifiées en UV à 390 nm, et le volume d'injection est de 80 µL. Toutes les analyses HPLC sont réalisées sur une colonne

ProntoSIL 120-5-C18 SH, 150 × 4,6 mm (Bischoff chromatography, Leonberg, Germany) complétée en amont par une pré-colonne 10 x 4 mm de la même marque.

Le dosage de dithiolopyrrolones dans le milieu de culture se fait selon la concentration des dithiolopyrrolones dans le milieu; si la concentration est suffisante pour la détection, le surnageant récupéré lors du dosage du poids sec est filtré par filtre PVDF puis directement injecté sans extraction. Dans le cas où la concentration est très faible moins de 0,1 mg L⁻¹, l'échantillon à doser a subi une extraction liquide/liquide décrite ci-dessus :

Un volume du surnageant de la culture est extrait deux fois avec le même volume de dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées et évaporées sous pression réduite (20 mbar) dans un speed-vac (Offenburg, Germany) dont la température est maintenue en dessous d'une température de 40 °C. Les extraits secs récupérés sont solubilisés dans 0,8 mL du mélange H₂O/CH₃CN 50:50 v/v. Les extraits concentrés sont ensuite filtrés sur des filtres seringues en PVDF (seuil 0,45 µm, Ø 4 mm). Les filtrats sont transférés dans des flacons HPLC en verre (vials). Les vials sont conservés à - 20 °C jusqu'à l'analyse par HPLC.

Tableau 9: Méthode HPLC utilisés pour la détection et la quantification des dithiolopyrrolones extracellulaires présents dans le milieu de culture

Temps (min)	Solvant A : H ₂ O (%)	Solvant B : Acétonitrile (%)
0	100	0
5	70	3
19	40	60
22	0	100
23	100	0
27	100	0

II.3.3 Quantification des dithiolopyrrolones

Une courbe d'étalonnage est réalisée pour la thiolutine en analysant différentes concentration de thiolutine 1, 2, 5, 10, 20 et 40 mg L⁻¹ préparées dans un mélange H₂O/CH₃CN 50:50 v/v à partir d'une solution mère à 60 mg L⁻¹ (la thiolutine utilisée au cours de toutes les expériences n'est pas une thiolutine standard commercialisée, mais une partie de la thiolutine issue de la synthèse biologique réalisée et vérifiée dans notre laboratoire par

Chorin *et al.* (2009). Cette même courbe étalon avec le même coefficient de réponse est utilisé pour quantifier l'ensemble des dithiolopyrrolones produit par *Sa. algeriensis* et en particulier la benzoyl-pyrrothine.

II.3.4 Dosage des protéines

Les concentrations en protéines dans les fractions issues des différentes étapes de chromatographies sont déterminées avec la méthode de Bradford (1979).

II.3.5 Préparation d'un extrait cellulaire de *Sa. algeriensis*

II.3.5.1 Préparation de la biomasse

A des temps souhaités d'une cinétique, la culture est arrêtée, et la biomasse est récupérée par centrifugation à 10,000 g pendant 15 min. La biomasse est ensuite lavée deux fois à l'eau physiologique (0,9 % de NaCl) et une fois avec un tampon de lyse (Tris-HCl, 50 mM, pH 8). Après, la suspension bactérienne est filtrée sous vide sur une membrane en acétate de cellulose (seuil 0,2 µm) et la biomasse est récupérée sur le filtre.

II.3.5.2 Extraction des protéines totales

0,6 g de biomasse humide sont resuspendus dans 1 mL de tampon de lyse puis la suspension est transférée dans un tube Fast Protein Blue (MP biomedicals, California, USA). Deux cycles de disruption (30 sec, 5 m s⁻¹) sont réalisés dans un disrupteur Fast Prep (Disrupteur ThermoFisher Scientific). Entre les deux cycles, l'échantillon est conservé 5 min dans la glace. L'échantillon est centrifugé à 10,000 g pendant 15 min pour éliminer la matrice de lyse et les débris cellulaires. Le surnageant constitue l'extrait cellulaire de *Sa. algeriensis*. Les activités pyrrothine *N*-acyltransférases sont déterminées dans l'extrait préparé immédiatement. Un échantillon est congelé à -80 °C pour le dosage des protéines. Les échantillons sont toujours conservés dans la glace et les centrifugations sont réalisées à 4 °C.

II.3.5.3 Extraction des protéines totales en vue de la purification

Pour la purification des activités *N*-pyrrothine acyltransférases, une grande quantité de biomasse a été nécessaire. Pour cette raison, la préparation de l'extrait s'est faite à l'aide d'un disrupteur dit « grande échelle » de marque inconnue (**Figure 17**). Elle est réalisée par une

unique bille dans un godet métallique. L'aliquot de biomasse congelée 15 g est déposé dans le godet en présence de la bille, après que l'ensemble ait été préalablement refroidi à l'azote liquide. L'échantillon subit un unique cycle de broyage pendant 1 min. Ensuite, le broyat cellulaire est suspendu dans le même tampon de lyse à raison de 1 mL pour 0,6 g de biomasse. La suspension est centrifugée pendant 15 min à 5,000 g. Le surnageant constitue l'extrait cellulaire soluble (cet extrait nommé extrait brut de *Sa. algeriensis*). Les échantillons sont maintenus dans la glace et les centrifugations sont réalisées à 4 °C.



Figure 17. Système d'extraction mécanique des protéines intracellulaires de *Sa. algeriensis*: A. Broyeur à bille, B. Godet et bille

II.3.6 Purification partielle des activités pyrrothine *N*-acyltransférases

II.3.6.1 Précipitation au sulfate d'ammonium

-Principe

La précipitation au sulfate d'ammonium ou « salting-out » se base sur les propriétés de surface des protéines. Les charges des protéines ne sont pas uniformément réparties. Elles possèdent certaines zones hydrophobes en surface qui régissent l'organisation d'une couche de molécules d'eau. Un sel, tel que le sulfate d'ammonium, piège les molécules d'eau qui sont présentes autour de la protéine et induit une diminution de sa solubilité. En fonction de leur hydrophobicité, les protéines ne précipitent donc pas à la même concentration en sel.

-Fractionnement de l'extrait par précipitation au sulfate d'ammonium

La précipitation fractionnée des protéines de l'extrait brut de *Sa. algeriensis* est réalisée par ajout de sulfate d'ammonium. L'extrait est successivement porté à 4 pourcentages de saturation différents (20 %, 40 %, 60 % et 80 %) en sulfate d'ammonium. Les cinq fractions protéiques suivantes sont obtenues : 0-20 %, 20-40 %, 40-60 %, 60-80 % et le

surnageant final. L'étape de la précipitation s'est déroulée de la manière suivante; la quantité de sulfate d'ammonium à ajouter pour atteindre le pourcentage de saturation souhaité est déterminée à l'aide d'un abaque (présenté en Annexe 2). Le sulfate d'ammonium est ajouté progressivement à l'extrait protéique sur une durée suffisante pour permettre la solubilisation du sel. La solution est laissée sous agitation pendant 40 minutes. Les protéines qui ont précipité sont récupérées par centrifugation pendant 15 min à 5,000 g. Le culot protéique est solubilisé dans 5,5 mL du tampon phosphate de sodium 50 mM + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,7 M pH 8. Le surnageant quant à lui subit une nouvelle précipitation, c'est-à-dire qu'il est amené à un pourcentage de saturation en sulfate d'ammonium supérieur. Les étapes décrites ci-dessus sont alors réitérées. Les échantillons sont maintenus dans la glace et les centrifugations sont réalisées à 4 °C.

II.3.6.2 Chromatographie d'interactions hydrophobes (HIC)

-Principe

La chromatographie hydrophobe est basée sur l'interaction hydrophobe entre les protéines de l'échantillon (en particulier certains éléments de leur surface) et un ligand hydrophobe fixé sur la matrice de la colonne. Cette interaction est favorisée par l'ajout d'un sel (agent lyotrophique) comme le sulfate d'ammonium dans le tampon d'élution initial. Les protéines retenues sur la colonne sont ensuite éluées, en fonction de l'intensité de leur interaction hydrophobe avec le ligand, lors d'un gradient d'élution avec un tampon à concentration en sel décroissante. Plus l'interaction hydrophobe entre la protéine d'intérêt et le ligand est élevée plus son élution est tardive. La séparation est régit par plusieurs paramètres dont la nature du groupement fonctionnel de la colonne, sa densité de greffage et la concentration initiale en sulfate d'ammonium.

-Descriptif de l'appareil et de la colonne

Les étapes de chromatographie préparative basse pression (la chromatographie d'échange d'anions et la chromatographie d'interactions hydrophobes) sont réalisées avec le BioLogic LP System 220 V (Bio-Rad, Hercules, Californie, Etats-Unis) associé à un collecteur de fraction modèle 2110 (Bio-Rad). Le système est piloté par une unité de contrôle et est composé d'une pompe péristaltique, d'une valve d'injection munie d'une boucle d'injection d'1 mL, d'un mélangeur, d'un détecteur UV, d'une cellule de mesure de la

conductivité et d'une valve SV-3 de dérivation. La récupération des données est réalisée par l'intermédiaire d'un ordinateur équipé avec le logiciel d'exploitation LP data view (Bio-Rad).

Une colonne HiTrap Phenyl Fast Flow (high sub Bior ad) est utilisée greffée sur des particules de sépharose de 90 μm de diamètre. La densité de greffage est de 40 $\mu\text{moles mg}^{-1}$ de milieu. La colonne possède un volume de 1 mL (dimensions 25 mm L x 7 mm DI).

-Conditions chromatographiques

La phase mobile est constituée d'un tampon A à forte force ionique, phosphate de sodium 50 mM + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,7 M (16,5 % de saturation en sulfate d'ammonium) et d'un tampon à faible force ionique, phosphate de sodium 50 mM. Les tampons sont ajustés à pH 7.5 à température ambiante (pH 8 à 4 °C). Ils sont filtrés sur un filtre membrane en ester de cellulose (seuil 0,2 μm). Ils sont enfin dégazés 30 min avec de l'hélium juste avant leur utilisation. 5 mL de la fraction de précipitation au sulfate d'ammonium 40-60 %, et qui se trouve dans le tampon correspondant aux conditions chromatographiques initiales est injectée. Le programme de la chromatographie est précisé dans le **Tableau 10**. La séparation est réalisée à un débit de 1 mL min⁻¹. Au cours de la purification, les fractions en sortie de colonne sont collectées tous les 3 mL. L'ensemble du système chromatographique, les tampons et les fractions collectées sont maintenus à 4 °C.

Tableau 10: Programme utilisé pour une l'étape chromatographique d'interactions hydrophobes. Le tampon A correspond au tampon à forte force ionique (phosphate de sodium 50 mM + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,7 M), et le tampon B correspond au tampon à faible force ionique (phosphate de sodium 50 mM). 5 mL de la fraction de précipitation au sulfate d'ammonium 40-60 %

	Temps (min)	Tampon A (%)	Tampon B (%)	Echantillon (%)
Equilibrage	0	100	0	0
	5	100	0	0
Injection	5	0	0	100
	21	0	0	100
Conditions initiales	21	100	0	0
	40	100	0	0
Gradient	40	100	0	0
	60	50	50	0
Lavage	60	0	100	0
	96	0	100	0

A l'issue de la chromatographie, la colonne est lavée successivement à l'eau bidistillée, au NaOH 1N, à l'éthanol à 60 % et 20 % v/v pour éluier les protéines encore retenues à la colonne à l'issue du lavage avec le tampon B. L'absorbance à 280 nm et la conductivité de l'éluat sont monitorées pendant les lavages mais l'éluat n'est pas récupéré car les conditions d'élution sont dénaturantes pour les protéines.

II.3.6.3 Chromatographie d'échange d'anions (AEC)

-Principe

Ce type de chromatographie repose sur les différences de charges des protéines. Les protéines sont amphotères. Leur charge évolue avec le pH du milieu. Le pH pour lequel la charge de la protéine est nulle est le point isoélectrique (pI). Si le pI de la protéine est inférieur au pH du milieu, la protéine est chargée négativement mais s'il est supérieur, la protéine est chargée positivement. Les colonnes d'échange d'anions sont constituées d'une matrice à laquelle sont liées des groupements ionisés positivement (capable de retenir les anions). Les protéines qui sont chargées négativement au pH de la phase mobile sont retenues sur la colonne. L'élution des protéines retenues est ensuite réalisée avec un tampon à force ionique croissante. Les anions du tampon viennent s'échanger avec les protéines retenues. Plus l'interaction ionique entre la protéine et le groupement ionique est faible au pH de la phase mobile plus la protéine est éluée tôt. La force de liaison de la protéine à la colonne est plus ou moins importante en fonction de la proximité de son pI avec le pH du tampon.

-Descriptif de la colonne

La colonne utilisée est une colonne UNOsphere ammonium quaternaire ($N^+(CH_3)_3$) qui lui confère un caractère d'échangeur d'anions fort. Le volume de la colonne est de 5 mL (dimensions 40 mm L x 12,6 mm DI).

-Conditions chromatographiques

La phase mobile est constituée du tampon A à faible force ionique, Tris-HCl 50 mM pH 8 et du tampon B à forte force ionique, Tris-HCl 50 mM pH 8 + NaCl 1 M. Les tampons sont ajustés à pH 8 à température ambiante. Ils sont filtrés sur un filtre membrane en ester de cellulose (seuil 0,2 μ m) puis ils sont dégazés pendant 30 minutes avec de l'hélium, juste avant leur utilisation. Les fractions possédant une activité benzoyltransférase à la sortie de l'interaction hydrophobe (fraction 5 et 6) sont rassemblées dans le même échantillon nommé pool1. Son tampon est échangé avec le tampon correspondant aux conditions

chromatographiques initiales, le tampon à faible force ionique, Tris-HCl, 50 mM, pH 8. Cette échange est réalisé sur des colonnes de filtration de gel Econopac 10 DG constituées d'une matrice en polyacrylamide Bio-gel P-10DG (seuil de coupure 10 KDa). 3,5 mL de pool1 est injecté puis la séparation réaliser à un débit de 1,5 mL min⁻¹ suivant le programme décrit dans le **Tableau 11**. L'ensemble du système chromatographique, les tampons et les fractions collectées sont maintenus à 4 °C.

Tableau 11: Programme utilisé pour chromatographique d'échange d'anions. Le tampon A est le tampon à faible force ionique (Tris-HCl, 50 mM), et B est le tampon à forte force ionique (Tris-HCl, 50 mM + NaCl, 1M). L'échantillon injecté correspond au pool1 de l'ensemble des fractions actives à l'issu de la chromatographie d'interactions hydrophobes (F5 et F6).

	Temps (min)	Tampon A (%)	Tampon B (%)	Echantillon (%)
Equilibrage	0	100	0	0
	6	100	0	0
Injection	6	0	0	100
	8	0	0	100
Conditions initiales	8	100	0	0
	20	100	0	0
Gradient	20	100	0	0
	54	50	50	0
Lavage	54	0	100	0
	76	0	100	0

II.3.7 Electrophorèse Native-PAGE

Les différentes fractions protéiques sont aussi analysées par électrophorèse de type Native-PAGE (conditions non dénaturantes) suivant le protocole d'Ornstein et Davis (Ornstein 1964, Davis 1964) dans un système Tetracell 4 (Biorad). Le gel de séparation est réalisé à 10 % d'acrylamide et le gel de concentration à 3 %. La migration est réalisée à 200 V constant pendant 45 min à 4 °C en présence d'un marqueur de taille. Si nécessaire l'échantillon est concentré par ultrafiltration sur un système Vivaspin 2 (Seuil de coupure 10 kDa). La détection des protéines sur le gel est réalisée avec du Bleu de Coomassie R-250 (seuil de détection variant de 36 à 47 ng de protéines par bande) ou du Bleu de Coomassie colloïdal G-250 (Page Blue Protein Staining Solution) plus sensible que le précédent (seuil de détection de 5 ng de protéines par bande).

II.3.8 Dosage des activités pyrrothine N-acyltransférases

Les activités pyrrothine N-acyltransférases sont dosées via une réaction enzymatique. Le milieu réactionnel contient le substrat (le pyrrothine), le groupe donneur (l'acyl CoA) et le catalysateur (l'extrait enzymatique). Les conditions de la réaction dépendent de la forme de l'enzyme.

II.3.8.1 Dosage des activités dans l'extrait protéique

La réaction enzymatique s'est faite dans un milieu réactionnel contenant dans l'ordre d'ajout 10 μ L de pyrrothine (solution à 10x dans le méthanol soit 2,5 mM, conservée à -20 °C, synthétisé chimiquement par notre laboratoire), 10 μ L d'acyl-CoA (solution à 10x dans l'eau déionisée soit 5 mM, conservée à -20 °C, Sigma), et 80 μ L d'extrait enzymatique dont l'ajout déclenche la réaction enzymatique (T_0). Le milieu réactionnel est incubé à 30 °C pendant un temps t (0, 5 et 10 min) puis la réaction est stoppée avec 20 μ L de TCA 2,5 % w/v (réalisé dans l'eau bidistillée extemporanément). Enfin 60 μ L de méthanol sont ajoutés. Le test est réalisé sur l'extrait brut non dilué ou dilué dans du tampon Tris HCl 50 mM, pH 8 de manière à observer une apparition linéaire du produit sur 10 min. Pour doser les dithiolopyrrolones formés dans les échantillons, ces échantillons sont centrifugés à 15,000 g pendant 15 min à 4 °C puis les surnageants sont transférés dans un nouvel Eppendorf et conservés à -80 °C. Avant l'analyse, les échantillons sont de nouveau centrifugés à 15,000 g pendant 15 min puis 120 μ L de surnageant sont transférés dans un vial HPLC (avec insert moulé, volume de 200 μ L en polypropylène). Afin de quantifier les produits de la réaction enzymatique initialement présents dans l'extrait (thiolutine, benzoyl-pyrrothine ou autres), la même réaction enzymatique est réalisée mais sans la pyrrothine (en ajoutant à sa place 10 μ L de méthanol).

II.3.8.2 Dosage des activités dans le gel Native-PAGE

Les activités enzymatiques dans le gel Native-PAGE sont quantifiées suivant le protocole précédemment indiqué avec quelques modifications. Le milieu réactionnel (200 μ L) contient, dans l'ordre d'ajout, 20 μ L de pyrrothine, et 160 μ L de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8. La fraction du gel d'électrophorèse désirée est ensuite ajoutée puis le milieu réactionnel est incubé 15 h à 30 °C. La réaction enzymatique est stoppée par ajout de 40 μ L de TCA à 2,5 % w/v. Après ajout du méthanol (120 μ L), le milieu réactionnel est filtré sur un filtre seringue en

PVDF (seuil 0,45 μm). Le filtrat est introduit dans un vial et les dithiolopyrrolones formées sont dosées par HPLC.

Finalement, les produits issus des réactions enzymatiques (thiolutine et BEP) sont analysés par HPLC avec la méthode présentée dans le **Tableau 12**.

Tableau 12: Méthode de détection et de quantification des produits issus des réactions enzymatiques acyltransférases

Temps (min)	Solvant A H ₂ O(%)	Solvant B Méthanol(%)
0	70	30
15	45	55
25	0	100
35	0	100
37	70	30

II.3.9 Grandeurs du suivi de la purification

Le facteur de purification (FP) traduit l'enrichissement en protéine d'intérêt. Il est donné par la relation :

$$\text{FP} = \text{Activité spécifique de l'étape} / \text{Activité spécifique initiale}$$

Le rendement (R) indique le degré de recouvrement de la protéine d'intérêt. Il est donné par la relation :

$$\text{R} = \text{Activité totale de l'étape} / \text{Activité totale initiale}$$

II.4 Les manipulations génétiques

II.4.1 Préparations et manipulations de l'ADN

Les extractions de l'ADN génomique et de l'ADN plasmidique, les transformations *E. coli* et la conjugaison *E. coli* / *Streptomyces*, ont été réalisées selon les conditions standards décrites par Kieser (2000) et Sambrook *et al.* (2001).

II.4.2 Extraction des ARN totaux

Afin d'éliminer toutes contaminations possibles lors de l'extraction d'ARN (surtout les RNases), des précautions sont prises (stérilisation du matériel et lavage au NaOH 2N puis à l'eau DEPC (Diethyl Pyrocarbonate, Sigma), utilisation de solutions traitées sans RNase, des cônes à filtres, des gants). L'extraction d'ARN se fait grâce à un kit (RNeasy Mini Kit Qiagen, France) avec des légères modifications, 750 µL de culture homogène de *Sa. algeriensis* ont été mélangés avec le même volume de solution I sans aucun lavage ni centrifugation. La qualité d'ARN est vérifiée par la valeur du rapport A_{260nm}/A_{280nm} et l'électrophorèse sur gel d'agarose selon des protocoles standards (Sambrook, Russell *et al.*, 2001)

II.4.2.1 Quantification de l'ADN et de l'ARN

Le dosage est fait à l'aide d'un NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

II.4.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Les trois étapes d'un cycle de PCR se déroulent à des températures précises dans un thermocycleur (My cycler™, BioRad).

II.4.3.1 Protocole

Un kit Qiagen est utilisé pour la préparation du mélange réactionnel, ce mélange est composé de :

Amorce 1 (50 µM).....1 µL
Amorce 2 (50 µM).....1 µL
dNTP (10 mM chacun).....1 µL (kit)
Tampon 10 X PCR.....10 µL (kit)
Tampon Q 5X.....5 µL (kit)
Taq DNA polymerase 5U/µL 0,25 µL (kit)
ADN..... ~ 200 ng
H₂O stérile.....q.s.p 50 µL

La PCR est programmée comme suit :

Première étape : - Dénaturation 96 °C pendant 10 min.

Deuxième étape : 30 cycles

- Dénaturation 96 °C pendant 45 sec.

- Hybridation T °C pendant 45 sec.

- Elongation 72 °C pendant t min.

(T dépend de l'amorce) (t dépend de la taille du fragment à amplifier)

Troisième étape : 72 °C pendant 10 min.

II.4.4 La Réverse Transcription (RT)-PCR

La RT-PCR est une technique qui a pour but d'étudier l'expression des gènes. Elle se fait en deux étapes, la première est la synthèse d'ADNc à partir d'ARN (également nommée la reverse transcription RT) et la deuxième est une PCR classique.

Pour la synthèse d'ADNc, le kit (Avantage, Clontech, BD Biosciences) est utilisé suivant les recommandations du fournisseur et en utilisant le Random hexamer. Les ADNc obtenus sont stockés à -80 °C.

II.4.5 La PCR quantitative (qPCR)

Le 7500 PCR en temps réel du système (Applied Biosystems, USA) a été utilisé pour la RT-qPCR. Le mélange réactionnel pour la RT-qPCR a été préparé dans 25 µL comme suit :

2x Quantitect SYBR [®] Green I Mix	12,5 µL (Qiagen, Courtaboeuf, France)
Amorce 1 (10 µM).....	1,25 µL
Amorce 2 (10 µM).....	1,25 µL
ADNc.....	2 µL
Solution ROX 5 µM.....	0,05µL (Fermentase 50 µM)
H2O stérile.....	q.s.p 25 µL

Des plaques de 96 puits et scellées avec des couvercles adhésifs optiques (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sont utilisés. La RT-qPCR a été effectuée avec les conditions suivantes: 50 °C pendant 2 min, 95 °C pendant 10 min, puis 40 cycles de 95 °C pendant 15 s, 60 °C pendant 1 min finalement, une étape supplémentaire à la fin des cycles d'amplification pour vérifier qu'il n'y a qu'un seul produit de PCR amplifié, un cycle entre 60 et 95 °C avec un pas de 0.5 °C est réalisé. Un échantillon témoin sans matrice d'ADN est inclu dans les essais expérimentaux. Le *FtsZ* gène [*FtsZ* est homologue à la tubuline chez les Eucaryotes (Margolin, 2005)] est utilisé comme un gène de référence pour quantifier

l'expression relative de gènes cible, vu qu'il est exprimé de façon constante tout au long de la croissance. La valeur relative de l'échantillon à 96 h a été attribuée arbitrairement à 1. Des triplicatas biologiques pour chacun des stades de développement de culture, et des triplicats techniques pour chaque échantillon y compris les gènes de référence et les contrôles négatifs (échantillons de réaction sans matrices d'ADNc) sont réalisés. Les données sont analysées par le logiciel StepOne version 2.0 (Applied Biosystems), et la valeur de Cq pour chaque échantillon a été calculée et présentée en utilisant la méthode $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak et Schmittgen 2001).

II.5 Traitement des données

protéine-protéine Blast recherche (Blastp) ont été menées à la base de données GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Les alignements multiples ont été réalisés en utilisant le site <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>. Les oligonucleotides ont été dessinés à l'aide du logiciel Clone Manager 9 logiciel (Sci-Ed Software, USA). Pour le Blast local (tblastn), BioEdit Séquence Alignement Editor version 7. 1. 3. 0 a été utilisé. Pour l'analyse statistique SPSS 16.0.2 programme a été utilisé.

RÉSULTATS

CHAPITRE I

**Identification et caractérisation, *in silico*, du cluster de la voie de
biosynthèse des dithiolopyrrolones
chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL-B 24137**

Identification et caractérisation, *in silico*, du cluster de la voie de biosynthèse des dithiolopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL-B 24137

La recherche du cluster de la voie de biosynthèse des dithiolopyrrolones chez *Sa. algeriensis* s'est principalement basée sur le cluster de la voie de biosynthèse de l'holomycine, *hlm*, chez *S. clavuligerus* (Li & Walsh, 2010). D'abord, le génome de *Sa. algeriensis* a été séquencé pour la première fois. Suite à ce séquençage, une banque de contigs a été obtenue, elle contient 4768 contigs. Ensuite, le cluster homologue au cluster *hlm* a été recherché dans cette banque. Les gènes homologues à *hlm* n'ont pas été obtenus dans un seul contig mais dans trois contigs, de taille 5921, 5118 et 1913 pbs. Ceux-ci ont été identifiés pour regrouper dix gènes homologues à ceux trouvés dans le cluster *hlm*. Les trois contigs ont alors été assemblés en un seul contig, de 13836 pbs. L'ensemble de ces gènes potentiellement impliqué dans la voie de biosynthèse de la thiolutine chez *Sa. algeriensis* est nommé le cluster *thi*. La banque génomique de *Sa. algeriensis* a permis par la suite de compléter la séquence du cluster *thi* et au final nous avons obtenu un cluster de 15.2 kb.

La comparaison entre le cluster *hlm* proposé par Li & Walsh (2011) et le cluster *thi* (**Figure 18**) montre que, parmi les huit gènes qui sont directement impliqués dans la biosynthèse de l'holomycine, six gènes codent pour des fonctions similaires dans le cluster *thi*. Deux différences clés apparaissent entre les 2 clusters. La première est l'absence, dans le cluster *thi*, du gène qui code pour une acyltransférase et l'absence du gène qui code pour un domaine de condensation. La deuxième différence est la présence d'un gène qui code pour une putative N-formimidoyl synthase dans le cluster *thi*.

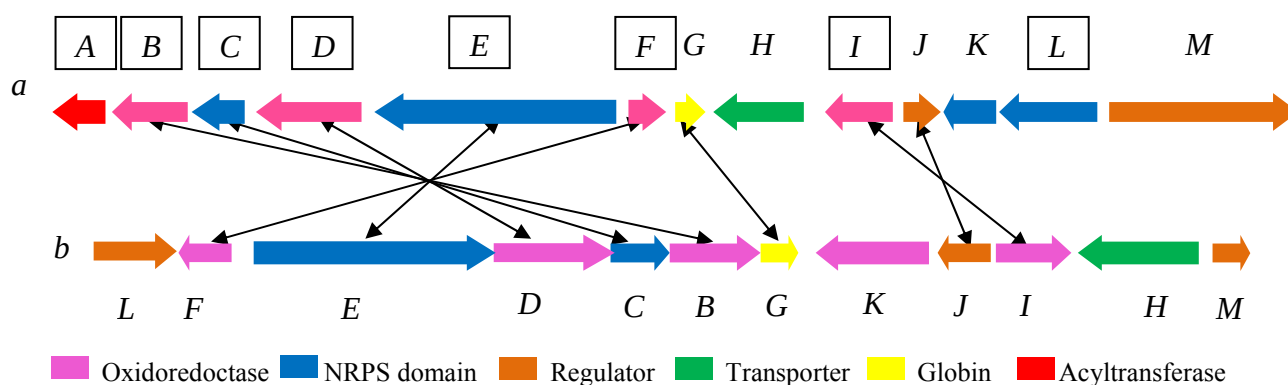


Figure 18. Comparaison des clusters de gènes de la voie de biosynthèse des dithiopyrrolones chez : (a) *S. clavuligerus* (Li & Walsh, 2011), (b) *Sa. algeriensis*. Les gènes sont colorés selon leur fonctionnalité. Les gènes encadrés sont directement impliqués dans la biosynthèse de l'holomycine

Nous avons également comparé le cluster *thi* avec les clusters de la voie de biosynthèse de l'holomycine *hom* chez *Yersinia ruckeri* ATCC 29473 (Qin *et al.*, 2013), des dérivés de l'holothine, *hol*, chez *Pseudoalteromonas* sp SANK 73390 (Fukuda *et al.*, 2011), et des dithiopyrrolones chez *Xenorhabdus bovienii* SS-2004. La classification taxonomique de ces microorganismes est présentée dans le **Tableau 13**. Elle montre que ces bactéries appartiennent à 2 classes différentes, Actinobacteria et Gammaproteobacteria.

Tableau 13: Position taxonomique des souches productrices des dithiopyrrolones

Niveau de Classification	<i>S. algeriensis</i> G+	<i>S. clavuligerus</i> G+	<i>Y. ruckeri</i> G-	<i>X. bovienii</i> G-	<i>Pseudoalteromonas</i> G-
Domaine	Bactérie	Bactérie	Bactérie	Bactérie	Bactérie
Phylum	Actinobacteria	Actinobacteria	Proteobacteria	Proteobacteria	Proteobacteria
Classe	Actinobacteria	Actinobacteria	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria
Ordre	Actinomycetales	Actinomycetales	Enterobacteriales	Enterobacteriales	Alteromonadales
Famille	Actinosynnemataceae	Streptomycetaceae	Enterobacteriaceae	Enterobacteriaceae	Pseudoalteromonadaceae
Genre	Saccharothrix	Streptomyces	Yersinia	Xenorhabdus	Pseudoalteromonas
Espèce	Algeriensis	Clavuligerus	ruckeri	bovienii	Sp

Les couleurs indiquent les niveaux communs entre les souches. G+ Gram-positive, G- Gram négative

Malgré la différence taxonomique de ces bactéries, la comparaison des 5 clusters montre la présence de six gènes communs qui codent pour ; une NRPS mutlidomaine, une thioestérase, une acyl-CoA déshydrogénase, une glucose-méthanol-choline oxydoréductase; une lantibiotic décarboxylase et une globine (**Figure 19** et **Tableau 14**). Trois différences principales sont observées entre ces clusters i) l'absence chez les bactéries Gram-négatives d'un gène qui code pour une thiorédoxine réductase. Le rôle essentiel de cette enzyme est déjà rapporté chez *S. clavuligerus*. ii) la présence d'un gène chez *S. clavuligerus* qui code pour un domaine de condensation, dont l'implication est dans la formation de la liaison peptidique (la formation de cette liaison est toujours inconnue chez ces bactéries). iii) l'absence d'un gène chez *Sa. algeriensis* et *X. bovienii* qui code pour une acyltransférase. Cette enzyme est responsable de la dernière étape de la formation des dithiopyrrolones par une acylation du noyau holothine ou pyrrothine.

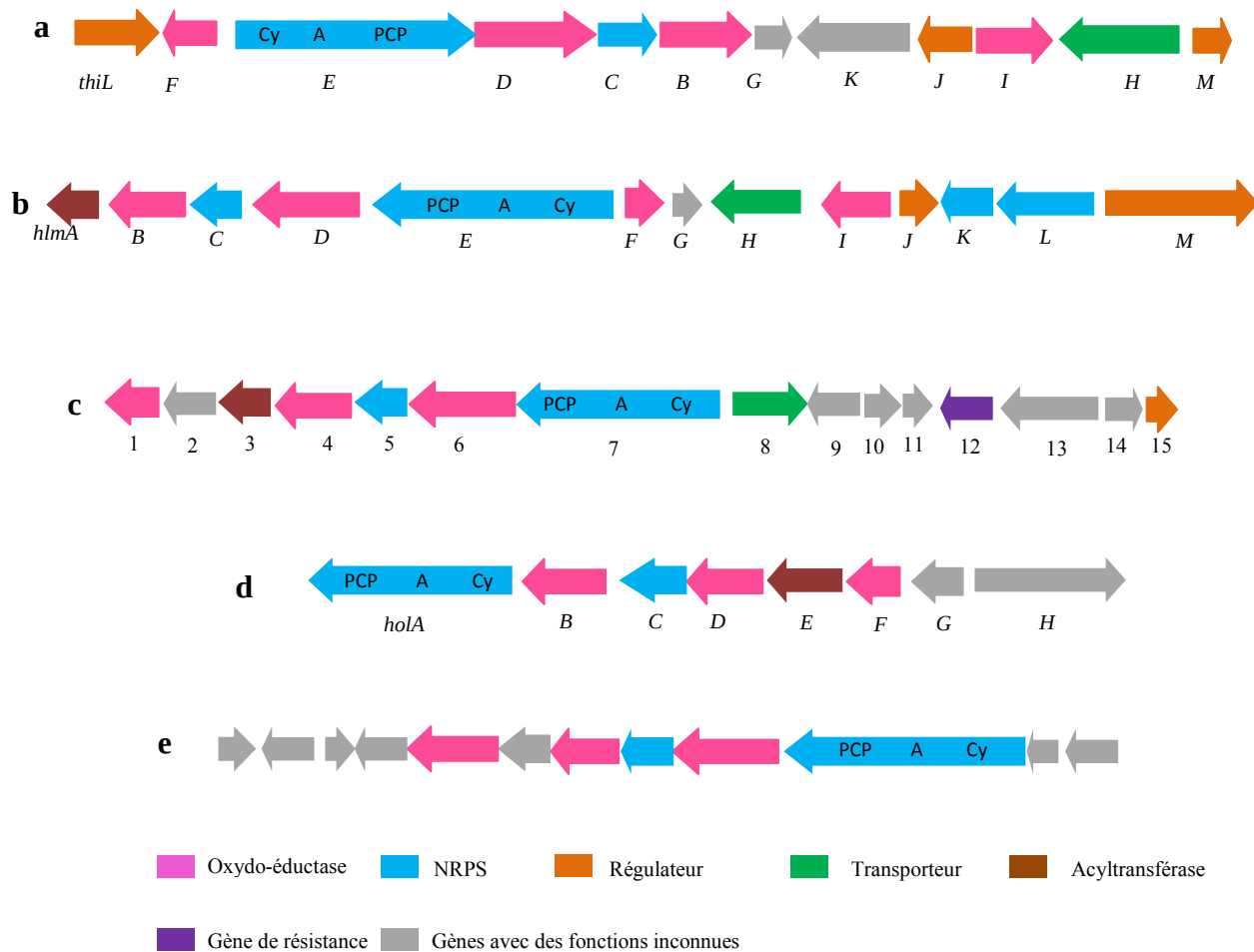


Figure 19. Comparaison des clusters de gènes de la voie de biosynthèse des dithiolopyrrolones chez : (a) *Sa. algeriensis*, (b) *S. clavuligerus*, (c) *Y. ruckeri* (d) *Pseudoalteromonas* et (e) *X. bovienii*. Les gènes sont colorés selon la fonction

Tableau 14: Les éventuelles fonctions déduites des ORFs du cluster du cluster *thi* chez *Sa. algeriensis* et leur identité et similarité avec les protéines homologues chez *S. clavuligerus*, *X. bovienii*, *Y. ruckeri* et *Pseudoalteromonas*

ORF	Protéine Homologue								Fonction proposée
	<i>S. clavuligerus</i>	Identité/ Similarité %	<i>X. bovienii</i> SS-2004	Identité/ Similarité %	<i>Y. ruckeri</i> ATCC 29473	Identité/ Similarité %	<i>Pseudoalteromonas</i> sp SANK 73390	Identité/ Similarité %	
<i>thiB</i>	SSCG_03485	72/84	XBJ1_1749 (YP_003467655.1)	54/74	ZP_04616955.1	56/71	YP_004661190.1	54/72	Acyl Co-A déshydrogénase
<i>thiC</i>	SSCG_03486	52/65	XBJ1_1750 (YP_003467656.1)	38/56	ZP_04616956.1	32/50	YP_004661189.1	35/52	domaine de thioestérase
<i>thiD</i>	SSCG_03487	62/72	XBJ1_1751 (YP_003467657.1)	47/64	ZP_04616957.1	45/60	YP_004661188.1	44/62	Glucose méthanol choline oxydoréductase
<i>thiE</i>	SSCG_03488	64/75	XBJ1_1752 (YP_003467658.1)	45/63	ZP_04616958.1	45/60	YP_004661187.1	44/60	NRPS
<i>thiF</i>	SSCG_03489	63/78	XBJ1_1746 (YP_003467652.1)	52/73	ZP_04616952.1	57/74	YP_004661193.1	54/72	Lantibiotic décarboxylase
<i>thiG</i>	SSCG_03490	63/78	XBJ1_1748 (YP_003467654.1)	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			MFS transporteur
<i>thiI</i>	SSCG_03492	69/78							Thiorédoxine réductase
<i>thiJ</i>	SSCG_03493	67/83							Protéine régulateur
<i>thiK</i>	<i>S. tenjimariensis</i> CAH60155.1	52/67	XBJ1_1132 (YP_003467058.1)	44/61					N-formimidoyl synthase
<i>thiL</i>	<i>S. glaucescens</i>	53/66							Régulateur de streptomycine
<i>thiM</i>	SCLAV_05211	37/52							Régulateur Transcriptionel de la famille MerR

I.1 L'analyse des séquences des domaines enzymatiques du cluster *thi*

Dans le but d'approfondir nos connaissances du cluster *thi*, chaque gène obtenu de ce cluster a été blasté sur les bases de données afin de vérifier sa fonctionnalité potentielle. Cette recherche a aussi permis d'analyser les domaines enzymatiques dans ce cluster, d'identifier les zones conservées et les motifs actifs, et finalement de proposer une fonctionnalité pour les enzymes spécifiques au cluster *thi* et qui ne sont pas présentes dans les autres clusters.

I.1.1 Les gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse

I.1.1.1 NRPS (ThiE)

L'analyse bioinformatique montre que dans le cluster *thi* il n'y a qu'un seul multi-domaine NRPS (ThiE). La prédiction des domaines de ThiE (réalisée à l'aide de deux programmes <http://www.nii.ac.in/~pkscdb/sbspks/master.html>, <http://nrps.igs.umaryland.edu/nrps/>) a montré que cette NRPS comprend trois domaines : Cyclisation (Cy), Adénylation (A), et Thiolation (T ou PCP pour « peptidyl carrier protein ») avec l'ordre suivant Cy-A-T. Ce même ordre a déjà été trouvé dans HlmE chez *S. clavuligerus* (Huang *et al.*, 2011; Li & Walsh, 2010) et Hom7 chez *Y. ruckeri* (Qin *et al.*, 2013) et HolA chez *Pseudoalteromonas sp* SANK 73390 (Fukuda *et al.*, 2011). Notre recherche a montré que cet arrangement est présent également chez les NRPS de *X. bovienii* et. Un arrangement similaire Cy-A-T a été également trouvé dans la voie de biosynthèse de la yersiniabactine chez *Y. pestis* (Miller *et al.*, 2002b), où le domaine Cy a une double fonction associant à la fois la formation de la liaison peptidique et ensuite la cyclisation des motifs thiazolyle (Miller *et al.*, 2002a). L'analyse détaillée de chaque domaine a permis d'éclairer la fonction prévue pour chacun d'eux dans le cluster *thi*.

Le domaine de cyclisation Cy montre une faible homologie avec le même domaine chez les bactéries productrices de dithiolopyrrolones sauf pour HlmE 59 %. Par contre tous les domaines ont présenté le motif conservé du domaine de cyclisation DXXXXDXXS (**Figure 20**) (Hur *et al.*, 2012).

Pour vérifier l'hypothèse sur la capacité de ce domaine à remplacer le domaine de condensation, responsable de la formation d'une liaison peptidique, nous avons cherché le

motif conservé du domaine de condensation HHXXXDX₁₄Y(Koglin & Walsh, 2009) dans cette séquence. Parmi les cinq souches, aucune n'a présenté ce motif, bien que seul le cluster *hlm* contienne un domaine de condensation qui pourrait réaliser la liaison peptidique. L'implication du domaine de condensation dans la formation de la liaison peptidique dans la voie de biosynthèse de l'holomycine chez *S. clavuligerus* n'a jamais été vérifiée. De plus, Li & Walsh (2010) ont indiqué la présence de la cystine dans le milieu réactionnel contenant au départ de la cystéine et HlmE purifiée. Ceci indique que la condensation pourrait être réalisée par le domaine de cyclisation de HlmE. Ainsi, la condensation des deux molécules de cystéine pourrait être réalisée par ce domaine de cyclisation ayant un autre motif non encore connu comme motif de condensation. Ou alors, la condensation pourrait être réalisée avec une autre enzyme.

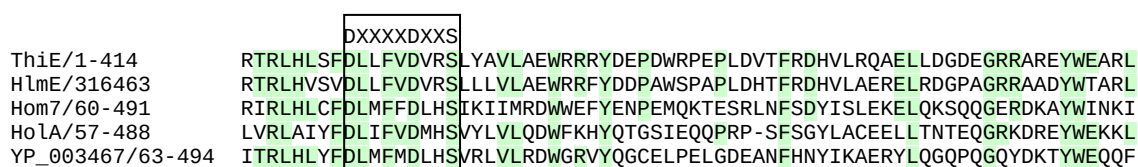


Figure 20. Alignement des séquences d'acides aminés des domaines Cy de NRPS des souches productrices des dithiopyrrolones. ThiE chez *Sa. algeriensis*, HlmE chez *S. clavuligerus*, Hom7 chez *Y. ruckeri*, HolA chez *Pseudoalteromonas* et chez YP_003467658.1 *X. bovienii*. Le motif actif DXXXXDXXS est indiqué dans le cadre

Concernant le domaine d'adénylation (A), la séquence du site actif montre une activation préférentielle de la cystéine (100 % de similarité, **Tableau 15**), Ceci est en accord avec les précédentes études qui montrent que la L-cystéine est un précurseur intervenant dans la biosynthèse de dithiopyrrolones (Furumai *et al.*, 1982). L'absence d'un second domaine d'activation pour la deuxième cystéine nécessaire à la formation de noyau pyrrothine suggère que ThiE peut être une enzyme itérative. (Juguet *et al.*, 2009). La présence d'un NRPS similaire a été déjà rapportée comme dans le cluster de la coelicheline qui est l'un des premiers exemples de NRPS non linéaire, car le premier module agit de manière itérative pour intégrer deux fois la même molécule (Lautru *et al.*, 2005).

Tableau 15: Prédiction de l'incorporation d'acides aminés dans la séquence du site actif du domaine A d'une NRPS (Stachelhaus *et al.*, 1999)

Domain	Position										Similarity (%)
	235	236	239	278	299	301	322	330	331	517	
Orn(1)	D	M	E	N	L	G	L	I	N	K	60
Ser	D	V	W	H	L	S	L	I	D	K	60
Cys	D	L	Y	N	L	S	L	I	W	K	100
ThiE	D	L	Y	N	L	S	L	I	W	K	

Cette même séquence consensus est trouvée dans les 4 NRPSs (**Figure 21**). Le domaine A des HlmE chez *S. clavuligerus* a déjà été prédit comme activant de la cystéine (Li & Walsh, 2010). De plus, les cinq NRPSs présentent également la séquence consensus du site responsable de l'attachement du domaine A au AMP (AMP-binding site), et le motif responsable de l'acylation (acyl-activating enzyme consensus motif) (**Figure 21**).

```

ThiE/427-955  AQRPE-----VQGHDDLAYVIFTSGSTGEPKGVMI THRSAGNTVQDINRRFGVTGFDLSVY--
HlmE/476-1009 TGPLES-----RQSVDDLAYVIFTSGSTGEPKGVMI SHRSAANTVQDINARFEVAGFDLSVY--
Hom7/501-1028 LPPTPR-----KQSPDDLAYVIFTSGSTGEPKGVMI SHTNAVNTVADINRRFSVAGFDLSVY--
Ho1A/501-1028 SHRVAE-----L---DDLAYVIFTSGSTGEPKGVMI SHRNAANTVIDINRRFSVAGFDLSVY--
YP_0/512-1039 AMDTEQKVS AHLSSVQALDDLAYVIFTSGSTGEPKGVMA SHRNAANTVLDINRKHFVAGFDLSVY--

ThiE      *NSLADAPAEAGA---SVRLALLSGDWIPVTLPGRLRERFPDMAVISLGGATEGSIWSWASIPYG
HlmE      *NSLADLAEQDGAGHGSLRLALLSGDWIPVALPGQIRRRVPGMRTISLGGATEGSIWSWTSIPYG
Hom7      NRAGEQLRD--S---SLRLVLMSGDWIPVDLPDQIRHVSEKIDVISLGGATEGSIWSWKSIPYG
Ho1A      NK--NTSNLTHS---KLRLVLMSGDWIPVDLPDRIKEVLP HCDVISLGGATEGSIWSWSSIPYG
YP_0      NDLAQTP-----LRLILMSGDWIPIDLPERIRENL PDAIISLGGATEGSIWSWKSIPYG

ThiE      ERLYRTGDLGRYLPGGDIEILGRD FQVKINGYRVELGEIESAL SKQPGVGHALVAAAAYVI--
HlmE      ERLYRTGDLGRYLPGGDIEILGRD FQVKINGYRVELGEIEAAL GRLPGMRQVMYTATAHLV--
Hom7      ERLYRTGDLGRYINEGLIEILGRD -NVKINGYRIELGEIEAAL LEHPSASHVVNAAAAYIV--
Ho1A      ERLYKTGDLGKYIADGYIEILGRD NQVKINGYRVELGEVEVCL LNHEYIGHVVVGAVAWIV--
YP_0      ERLYKTGDLGRYMANGLIEILGRD NQVKINGYRIELGEIEAC L THENAGHVVMADAVAYVPS

ThiE      --LPGYMVP THYVAVDAFPMT PNGKIDHAALPTPWH DGGES--
HlmE      --LPGYMVP SHYLTRDALPLT ANGKIDRDALALPWS DGDVAQG
Hom7      ATLPSYMVP MWVLLDEMLT PNGKIDRNALPAVWAD SVA---
Ho1A      RELPNYMIP SYIIVLESMLT SNGKISHNELPSPWQDL-----
YP_0      --LPSYMVP SYIIVLLAHMPLT SNGKIDRKALPLWADS-----

```

Figure 21. Alignement des séquences d'acides aminés des domaines A de NRPS des souches productrices des dithiolopyrrolones. ThiE chez *Sa. algeriensis*, HlmE chez *S. clavuligerus*, Hom7 chez *Y. ruckeri*, HomA chez *Pseudoalteromonas* et YP_003467658.1 chez *X. bovienii*. Les résidus responsables de l'activation de la cystéine sont indiqués par des étoiles, les motifs responsables de l'acylation (acyl-activating consensus motif) sont surlignés en rouge et les sites responsables de la liaison à l'AMP (AMP binding site) en vert. L'homologie entre les 5 séquences est soulignée en jaune

Concernant le domaine de thiolation, l'alignement du domaine PCP de ThiE a montré que ce domaine partage les mêmes motifs actifs (I/V)GG(D/H)SL (Concurso & Bruner, 2012) ou GGXSL (Du & Shen, 1999) avec les autres NRPS (**Figure 22**). Le résidu sérine dans le premier motif est rapporté comme étant responsable de la phosphopantetheinylation du site 4'-phosphopantetheinyl par une phosphopantetheinyl transférase (Marahiel *et al.*, 1997). Cette modification post-traductionnelle est indispensable pour la biosynthèse des peptides car elle convertit l'*apo*-PCP en *holo*-PCP fonctionnelle (Du & Shen, 1999).

ThiE/965-1034	VEQRLLTWFDQLGHTDFGVEDGFFDVGGDSLHAVGIIGKLRAEFEID
HlmE/1019-1064	--ERLFALWAEELGHSEFGVEDGFFDVGGDSLHAVRIIARLRADFGID
Hom7/1041-1083	--TRLYSIWAAQLQHSDFGVTDGFFDIGGDSLHAVSLLSAVRQSF---
Ho1A/1028-1087	--AALLEIWIQQLQHSSLDVTSGFFDIGGDSLHAVALIGTIRERFG--
YP_003467658.1/1055-1099	--TKILQLWQSQLQHDDFDVTDGFFDIGGDSLHAVGLLSALRQEFNI-

Figure 22. Alignement des séquences d'acides aminés des domaines PCP de NRPS des souches productrices des dithiolopyrrolones ThiE chez *Sa. algeriensis*, HlmE chez *S. clavuligerus*, Hom7 chez *Y. ruckeri*, HomA chez *Pseudoalteromonas* et chez YP_003467658.1 *X. bovienii*. Les motifs actifs conservés (I/V)GG(D/H)SL (Concurso & Bruner, 2012), GGXSL (Du & Shen, 1999) sont soulignés en jaune

I.1.1.2 Acyl CoA déshydrogénase (ThiB)

ThiB représente la première enzyme parmi les enzymes oxido-réductases codées par le cluster *thi*. En général, l'acyl CoA déshydrogénase catalyse l' α , β déshydrogénation de l'acyl-CoA pour générer les trans- α , β -CoA. L'analyse des séquences et leur comparaison avec les bases de données ont permis d'identifier la fonction putative de ThiB comme une déshydrogénase flavoenzyme. ThiB présente une forte homologie avec d'autres acyl-CoA déshydrogénases chez d'autres bactéries notamment celles qui sont connues comme productrices des dithiolopyrrolones comme HlmB, Hom4, Ho1D et YP_0034676 avec une identité de 72, 54, 56 et 54 % respectivement. De plus, les cinq précédentes enzymes partagent une forte homologie pour les trois séquences distinctives de cette famille, le site de liaison à la FAD (FAD binding site), le site de fixation de substrat (substrate binding pocket) et aussi la base catalytique (**Figure 23**).

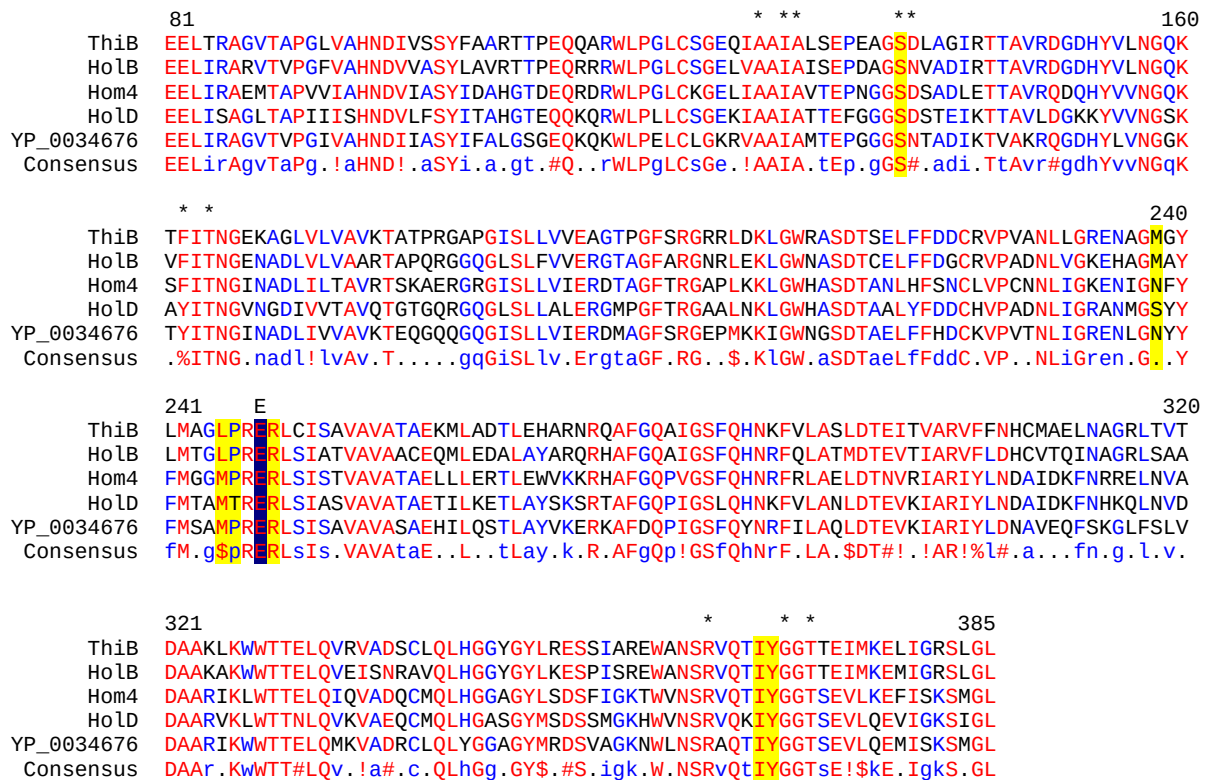


Figure 23 Alignement de séquences d'acides aminés déduits de ThiB de *Sa. algeriensis* avec d'autres acyl CoA déshydrogénases d'espèces déjà connues comme productrices des dithiolopyrrolones ; HlmB chez *S. clavuligerus*, Hom4 chez *Y. ruckeri*, Hold chez *Pseudoalteromonas* et YP_003467655.1 chez *X. bovienii*. Les étoiles représentent le site de liaison à la FAD (FAD binding site). Le site de fixation du substrat (substrate binding pocket) est souligné en jaune et la base catalytique (catalytic base) est surlignée en bleu

1.1.1.3 Lantibiotic décarboxylase (ThiF)

Parmi les enzymes oxydo-réductases, le cluster *thi* code pour une Décarboxylase Phosphopantothénocystéine PPC-DC (4.1.1.36) ThiF. Cette enzyme catalyse généralement la décarboxylation de l'unité de la cystéine dans l'acide 4'-phosphopantothénocystéine (PPC) pour former le 4'-phosphopantéthéine (PPantSH). Cette réaction fait partie de la biosynthèse du coenzyme A. PPC-DC est un membre de la famille des décarboxylases de cystéine y compris les enzymes impliquées dans la biosynthèse du lantibiotique EPID et MrsD, (Begley *et al.*, 2001). L'alignement de la séquence des acides aminés de ThiF sur les bases de données montre une similarité entre ThiF et d'autres PPC-DC chez des bactéries déjà connues productrices de dithiolopyrrolones (**Figure 24**). De plus, cette figure montre que toutes ces enzymes partagent le motif actif PXXAX₈GX₂₀PXMX₃MW avec l'enzyme la plus

étudiée dans cette famille EpiD chez *Staphylococcus epidermidis* (Kupke *et al.*, 2000; Kupke, 2002).

Figure 24. Alignement des séquences d'acides aminés de ThiF de *Sa. algeriensis* avec d'autres PPC-DC des espèces déjà connues comme productrices des dithiolopyrrolones ; HlmF chez *S. clavuligerus*, Hom1 chez *Y. ruckeri*, HolG chez *Pseudoalteromonas* et YP_003467652.1 chez *X. bovienii*. L'exemple type de cette famille enzymatique EpiD chez *Staphylococcus epidermidis* est aussi inclus dans cet alignement. Le motif actif est souligné en jaune

I.1.1.4 Thioestérase (ThiC)

phosphopantéthéinyle en produisant un acide libre ou par une cyclisation à l'aide d'un nucléophile interne (Kohli & Walsh, 2003). Les domaines TE sont membres de la grande famille des α , β -hydrolases qui contiennent une triad catalytique typique (Ser-His-Asp/Glu) (Bruner *et al.*, 2002). Malgré la faible similarité (moins de 30 %) entre ThiC et les autres thioestérases chez d'autres bactéries, les trois sites actifs Ser-His-Asp/Glu (S-H-D) de la thioestérase (Bruner *et al.*, 2002) sont présents pour toutes les enzymes (**Figure 25**).

Aucune étude n'a encore été faite pour vérifier le rôle de cette enzyme dans la biosynthèse des dithiolopyrrolones chez les souches productrices.

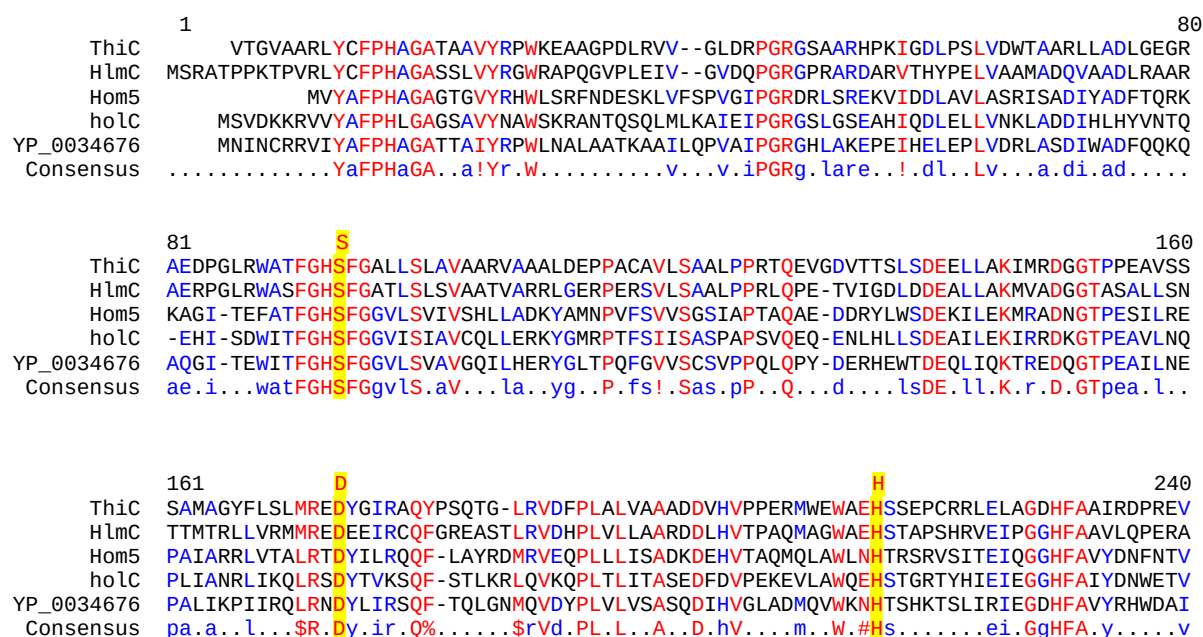


Figure 25. Alignement de ThiC de *Sa. algeriensis* avec d'autres gènes thioestérase des espèces déjà connues comme productrices des dithiolopyrrolones ; HlmC chez *S. clavuligerus*, Hom5 chez *Y. ruckeri*, HolC chez *Pseudoalteromonas* et YP_003467656.1 chez *X. bovienii*. La triade catalytique typique Ser-His-Asp/Glu de la thioestérase (Bruner *et al.*, 2002) est soulignée en jaune

1.1.1.5 Glucose methanol choline oxydo-réductase (ThiD)

Dans le cluster *thi* se trouve une ORF qui code pour une enzyme de la famille oxydo-réductase glucose-méthanol-choline (GMC oxydoréductase) ThiD. GMC oxydo-réductase est une famille d'enzymes ayant une activité oxydo-réductase. Les GMCs sont des flavoprotéines oxydo-réductases qui comprennent une variété de protéines comme la Choline deshydrogénase (CHD) EC 1.1.99.1, le Méthanol oxydase (MOX) EC 1.1.3.13 et la cellobiose deshydrogénase EC 1.1.99.18 (Cavener, 1992b; Li *et al.*, 1993). Bien que les similarités de

séquence de cette famille ne sont pas élevées et que ses membres catalysent des réactions diverses, cette famille de flavoenzymes partage un motif conservé ADP-binding motif (une région d'environ 30 acides aminés) à son extrémité N-terminale et la séquence consensus des signatures 1 et 2 (Cavener, 1992a). Toutes les protéines de cette famille possèdent trois domaines de fixation à la FAD (FAD-binding domain) et un domaine de liaison au substrat (substrat-binding domain) dans une région de séquences proches (Kiess *et al.*, 1998). Une forte homologie un niveau des signatures spécifiques de GMCs a été trouvé entre ThiD, HlmD, Hom6, HolB, et YP_0034676 (**Figure 26**).

	81		160
ThiD	R-----TAGGRPSRALWSRFYPV	GKVVGGS	SVNGAVAMRALPRDFFD
HlmD	RSSTRWDELVGVGASGSTADAGR	SRALWTRFPYQL	GKVVGGS
Hom6	RGAERL-----SRFLQPD	AESHAPRRRKPFYRL	GKVLGGSSA
YP_0034676	RSED	RFADLISPSHYLQDEKKQEHKHRGRKLFN	YRVGKVLGGSSA
HolB	SGSNRF---	MCPSSVLPPKQNGRVPD---	KMFGYKAGKVMGGSSA
Consensus	r...r.....	ta....sralw.rFPY..	GKVvGGsSa!NGA!AmR.lprDfD.wv..GnpdWswd.VlP.%r
	161		240
ThiD	AIERDADFPG-GD	HGDSGP	IPIRRPRREGLHVLDAF
HlmD	RIENDADHPGDAA	HGDHGAIPVRRP	GPADLHELEVA
Hom6	KLENDRDIADETL	HGHAGPLLLRRPTA	EETLPLETGFASACVSHGI
YP_0034676	HL	ENDVDR	TGDDNHGSLGPMCLRRPQHEI
HolB	HL	ETDADF	GGSDHGHKGYLNI
Consensus	.iEnDaD.pg...	HGD.Gpip.RRP...e.lh.L#.	aF...aC.rmg!p.l.DlNgg.e.gVG.VPaN.vdg.ER.Dv...Y
	241		320
ThiD	LAAARHL	PNLEVRPRS	RVLRVL
HlmD	LTDVRKL	PELELRTGCRV	TRVLFEGRR
Hom6	LTPARM	SNLQIMTE	MTVERVLF
YP_0034676	LEPVL	HRK	NLRVMDVLAQI
HolB	LEPN	ERNLHIM	DATVSCVNFSGKATG-V
Consensus	L...r.lp#Le.rt...	rV.r!lf.grrAvG.V.V...dg....	vra...!!LcAGA!Gsp.vLQRSG!Gda...l.aLg!Pv!

Figure 26. Alignement de ThiD de *Sa. algeriensis* avec d'autres thioestérase des espèces déjà connues comme productrices des dithiolopyrrolones ; HlmD chez *S. clavuligerus*, Hom6 chez *Y. ruckeri*, HolB chez *Pseudoalteromonas* et YP_003467657.1 chez *X. bovienii*

L'implication de cette enzyme dans la biosynthèse de l'holomycine chez *Y. ruckeri* a été déjà validée. Un mutant déficient pour ce gène a perdu sa capacité de produire l'holomycine (Qin *et al.*, 2013).

1.1.1.6 Thiorédoxine oxidoréductase (ThiI)

Parmi les enzymes oxydoréductases, le cluster *thi* code pour une thiorédoxine réductase ThiI. Cette enzyme partage une homologie avec le gène de la superfamille de thiorédoxine oxydo-réductase, HlmI de *S. clavuligerus* de (69 %). Cette enzyme a été également récemment identifiée et caractérisée chez *S. clavuligerus* comme une dithiol-oxydase de la famille FAD-dépendante qui utilise l'O₂ comme substrat (Li & Walsh, 2011; Li

et al., 2012). L'O₂ a été rapporté comme étant substrat pour HlmI accélérant la formation de la liaison disulfure dans la dernière étape de la formation de l'holomycine chez *S. clavuligerus* (Li & Walsh, 2011). Le rôle de cette enzyme dans la biosynthèse de l'holomycine chez *S. clavuligerus* a été déjà validé, un mutant déficient pour ce gène a perdu sa capacité à produire l'holomycine. De plus, ce même mutant a considérablement augmenté sa sensibilité envers l'holomycine, ce qui signifie que *hlmI* joue un rôle important dans l'auto-protection. ThiI partage également une homologie avec la gliotoxine dithiol GliT oxydase récemment caractérisé chez *Aspergillus fumigatus* (Scharf *et al.*, 2010). Vue l'homologie de ThiI avec HlmI et GliT qui ont déjà été identifiées comme des FAD-dépendantes (le domaine de liaison de FAD est souligné en vert dans la **Figure 27**, et la différence avec TrxB qui a été identifiée comme étant NADP-dépendant, ThiI pourrait être une flavoenzyme FAD-dépendant.

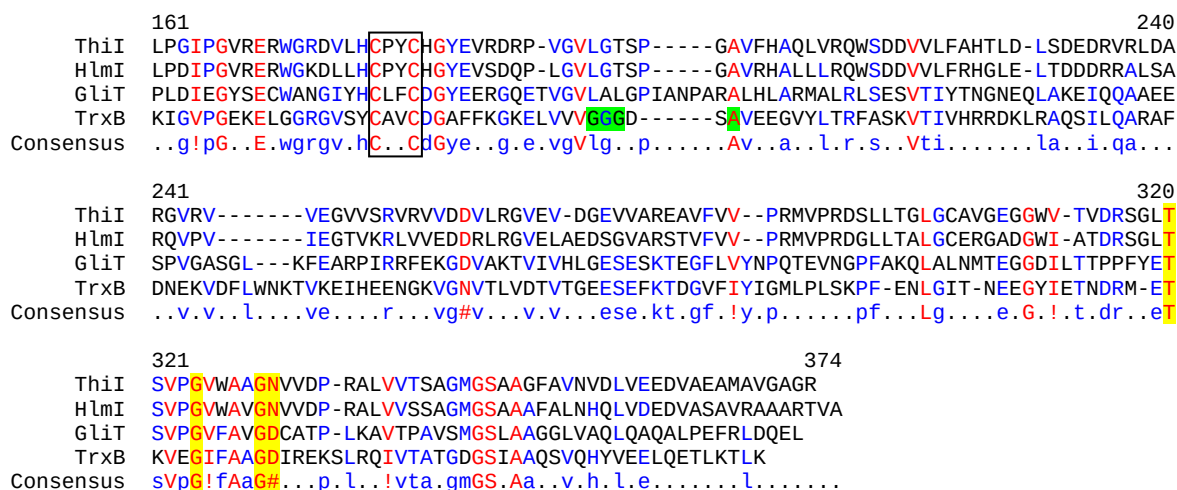


Figure 27. Alignement de ThiI de *Sa. algeriensis* avec HlmI chez *S. clavuligerus*, GliT de *Aspergillus fumigatus* et TrxB de *Bacillus subtilis*. Le motif conservé CXXC est cadré, le domaine de liaison de FAD est souligné en jaune et le domaine de liaison de NADP est souligné en vert (Lewin *et al.*, 2008; Li & Walsh, 2011; Scharf *et al.*, 2010)

L'enzyme analogue à la dithiol oxydase (thiorédoxine réductase) n'a pas été retrouvée dans le cluster de la voie de biosynthèse des dérivés de l'holothine chez la bactérie marine *Pseudoalteromonas sp* SANK 73390 ce qui suggère que cette bactérie a un autre mécanisme de formation des liaisons disulfures (Fukuda *et al.*, 2011). Une absence similaire a également été observée dans le cluster de gènes d'holomycine chez *Yersinia ruckeri*, ce qui suggère que le mécanisme de formation de liaisons disulfures est différent chez les bactéries Gram-négatives (Qin *et al.*, 2013).

I.1.2 Les gènes potentiellement impliqués indirectement dans la biosynthèse

I.1.2.1 *N*-formimidoyl synthase (ThiK)

Cette enzyme appartient aux enzymes oxydoréductases codées par le cluster *thi*. Chez les actinomycètes, la N-formimidoyl synthase semble être responsable de la transformation de fortimicin A en N-formimidoyl fortimicin A chez *Micromonospora olivasterospora* et l'istamycine en N-formimidoyl istamycine chez *Streptomyces tenjimariensis* par l'ajout du groupe formimidoyl 'H₂C=N' (DiPietro *et al.*, 1996). La caractérisation de cette enzyme chez *M. olivasterospora* a montré qu'elle est de type adénine dinucléotide flavine (FAD) (Dairi *et al.*, 1992).

Dans la voie de biosynthèse des dithiolopyrrolones, le rôle de cette enzyme n'est pas encore connu. Ni le cluster *hlm* chez *S. clavuligerus* ni *hom* chez *Y. ruckeri* ne présentent un gène codant pour cette enzyme. Par contre la recherche bioinformatique montre qu'une enzyme équivalente semble être codée par *X. bovienii* avec une homologie de 41 %. Une homologie a également été trouvée entre ThiK et une autre N-formimidoyl synthase, *fms14*, chez *M. olivasterospora* et CAH60155.1 chez *S. tenjimariensis* (51 % et 65 % d'identité respectivement) (Figure 28).

	81	160
ThiK	IRATSLWPEWLAGLGDDAAE-R-IVTADGTTVILNAIGMAEIDDTNYRAIRTELD RYSGAYEDVDPDLDEWVDAEPISRP	
gi83999855	VRATALWDDWEKSLVEESGGEQR-IRSDAGTVVILNTIGVREIDTAGYAAIREALDSYEEPYEDVDPDRLDWLAPETSRP	
gi216777	YQATGRWDAWEQGLLEESDETA-IRTAGTVVILNTVGVHEIDTEGFRAIRAAALDEYKEPYEDLDPAEVPLWHPAPTARP	
YP_0034670	RIAKDRWSTWQRLAASSGDT RPLFTAKGTHVILNTAGMEVVDVSVNYDAIESVLREYNPEYEVIEPRSIKGMKPNDLVRS	
Consensus	..At.rw..W.q.L...sg#tr.i.tA.GT.VILNt.Gm.e!D..n%.AIR...LdeY.epyEd.#P....w..p.p..Rp	
	161	240
ThiK	LRAFHIPGEHAVSTPALLERLQSAFLAEGGTVIAQQATRV DHEGDRVTGVTLENGDRLTAGQVTLAAGAQSQALIDGLP-	
gi83999855	LKAMFLPNEHAVDSTALLRALTTAFERAGGTLMDLVTEVVVDGGRAKGVVLRSSHTLSSPQVVLAAAGASVDLLGSLPD	
gi216777	LHAMFIPGEHAVDAPALLRALSAAFTRNGGTLVDDLVGEVLLVGGRAVGVRLTSGTTL SAGHVALATGAATTKLLDCLPE	
YP_0034670	LKGLYIP EEAHLNHLLEMLDAALLREGGEIVDNNVKRVL TENGIIIVGVETVDGVRF TANKV IIAAGVQSLDILSDQTS	
Consensus	Lka..iP.EHAv.s.aLLe.L.aAflreGGt.vd#.v.rvl.eggr.vGV.l..g.rlta..V.laAgaqs.dll..lp.	
	241	320
ThiK	-VAGRIPPLVSGYGVSVLMKTV D-GTAPRSVIRTPNRSFACGLHVVP RGEVYLGATNVVSI RPRDVADMRDLVFLLC	
gi83999855	EIRDRVPAMVSGYGVSLILEAQD-GTVPPYVIRTPNRAFACGLHVVPRTGGQLYLGATNNISPTSRAYAKVDDLNLLLGC	
gi216777	DVRHRIPAIAGRGVALMVRTTD-GVVPESVIRTPNRAFACGLHVVP R DGLIYLGATNEVESQLGTTAAIGELNLLSG	
YP_0034670	-IVQKIPPLFAGYGVSVLLKVKNPDELPTSVIRTPNRAFACGLHCVPRSDGVLVYGATNLLSNQPRTHATVATIQFLLC	
Consensus	..!..r!PplvaGyGVsvllk..#.g..P.sVIRTPNRAFACGLHVVP R.dg.lylgatn..s.qprt.A.v..l.fll.c	
	321	400
ThiK	AHRQVRRKLWDSQVEKVQVGNRPIALDGFPLIGSGGMAGLWLLTGTYRDGVHLSPLLAQEMADRI LGEPG-SVDLDRFTP	
CAH60155.1	T-KQIRSDLVEASVHKIMVGNRPVPLDGFPLLGRVEVDGLWMTGT YRDGLHQSPLLARDFAARVLGEEH-DTSLDVFTP	
Fms14	T-SQMHDLLVNAWVERIMVGNRPVPLDGFPLLGSVGEGLWMTGT YRDGLHQSPLLAADMAARILGEPH-DS ELDVFTP	
YP_0034670	AYNQINVDLFESEILATQVGNRPISADGFPLIGSCGIDGLWLVTGT YRDGLHQSPLLADYVANALMGLPNLEIDLADFTP	
Consensus	a..Qi..dL.#s.!...!qVGNRP!.LDGFPLIGs.g.dGLW\$.TGTYRDGLHqSPLLA...A.r.\$Gep....dLd.FTP	
	401	480
ThiK	L RKPLQEWTRDRIVNDTVEHWIGIGYEQDWQIPVDWHQWITDLRPATERWVEDIDPEFTPPAELVFLSRMDPEALKLLR	
gi83999855	VRAPIQAMSRQDCLDTAVQHTLALGYEHDWGPVDWPP LIEEQLRAMYDRMLDELHPRFVPPPELLAFD--DPAINTALQ	
gi216777	VRPIEAMT REESLEMAVRHTLGSGYEHEWRLPDDWPPMIEKHFAAFGR TLEQVDPEFVPPPEMFIFA--DESIIHAALR	
YP_0034670	IRRPLVGLSRDMTISEAAKQTVAMGYEFIWNLKPGWDEL IYKSL LNIYGAQVESIDAIYTPPPDLVAFSCKDEQITKRLR	
Consensus	.R.Pl...sR#.....av.ht.a.GYE..W.lp.dw..lIek.lr..ygr.v#.idp.%tPPp#\$vafs..De.i.k.Lr	

Figure 28. Alignement de ThiK de *Sa. algeriensis* avec YP_003467058.1 chez *X. bovienii* et les gènes, *Fms14* chez *M. olivasterospora* et CAH60155.1 chez *S. tenjimariensis*

1.1.2.2 Globine (ThiG)

Le cluster *thi* code pour une enzyme ayant une fonction inconnue dans la voie de biosynthèse des dithiopyrrolones et cette enzyme appartient à la superfamille de globines. Généralement cette enzyme fait partie des enzymes oxydo-réductases. Les hémoglobines peuvent servir dans des fonctions autres que le transport de l'oxygène entre tissus, allant du transport intracellulaire de l'oxygène à la catalyse de réactions d'oxydo-réduction (Hardison, 1998). Les hémoglobines ont été trouvées dans de nombreuses bactéries comme la flavo-hémoglobine d'*E. coli* (Vasudevan *et al.*, 1991) et *B. subtilis* (LaCelle *et al.*, 1996). Ces enzymes possèdent deux domaines, un pour la liaison de l'hème et l'autre pour la liaison d'un cofacteur de flavine.

ThiG comme HlmG, pourrait agir comme un porteur d'électrons au cours de l'oxydation de ThiI pour maintenir la forme oxydative de ThiI dans l'environnement réducteur du cytoplasme. ThiG présente une forte homologie avec les autres globines HlmG, HolG, Hom2 et une globine chez *X. bovienii* (Figure 29).

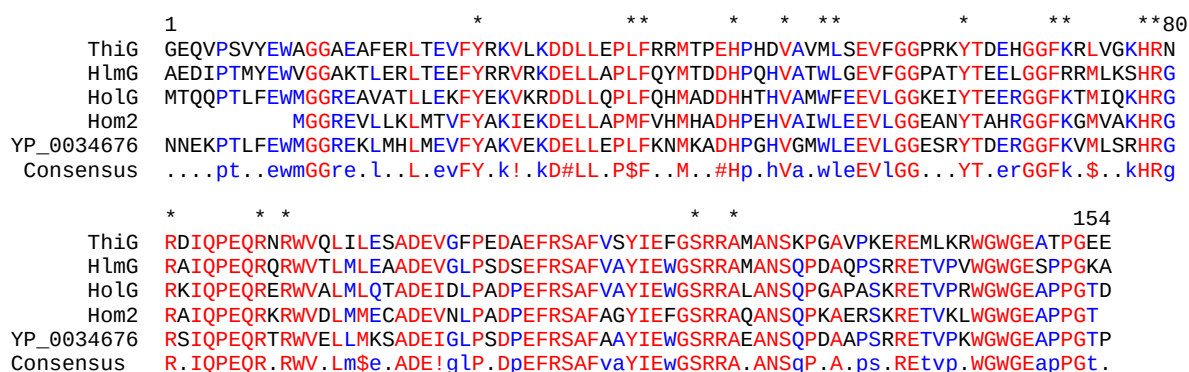


Figure 29. Alignement de ThiG de *Sa. algeriensis* avec d'autres globines chez les espèces déjà connues comme productrices des dithiopyrrolones ; HlmG chez *S. clavuligerus*, Hom2 chez *Y. ruckeri*, HolG chez *Pseudoalteromonas* et YP_003467654.1 chez *X. bovienii*. Les étoiles représentent les sites de la liaison à l'hème

I.1.2.3 Transporteur de la famille MFS (ThiH)

L'analyse du cluster *thi* a montré la présence d'un gène *thiH* codant pour une protéine d'efflux MFS putative (pour Major Facilitator Superfamily) (**Figure 30**). MFS est la deuxième grande famille parmi les cinq familles de pompes à efflux chez les bactéries (Pao *et al.*, 1998; Webber & Piddock, 2003). Ces familles de transporteurs représentent 3-12 % des génomes bactériens. Ces protéines peuvent être vitales pour l'efflux des antibiotiques, la sécrétion des protéines/toxines, la nutrition des cellules, la détection environnementale, la synthèse d'ATP, ou d'autres fonctions (Yan, 2001). Les MFSs transportent de manière sélective un large éventail de substrats à travers les membranes biologiques et jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus physiologiques. Malgré d'intenses recherches, seulement sept protéines de types MFSs provenant de six sous-familles ont été structurellement élucidées (Yan, 2013).

Parmi les quatre souches productrices des dithiolopyrrolones, seulement deux bactéries présentent ce gène, avec une faible homologie, (moins de 30 %) pour HlmH chez *S. clavuligerus* et Hom8 chez *Y. ruckeri* (**Figure 31**). Ce qui est faible si l'on considère l'homologie entre HlmH et Hom8 (61 %) (Qin *et al.*, 2013). L'absence de gène équivalent dans les deux autres souches met un doute sur le rôle de ce gène dans la résistance à l'holomycine.

1 100
 ThiH MNPRQANPWAAIGALCLGFFMILLDTTIVSIAVPDMLRELDAGLNSVWVMSVYLLTYAVPMLFTSRLGDRFGPKRVYLA
 YP_0070381 MNARQANPWAAALGALCLGFFMILLDTTIVSIAVPDMLRELDAGLNSVWVMSVYLLTYAVPMLFTSRLGDRFGPKRIFLA
 ZP_0727658 MNARPVPNWAALSALCIGFFMILLDTTIVSIAVPAMLQHLGAGLNSVWVMSVYLLTYAVPMLFTSRLGDRFGPKRVFA
 YP_0037631 MILLDTTIVSIAIPTMLRELGAAGLNSIVWVMSVYLLTYAVPMLFTSRLGDRFGPKRVFLA

81 160
 ThiH GLVVF^{*}TASSLW^{***}CGLAGD^{***}VETLIAARA^{***}AQGLGAALMTPQT^{***}LAFITHLFP^{***}PAERG^{***}PAMGLWGGVAGLATIT^{***}GP^{***}LLGGF^{***}LV^{***}EH
 YP_0070381 GLVVF^{*}TASSLW^{***}CGLSGDV^{***}SMLIAARA^{***}AVQGLGAALMTPQT^{***}LAFITHLFP^{***}PAKRG^{***}AAMGMWGGVAGLATIT^{***}GP^{***}LLGGV^{***}LV^{***}DH
 ZP_0727658 GLVVF^{*}TASSLW^{***}CGLSGNV^{***}EMLIAARA^{***}AVQGLGAALMTPQT^{***}LAFISHLFP^{***}PAKRG^{***}AAMGAWGGVAGLATIT^{***}GP^{***}LLGGV^{***}LV^{***}QH
 YP_0037631 GLLVFTGASLW^{***}CGLSGNV^{***}EMLIAARA^{***}AVQGLGAALMTPQT^{***}LAFITHLFP^{***}PAKRG^{***}PAMGMWGGVAGLATIAG^{***}PL^{***}LLGGV^{***}LV^{***}DH

161 240
 ThiH LGWEWIFFVNPV^{*}VGAV^{***}VAA^{***}LLLPVDWQ^{***}PRTAHSF^{***}DLPGIALSAAGLFCV^{***}VFGLQNGQH^{***}YDWGEVAGGVTVF^{***}EVV^{***}GAGV
 YP_0070381 LGWEWIFFVNPV^{*}IGV^{***}VAIV^{***}LTLLLPVDWQ^{***}PRHSHSF^{***}DPGIVLSAAGLFCV^{***}VFVGQNGEH^{***}YDWGTVAGGITVFEI^{***}IGAV
 ZP_0727658 LGWEWIFYNVP^{*}IGV^{***}IAIALTLWLVPD^{***}WQPKHSHSF^{***}DLGLILLSAAGLFCV^{***}VFVGQNGQYDWGTVF^{***}GGITVFEI^{***}IGAV
 YP_0037631 FGWEWIFFVNPV^{*}IGV^{***}IAVVL^{***}TLVLVPD^{***}WQPKHSHSF^{***}DLGLIVLSAALLCIVF^{***}VGQNGQYDWGTVF^{***}GGITVFEI^{***}IAAGV

241 320
 ThiH ALLVAFV^{*}LWQRRNR^{***}REPL^{***}PLEVFGN^{***}RNFSAGT^{***}LTA^{***}VTVGFTMTGMFLPII^{***}YIQT^{***}VLGLSPTMAGVLTAPMSLLSGVVS
 YP_0070381 VLLVAFV^{*}LWQRYNKSE^{***}PLPLAVF^{***}GNRNF^{***}SAGT^{***}LTA^{***}VTVGFTMTGMFLPII^{***}YIQT^{***}VLGLSPTMAGALTAPMSLLSGVVA
 ZP_0727658 VLLIAFV^{*}LWQRRNR^{***}REPLV^{***}PLAVFAN^{***}RNFSAGT^{***}LTA^{***}VTVGFTMTGMFLPII^{***}YIQT^{***}VLGLSPTMAGLLTAPMSLLSGVIA
 YP_0037631 VLLIAFV^{*}VWQRFN^{***}QREPL^{***}LQVFSNRN^{***}FSAGT^{***}LTA^{***}VTVGFA^{***}MTGMFLPLVIYIQSVLGLSPTMGGLTAPMSLLSGVIA

321 400
 ThiH PFVGRASDRVDGRHLLV^{*}VAGLAL^{***}LAAGMAVIALQARPD^{***}TNPWALVPALLSGLGIGLVFP^{***}PM^{***}SNLTMNGVAPRLAGAASGI
 YP_0070381 PFVGRASDRVDGRYLV^{*}MGGALLALCGMTIALQARPD^{***}SNPWT^{***}IPALLVCGVGIGCFSP^{***}MSNLT^{***}MGV^{***}VEPKLAGTASGI
 ZP_0727658 PFVGRASDKINGKYLV^{*}MGGALLALAGVGIIALQARPD^{***}TSPWALIPALLVCGLVGVCIFSP^{***}MSNLT^{***}MA^{***}SV^{***}EPRLGTASGI
 YP_0037631 PFVGRASDKVNGKYLV^{*}MFGLAALAGGIIALQATPD^{***}SNAWTFVPALLVCGLVGIGCFSP^{***}MSNLT^{***}MG^{***}SV^{***}EPRLGTASGI

contribue pas à la résistance à l'holomycine des souches productrices et que le gène de résistance est situé en dehors du cluster *hlm*, (Robles-Reglero *et al.*, 2012).

I.1.2.4 Régulateur de la famille XRE (ThiJ)

Le cluster *thi* code pour un régulateur transcriptionnel putatif de la famille XRE régulateur pour « Xenobiotic Response Element ». Cette famille de régulateurs transcriptionnels représente la deuxième famille régulatrice la plus répandue chez les bactéries. Les régulateurs dans cette famille contrôlent une vaste variété de fonctions métaboliques. La famille XRE constitue une grande famille de protéines avec un motif hélice-tour-hélice de liaison à l'ADN (HTH) de type similaire à la protéine du répresseur CI et Cro chez le bactériophage lambda (λ), SinR chez *B. subtilis*, et BzdR chez *Azoarcus sp* (Durante-Rodriguez *et al.*, 2010; Gaur *et al.*, 1991).

Chez les actinomycètes, l'activateur transcriptionnel spécifique de la voie de biosynthèse de la méthylénomycine chez *S. coelicolor* MmyB (20 % de similarité avec ThiJ) a montré une forte similarité au niveau N-terminal avec la famille XRE. Un mutant déficient pour *mmyB* a complètement perdu sa capacité à produire la méthylénomycine confirmant son rôle comme activateur de ce gène (O'Rourke *et al.*, 2009). L'effet activateur de MmyB se fait par contact avec les composantes σ de l'holoenzyme ARN polymérase (O'Rourke *et al.*, 2009). Une faible homologie entre ThiJ et BzdR, MmyB, SinR, et HlmJ au niveau N-terminal et quasiment pas d'homologie au niveau C-terminal. Parmi les quatre souches productrices des dithiopyrrolones, seule *S. clavuligerus* présente cette enzyme en similarité avec *Sa. algeriensis* au niveau des résidus spécifiques pour la liaison à l'ADN (HTH binding domain), mais différente des autres membres de la famille XRE (**Figure 32**). La comparaison du profil de l'expression de *hlmJ* chez la souche sauvage de *S. clavuligerus* et son mutant qui produit 250 fois plus de l'holomycine, *S. clavuligerus oppA2::aph*, a indiqué que ce gène a présenté le même niveau de l'expression. Cette identité en expression chez les deux souches met en doute le rôle activateur de ce gène (Robles-Reglero *et al.*, 2012).

	1		80
ThiJ		MREFEDISGALSDIGPRLRRLRTQRRLSLSALSEMTGISKSTLSRLEAGQR-RPS	
HlmJ		MKQSPAISQVLDDEVGPRRLRWLRTQRGVSLTAIAEATGISKSTLSRLESGQR-RPS	
BzdR		MSNDENSSRLKRPDLGLEENNYLLMLGDRIRDRLAQRGMTKMLAQQSGVSESYLEAQLETGHG-NIS	
MmyB	MASVDGVAKDSTVCSPKRQREALRHFLR	SRRARLSPDDVGLLATGRHHTPGLRREVAIVAGVSASWYTWLEQGRDIKVS	
SinR		MTLIGQRIKQYRKEKGYSLSELAEKAGVAKSYLSSIERNLQTNPS	
	81		160
ThiJ	LELLPVRAYRIPLDELIGGPEVADPRIRPTPRRVGSSVLP	LTRQPGPQHTFKTMIPPSRNIPELCTHGEYEWLYVLS	
HlmJ	LELLPIAQAHQVPLDELVGAPDEVDPRIRTSPRSVNGNTVLP	LTQPGPLQAFKMVLPATRKTPDLCNHGEYEWLYVLS	
BzdR	IILLRQIAQGLGFPIVD-----LVREEAQSPELTLLIQYLSRFPPKTHEWARR-LLQNELESSGRSARRQRIAFIGLR		
MmyB	DGVLNAISQALRLDDTERAHLRLAGVNPPQSVPATAGQTETSRQLIVDGWLPAPAFVVDRYWNTLAANQAARSALGVG		
SinR	IQFLEKVSALVDVSVHT-----LLDEKHTEYDGGLDSEWEKLV	RDAMTSGVSKKFREFLDYQKWRKSQKEE	
	161		240
ThiJ	GRLRLVVAEQDLVLEAGEAAEFDRPLPHWFGSTGECPEVLNILG-PQGERIHLRVRTNEEK		
HlmJ	GTLRLLLADHDLTLGPGEAAEFDRPLPHWFGTTGEGPVEVLSLFG-RQGERMHVRARPRDGSHPSPR		
BzdR	GAGKTTLGT--MLAEHLG-VPFLELAKVIEQAGADLSEIFSLYGGTAYRRYERR--GLESVVASNEAFVLIAGGSIVSE		
MmyB	AGDQNYLAA--FFTETARARYLDWDKLATRLVQGFRVQAARFPEDPRFDIARQLCATDHAFLWARHETCDTAMTSV		

Figure 32. Alignement de ThiJ de *Sa. algeriensis* de HlmJ chez *S. clavuligerus*, BzdR chez *Azoarcus sp*, MmyB chez *S. coelicolor* et SinR chez *B. subtilis*. Les résidus spécifiques pour le domaine de la liaison à l'ADN HTH (sequence-specific DNA binding) sont surlignés en jaune

I.1.2.5 Régulateur transcriptionnel de la famille MerR (ThiM)

Le cluster *thi* code pour un régulateur transcriptionnel putatif de la famille MerR. MerR est le régulateur de résistance au mercure dans l'opéron (*mer*) chez les bactéries Gram-négatives (Brown *et al.*, 1983). Cette famille regroupe des régulateurs transcriptionnels différents qui peuvent agir comme un répresseur/activateur permettant de contrôler divers processus métaboliques dans la cellule. En se basant sur la nature de leurs molécules effectrices et l'architecture de leurs domaines de liaison, les régulateurs MerR sont divisés en deux groupes. Le premier groupe est composé des régulateurs sensibles aux métaux lourds et aux stress oxydatifs (comme SoxR). Le deuxième groupe comprend des protéines reconnaissant les divers composés aromatiques et biologiques qui sont souvent toxiques (Kumaraswami *et al.*, 2010). Les régulateurs MerR ont un domaine N-terminal caractéristique avec une liaison HTH à l'ADN (PF00376) et une région C-terminale variable leur permettant de répondre aux différentes stimulations environnementales (Thaden *et al.*, 2010). Chez les bactéries Gram-négatives, (i) en l'absence de Hg (II) MerR réprime l'initiation de la transcription des gènes du cluster *merT*, *P*, *C*, *A* et *D*. (ii) En présence de Hg (II), MerR active l'initiation de la transcription de ces gènes. (iii) MerR réprime sa propre transcription indépendamment de la présence de Hg (II) (Summers, 1992). Le mode d'activation de l'expression des gènes par MerR pourrait être réalisé en déformant la séquence d'ADN de l'opérateur et en permettant à l'ARN polymérase d'initier la transcription à un promoteur optimal.

Chez les actinomycètes, TipA et BldC chez *S. coelicolor* et *S. lividans* sont les exemples les plus étudiés de cette famille (Chiu *et al.*, 1999). L'alignement de ThiM sur les bases de données montre une forte homologie au niveau N-terminal et moins au niveau C-terminal avec d'autres MerR notamment chez *Frankia sp.* Cette homologie est beaucoup moins importante en comparaison avec Tip chez *S. coelicolor* même au niveau du site de liaison à l'ADN (**Figure 33**).

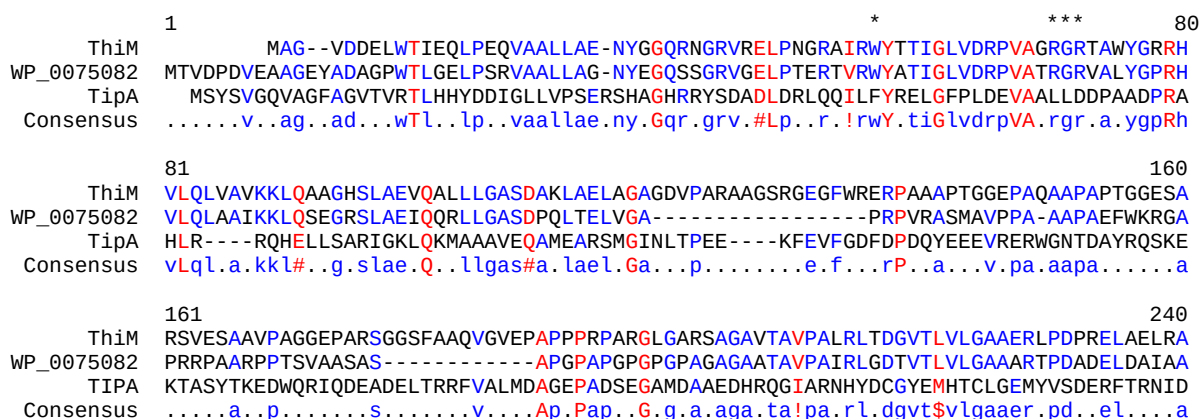


Figure 33. Alignement de ThiM de *Sa. algeriensis* avec des MerR; WP_007508256.1 chez *Frankia sp.* CN3 et TipA chez *S. coelicolor*. Les étoiles indiquent les résidus de la liaison à l'ADN

Parmi les souches productrices des dithiopyrrolones, aucune souche ne montre la présence de cette enzyme, par contre chez *S. clavuligerus hlmM* suggère la présence d'un gène qui code un régulateur transcriptionnel mais de la famille de LuxR.

1.1.2.6 Régulateur de Streptomycine (ThiL)

Le troisième gène qui code pour un régulateur dans le cluster *thi* est *thiL* qui code pour un régulateur de la streptomycine (StrR). Chez les actinomycètes, ce régulateur est bien connu notamment chez *S. griseus*. StrR fait partie de la régulation en cascade du facteur A dirigé par le gène *adpA* (Bibb, 2005), et il joue un rôle d'activateur spécifique du cluster de la biosynthèse de la streptomycine chez *S. griseus* (Retzlaff & Distler, 1995). StrR a été rapporté comme étant un activateur transcriptionnel qui possède un site de liaison à l'ADN (HTH domaine) et interagit avec les gènes du cluster de la voie de biosynthèse de la streptomycine (Thamm & Distler, 1997). ThiL a une identité de 50 % avec StrR de *S. griseus*. De plus les deux enzymes présentent une identité de 63 % avec le domaine de liaison à l'ADN (HTH domaine) (**Figure 34**).

```

1
ThiL VPVPVTALRPSDSPRLAGEDCEHARALAESETALPPVLVHRPTMRVI 80
strR MEHISGNSPEQVRERSAAVTGAVEESELKLSAVTMVPVESLLPSDSPRSAGEDVEHIRTLAASGAELPAIVVMPTTKRVI

81
ThiL DGMHRLHA AVL RGEETIRVRFFDGDAA DAFVLGVR SNV KHGRPLTLADRR AAALRI IASH PQWSDRAI ASATGLAAKT VG 160
strR DGMHRLRATKMRGATEI AVR YFEGGEE EAFI FAVKSNVTHGLPLSLDRKAAATRVLETHPSWSDRAIGLATGLSAKT VG

161
ThiL AIRCATGED PQSRSRVGRDGRVRPLNSADGR LRASALLREKPSASLRQIAVQAGVSLGTVRDVRDRLARGDDPVPPRQR 240
strR TLRSCSTAGVPQSNVRIGRDGRARPLDTEGRKLASRLLENPSASLRQIAAQAGVSPSTASDVRKRLSRGESPLPERDR

241
ThiL RGPRTGSASGAGSSTRAKEPQRAPAADRCAERVEAQRSLLVRLKRDPSLRFTEAGRTLIRLLNSHVVDQPECRQVLDV 320
strR QQE-----VPAVARTPARVSRADGSWA--PHTVALRHL SRDPSVRLTEDGRALLRWLNVVAVRNQDWRLLGNV

321
ThiL PAHCRGIVAEIAQSYADTWKELAVWLDGTSAGS 363
strR PPHCVKVIAELARGCADIWHRVAEELDQAGIDEAAGRSLSDVG

```

Figure 34. Alignement de ThiL de *Sa. algeriensis* avec StrR de *S. griseus*

CHAPITRE II

**Etude de la voie de biosynthèse des dithiopyrrolones chez
Saccharothrix algeriensis NRRL B-24137**

Etude de la voie de biosynthèse des dithiopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis*

NRRL B-24137

II.1 Introduction

L'objectif principal de ce projet de thèse fut l'identification et la caractérisation de la voie de biosynthèse des dithiopyrrolones chez *Sa. algeriensis*. L'analyse *in silico* nous a permis d'identifier un cluster *thi*, dont l'analyse détaillée suggère qu'il pourrait être responsable de la biosynthèse des dithiopyrrolones. Afin de vérifier l'implication du cluster *thi* dans la biosynthèse des dithiopyrrolones, une approche génétique basée sur la construction de mutants déficients pour les gènes clés dans ce cluster a été suivie. Malheureusement, aucune tentative n'a abouti et aucun mutant n'a pu être obtenu. L'expression hétérologue de ce cluster dans d'autres souches non productrices n'a pas non plus permis de produire la thiolutine ou un de ses intermédiaires.

Pour faire face à ces difficultés, et afin de vérifier l'implication du cluster *thi* dans la biosynthèse des dithiopyrrolones, une autre approche a été adoptée. Cette approche s'est basée sur la corrélation entre l'expression des gènes clés du cluster *thi* et la production de la thiolutine (elle représente la dithiopyrrolone majeure produite par *Sa. algeriensis*). D'abord, trois gènes clés dans le cluster *thi* ont été choisis, ces sont les gènes ; *thiE* qui code pour une NRPS multi-domaine, *thiC* qui code pour une thioestérase et *thiI* qui code pour une thiorédoxine réductase. Ces gènes ont été choisis car leurs rôles putatifs est équivalent aux rôles des gènes du cluster *hlm* responsables de la biosynthèse de l'holomycine chez *S. clavuligerus*. Puis, deux milieux ont été testés pour l'analyse transcriptionnelle des ces gènes. Le premier est le milieu semi-synthétique, SS, qui favorise la production des la thiolutine. Le deuxième est le milieu TSB qui ne permet pas de produire cet antibiotique (**Figure 35**).

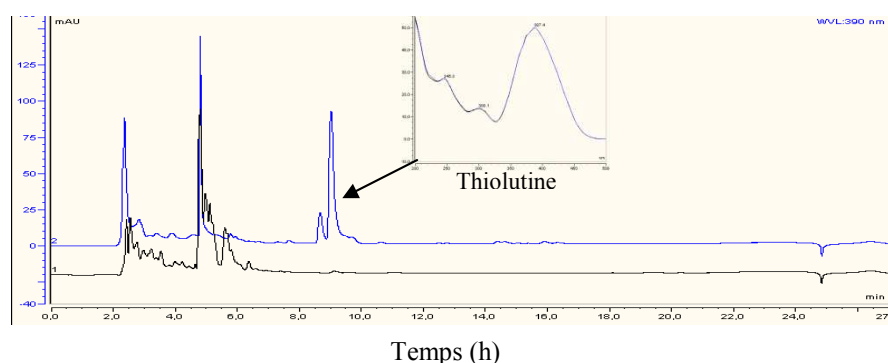


Figure 35. Profils du chromatogramme à 390 nm du surnageant de culture de *Sa. algeriensis* sur deux milieux, ligne bleue milieu SS et ligne noire TSB

Ensuite, nous avons suivi l'expression de ces gènes ainsi qu'un gène de référence *FtsZ*-like (qui est censé être exprimé de manière stable) sur ces deux milieux. Le résultat de RT-PCR a montré que le gène de référence est bien exprimé sur les deux milieux, en revanche *thiE*, *thiI* et *thiC* sont seulement exprimés sur milieu SS, et aucune expression n'a été détectée sur le milieu TSB (**Figure 36**). Ces résultats suggèrent que ces gènes pourraient être impliqués dans la biosynthèse de la thiolutine.

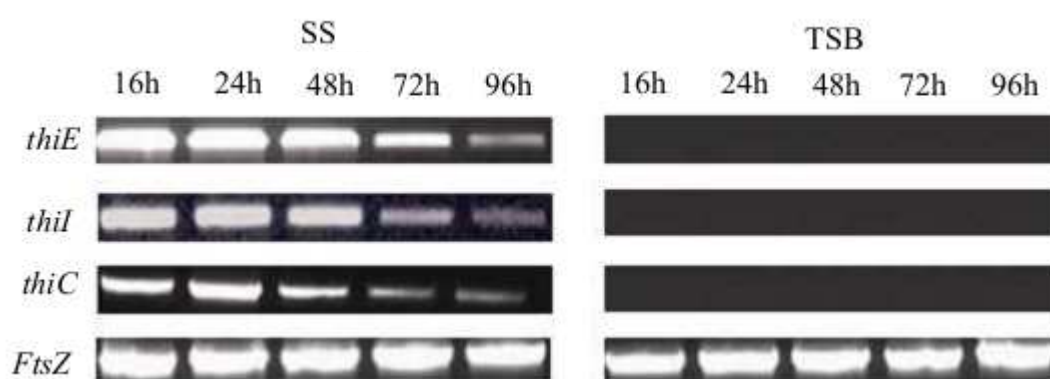


Figure 36. Profil d'expression des gènes *thiE*, *thiI*, *thiC* et *FtsZ*-like au cours du temps sur deux milieux, milieu semi synthétique SS à gauche et Tryptic Soy Broth TSB à droite

Afin de vérifier cette supposition, l'expression de ces gènes a été quantifiée au cours du temps en réalisant une cinétique à différents intervalles de temps (16, 24, 48, 72, 96 h). Puis, une corrélation entre la vitesse de la production spécifique de la thiolutine, et l'expression de ces gènes a été établie.

Le suivi de l'expression de *thiE*, *thiC*, et *thiI* en fonction du temps sur milieu SS a montré que : d'abord les trois gènes s'expriment à partir de 16 h de culture, puis leurs expressions augmentent jusqu'à ce qu'elles atteignent une valeur maximale à 24 h. L'expression maximale est celle de *thiE* puis *thiI* et enfin *thiC* (**Figure 37**). La vitesse maximale de la production spécifique de thiolutine, $0.89 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, est atteinte à 24 h de culture.

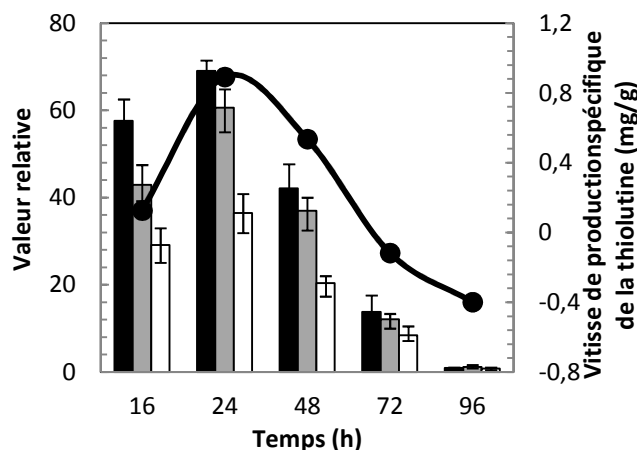


Figure 37. Evolution de la vitesse de production spécifique de thiolutine (●) sur milieu SS et la valeur relative de l'expression de *thiE* colonne noire, *thiI* colonne grise et *thiC* colonne blanche. La vitesse de production spécifique des dithiopyrrolones est exprimée en $\text{mg h}^{-1} \text{g}^{-1}$ de MS. Le temps est donné en heures

La comparaison du profil de vitesse de production spécifique de thiolutine et des profils d'expression des trois gènes cibles a révélé que ces profils sont similaires et qu'ils atteignent leur maximum en même temps (après 24 h de culture). Cette coïncidence conforte notre hypothèse sur l'implication du cluster *thi* dans la biosynthèse de la thiolutine. Récemment, une corrélation similaire entre la production de l'holomycine et l'expression des gènes *hlmC*, *hlmE*, *hlmI* a été établie. Les trois gènes sont bien exprimés chez le mutant surproducteur de l'holomycine *S. clavuligerus opp::aph*, alors que l'expressions de ces mêmes gènes n'est pas détectée chez la souche sauvage qui produit une quantité d'holomycine très porche du niveau de détection ($11\mu\text{g}$ de l'holomycine/ mg d'ADN) (Robles-Reglero *et al.*, 2012).

II.2 **Project article I: Study of potential thiolutin biosynthetic gene cluster in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137**

Accepted for oral communication in International Conference on Antimicrobial Research - ICAR2012, 21-23 Novembre 2012, Lisbon, Potugal

S. SAKER¹, S. LAUTRU², J. L. PERNODET², A. LEBRIHI¹ and F. MATHIEU¹

¹Université de Toulouse, Laboratoire de Génie Chimique, UMR 5503 (CNRS/UPS/INPT), Département BioSyM. INP-ENSAT de Toulouse, 1 Avenue de l'Agrobiopôle, B.P. 32607, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex 1, France.

² Université Paris 11, CNRS, Inst Genet and Microbiol, UMR8621, F-91405 Orsay, France

Author for correspondence:

F. MATHIEU. Université de Toulouse, Laboratoire de Génie Chimique, Department of BioSyM, INP- ENSAT de Toulouse, 1 Avenue de l'Agrobiopôle, B.P. 32607, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex 1, France. Phone: +33 05 34 32 39 35. Fax: +33562193901. E-mail: mathieu@ensat.fr

ABSTRACT

Saccharothrix algeriensis NRRL B-24137 naturally produced dithiolopyrrolone antibiotics which reported to interfere with bacterial RNA metabolism. The high level and diversity of dithiolopyrrolones produced by this bacterium according to the medium composition, and using the same precursor, the pyrrothine, make the understanding of their biosynthetic pathway very interesting. Therefore, *Sa. algeriensis* full genome was sequenced for the first time, and a genome-sequence analyses allowed proposing a candidate cluster for thiolutin biosynthesis by analogy with holomycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces clavuligerus*. Bioinformatics analysis of this gene cluster revealed that thiolutin was assembled by a single multi-domain non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) consisting of heterocyclization, adenylation, and thiolation domains (Cy-A-T), a free-standing thioesterases domain, four tailoring enzymes involved in oxidative reactions and three regulatory and transcriptional genes, one Globin, one transporter and one unknown function N-formimidoyl synthase. This cluster was examined based on the thiolutin-non producing phenotype of mutant deficient in the key gene *thiE* which codes for NRPS. Unfortunately, the genetic manipulation for this bacterium was still difficult and no mutant could be obtained yet. Therefore another genetic approach based on the gene expression coupled with the following of antibiotic production were performed; The expression of three key genes in this cluster was investigated in two different media, i) Semi-Synthetic Medium (SSM) which promotes the production of acetyl-pyrrothine (thiolutin), and ii) Tryptic Soy Broth (TSB) in which no dithiolopyrrolone was detected.

Keywords: *Saccharothrix algeriensis*, dithiolopyrrolone biosynthesis, gene expression

Abbreviations: DTP, Dithiolopyrrolone; SSM, semi-synthetic medium; TSB, Tryptic Soy Broth; *thi*, thiolutin cluster

INTRODUCTION

Dithiolopyrrolones are a class of antibiotics that possess the unique pyrrolinonodithiole (4H-[1,2] dithiolo [4,3-b] pyrrol-5-one) skeleton linked to two variable groups, R1 and R2 (Fig. 1a). This structural class includes the bioactive natural products, thiolutin (Celmer & Solomons, 1955), holomycin (Kenig & Reading, 1979), and aureothricin (Celmer *et al.*, 1952). This class also includes the more recently identified, thiomarinol which has been isolated from a marine bacterium (Shiozawa *et al.*, 1993). Dithiolopyrrolones were initially isolated from species of *Streptomyces* in the 1940s and from other microorganisms such as *Alteromonas rava*, *Xenorhabdus bovienii*, (McInerney *et al.*, 1991a; McInerney *et al.*, 1991b; Paik *et al.*, 2001; Shiozawa *et al.*, 1997), and more recently from *Photobacterium halotolerans*, the marine Gram-negative bacteria *Pseudoalteromonas* sp SANK 73390 and the fish pathogen *Yersinia ruckeri* (Fukuda *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2013; Wietz *et al.*, 2010). Generally, dithiolopyrrolones have broad-spectrum antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria and eukaryotic microorganisms (yeasts, fungi and parasites) (Celmer & Solomons, 1955; Lamari *et al.*, 2002a; Oliva *et al.*, 2001; Webster *et al.*, 2000). Furthermore, they have strong anticancer activity against several human cancer cell lines and are especially useful in the treatment of malignant mammary cells (Arnold *et al.*, 1995; Minamiguchi *et al.*, 2001; Webster *et al.*, 2000). Moreover, some dithiolopyrrolone derivatives have demonstrated promising antitumor activities (Li *et al.*, 2007).

Due to emerging importance of dithiolopyrrolones, the understanding of their biosynthesis was investigated especially in *S. clavuligerus* which known to produce several secondary metabolites with interesting pharmacological activities as the β -lactam, cephamycin C, and clavulanic acid. In addition to these compounds, *S. clavuligerus* wild-type strain 27064 showed an uniform production of holomycin (Fig. 1b) of about 11 μ g per mg of DNA, so close to its detection limit (de la Fuente *et al.*, 2002). Furthermore, it has been reported that mutants of *S. clavuligerus* with disruption in different genes for clavulanic acid biosynthesis (ORF10, ORF12, and ORF15) produce large amounts of holomycin (de la

Fuente *et al.*, 2002). Recently, holomycin (*hlm*) gene cluster was identified and characterized in *S. clavuligerus* (Huang *et al.*, 2011; Li & Walsh, 2010). In this cluster, a stand-alone nonribosomal peptide synthetase (SSCG_03488; HlmE) was postulated to catalyze the condensation of two cysteines to form the L-Cys–L-Cys dipeptide intermediate. Three other stand-alone NRPS were found in this cluster, a thioesterase domain HlmC, a condensation domain HlmL, and an inactive thioesterase domain HlmK. Four oxidoreductases including an acyl-CoA dehydrogenase HlmB, a glucose-methanol-choline HlmD, a lantibiotic decarboxylase HlmF and a thioredoxin-disulfide oxidoreductase HlmI could be encoded by this cluster. Four tailoring enzymes are encoded by the rest of the genes including: two transcriptional regulators HlmJ and HlmM, a globin HlmG and a major facilitator family transporter HlmH. Only one acetyltransferase was found in this cluster to catalyze the transfer of acyl group to holothin core to produce the holomycin. Knockout of HlmE, HlmC and HlmI completely abolished the production of holomycin (Huang *et al.*, 2011; Li & Walsh, 2010). More recently, the biosynthetic gene cluster of holomycin has been identified and characterized in the fish pathogen *Y. ruckeri* (Qin *et al.*, 2013).

Sa. algeriensis produces naturally at least five pyrrothine derivatives characterized by their different N-acyl groups such as thiolutin (acetyl-pyrrothine), senecioyl-pyrrothine (SEP), tigloyl-pyrrothine (TIP), isobutyryl-pyrrothine (ISP) and butanoyl-pyrrothine (BUP) (Fig. 1c) (Lamari *et al.*, 2002a; Lamari *et al.*, 2002b). Furthermore, the addition of precursors to the culture medium led to modify the production levels of known dithiolopyrrolones (Bouras *et al.*, 2006a, b). Precursor-directed biosynthesis (PDB) method led also to produce new dithiolopyrrolone analogues. The addition of benzoic and valeric acids led to the production of unnatural dithiolopyrrolones valeryl-pyrrothine, benzoyl-pyrrothine (BEP) and demethyl-benzoyl-pyrrothine (benzoyl-holothin) (Bouras *et al.*, 2007, 2008). Further exploitation of PDB method revealed the remarkable flexibility of the dithiolopyrrolone biosynthetic pathway in *Sa. algeriensis*. The addition of 5 mM sorbic acid in the culture medium induced the production of new dithiolopyrrolone derivatives: crotonyl-pyrrothine, sorbyl-pyrrothine, 2-hexonyl-pyrrothine and 2-methyl-3-pentenyl (Fig. 1d). In *Sa. algeriensis*, only the last step of the DTP biosyntheses including the pyrrothin acylation by an acyltransferase was investigated basing on enzymological study (Chorin *et al.*, 2009).

Here in, the full genome of *Sa. algeriensis* was sequenced for the first time. The deduced sequence was the prone of bioinformatics analysis, which led to propose a thiolutin

biosynthetic gene cluster. This cluster was verified basing on, gene expression, and DTP productions.

MATERIALS AND METHODS

Strains, plasmids and culture conditions

The strain used in this work is the wild type strain *Sa. algeriensis* NRRLB-24137 (= DSM 44581). For heterologous expression experiments, *S. coelicolor* M1154, and *S. lividans* TK23 were used. The resultant transformants were further fermented. Inocula of these strains were grown in 50 ml of TSB (Tryptic Soy Broth) and semi synthetic medium (SSM) at 30 °C , 240 rpm for 48 h. Five millilitres of each inoculum culture were used to seed 250 ml of same media and the cultures were kept growing for 72 h under the same conditions. Growth curves, DNA extractions, LC-MS and HPLC analysis were obtained from the culture presented previously. The strains of *Escherichia coli* used in this study are listed in Table1. These strains were cultivated in LB medium (Sambrook, 1989). When needed, these antibiotics were added to the cultures: ampicillin, apramycin, kanamycin, at 50 µg mL⁻¹, chloramphenicol and nalidixic acid at 25 µg mL⁻¹.

Preparation and DNA manipulations

E. coli transformations and *E.coli* / *Streptomyces* conjugations, DNA genomic, and DNA plasmidic extractions were performed under standard conditions (Kieser, 2000; Sambrook *et al.*, 2001). Enzymatic digestion and ligation were achieved according to the supplier's manual for each of them. *Taq* polymerase from Qiagen was used for all PCR verifications. If necessary, PCR products were purified using the Nucleospin Gel and PCR clean up kit from Macherey-Nagel. All primers used in this work are listed in Table 2.

Construction of cosmid library of *Sa. algeriensis* genomic DNA

A cosmid library of *Sa. algeriensis* genomic DNA was constructed using the pWED4 cosmid. Total DNA was partially digested with *Sau3AI* and fragments from 35 to 45 kb were ligated with *Bam*HI digested pWED4. The *in vitro* packaging was performed using the Packagene Lambda DNA packaging system (Promega), according to the manufacturer's protocol. Phage particles were used to infect the *E. coli* DH10B strain. About 2000 clones were screened by colony hybridization with the radiolabelled probes P1 and P2. These probes

correspond to 300 bp internal fragment of two genes, *thiC* and *thiI*, in *thi* cluster. The primers used for generating these probes were listed in Table 2.

Attempts to heterologously express the putative thiolutin biosynthetic gene cluster

Cosmids obtained from the genomic bank were introduced separately into *S. lividans* TK23 and *S. coelicolor* M1154. The resultant transformants, *S. lividans* TK23::pThi003, *S. lividans* TK23::pThi004 and *S. lividans* TK23::pThi005 *S. coelicolor* M1154::pThi003, *S. coelicolor* M1154::pThi004 and *S. coelicolor* M1154::pThi005 were further fermented. The fermented broths were analyzed by LC-MS for dithiolopyrrolone derivatives or their intermediaries. Further an antibacterial-activity analysis was also performed for these transformants.

Attempts to construct a *Sa. algeriensis* thiolutin non producing mutant

In order to verify the involvement of *thi* cluster in thiolutin biosynthesis, we used the thiolutin-non producing phenotype of mutants disrupted in keys genes in this cluster as *thiE*. For *thiE* disruption, a 1.9 kb internal fragment of *thiE* was amplified from genomic DNA using the primers (see table). The PCR product was cloned in pGEMT-easy to generate the plasmid pThi001. This plasmid then digested by EcoRI, and cloned into the same sites on pOJ260 yielding pThi002, this later was introduced into the conjugative *E. coli* ET12567/pUZ8002 by electroporation. We used conjugation transfer to introduce pThi002 into *Sa. algeriensis*. Optimization of conjugation conditions *E.coli* / *Sa. algeriensis* were firstly assayed using vectors containing site-specific recombination and with different conditions (concentration of *E. coli*, conjugation medium, overlaying by SNA medium (Kieser, 2000) or H₂O, incubation temperature).

Total RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from *Sa. algeriensis* using the Kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, France) with slight modification, i. e. seven hundred microlitres of *Sa. algeriensis* homogenate culture were mixed with the same volume of solution I without washing or centrifugation. The quality and quantity of RNA were checked by the A_{260} / A_{280} ratio via a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). 1.5 % agarose gels were run to visualize the integrity of the RNA according to standard

protocols (Sambrook *et al.*, 2001). The cDNAs were obtained after reverse transcription of 2 µg of DNase I-treated total RNA using Advantage RT-for-PCR Kit (BD Biosciences) and random hexamer primers according to the manufacturer's instructions. The cDNA products were diluted 1:10 and stored at -80 °C.

Primer design and RT- PCR reaction

Primers were designed using Clone Manager 9 software (Sci-Ed Software, USA). For transcriptional analysis the primers were designed in order to produce amplicons between 100 and 150 bp. Primer synthesis was performed from GeneGust (Luxembourg). Primer pairs listed in Table 2 were used to analyze the cDNA for *thiE*, *thiC*, *thiI*, and *FtsZ*-like gene expression. The PCR was performed with the *Taq* DNA Polymerase kit (Qiagen, France) according to the user manual provided and PCR conditions were as follows: 96 °C for 10 min, (96 °C for 30 s, 52 °C for 30 s and 72 °C for 30 s) x 30 cycles followed by an incubation at 72 °C for 10 min. The amplified products were examined by agarose gel electrophoresis.

RT- qPCR conditions and analysis

The 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) was used for RT-qPCR amplification and detection. Samples for RT-qPCR were prepared in 25 µL reaction mixture in MicroAmp optical 96-well reaction plates and sealed with optical adhesive covers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Each reaction contained 2 µL of template cDNA, 12.5 µL of 2 x Quantitect SYBR[®] Green I Mix (Qiagen, Courtaboeuf, France), and 1.25 µL each of forward and reverse primers (10 µM), and 0.05 µl ROX solution 5 µM (Fermentase 50 µM). Reactions were run using the manufacturer's recommendation as cycling parameters of 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, 40 cycles of 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min. Negative controls (No-template controls) were included in all RT-qPCR assays, and each experiment was performed in triplicate. Dissociation curves for each amplicon were then analyzed to verify the specificity of each amplification reaction; the dissociation curve was obtained by heating the amplicon from 60 °C to 95 °C. SYBR fluorescence was analyzed by StepOne software version 2.0 (Applied Biosystems). The C_q (quantification cycle, previously known as the threshold cycle C_t) was automatically determined for each reaction by the Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System set with default parameters and then the C_q value was calculated and reported using the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method (Livak & Schmittgen, 2001). The *FtsZ*-like gene [*FtsZ* is homologous to tubulin, the building block of the microtubule cytoskeleton

in eukaryotes (Margolin, 2005)] was used as reference gene to quantify the relative expression of targeted genes, as it is expressed constantly throughout the growth of *Sa. algeriensis*.

Dry Cell Weight (DCW) measurement

Dry cell weights (DCW) were determined as described by Bouras *et al.* (2006a) and expressed in g L⁻¹.

Dithiopyrrolones quantification

For detection and quantification of thiolutin produced in the culture medium of *Sa. algeriensis*, analyses were performed as described by (Bouras *et al.*, 2006b). For heterologous expression verification, fermentation broth of the transformants was filtered (0.45 µm cellulose nitrate filter) then the cell-free filtrate was extracted twice with dichloromethane. Then the organic phase was collected and dried with anhydrous sodium sulfate. The extracted product was desiccated under vacuum, and dissolved in methanol for LC/MS and MS/MS analyses.

Data analysis

BioEdit Sequence Alignement Editor Version 7. 1. 3. 0 was used for local Blast. The protein-protein Blast (Blastp) searches were conducted at the GenBank database: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. The prediction of NRPS domains and the amino acid specificities of the A domain were performed by using the BLAST servers provided at <http://ab.inf.uni-tuebingen.de/toolbox/index.php?view=domainpred> and <http://www.nii.res.in/searchall.html>. The secondary metabolites search tool antiSMASH (Medema *et al.*, 2011) was used to identify the homologous-cluster. For statistical analysis SPSS 16.0.2 program was used.

RESULTS

***In silico* identification of the putative thiolutin biosynthetic gene cluster**

Sa. algeriensis whole-genome was sequenced for the first time. Following this sequencing, a contig library of 4768 contigs was obtained.

The homologous genes to those of *hlm* have not been obtained in a single contig in library contigs of *Sa. algeriensis*. However, three contigs, their size of 5921, 5118 and 1931 bps, were identified to contain ten genes homologous to those found in *hlm*. The next step was to join up the adjacent contigs by obtaining sequences from the gaps between them. Firstly, the identified contigs were checked if they share any sequence. Then primer pairs were designed in the end of adjacent contigs. Finally, the three contigs were assembled in one contig, its size is of 13836 bps, containing ten genes. The assembly of these genes was named *thi* cluster.

Construction of a cosmid library of *Sa. algeriensis* genomic DNA

To determine whether the *thi* gene cluster is responsible for thiolutin biosynthesis, a genomic cosmid library of *Sa. algeriensis* was constructed using an integrative *Streptomyces-E. coli* shuttle vector, pWED4. We used internal fragment from two genes *thiI* and *thiC* as probes to obtain the overlapping cosmids for full length of the *thi* gene cluster. Screening of the cosmid library resulted in the isolation of three cosmids which contained *thi* cluster as verified by PCR using the oligonucleotides cited before. These cosmids were named pThi003, pThi004 and pThi005. For cosmid full-insert sequence, pairs of primers were designed subsequently at each insert extremity and in the two directions (from cosmid to insert and *vice versa*), the sequencing was performed using the cosmid of interest pThi003 and pThi004 as matrix and the primers listing in Table 2. The gaps between these linked contigs are closed by subsequent PCR strategies. The results of full-insert sequence allowed extending *thi* cluster.

Heterologous expression of the *thi* cluster in *S. lividans* TK23 and *S. coelicolor* M1154

The three cosmids previously obtained from the previous step were introduced separately into two hosts *S. lividans* TK23 and *S. coelicolor* 1154. The obtained transformants were *S. lividans* TK23::pThi003, *S. lividans* TK23::pThi004 and also *S. lividans* TK23::pThi005 *S. coelicolor* M1154::pThi003, *S. coelicolor* M1154::pThi004 and *S. coelicolor* M1154::pThi005. We also introduced the cosmid pWED4 as control. These transformants were further fermented in ISP2 and SSM media. The supernatants corresponding to 72 aged cultures were extracted twice (volume/volume) by dichloromethane and concentrated 100 fold in methanol. These extracts were then analyzed in LC-MS. From

mass spectrometry and UV spectrometric analyses, as well as by comparison with all dithiolopyrrolone derivatives reported in the literature (data not show), neither thiolutin nor its intermediaries have been detected. Furthermore, the antibacterial activity assays showed that these transformants as well as the control (with pWED4) not displayed inhibition zone for *Bacillus subtilis* ATCC6633 and *Mucor ramannianus* NRRL1829 comparing to *Sa. algeriensis* wild type.

Attempts to construct a *Sa. algeriensis* thiolutin non-producing mutant

In order to optimize the conditions of conjugation, different conditions were tested using the integrative vector pSET152 which contains a site-specific recombination. Two incubation temperatures, 30 and 37 °C, three media SFM, SAF, ISP2, two overlaying solution SNA medium and water were tested. Different concentrations of *Sa. algeriensis* spores and *E. coli* cultures, three *Sa. algeriensis* spores concentrations of 10^8 , 10^8 and 10^7 spores/ mL and five *E. coli* concentrations +10X, +3X, X, -10X, -3X were also tried (normally *E. coli* culture of DO = 0.6 concentrated 10 fold which noted here X). Other integrative vectors which contain site-specific recombination as, pKT02, pRT801 and pOSV554, were also tested. Unfortunately, all previous attempts not allowed obtaining any transformant. The same difficulty was found when we tried to construct a *Sa. algeriensis* mutant deficient in *thiE* gene. The attempt of conjugation succeeded only when *E. coli* strain contained the plasmid pThi003, almost fifty colonies were obtained in conjugation standard condition.

Sequence analysis and comparison with already identified dithiolopyrrolone gene clusters

Genome mining of *Sa. algeriensis* genome based on the holomycin biosynthetic gene cluster, *hlm*, in *S. clavuligerus* (Li & Walsh, 2010). This analysis allowed us to identify a gene cluster in the chromosome of *Sa. algeriensis* which appears to be responsible for the biosynthesis of dithiolopyrrolone derivatives. This gene cluster named *thi* (thiolutin) consisted of 12 genes, covering an approximately 15.2 kb region (Fig. 2 and Table 4). Advanced bioinformatic analyses using AntiSMASH site (Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell) (Medema *et al.*, 2011) allowed the identification of similar cluster in two Gram-negative bacteria; the fish pathogen *Y. ruckeri* ATCC 29473 (Qin *et al.*, 2013) which

produces the holomycin and *Pseudoalteromonas* sp SANK 73390 producer of holothine derivatives as xenorhabdins and thiomarinols (Fukuda *et al.*, 2011; Murphy *et al.*, 2011). We observed also a group of genes similar to *thi* cluster in marine Gram-negative bacterium *X. bovienii* (grouped in XBJ1_1743 to XBJ1_1754) (Chaston *et al.*, 2011) which have been already reported to produce different dithiolopyrrolone derivatives (McInerney *et al.*, 1991a; McInerney *et al.*, 1991b; Paik *et al.*, 2001; Shiozawa *et al.*, 1997), but no cluster for these antibiotics has been yet identified. Advanced analyses of *thi* sequence and functional annotation showed that several open reading frames (ORFs) in *thi* cluster appear to be homologous of genes in the clusters mentioned above including: three oxidoreductases likely to be involved in oxidative transformations, including a putative acyl-CoA dehydrogenase ThiB, a glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductase ThiD, a phosphopantothenoylcysteine decarboxylase (PPC-DC) ThiF, one globin ThiG, one thioesterase and one multi-domain NRPS (details of similarity and identity were presented in Table 4). The NRPS contains a unique arrangement of cyclization (Cy), adenylation (A) and thiolation (T) domains. This NRPS module arrangement was also observed in *S. clavuligerus* and *Y. ruckeri*, *Pseudoalteromonas* and *X. bovienii*. Predicted adenylation specificity of the ThiE A domain suggested activation of cysteine-like amino acids (Table 3).

Moreover, the Cy domain of ThiE as well as the other NRPSs presented the characteristic motif DXXXXDXXS of Cy domain (Fig. 3). Additionally, one stand-alone NRPS, ThiC, has the typical catalytic triad (Ser-His-Glu/Asp) of a thioesterase (Linne *et al.*, 2004) (Fig. 4).

Only two genes were common with *S. clavuligerus*, there are the fourth oxidoreductase one, a putative thioredoxin reductase *thiI*, and first regulator gene *thiJ*. One gene was common only with *X. bovienii* this was unknown function *thiK* gene encoding a N-formimidoyl synthase

Differences between *thi* cluster and the other clusters were also evident. Firstly, three genes were identified in *thi* cluster which are not present in the other cluster. They are, *thiL* gene encodes a streptomycin regulator, *thiM* encodes a transcriptional regulator from MerR family and finally *thiH* encodes a MFS transporter. Secondly, no homologous gene encoding for acyltransferase could have been identified in *thi* cluster. In the contrary, this enzyme was found in *S. clavuligerus*, *Y. ruckeri* and *Pseudoalteromonas*. Additionally, no homologous

gene encoding a condensation domain could be found either in *Sa. algeriensis* genome or in *Y. ruckeri*, *Pseudoalteromonas* and *X. bovienii* genomes. Only *S. clavuligerus* presented this gene in *hlm* cluster.

Biomass and thiolutin production

Sa. algeriensis presents similar growth in the two studied media TSB and SSM and maximal DWC was observed at 96 h. No thiolutin has been detected in the TSB medium, otherwise with SSM (Fig. 5). On SSM, thiolutin specific production reached the maximum values of 21 mg. g⁻¹ at 48 h of culture (Fig. 6), whereas specific production rate reached its maximum level of 0.94 mg g⁻¹ h⁻¹ at 24 h.

The expression of the three genes: *thiC*, *thiE*, and *thiI*

Firstly, the expression of the reference gene *FtsZ* was tested on both media TSB and SSM. Therefore, a PCR was performed using the cDNA as template. The gel electrophoresis photo (Fig. 7) shows that the expression of this gene was stable over time culture (at least for 96 h) for TSB and SSM media. Consequently, this gene was used as a reference gene.

The expression of the three genes: *thiC*, *thiE* and *thiI* was examined using the same cDNA indicated above. The obtained results indicate that the three genes were not expressed in the TSB medium, interestingly; they were expressed only in SSM (data not shown). The expression of these genes was followed over time culture using RT-qPCR, and then the relative expression was coupled with specific production rate of thiolutin. The results indicate that, although the expression level for the three chosen genes was different, the gene-expression evolutions are still similar. The gene expressions start early 16h and go up to the maximum value at 24 h (69, 60, and 36.4 for *thiE*, *thiI*, and *thiC* respectively) then it decreased at 48 h (Fig. 8). Moreover, this Figure shows clearly that not only the specific production rate of thiolutin and the gene expressions reach a maximum level at 24 h of culture, but also the profile of each one over time is similar.

DISCUSSION

In the present study, bioinformatic analyses allowed us to suggest a candidate cluster, *thi*, for thiolutin biosynthesis in *Sa. algeriensis*. The involvement of this cluster in thiolutin biosynthesis was also investigated basing on gene expression and antibiotic production.

Firstly, bioinformatic analyses of *Sa. algeriensis* genome basing on holomycin biosynthetic gene cluster *hlm* in *S. clavuligerus*, led to propose a biosynthetic gene cluster, *thi*, potentially responsible for thiolutin biosynthesis in *Sa. algeriensis*. In this cluster, only one multi-domain NRPS, ThiE, including three domains Cy-A-T was found. A similar Cy-A-T module arrangement of a NRPS was already reported in the holomycin biosynthetic gene cluster in *S. clavuligerus* and *Y. ruckeri*, holothine derivatives in *Pseudoalteromonas* and dithiolopyrrolone derivatives in *X. bovienii*. Other similar module arrangement was also found in the biosynthesis of the yersiniabactin siderophore, where the Cy domain serves a dual function involving both peptide bond formation and cyclization of the thiazolyl motifs (Miller *et al.*, 2002b). Predicted adenylation specificity of the ThiE A domain suggested activation of cysteine-like amino acids (Table 3). This result is consistent with previous biosynthetic feeding experiments showing that L-cysteine is a precursor involved in dithiolopyrrolone biosynthesis (Furumai *et al.*, 1982). Our analyses showed that *thi* cluster is different from *hlm* one in *S. clavuligerus*. Firstly, No obvious ORF in *thi* gene cluster could be assigned to the NRPS condensation domain which supposed to be responsible for peptide-bond formation. A similar absence was also observed in the holomycin gene cluster from the fish pathogen *Y. ruckeri*, holothine derivatives gene cluster in *Pseudoalteromonas* (Wietz *et al.*, 2010), and dithiolopyrrolone derivatives in *X. bovienii*. However, Cy domain predicted to be a variant of condensation domains to make peptide bonds during chain elongation on NRPS assembly (Sattely *et al.*, 2008). Since, the ability of NRPS cyclization domain to play the condensation domain role was tested, Cy domain sequences were analyzed for conserved motif of the condensation domain HHXXXDX14Y (Koglin & Walsh, 2009). Among the five strains, none one has presented this motif (Fig. 3). On the contrary, Li & Walsh (2010) had reported the presence of the Cys-Cys dipeptide in solution contained also purified HlmE which indicated that condensation could be achieved by the HlmE cyclization domain. Consequently, we suggest that the condensation of two molecules of cysteine could be occurred by cyclization domain by condensation motif differs of this cited before or it is performed with another enzyme.

Secondly, our analysis showed also that no ORF in *thi* cluster can encode for an acyltransferase responsible for the acylation of pyrrothine intermediate to thiolutin. The most similar gene to the one found in *S. clavuligerus* with 51 %, and 62 % of identity and similarity, respectively, was located outside this cluster. A similar absence was also observed

in the dithiopyrrolones gene cluster in *X. bovienii* (grouped in XBJ1_1743 to XBJ1_1754) (Chaston *et al.*, 2011). The latter has been well known as producer to several dithiopyrrolone derivatives (Li *et al.*, 1995; McInerney *et al.*, 1991a; Paik *et al.*, 2001).

Thirdly, *thi* cluster encodes an unknown function N-formimidoyl synthase, similarly this enzyme was also observed in the dithiopyrrolones gene cluster in *X. bovienii*, while the three other cluster not presented this enzyme. The presence of such enzymes in the two bacteria that produced pyrrothine and holothine derivatives and its absence in the three other which produced only holothine derivative could be related to this enzyme.

One stand-alone NRPS protein ThiC could be found in *thi* cluster, this is the thioesterase domain. This enzyme catalyzes the release of the peptide from the assembly line through hydrolysis of the phosphopantetheinyl thioester to form a free acid or by cyclization using an internal nucleophile (Kohli & Walsh, 2003). Despite the low similarity between ThiC and other thioesterase in four other clusters (less than 30 %), typical catalytic triad Ser-His-Asp/Glu of the thioesterase (Bruner *et al.*, 2002) were present for all enzymes.

We also identified a *thiI* gene encoding a putative thioredoxine reductase. This enzyme plays a crucial role in holomycin biosynthesis in *S. clavuligerus*, mutant deficient in this gene was unable to produce the holomycine (Huang *et al.*, 2011). Further, HlmI was reported to play an important role for self-protection in *S. clavuligerus*. The mutant deficient in this gene was more sensitive to the holomycin (Li & Walsh, 2011; Li *et al.*, 2012). No homologous gene was found in Gram-negative bacteria (*Y. ruckeri*, *Pseudoalteromonas* and *X. bovienii*) suggesting that the underlying chemical logic of disulphide formation is different in the Gram-negative bacteria (Qin *et al.*, 2013)

Construction of a cosmid library of *Sa. algeriensis* genomic DNA allowed obtaining three cosmids, pThi003, pThi004 and pThi005. Full-sequencing insert for Thi003 and pThi004 led to extend *thi* cluster to 15.2 kb. Introducing these cosmids in two different hosts, *S. lividans* TK23 and *S. coelicolor* M1154, fully succeeded, but no transformant could produce thiolutin or any of its intermediaries. The absence of acyltransferase gene can explain why these transformants could not produce the thiolutin but it is not yet known why these transformants not produced its intermediaries. The presence of regulatory gene which can control the expression of whole gene cluster could be a hypothesis to explain the absence of thiolutine-intermediaries production. The existence of three transcriptional regulatory genes in

thi cluster (*thiJ*, *thiL* and *thiM*) makes this hypothesis significant. Nevertheless, the control of this cluster by no specific regulatory genes located outside *thi* cluster must not be excluded. In *S. clavuligerus*, mutant deficient in clavulanic acid biosynthesis gene cluster, ORF12 or ORF15, produced 150-250 fold of holomycin compared to the wild type (de la Fuente *et al.*, 2002). The disruption of *rhlA* gene which encodes for rhodanese-like protein (double mutant *S. clavuligerus* *OFR15::aphΔrhlA*) was strongly decreased holomycin production comparing to *S. clavuligerus* *OFR15::aph* (Nardiz *et al.*, 2011). Another mutant deficient in *argR* (ArgR regulates the expression of arginine biosynthetic genes) produced 150 fold of holomycin compared to wild type strain (Yin *et al.*, 2012).

Attempts to conjugate *E. coli* strains which contain integrative plasmids (pSET152, pKT02, pRT801 and pOSV554) as well as to construct a *Sa. algeriensis* thiolutin non-producing mutant did not lead to obtain any mutant, in spite of testing different conditions. While the conjugation of *E. coli* strain contained pThi003 plasmid with *Sa. algeriensis* allowed obtaining almost fifty colonies. This result indicates that, apparently, conjugation efficiency strongly depends on the size of the region of recombination homologues (for pThi003 plasmid contains at least 35 kbs of *Sa. algeriensis* DNA).

Finally, the expression of three key genes *thiC*, *thiE*, and *thiI*, associated with the thiolutin production was used as a methodology to verify the implication of these genes in thiolutin biosynthesis. The disruptions of the homologous genes *hlmC*, *hlmE*, and *hlmI* in holomycin biosynthesis cluster completely abolished the holomycin production for both *S. clavuligerus* the wild-type strain and the holomycin-overproducer strain (Huang *et al.*, 2011; Li & Walsh, 2010).

The absence of thiolutin production and *thiC*, *thiE*, and *thiI*, expressions on TSB medium compared to SSM one suggested the involvement of these genes in thiolutin biosynthesis. This suggestion was supported by the similarity of time course of both rates of thiolutin specific production and gene expressions. Further, the coincidence between the maximum rate of thiolutin production and the maximum expression emphasized our hypothesis about the implication of *thi* cluster in thiolutin biosynthesis. Recently, similar correlation between holomycin production and *hlmC*, *hlmE*, and *hlmI* gene expression was reported. *hlmC*, *hlmE*, and *hlmI* were well expressed in holomycin overproducer strain *S.*

clavuligerus opp::aph ,while they were not expressed in the non-producer strain *S. clavuligerus* wild type (Robles-Reglero *et al.*, 2012).

In conclusion, our paper presents new insight in the dithiolopyrrolone biosyntheses in *Sa. algeriensis*, furthermore it proposed a cluster candidate for this biosynthesis. This proposition was supported by our results concerning transcription analyses of key genes.

Table 1: Strains and plasmids used in this study

Strains	Description	Reference
E. coli strains		
ET12567/ pUZ8002	Host strain for conjugation from E. coli to Streptomyces	(Gust <i>et al.</i> , 2004)
DH5 α	General cloning host	Promega
DH10B	Strains used for λ RED-mediated recombination	Invitrogen
DY330	Strains used for PCR-targeting mutagenesis	(Yu <i>et al.</i> , 2000)
BW25113/PIJ790	Strains used for PCR-targeting mutagenesis	(Gust <i>et al.</i> , 2002)
Plasmids		
pGEMT-easy	<i>E. coli</i> cloning vector	Promega
POJ260	Conjugative plasmid	
pWED4	<i>E. coli</i> -Streptomyces shuttle cosmid for construction of the genomic library	
pThi001	pGEMT-easy derivative containing a 1.9 kb PCR product from <i>thiE</i> gene, construct for <i>homE</i> inactivation	This work
pThi002	POJ260+ derivative containing pThi001 EcoRI fragment	This work
pThi003	pWED4-based <i>Sa. algeriensis</i> genomic library cosmid containing <i>thi</i> cluster	This work
pThi004	pWED4-based <i>Sa. algeriensis</i> genomic library cosmid containing <i>thi</i> cluster	This work
pThi005	pWED4-based <i>Sa. algeriensis</i> genomic library cosmid containing <i>thi</i> cluster	This work
pSET152	Integrative plasmid	
pKT02	Integrative plasmid	
pRT801	Integrative plasmid	
pOSV554	Integrative plasmid	
Host strains		
<i>S. lividans</i> TK-23		
<i>S. coelicolor</i> M1154		
Host strains derivatives		
<i>S. coelicolor</i> M1154/[pThi003]	<i>S. coelicolor</i> M1154 contains pThi003 cosmid	This work
<i>S. coelicolor</i> M1154/[pThi004]	<i>S. coelicolor</i> M1154 contains pThi004 cosmid	This work
<i>S. coelicolor</i> M1154/[pThi005]	<i>S. coelicolor</i> M1154 contains pThi005 cosmid	This work
<i>S. lividans</i> TK-23/[pThi003]	<i>S. lividans</i> TK-23 contains pThi003 cosmid	This work
<i>S. lividans</i> TK-23/[pThi004]	<i>S. lividans</i> TK-23 contains pThi004 cosmid	This work
<i>S. lividans</i> TK-23/[pThi005]	<i>S. lividans</i> TK-23 contains pThi005 cosmid	This work

Table 2: Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'-3')	Comments
Primers used for the transcriptional analysis		
NRPS-F NRPS-R	CGTCGTGCTGCTGGCCGCTTAC AGCCGGTCGAGCAGGGTGAG	<i>thiE</i>
ThiC-F ThiC-R	CTACCGGCCGTGGAAGGAG GTCGCCGATCTTCGGGTGC	<i>ThiC</i>
ThiI-F ThiI-R	GTGCTGCACTGCCCCGTA CTG AGCTGGGCGTGGAACACC	<i>thiI</i>
FtsZ-F FtsZ-R	CGCCGTGAACCGGATGATCG GTCGGCGTCGGACATCAGCAG	<i>FtsZ</i> -like
Primers for in-frame <i>thiE</i> disruption		
SS042 SS043	GGCCGGTGTTCCGCAAGCTC TCGGTCCGGCCCAGGATCTC	Forward and reverse primer for <i>thiE</i> disruption
Primers used for full-insert sequence and closing sequence gaps		
T7p T7t	TAATACGACTCACTATAGGG GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Sequencing universal primers
SS013	ACGACGGGTGGGTGAAGATG	Primer for sequencing contig664 (for pThi-004)
SS014	GCGAGGCGCTCGGGTTGCTG	Primer for sequencing contig3432(for pThi-004)
SS015	AGCGCCGAATTCGGCTCGCG	Primer for sequencing contig723 (for pThi-003)
SS016	TACTACTCCTCGGCGCGCGG	Primer for sequencing contig4193 (for pThi-003)
SS017	GAGGTCCAGGCGCTGCTGCT	Primer for cluster sequence (from cluster pThi003 to cosmid) right-side
SS018	AGCTACGACGTCGGGTCGCG	Primer for cluster sequence (from cluster pThi003 to cosmid) left-side
SS019	TGCTGGCGGACCGGAAGCTG	Primer for contig 3432 sequence (following the result of SS014 primer) for pThi004
SS020	ATGCCAGGGGCACGGTGCTC	Primer for contig669 sequence (following the result of SS013 primer) for pThi004
SS021	TCAGGGTGTCGGGAGGCCGTCG	Primer for contig 1697
SS022	GGGTGAGCAGGTCGAGCAGG	Used with SS019 primer to complete the sequence of <i>thi</i> cluster
SS023	TGGTGGACGAGTCGGGCGAGCTCCAC	séquence thiolutine
SS024 SS025	GATCTCGGTGCCCAGCAC CACCTGCGCACCGCCGAG	Forward and reverse primers to close the gap
SS026	GAGGATCAGCCGGTAGGCGCGCTC	Sequencing
SS027	TCGCTGGAGTTCGGCGTGCTGTCG	Sequencing
SS028	GAACCCGAACGCGAGGTGGTG	Sequencing

SS029	CAACATGATCGCGCTGGGCACCCTG	Sequencing
SS030	TGGTGTCTGTCGGCACC CGAAG	Sequencing
SS031	GCGGGCTCTCATATTTGGTAAGG	Sequencing
SS038 SS039	TACGGCGGTTCGGATCGTCCG CACCCGGTCCTCGTCGGACA	Forward and revers primers to close the gape in <i>thiI</i> gene
SS040 SS041	TACGGCGGTTCGGATCGTCCG ATGGCGCTGGAGGACACCGCCT	Forward and revers primers to close the gape in <i>thiC</i> gene

Table 3: Prediction of substrate specificity of ThiE according to selectivity-conferring residues of A domains (Huang *et al.*, 2011; Stachelhaus *et al.*, 1999)

Domain	Position										Similarity (%)
	235	236	239	278	299	301	322	330	331	517	
Orn(1)	D	M	E	N	L	G	L	I	N	K	60
Ser	D	V	W	H	L	S	L	I	D	K	60
Cys	D	L	Y	N	L	S	L	I	W	K	100
HlmE	D	L	Y	N	D	A	L	I	W	K	80
ThiE	D	L	Y	N	L	S	L	I	W	K	

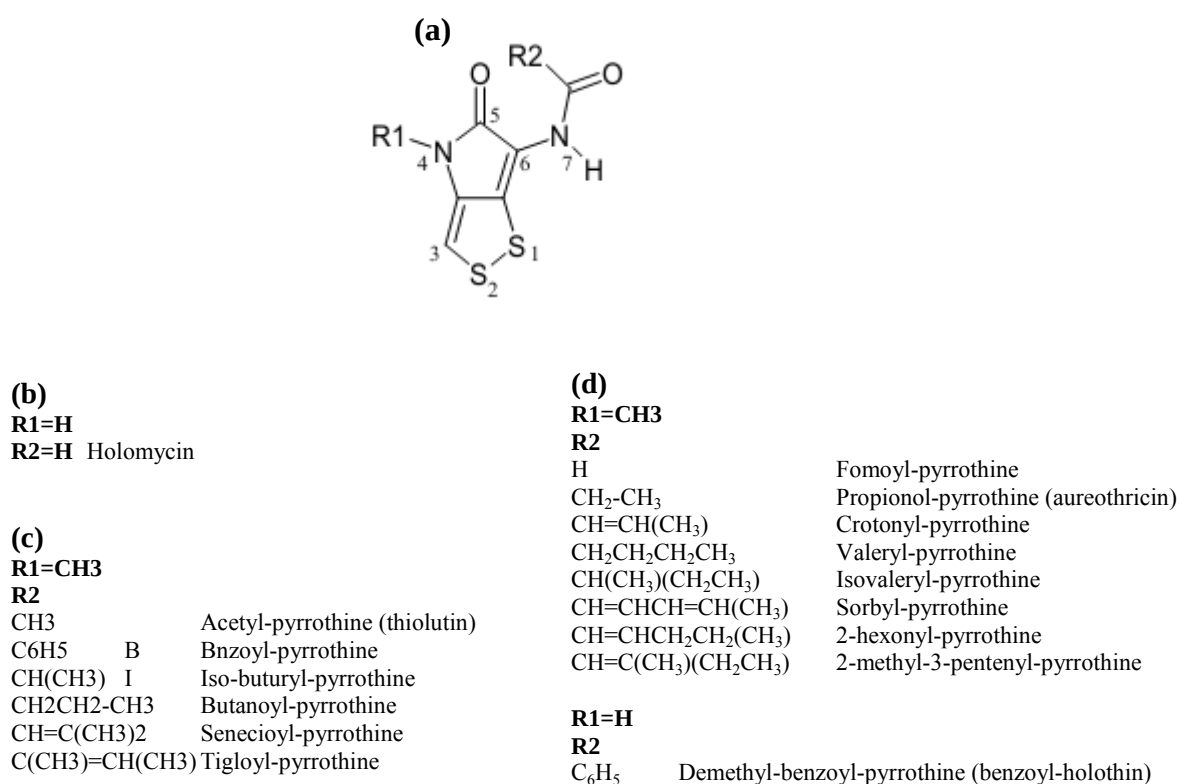


Fig.1. Dithiopyrrolones general structure (a), holomycin produced by *S. clavuligerus* (b), natural dithiopyrrolones products produced by *Sa. algeriensis* (c), unnatural dithiopyrrolones products using precursor-directed biosynthesis ‘PDB method’ (d)

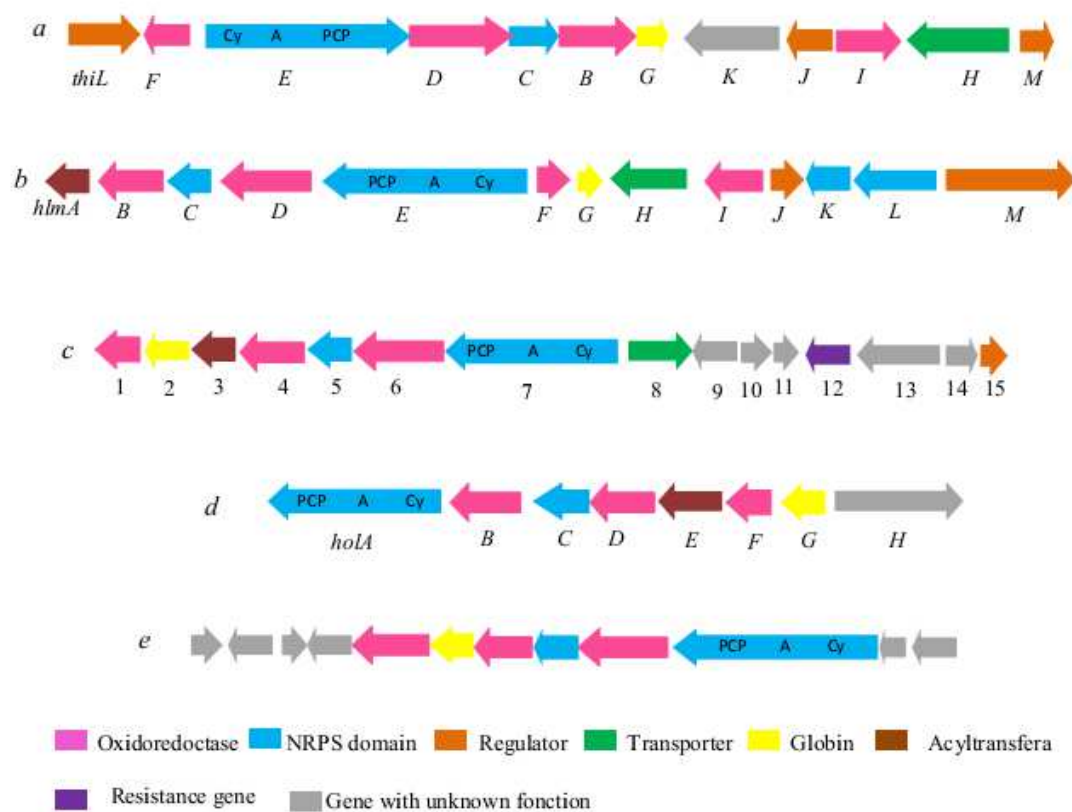


Fig. 2. Comparison of the genetic organization of the biosynthetic gene clusters from (a) *Sa. algeriensis*, (b) *S. clavuligerus*, (c) *Y. ruckeri* ATCC 29473, (d) *Pseudoalteromonas* sp SANK 73390 and (e) *X. bovienii* SS-2004

Table 4: Deduced functions of ORFs in the thiolutin biosynthetic gene cluster of *Sa. algeriensis* and their identities and similarities with protein homologs in *S. clavuligerus*, *X. bovienii*, *Y. ruckeri* et *Pseudoalteromonas*

ORF	Protein Homolog and origin								Proposed function
	<i>S.clavuligerus</i>	Identity/ Similarity %	<i>X. bovienii</i> SS-2004	Identity/ Similarity %	<i>Y. ruckeri</i> ATCC 29473	Identity/ Similarity %	<i>Pseudoalteromonas</i> <i>sp</i> SANK 73390	Identity/ Similarity %	
<i>thiB</i>	SSCG_03485	72/84	XBJ1_1749 (YP_003467655.1)	54/74	ZP_04616955.1	56/71	YP_004661190.1	54/72	Acyl Co-A dehydrogenase
<i>thiC</i>	SSCG_03486	52/65	XBJ1_1750 (YP_003467656.1)	38/56	ZP_04616956.1	32/50	YP_004661189.1	35/52	Thioesterase domain
<i>thiD</i>	SSCG_03487	62/72	XBJ1_1751 (YP_003467657.1)	47/64	ZP_04616957.1	45/60	YP_004661188.1	44/62	Glucose-Methanol- Choline Oxidoreductase
<i>thiE</i>	SSCG_03488	64/75	XBJ1_1752 (YP_003467658.1)	45/63	ZP_04616958.1	45/60	YP_004661187.1	44/60	NRPS
<i>thiF</i>	SSCG_03489	63/78	XBJ1_1746 (YP_003467652.1)	52/73	ZP_04616952.1	57/74	YP_004661193.1	54/72	Lantibiotic decarboxylase
<i>thiG</i>	SSCG_03490	63/78	XBJ1_1748 (YP_003467654.1)	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			MFS transporteur
<i>thiI</i>	SSCG_03492	69/78							Thioredoxin reductase
<i>thiJ</i>	SSCG_03493	67/83							Regulatory protein
<i>thiK</i>	<i>S. tenjimariensis</i> CAH60155.1	52/67	XBJ1_1132 (YP_003467058.1)	44/61					N-formimidoyl synthase
<i>thiL</i>	<i>S. glaucescens</i>	53/66							Streptomycin regulator
<i>thiM</i>	SCLAV_05211	37/52							Transcriptional regulator (MerR-family)

```

ThiE 1 -----MVIGRHRGIELGGVAGHYVEFEGPALDVERLSRALREVVARHMLRAVTAPDGAGQCVLDEVPDYEIRVTDLR
HlmE 1 PAERHDAFPLTDIQHGYLIGRHKGLELGGVSSHYFFEDGPALDVPRLLTALGRVVERHMLRAVTDADGA-QRVLAETPPYIAVTDLR
Hom7 1 ENDSEPFSLTDIQYA-YLIGRNAAIPLGGVPASHYTEIEVYNPDFDRLNDALGRVIACHPVMSALT-DSGRQRF LPAMGDDVIPLIDCS
HolA 1 SANSTSPFTLSDIQYAYVIGRNPGLVGGSSSFYIEIDVEDADIGSLTKSLNHVIMLHPMLRAVISSDGK-QEVLNVPPYHIEVL DVA
X. b 1 ESTTDDFPLTDIQYA-YLIGRNPGLVGGRTSCLYTEWDVKSLDIKVLNDALNMVIGYHPMLRALTSSDGQ-QRVLSESLAYTISIQDGR

ThiE 75 DRTDEERRAALDAIRAELSDEVPTDQWPLFDIRATLPAEGRTRLHLSFDLLFVDVRSLYAVLAEWRRRYDEPDWRPEPLDVTFRDHVLR
HlmE 90 EVSDAERDEALARIRAELENQVLPSPDRWPPFDIRATHLPDRRLHVSVDLLFVDVRSLLLVLAEWRRFYDDPAWSPAPLDHTFRDHVLA
Hom7 89 GQDPQSVHDQVGKTRIEAMRTQGNVRPFDIRATQIGNRNIRLHLCFDMFFDLHSIKIIMRDWWEFYENPEMQKTESRLNFSDYISL
HolA 90 ALSDDEKKLALAEHRHALEATLLSLGEAPSFVVKAIRLDSGLVRLAIYFDLIFVDMHSVYLVLDQWFKHYQTGSIEQQPRP-SFSGYLAC
X. b 89 AWPASEKDKQLADIRQKMETQLLPVDKTPSFDIRATILSDEITRLHLYFDLMFMDLHSVRLVLRDWGRVYQGCELPGLDEANFNHYIKA

ThiE 165 QAELLDGDEGRRAREYWEARLDELPAQDLPLATSPELVGRPVFRKLDVVPAPRWAAIKEAAARRGVPVNVVLLAAYGEVLRWRSRRSD
HlmE 180 EREL RDGPAGRAADYWTARLDEIPPAPDLPLATAPEQIGPPSFVLHRAVLPQDRWAALSATARRHGLTPSNLLAAYA EVLRTWSRRQE
Hom7 179 EKELQKSQQGERDKAYWINKINIPGAPELPLHQSPELIRHPVIKTLKKEIPFETINKLRHAAAQNGITLEVLF LGVYTEVLRQWSRRQD
HomA 179 EELLTNTTEQGRKDREYWEKKLDTLPLAPEMPLKKAPSLLSNPQFRRLSKVLP LTLIDKL RVVAQNVGITLETLLLSYSEVIRQWSKTQN
X. b 179 ERYLQGQPQGYDKTYEQQFDNLPSPPELPLKNAPELISPPMFKRYSRKIATETLSALKKKA EQQKL TLETLLGTAYEVLRLQWSKRQT

ThiE 255 FTIALTL LDRPLVHPRI GEVVGDFLSGLPVTRASGGGT FEDRVRALDQVSADADHAAFSGIRVRELTRARGDGRVPVMPVVSSTLG
HlmE 270 FTLTLTLFKRLPLHPETNGVVGNF LSPNLLTV DGRSDETFGRRAARVQNRLADLEHSAYGGVQV LRELTRRQDGRNVSM PVVFTSTLD
Hom7 269 FTLTLTQNGRRAYSEDI THITGNFLQSCLLCVNSPSSDSFAERLVSLQTELLLRWHSSFNQIQLVREMTRLNSDGRAFSLPVVFSTNLN
HolA 269 FTLTIVTQMSRRPYFEGIENTVGNFLQPVLLPV DGTKEQTFVERLLQLQSSLIK NRLHCSHNSIKVLRALTKQSHANRAASFVIFSNLTD
X. b 269 FTLTITQLGRRPYFSAVENIVGNFLQPTLLAIQGTENDSFNDRLVQLQTDFLMNRWHSYNGVQV LRELTRRSHGSRVSA PVVFSNTLT

ThiE 345 GE-----PG---GDALGL-FGEVV--HSASQTPQIWLENQVREQAGGLALS WNAVEGLFPAGVDDMF DAYLRLLAATADD-----
HlmE 360 GD-----EGDAKG DPLSV-FGELA--HSASQTPQVWLENQVFEENGALTVNWN AVDGLFAPD TLDAMFAYLALLDRLTDDE-----
Hom7 359 AELEDI-VS---DDLWRN-AARIV--HTATRTPGVWLENQLMRINGELVMNWN YVDGLFPDGM AEAMFEADKLLCACADN-----
HolA 359 YDLQEVVKS---PSLPGV-YCR---YSSNTTPQLWLENQLTHEQGEVTINWNYVDELFPDGM IHDMLEAYFALLNSCANNTQLLSRQGS
X. b 359 AH-----LD---DVVTDM DWADTVQVYSSNQTPQVWLENQIVRV DGVQINWNTVSELF PDGMVEAMLD SYMELLIVCAEDDSVWGKTGS

ThiE -----
HlmE -----
Hom7 -----
HolA 441 VVDLPESDANARLQANNTEVELHPALLHELVLKGAHINPEHVALVQGE-----
X. b 441 LVKLPASDRAERAKANATDIDLAPRLLHEMVLQAAEKFPHSIALVQGGKYFTYA

```

Fig. 3. Alignment of amino acid sequences of NRPS Cy domains for dithiolopyrrolones producing strains. ThiE in *Sa algeriensis*, HlmE in *S. clavuligerus*, Hom7 in *Y. ruckeri*, HolA in *Pseudoalteromonas* and in X.b (YP_003467658.1) *X. bovienii*. The amino acids boxed in red represent the characteristic motif DXXXXDXXS of Cy domain, Consensus sequences were highlighted in green

```

1                               80
ThiC  VTGVAARLYCFPHAGATAAVYRPWKEAAGPDLRV--GLDRPGRGSAARHPKIGDLPSLVDWTAARLLADLGEGR
HlmC  MSRATPPKTPVRLYCFPHAGASSLVYRGWRAPQGVPLEIV--GVDQPGRGPRARDARVTHYPELVAAADQVAADLRAAR
Hom5  MVYAFPHAGAGTGVRHWSRFNDESKLVFSPVGIPIGRDRLSREKVIDDLAVLASRISADIYADFTQRK
hoIC  MSVDKKRVVYAFPHLGAAGSAVYNWAKRANTQSQLMLKATIEIPGRGSLGSEAHIQDLELVNKLADDIHLHYVNTQ
YP_0034676 MNINCRRVIYAFPHAGATTAIYRPWLNLAATKAAILQVVAIPGRGHLAKEPEIHELEPLVDRLASDIWADFQQKQ
Consensus .....YaFPHaGA..a!Yr.W.....v...v.iPGRg.lare...!.dl..Lv...a.di.ad.....

81                               160
ThiC  AEDPGLRWATFGHSFGALLSLVAARVAALDEPPACAVLSAALPPRTQEVGDVTTLSDEELLAKIMRDGGTPPEAVSS
HlmC  AERPGLRWASFGHSFGATLSLSVAATVARRLGERPERSVLSAALPPRLQPE-TVIGDLDEALLAKMVAADGGTASALLSN
Hom5  KAGI-TEFATFGHSFGGVLVSVSHLLADKYAMNPVFSVVSIGIAPTAQAE-DDRYLWSEKILEKMRADNGTPESILRE
hoIC  -EHI-SDWITFGHSFGGVISIAVCQLLERKYGMRPTFSIISAPAPSVQEQ-ENLHLSDAILEKIRRDGTPPEAVLNQ
YP_0034676 AQGI-TEWITFGHSFGGVLVAVGQILHERYGLTPQFGVVSQSVPPQLQPY-DERHEWTDEQLIQKTRDQGTPEAILNE
Consensus ae.i...watFGHSFGgvLS.av...la..yg..P.fs!.Sas.pp..Q...d...lsDE.ll.K.r.D.GTpea.l..

161                               240
ThiC  SAMAGYFLSLMREDYGIraqYPSQTG-LRVDPLALVAAADDVHVPPEMMWEAEHSSEPCCRRLAELAGDHFAAIRDPREV
HlmC  TTMTRLVLRMRDEEIRCQFGREASTLRVDHPLVLLAARDLHVTPAQMAGWAEHSTAPSHRVEIPGGHFAAVLQPERA
Hom5  PAIARRLVTAIRTDYILRQGF-LAYRDMRVEQPLLLISADKDEHVTAMQLAWLNHTRSRVSITEIQGGHFAYVDFNTV
hoIC  PLIANRLIKQLRSDYTVKSQF-STLKRRLQVKQPLTLITASEDFVPEKEVLAWQEHSTGRITYHIEIEGGHFAIYDNWETV
YP_0034676 PALIKPIIRQLRNDYLIRSQF-TQLGNMQVDYPLVLVSASQDIHVGLADMVQWKNHTSHKTSIRIEGDHFAVYRHWDAT
Consensus pa.a..l...$R.Dy.ir.Q%.....$rVd.PL.L..A..D.hv....m..W.#Hs.....ei.GgHFA.y.....v

```

Fig. 4. Alignment of the deduced amino acid sequence of *Sa. algeriensis* ThiC with other Te domain in species already known as holomycin producers; HlmC in *S. clavuligerus*, Hom5 in *Y. ruckeri*, HolC in *Pseudoalteromonas* sp SANK 73390 and YP_003467656.1 in *X. bovienii* SS-2004. The red stars indicated the typical catalytic triad (Ser-His-Asp/Glu) of the thioesterase

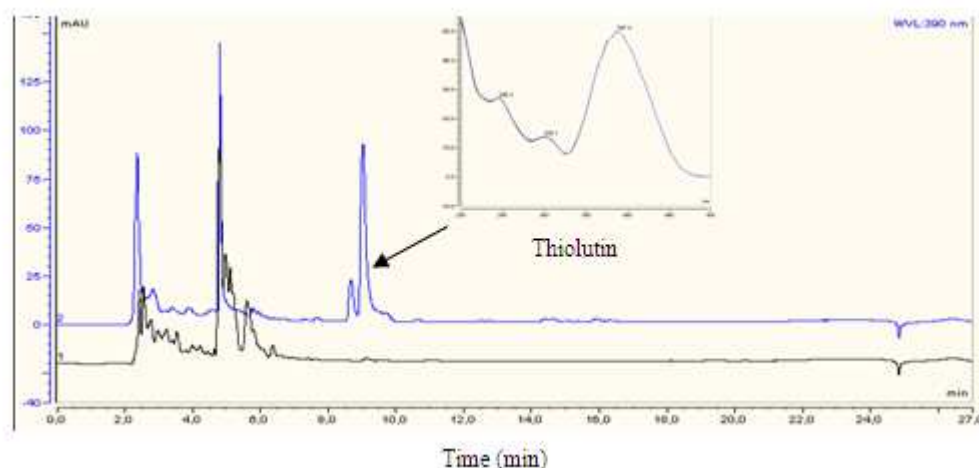


Fig. 5. Dithiolopyrrolones production. In SSM, blue line; in TSB, black line. HPLC analysis at 390 nm was done on supernatant of *Sa. algeriensis*

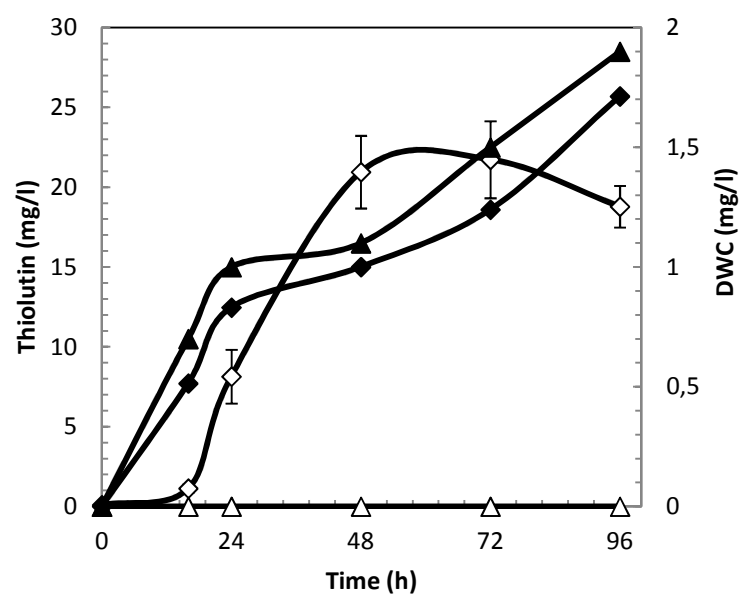


Fig. 6. Time course of dry cell weight (DCW) during cultures of *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 on: (SS, $\blacklozenge$), and (TSB, $\blacktriangle$), with the production of ; thiolutin (SS, $\diamond$), (TSB, Δ).; Dry cell weight (DCW) is given in g L^{-1} , antibiotic productions in mg L^{-1} and the time in hours

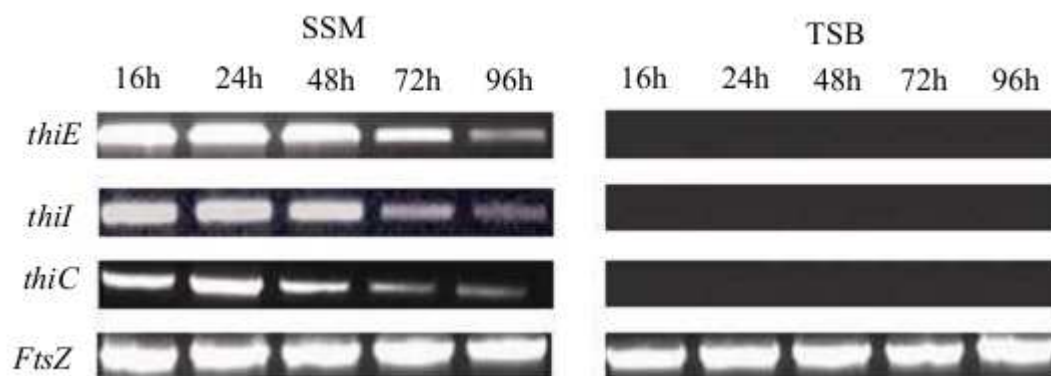


Fig. 7. Differential expression on two media; SSM (at left), TSB (at right), for four genes: *thiE*, first panel; *thiI*, second panel; *thiC*, third panel and the reference gene *FtsZ*, fourth panel

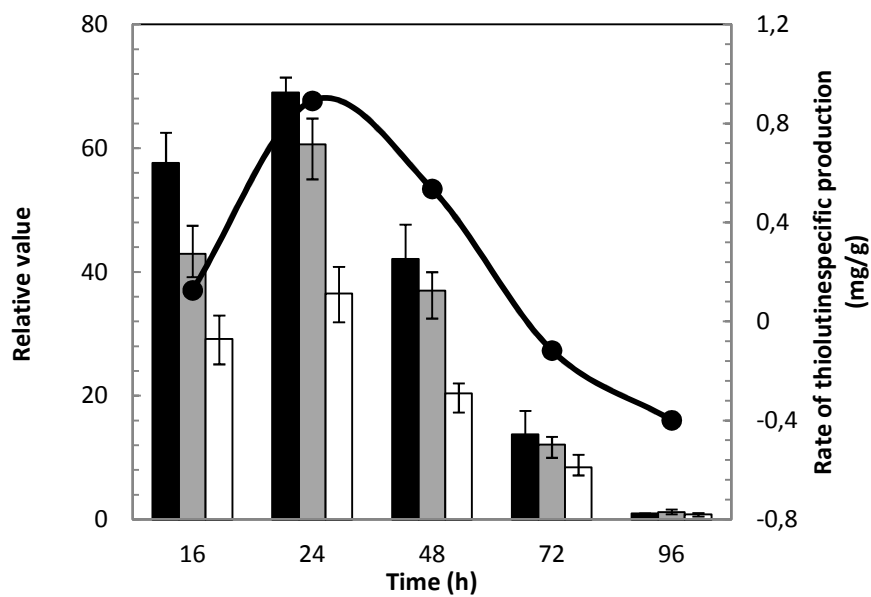


Fig. 8. Relative expression of (*thiE*, black); (*thiI*, gray); (*thiC*, white) with rate of thiolutinspecific production on SSM. Specific productions rate is given in $\text{mg h}^{-1} \text{g}^{-1}$ of DCW. Time is given in hours

References:

Arnold, J. T., Wilkinson, B. P., Sharma, S. & Steele, V. E. (1995). Evaluation of chemopreventive agents in different mechanistic classes using a rat tracheal epithelial-cell culture transformation assay. *Cancer Res* **55**, 537-543.

Bouras, N., Mathieu, F., Sabaou, N. & Lebrihi, A. (2006). Effect of amino acids containing sulfur on dithiolopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *J Appl Microbiol* **100**, 390-397.

Bruner, S. D., Weber, T., Kohli, R. M., Schwarzer, D., Marahiel, M. A., Walsh, C. T. & Stubbs, M. T. (2002). Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure* **10**, 301-310.

Celmer, W. D., Tanner, F. W., Harfenist, M., Lees, T. M. & Solomons, I. A. (1952). Characterization of the antibiotic thiolutin and its relationship with aureothricin. *J Am Chem Soc* **74**, 6304-6305.

Celmer, W. D. & Solomons, I. A. (1955). The structures of thiolutin and aureothricin, antibiotics containing a unique pyrrolinonodithiole nucleus. *J Am Chem Soc* **77**, 2861-2865.

Chaston, J. M., Suen, G., Tucker, S. L. & other authors (2011). The Entomopathogenic Bacterial Endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: Convergent Lifestyles from Divergent Genomes. *PLoS ONE* **6**.

Chorin, A. C., Bijeire, L., Monje, M. C., Baziard, G., Lebrihi, A. & Mathieu, F. (2009). Expression of pyrrothine N-acyltransferase activities in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137: new insights into dithiolopyrrolone antibiotic biosynthetic pathway. *J Appl Microbiol* **107**, 1751-1762.

de la Fuente, A., Lorenzana, L. M., Martin, J. F. & Liras, P. (2002). Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin: Possible cross-regulation of two unrelated secondary metabolic pathways. *J Bacteriol* **184**, 6559-6565.

Fukuda, D., Haines, A. S., Song, Z. & other authors (2011). A Natural Plasmid Uniquely Encodes Two Biosynthetic Pathways Creating a Potent Anti-MRSA Antibiotic. *Plos One* **6**, e18031.

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*. *J Antibiot (Tokyo)* **35**, 1367-1373.

Gust, B., Kieser, T. & 2002., K. C. (2002). PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). Disponible en ligne. 1-39.

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

Kenig, M. & Reading, C. (1979). Holomycin and an antibiotic (mm-19290) related to tunicamycin, metabolites of *streptomyces clavuligerus*. *J Antibiot (Tokyo)* **32**, 549-554.

Kohli, R. M. & Walsh, C. T. (2003). Enzymology of acyl chain macrocyclization in natural product biosynthesis. *Chem Commun*, 297-307.

Lamari, L., Zitouni, A., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Lebrihi, A., Lefebvre, G., Seguin, E. & Tillequin, F. (2002a). New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp SA 233 - I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)* **55**, 696-701.

Lamari, L., Zitouni, A., Dob, T., Sabaou, N., Lebrihi, A., Germain, P., Seguin, E. & Tillequin, F. (2002b). New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp SA 233 - II. Physicochemical properties and structure elucidation. *Journal of Antibiotics* **55**, 702-706.

Li, B., Lyle, M. P. A., Chen, G., Li, J., Hu, K., Tang, L., Alaoui-Jamali, M. A. & 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. *Bioorg Med Chem* **15**, 4601-4608.

Li, B. & Walsh, C. T. (2010). Identification of the gene cluster for the dithiolopyrrolone antibiotic holomycin in *Streptomyces clavuligerus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 19731-19735.

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., Forseth, R. R., Bowers, A. A., Schroeder, F. C. & Walsh, C. T. (2012). A Backup Plan for Self-Protection: S-Methylation of Holomycin Biosynthetic Intermediates in *Streptomyces clavuligerus*. *Chembiochem* **13**, 2521-2526.

Li, J. X., Chen, G. H., Webster, J. M. & Czyzewska, E. (1995). Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont. *Journal of Natural Products-Lloydia* **58**, 1081-1086.

Linne, U., Schwarzer, D., Schroeder, G. N. & Marahiel, M. A. (2004). Mutational analysis of a type II thioesterase associated with nonribosomal peptide synthesis. *Eur J Biochem* **271**, 1536-1545.

Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* **25**, 402-408.

Margolin, W. (2005). FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 862-871.

McInerney, B. V., Gregson, R. P., Lacey, M. J., Akhurst, R. J., Lyons, G. R., Rhodes, S. H., Smith, D. R. J., Engelhardt, L. M. & White, A. H. (1991a). biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part 1. Dithiolopyrrolone derivatives with antibiotic activity. *J Nat Prod* **54**, 774-784.

McInerney, B. V., Taylor, W. C., Lacey, M. J., Akhurst, R. J. & Gregson, R. P. (1991b). Biologically-active metabolites from *Xenorhabdus* spp .2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity. *J Nat Prod* **54**, 785-795.

Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., Weber, T., Takano, E. & Breitling, R. (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res* **39**, W339-W346.

Miller, D. A., Luo, L. S., Hillson, N., Keating, T. A. & Walsh, C. T. (2002). Yersiniabactin synthetase: A four-protein assembly line producing the nonribosomal peptide/polyketide hybrid siderophore of *Yersinia pestis*. *Chem Biol* **9**, 333-344.

Minamiguchi, K., Kumagai, H., Masuda, T., Kawada, M., Ishizuka, M. & Takeuchi, T. (2001). Thiolutin, an inhibitor of HUVEC adhesion to vitronectin, reduces paxillin in HUVECS and suppresses tumor cell-induced angiogenesis. *Int J Cancer* **93**, 307-316.

Nardiz, N., Santamarta, I., Lorenzana, L. M., Martin, J. F. & Liras, P. (2011). A rhodanese-like protein is highly overrepresented in the mutant *S. clavuligerus oppA2::aph*: effect on holomycin and other secondary metabolites production. *Microbial Biotechnology* **4**, 216-225.

Oliva, B., O'Neill, A., Wilson, J. M., O'Hanlon, P. J. & Chopra, I. (2001). Antimicrobial properties and mode of action of the pyrrothine holomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 532-539.

Paik, S., Park, Y. H., Suh, S. I., Kim, H. S., Lee, I. S., Park, M. K., Lee, C. S. & Park, S. H. (2001). Unusual cytotoxic phenethylamides from *Xenorhabdus nematophilus*. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **22**, 372-374.

Qin, Z., Baker, A. T., Raab, A., Huang, S., Wang, T., Yu, Y., Jaspars, M., Secombes, C. J. & Deng, H. (2013a). The Fish Pathogen *Yersinia ruckeri* Produces Holomycin and Uses an RNA Methyltransferase for Self-resistance. *J Biol Chem* **288**, 14688-14697.

Robles-Reglero, V., Santamarta, I., Álvarez-Álvarez, R., Martín, J. F. & Liras, P. (2012). Transcriptional analysis and proteomics of the holomycin gene cluster in overproducer mutants of *Streptomyces clavuligerus*. *J Biotechnol* **163**, 69-76.

Sambrook, J., Russell, D. W. & Cold Spring Harbor, L. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual / Joseph Sambrook, David W. Russell.* Cold Spring Harbor, N.Y. :: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sattely, E. S., Fischbach, M. A. & Walsh, C. T. (2008). Total biosynthesis: in vitro reconstitution of polyketide and nonribosomal peptide pathways. *Nat Prod Rep* **25**, 757-793.

Shiozawa, H., Kagasaki, T., Kinoshita, T., Haruyama, H., Domon, H., Utsui, Y., Kodama, K. & Takahashi, S. (1993). Thiomarinol, A New Hybrid Antimicrobial Antibiotic Produced By A Marine Bacterium Fermentation, Isolation, Structure, And Antimicrobial Activity. *J Antibiot (Tokyo)* **46**, 1834-1842.

Shiozawa, H., Shimada, A. & Takahashi, S. (1997). Thiomarinols D, E, F and G, new hybrid antimicrobial antibiotics produced by a marine bacterium; Isolation, structure, and antimicrobial activity. *J Antibiot (Tokyo)* **50**, 449-452.

Stachelhaus, T., Mootz, H. D. & Marahiel, M. A. (1999). The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**, 493-505.

Webster, M., J., Li & Chen, G. (2000). Anticancer property of dithiolopyrrolones. United States.

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**, 2946-2960.

Yin, H., Xiang, S., Zheng, J. & other authors (2012). Induction of Holomycin Production and Complex Metabolic Changes by the *argR* Mutation in *Streptomyces clavuligerus* NP1. *Appl Environ Microbiol* **78**, 3431-3441.

II.3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons essayé de confirmer notre hypothèse concernant l'implication du cluster *thi* dans la biosynthèse des dithiolopyrrolones chez *Sa. algeriensis*. Deux approches génétiques ont été utilisées, la première s'est basée sur la construction des mutants déficients pour les gènes clés dans ce cluster, la deuxième est basée sur l'expression hétérologue de ce cluster dans des bactéries qui ne produisent pas les dithiolopyrrolones.

Comme nos expériences sont les premières manipulations génétiques chez *Sa. algeriensis*, les conditions de l'étape de conjugaison *E. coli*/*Sa. algeriensis* ont d'abord été optimisées en utilisant des vecteurs conjugatifs (pSET152, pKT02, pRT801 et pOSV554). Lors de la conjugaison avec ces vecteurs, la recombinaison homologue se passe via un site spécifique de recombinaison grâce à une enzyme recombinase. Malgré toutes les tentatives de conjugaison, aucun transformant n'a pu être obtenu. De même, nous n'avons pas pu obtenir de mutant de *Sa. algeriensis* déficient pour le gène *thiE*. La conjugaison a seulement réussi avec le plasmide pThi003. Près de cinquante colonies ont été obtenues en condition standard de conjugaison. Apparemment, l'efficacité de la conjugaison dépend fortement de la taille de la région de recombinaison homologue (le plasmide pThi003 contient au moins 35 kbs d'ADN de *Sa. algeriensis*).

La construction d'une banque génomique de *Sa. algeriensis* a permis d'obtenir trois cosmides, pThi003, pThi004 et pThi005 contenant le cluster *thi*. Le séquençage complet pour les cosmides pThi003 et pThi004 a conduit à compléter la séquence du cluster *thi* à 15.2 kb. L'expression hétérologue de ces cosmides dans deux hôtes différents, *S. lividans* TK23 et *S. coelicolor* M1154, a bien réussi, mais aucun transformant n'a pu produire ni la thiolutine ni l'un de ses intermédiaires. L'absence d'un gène acyltransférase pourrait, peut-être, expliquer pourquoi ces transformants ne pouvaient pas produire la thiolutine. Par contre, cela ne peut pas expliquer pourquoi ces transformants ne produisent pas les intermédiaires. La présence d'un gène régulateur qui exercerait un effet répresseur sur l'expression de tous les gènes du cluster pourrait expliquer l'absence de production de thiolutine ou de ses intermédiaires. L'existence de trois gènes régulateurs de la transcription dans le cluster *thi* (*thiJ*, *thiL* et *thiM*) met cette hypothèse en exergue. Néanmoins, le contrôle de ce cluster par des régulateurs spécifiques ne lui appartenant pas ne doit pas être exclu.

Enfin, l'expression de trois gènes clés du cluster *thi* ; *thiE*, *thiC* et *thiI*, associée à la production de la thiolutine a été utilisée comme une méthode pour vérifier l'implication de ce cluster dans la biosynthèse de la thiolutine. D'abord, l'absence de la production de la thiolutine et de l'expression de ces gènes sur le milieu TSB par rapport au milieu SS a suggéré l'implication de ces gènes dans la biosynthèse de la thiolutine. De plus, la cinétique de la vitesse de production spécifique de la thiolutine et l'expression de ces gènes a montré que leurs profils au cours du temps sont très similaires. La vitesse de production spécifique est maximale en même temps que l'expression de ces gènes à 24 h. Cette coïncidence supporte notre hypothèse sur l'implication du cluster *thi* dans la biosynthèse de la thiolutine.

CHAPITRE III

**Identification de deux gènes codant pour des acyltransférases putatives
potentiellement impliquées dans la biosynthèse des dithiolopyrrolones
chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137**

**Identification de deux gènes codant pour des acyltransférases putatives
potentiellement impliquées dans la biosynthèse des dithiolopyrrolones chez
Saccharothrix algeriensis NRRL B-24137**

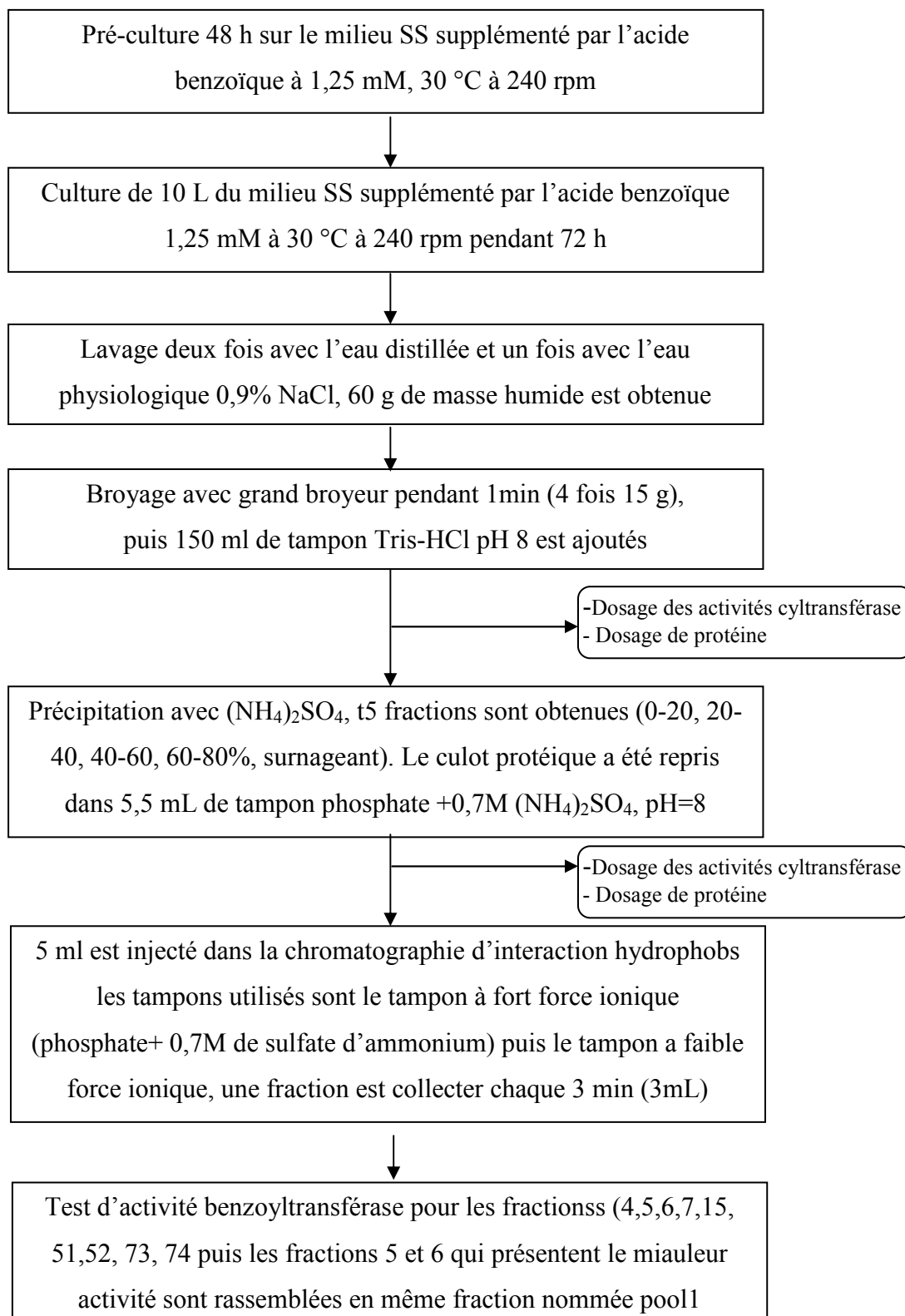
III.1 Introduction

De la Fuente *et al.* (2002) a mis en évidence l'existence d'une activité enzymatique catalysant l'acylation du noyau holothine avec de l'acétyl-CoA pour synthétiser l'holomycine chez *S. clavuligerus*. Une activité enzymatique pyrrothine *N*-acyltransférase, impliquée dans la biosynthèse des dithiolopyrrolones, a été mise en évidence dans l'extrait cellulaire de *Sa. algeriensis* obtenu sur milieu semi-synthétique, supplémenté ou non en acide organique (Chorin *et al.*, 2009). Récemment, le cluster de la voie de la biosynthèse de l'holomycine a été identifié par Li & Walsh (2010). Une seule acétyltransférase supposée être impliquée dans la dernière étape de la biosynthèse de l'holomycine codée par le gène *hlmA* a été identifiée. Grâce à ces précédentes études, Chorin *et al.* (2009) et Li & Walsh (2010), nous avons envisagé l'identification de (s) acyltransférase(s) chez *Sa. algeriensis* en suivant deux approches. La première s'est basée sur une analyse bioinformatique permettant d'identifier, dans le génome de *Sa. algeriensis*, le gène homologue à *hlmA* codant pour une acétyltransférase chez *S. clavuligerus*. La deuxième s'est basée sur la purification des enzymes proposées par Chorin *et al.* (2010), en réalisant un microséquençage des protéines partiellement purifiées permettant finalement l'identification du (des) gène(s) qui code (ent) cette ou ces enzyme(s).

La stratégie de purification des acyltransférases chez *Sa. algeriensis*

Les étapes de la purification sont présentées dans la **Figure 38**. D'abord une grande quantité de biomasse de *Sa. algeriensis* est préparée en réalisant une culture de 10 L dans le milieu SS supplémenté avec 1,25 mM d'acide benzoïque. La biomasse est récupérée après 72h puis traitée et broyée comme indiqué en II.3.5.3, p. 55. La première étape de la purification est la précipitation au sulfate d'ammonium. Selon le degré de saturation, cinq fractions sont obtenues, 0-20 %, 20-40 %, 40-60 %, 60-80 % et le surnageant. La fraction qui présente la meilleure activité acyltransférase sera injectée dans la chromatographie d'interactions hydrophobes. De la même manière, la fraction qui présente la meilleure activité acyltransférase sera injectée dans la chromatographie d'échange d'anions. Finalement,

l'électrophorèse en conditions non dénaturantes sera utilisée pour à la fois contrôler l'avancement de la purification et pour récupérer les bandes d'intérêts pour le microséquençage. La concentration en protéines et les activités acétyltransférase et benzoyltransférase sont suivies dans toutes les fractions.



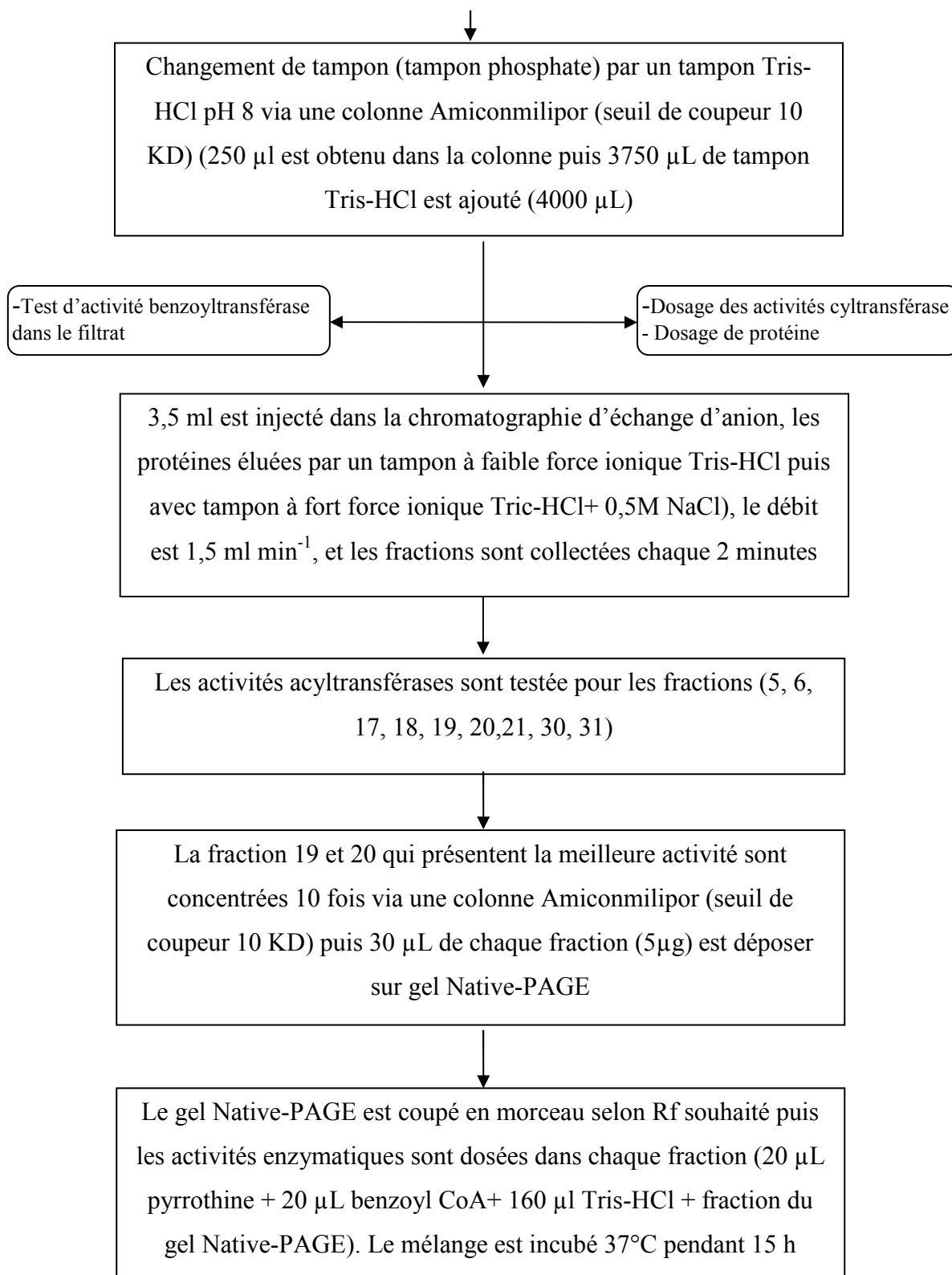


Figure 38. Les étapes détaillées du protocole de la purification des acyltransférases à partir d'un extrait brut de *Sa. algeriensis*

Résultats

Le fractionnement des protéines dans l'extrait brut de *Sa. algeriensis* a permis d'obtenir cinq fractions différentes (**Figure 39**). Les protéines se sont réparties sur les cinq fractions avec un maximal de concentration dans la fraction 40-60. Le suivi des activités acyltransférases dans chaque fraction, a montré que l'activité spécifique benzoyltransférase est maximale dans la fraction 40-60 (1.5 et 2.7 fois par rapport aux fractions 20-40 et 60-80 respectivement). Par contre, le maximum de l'activité spécifique acétyltransférase est dans la fraction 60-80 (1.4 fois par rapport à la fraction 40-60). Suite à ce résultat la purification des activités acyltransférases sera donc poursuivie à partir de la fraction 40-60.

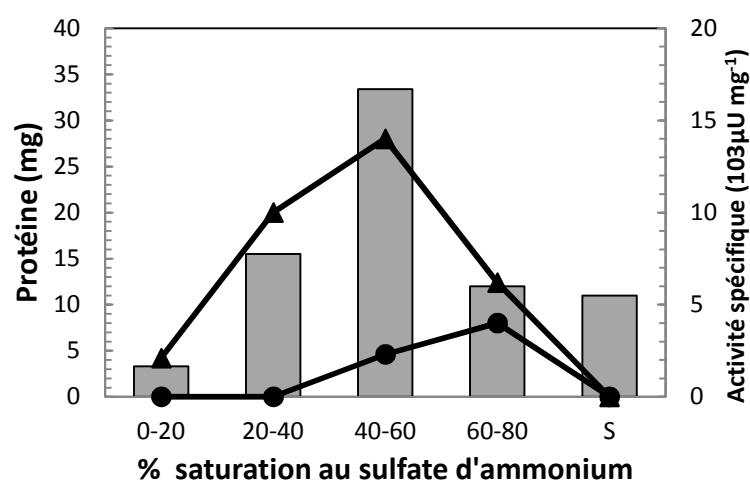


Figure 39. Les activités acyltransférases et la quantité de protéines en fonction de la saturation en sulfate d'ammonium : (■) protéines totales, (-●-) l'activité spécifique acétyltransférase, (-▲-) l'activité spécifique benzoyltransférase

Le choix entre la chromatographie d'échange d'anions et la chromatographie l'interactions hydrophobes pour la deuxième étape de la purification s'est déterminé par apport aux deux critères : le premier est la condition initiale de la chromatographie qui demande que les protéines soient dans le même tampon utilisé que celui de condition initiale, et le deuxième est d'éviter le changement de tampon sous forme de dialyses, qui cause la perte d'activité

A l'issue de la précipitation au sulfate d'ammonium, le culot protéique contient du sulfate d'ammonium. Donc l'utilisation de la chromatographie d'échange d'anions nous oblige à réaliser une dialyse pour éliminer le sulfate d'ammonium. La dialyse entraîne une

perte supplémentaire d'activité causée par le temps de dialyse et par la dialyse elle-même. Le **Tableau 16** montre que la perte de l'activité liée au temps de cette opération est de 84.3 et 22.1 % pour l'activité acétyltransférase et benzoyltransférase respectivement. Par ailleurs, la perte supplémentaire due à la dialyse est respectivement de 6.2 et 17 %.

Tableau 16: Evolution des activités acétyltransférase et benzoyltransférase au cours du temps de conservation de la fraction 40-60 % à 4 °C avec ou sans inclusion d'une dialyse de l'extrait de 12 h

Temps (heures)	Protéine (mg)	Activité acétyltransférase			Activité benzoyltransférase		
		Activité spécifique (mU mg ⁻¹)	Activité totale (mU)	R (%)	Activité spécifique (mU mg ⁻¹)	Activité totale (mU)	R (%)
0	31.2	4.6	143.5	100	25.7	804	100
12	22.4	1.01	32.6	22.7	20.4	575	71.5
12h de dialyse	15.1	0.9	21.59	14.5	1.4	468	58.2

Pour éviter cette perte, la chromatographie d'interactions hydrophobes est utilisée pour la deuxième étape. L'éluant initial dans cette chromatographie est constitué d'un tampon à forte force ionique, le phosphate de sodium à 50 mM + (NH₄)₂SO₄ à 0.7 M (16,5 % de saturation en sulfate d'ammonium). Le culot protéique est donc repris dans ce même tampon. Ainsi, la fraction 40-60 % obtenue à l'issue de la précipitation au sulfate d'ammonium est injectée sur une colonne d'interactions hydrophobes pour poursuivre la purification de l'activité acyltransférase.

Le chromatogramme obtenu est présenté dans la **Figure 40A**. Le suivi de l'absorbance à 280 nm indique la présence d'un seul pic, ce pic est observé après l'injection de 10 à 20 min pendant la phase de lavage avec le tampon A (phosphate de sodium 50 mM + (NH₄)₂SO₄ 0,7 M). Il atteint une absorbance maximale de 0,8 U.A, l'aire de ce pic traduit la quantité de protéines non retenues à la colonne dans les conditions chromatographiques initiales.

Suite à l'étape de séparation (élution dans des conditions non dénaturantes et collection des fractions), la colonne a été lavée à l'eau bidistillée puis avec de l'éthanol, pour éluer les protéines fortement retenues à la colonne. La colonne a aussi été lavée avec NaOH pour éliminer les protéines qui ont précipité lors de la chromatographie, mais les conditions

d'élution sont dénaturantes pour les protéines. Ces étapes permettent de régénérer la colonne pour un prochain usage. Le suivi de l'absorbance à 280 nm lors de ces lavages indique 3 pics d'absorbance regroupant plusieurs pics non résolus. Le profil de l'absorbance à 280 nm semble donc indiquer qu'une quantité de protéines est éluée durant les différents lavages successifs. L'activité benzoyltransférase a été dosée dans une fraction sur deux du gradient d'élution (ff4, 5, 6, 7, 15, 51, 52, 73 et 74).

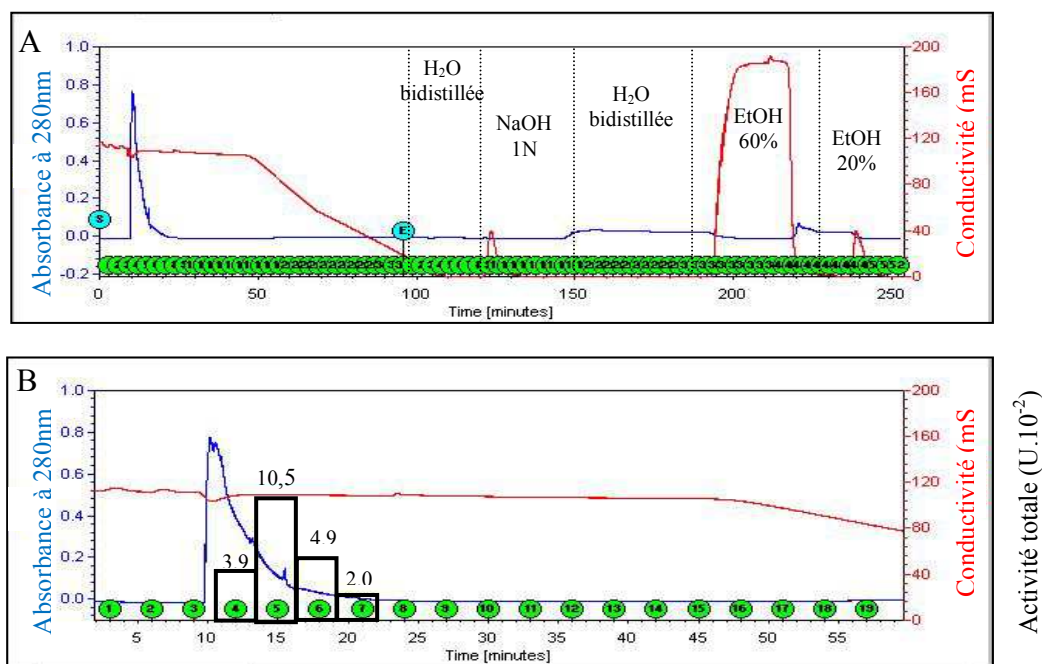


Figure 40. Chromatographie d'interactions hydrophobes appliquée à la fraction 40-60 % : A. Chromatogramme complet, B. Zoom sur la zone 5-55 min. La conductivité (--) de l'éluat et son absorbance (--) à 280 nm, qui traduit la quantité de protéines totales. L'activité enzymatique totale (□) mesurée dans les fractions est aussi montrée. Le changement de fraction apparaît sous la forme d'une pastille verte. Les différentes phases de lavage de la colonne sont détaillées sur la figure

L'activité acétyltransférase n'a pas pu être détectée dans aucune de ces fractions, par contre l'activité benzoyltransférase est détectée dans 4 fractions (**Figure 40B**). Suite à cette étape les fractions 5 et 6 sont rassemblées en une seule fraction nommée pool1. Cette fraction sera injectée dans la chromatographie d'échange d'anions. Le chromatogramme obtenu (**Figure 41A**) montre 3 pics d'absorbance à 280 nm. Un premier pic (de 9 à 12 min, valeur maximale de 0,02 U.A.) est observé, après injection de l'échantillon, avec le tampon initial à faible force ionique, Tris-HCl 50 mM pH 8. Un pic, assez peu résolu (de 35 à 55 min, valeur maximale de 0,16 U.A.), est ensuite visualisé pendant la phase d'élution avec un tampon à

force ionique croissante (Tris-HCl 50 mM pH 8 + 0 à 0,5 M de NaCl). Enfin, un pic d'absorbance (de 56 à 66 min, valeur maximale de 0,04 U.A.) est observé pendant la phase de lavage avec le tampon à forte force ionique (Tris-HCl 50 mM pH 8 + 1M NaCl). L'activité benzoyltransférase a été dosée dans l'ensemble des fractions (5, 6, 17, 18, 19, 20, 21, 30, 31 et 32). L'activité enzymatique n'est détectée que dans 4 fractions (F18 à F21) récupérées au début du gradient d'élution (**Figure 41B**).

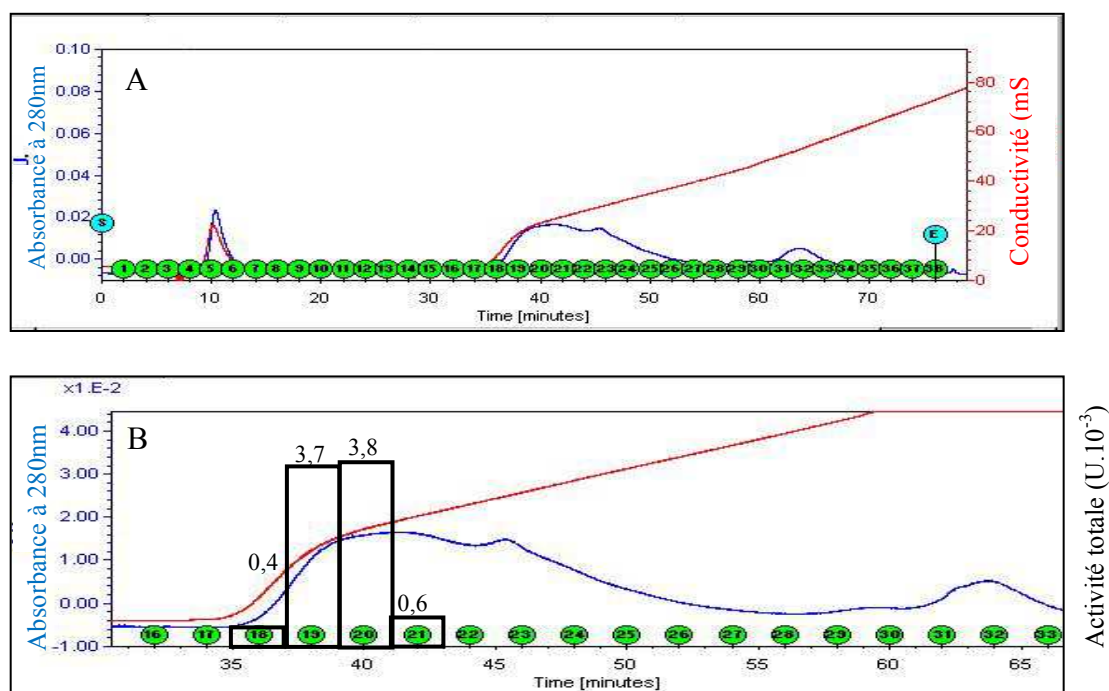


Figure 41. Chromatographie d'échange d'anions appliquée à l'ensemble des fractions actives à l'issue de la chromatographie d'interactions hydrophobes (F5 + F6): A. Chromatogramme complet, B. Zoom sur le gradient d'élution (Tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 + 0 à 0,5 M de NaCl de 26 à 60 min). La conductivité (--) de l'éluat et son absorbance à 280 nm (--), qui traduit la quantité de protéines totales. L'activité enzymatique totale (□) mesurée dans les fractions est aussi montrée. Le changement de fraction apparaît sous la forme d'une pastille verte

Afin de contrôler l'avancement de la purification, l'extrait brut de *Sa. algeriensis*, la fraction 40-60 issue de la précipitation au sulfate d'ammonium, le pool1 issues de la chromatographie d'interactions hydrophobes (HIC), la fraction 19 et la fraction 20 issue de la chromatographie d'échange d'anions (AEC) sont disposées sur un gel d'électrophorèse en conditions non dénaturantes (Native-PAGE). Après migration, une partie du gel est colorée au bleu de Coomassie afin de visualiser les protéines colorées et une autre partie est utilisée pour

révéler l'activité benzoyltransférase. A ce stade de la purification, un grand nombre de protéines contaminantes sont encore présentes avec l'enzyme partiellement purifiée. La bande correspondant à l'enzyme d'intérêt ne peut pas être identifiée mais se situe avant l'albumine sérique (66 KDa) (**Figure 42**).

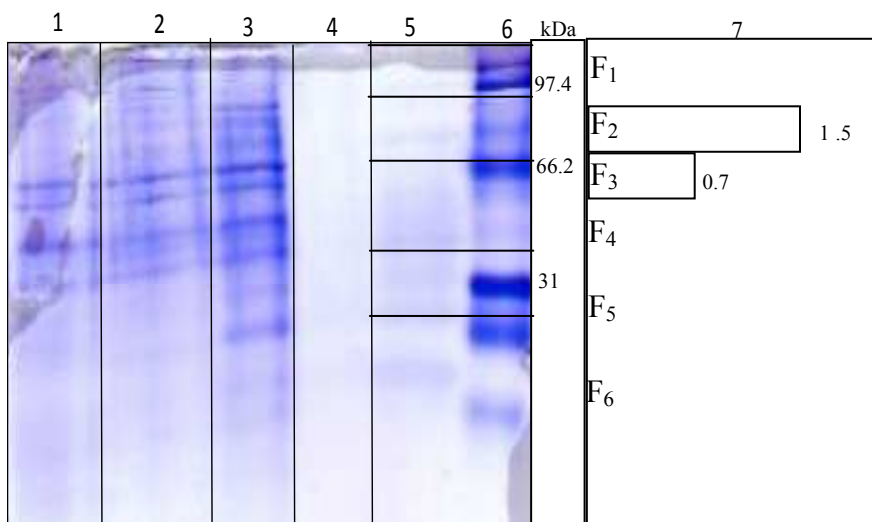


Figure 42. Gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes à T= 10 %. Ligne1- Extrait brut de *Sa. algeriensis* (10 µg) ; Ligne2-Précipitation au sulfate d'ammonium fraction 40-60 % (10 µg), Ligne3- : Fractions actives (5 + 6) à la sortie de HIC (10 µg). Ligne4 et 5- Fractions 19 et 20 à la sortie de l'EIC (5 µg). Ligne6-Marqueur de taille « broad range » de chez Biorad BEP. Ligne7-benzoyl-pyrrothine apparue en µmoles L⁻¹ après 15 h d'incubation des bandes à 30 °C dans le milieu réactionnel (gel antérieur)

III.2 **Article II**: Identification of two putative acyltransferase genes potentially implicated in dithiolopyrrolone biosyntheses in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137.

Soumis à Applied Biochemistry and Biotechnology

S. SAKER, A. LEBRIHI and F. MATHIEU

Université de Toulouse, Laboratoire de Génie Chimique, Département of BioSyM, INPT-ENSAT, 1 Avenue de l'Agrobiopôle, B.P. 32607, F-31326 Castanet Tolosan Cedex 1, France.

Author for correspondence: F. MATHIEU. Université de Toulouse, Laboratoire de Génie Chimique, Département of BioSyM, INPT-ENSAT, 1 Avenue de l'Agrobiopôle, B.P. 32607, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex 1, France. Phone: +33 05 34 32 39 35. Fax: +33562193901

E-mail: mathieu@ensat.fr

ABSTRACT

The dithiolopyrrolone class of antibiotics has been known to display bacteriostatic activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria and exert other biological activities. Acyltransferase activities are proposed to be responsible for the structural diversity of dithiolopyrrolones produced by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Moreover, two activities pyrrothine *N*-acetyltransferase and pyrrothine *N*-benzoyltransferase are reported to catalyze the formation respectively to thiolutin and benzoyl-pyrrothine (BEP) in this bacterium. In this study, two genes encoding two putative acyltransferases were identified in *Sa. algeriensis*. First *actA*, was identified by bioinformatic analysis and by analogy to an acetyltransferase, *hlmA*, identified in holomycin biosynthetic gene cluster in *S. clavuligerus*. The second one was identified by purification of both enzymes from the bacterial biomass which provided a semi-purified extract. The Microsequencing of tryptic peptides from the final protein preparation yielded sequences of eight different fragments, two of them located in one gene, *actB*, in *Sa. algeriensis* genome bank. The alignment of *actB* against GenBank database revealed significant homology to acyltransferase family. Differential expression of these genes, *actA* and *actB*, were then investigated in three different media, i) Semi-Synthetic Medium (SSM) which promotes the production of thiolutin, ii) SSM supplemented by

1.25mM benzoic acid (SSM+BA) which promotes the production of both thiolutin and BEP, and iii) Tryptic Soy Broth (TSB) in which no dithiolopyrrolone derivatives were detected.

Keywords: *Saccharothrix algeriensis*, dithiolopyrrolone, acyltransferase, protein purification, gene expression.

1. INTRODUCTION

Dithiolopyrrolones (DTPs) are members of the pyrrothine class of naturally-occurring antibiotics. This class of compounds includes thiolutin (acetyl-pyrrothine), aureothricin (propionyl-pyrrothine), isobutyryl-pyrrothine (2-methylpropanoyl-pyrrothine), butanoyl-pyrrothine (xenorhabdin VII), senecioid-pyrrothine (3-methyl-2-butenoyl-pyrrothine), tigloyl-pyrrothine, propionyl-holothin, holomycin, xenorhabdins, xenorxides and thiomarinols [1-6]. Dithiolopyrrolone antibiotics have strong inhibitory effects against a variety of Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeasts, filamentous fungi and amoeboid parasites [2, 7, 8]. Thiolutin was also reported to inhibit RNA polymerases [9-11] and the degradation of mRNA in yeast [12]. Recent studies showed that thiolutin also potently inhibits developmental angiogenesis in zebrafish and vascular outgrowth from tissue explants in 3D cultures [13]. Biological activity of dithiolopyrrolones is strongly influenced by the nature of its acyl groups [8, 14-16]. Dithiolopyrrolones have been initially isolated from species of *Streptomyces* in the 1940s and from other microorganisms such as *Alteromonas rava*, *Xenorhabdus bovienii* and *Xenorhabdus nematophilus* [1, 5, 17, 18]. *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 isolated from a south Algerian soil sample was found to naturally produce at least six pyrrothine derivatives characterized by their different N-acyl groups R₂: thiolutin (acetyl- pyrrothine), senecioid-pyrrothine (SEP), tigloyl-pyrrothine (TIP), isobutyryl-pyrrothine (ISP), butanoyl-pyrrothine (BUP) and benzoyl-pyrrothine (BEP) [3, 8] (Fig. 1a). Pyrrothine and acyl-CoA precursors supply has been successfully applied to induce both the dithiolopyrrolones, which have already been produced and new dithiolopyrrolones derivatives production for example: cystine and benzoic acid increase the production of thiolutin, benzoyl-pyrrothine respectively, while valeric acid and sorbic acid induce valeryl-pyrrothine and sorbyl-pyrrothine respectively [19-24] (Fig. 1b).

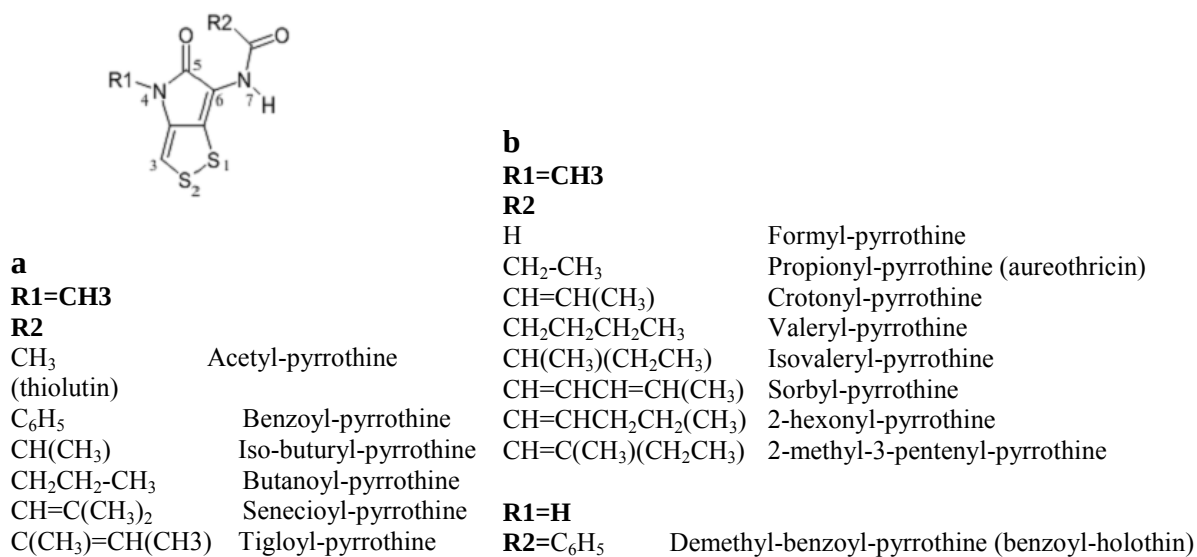


Fig.1. Dithiolopyrrolones produced by *Sa. algeriensis*, (a) natural dithiolopyrrolone products (b) unnatural dithiolopyrrolone products using precursor-directed biosynthesis ‘PDB method’

Pyrrothine N-acyltransferase in *Sa. algeriensis* was presumed to be responsible for the transfer of the acyl groups to the pyrrothine nucleus causing the diversity of dithiolopyrrolones derivatives [25]. The study of the enzymatic activity in the free-cell extract of *Sa. algeriensis* grown on semi-synthetic medium supplemented or non-supplemented by organic acid was already investigated by Chorin *et al.* (2009). The results obtained in this study suggested that two different enzymes could catalyze the acylation of pyrrothine core. This hypothesis was based on the fact that the ratio of both enzymatic specific activities was not constant throughout culture. The difference between the acetic acid and benzoic acid additions to culture medium emphasized the hypothesis; 1.25mM of benzoic acid increased benzoyltransferase activity by two-fold and multiplied the benzoyl-pyrrothine production by 50 fold, with no effect on while pyrrothine N-acetyltransferase activity. In contrast, 1.25mM of acetic acid did not affect the production of thiolutin nor the N-acetyltransferase [25]. Recently holomycin biosynthetic gene cluster was identified and characterized in *S. clavuligerus* [26, 27]. An acetyltransferase was proposed to be responsible for the transfer of acyl group to holothin core to produce the holomycin [27]. Only one acetyltransferase was found in this cluster to catalyze the formation of holomycin, which is the sole dithiolopyrrolone derivative produced *in vivo* by *S. clavuligerus*. However, the purified form

of this enzyme was able to utilize acetyl-CoA *in vitro* as well as the hexanoyl-, octanoyl-, and palmitoyl-CoA as substrates to form the corresponding product [27].

Due to The role of acyltransferase in dithiolopyrrolone diversity produced by *Sa. algeriensis*, we tried to identify the genes encoding these acyltransferases. In this study, we have identified two putative acyltransferase genes in *Sa. algeriensis*. The differential expression of these genes strongly suggests a role in dithiolopyrrolones biosynthesis. We also investigated The hypothesis concerning the indication of acyltransferase genes by medium supplementation

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Strain and culture conditions

Sa. algeriensis NRRLB-24137 (= DSM 44581) was used for this study. *Sa. algeriensis* pre-cultures were prepared in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL culture medium and inoculated with 2.10^7 UFC mL⁻¹. Five mL of *Sa. algeriensis* pre-cultured for 48h were used to inoculate 100 mL of culture medium prepared in 500 mL Erlenmeyer flasks. The pre-culture and the culture were prepared in the same medium.

For enzyme purification, a semi synthetic medium (SSM) [20], supplemented by 1.25 mM of benzoic acid separately autoclaved and added before inoculation, was used. *Sa. algeriensis* was incubated at 30 °C at 240 RPM on a rotary shaker (New Brunswick Scientific Company, NJ, USA) for 48 h.

For gene expression, three different media, SSM, SSM supplemented by 1,25mM benzoic acid (SSM+BA) and TSB (Tryptic soy broth, BD Bacto™) were used. Incubation time was 96 h.

For PDB affect on benzoyltransferase activity, Benzoic acid, shikimic acid, cinnamic acid, L-phenylalanine and benzoyl-CoA were separately prepared. The pH was adjusted to 7 using NaOH then they were sterilized using PVDF syringe filter sterile (0.22 µm, 10 mm, Millipore™ Millex™) and added to SSM medium at final concentration of 5mM. Benzoyl-CoA was added at a final concentration of 0,05mM.

2.2. Cell-free extract preparation (crude extract)

Sa. algeriensis was grown in SSM+BA for 48 h. The biomass was then pelleted by centrifugation at 5000 $\times g$ for 15 min at 4 °C (4K15, Sigma, Osterode am Harz, Germany). The biomass was washed twice with saline solution (0.9 % NaCl), and once with buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 8). Wet cells were finally recovered by filtration on 0.2 μm membrane filters (Advantec, Dublin, Ireland), crushed in liquid nitrogen and stored at -80 °C. The final 15 g of frozen biomass were disrupted by mechanical grinder for one min. The subsequent powder was suspended in Tris-HCl buffer at a rate of 1 mL for 0.6 g biomass. The suspension was centrifuged for 30 minutes at 5000 $\times g$ at 4 °C. The supernatant, which constitutes soluble cell-free extract of *Sa. algeriensis*, was used immediately for the assay of pyrrothine N-acyltransferase activities. Remaining supernatant was frozen at -80 °C for further protein assays. The proteins were determined in the crude extract by the method of Bradford (1976).

2.3. Dry Cell Weight (DCW), dithiolopyrrolones and enzymatic activity determination

The Dry cell weights (DCW) were determined as described by Bouras *et al.* (2006) and expressed in g L⁻¹. The Dithiolopyrrolones and enzymatic activity were quantified as described by Chorin *et al.* (2009). Enzymatic activity was identified as either acetyltransferase or benzoyltransferase activity according to the acyl group donor used during the assay, i.e. acetyl-CoA and benzoyl-CoA respectively. An enzyme unit is defined as the enzyme activity producing 1 μ mol of thiolutin or BEP per minute. Specific enzymatic activity was expressed in μ U mg⁻¹ of protein.

2.4. Purification protocol

The crude extract was successively saturated with ammonium sulfate, and five protein fractions were obtained: 0-20 %, 20-40 %, 40-60 %, 60-80 %, and the supernatant. The precipitates were recovered in pellet form by centrifugation for 20 minutes at 5000 $\times g$ at 4 °C. The protein pellet (one volume) was then dissolved in 5.5 mL of Tris-HCl buffer 50 mM, pH 8. Five mL of precipitated (NH₄)₂SO₄ fraction was loaded onto a hydrophobic interaction chromatography column (HiTrap Phenyl Fast Flow, 25 by 7 mm). The mobile phase consisted of two buffers, a high ionic strength buffer A of sodium phosphate 50 mM + ammonium sulfate 0.7 mM, and a low ionic strength buffer B of sodium phosphate 50 mM. The pH is adjusted to 7. The proteins were eluted with 100 % of buffer A for 40 min, reaching 50 % in

20 minutes, then from 50 % to 100 % of buffer B in 36 minutes, using a flow rate of 1 mL min⁻¹. The DO at 280 nm was followed and fractions of 3 mL were collected. For the ion-exchange chromatography, 3.6 mL of desired HIC fraction (named pool1) were loaded onto column (UNOsphere Q column Biorad, 40 mm by 12.6 mm). The mobile phase consisted of buffer A Tris-HCl 50 mM pH 8 and buffer B Tris-HCl 50 mM pH 8 added with NaCl 1 M. The proteins were eluted with 100 % of buffer A for 20 minutes, reaching 50 % in 34 minutes, and then from 50 % to 100 % buffer B in 25 minutes, using a flow rate of 1.5 mL min⁻¹. The DO at 280 nm was followed and fractions of 3 mL were collected.

Native-PAGE (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) was performed following the protocol of Ornstein and Davis [28, 29] in a Tetracell 4 (Biorad). The separation gel was performed with 10 % Acrylamide and a gel concentration of 3 %. The migration was carried out at 200 V for 45 min at 4 °C. Detection of proteins on the gel was achieved with Coomassie blue R-250 (Detection limit ranging from 36 to 47 ng protein per band).

The enzymatic activity was measured in the Native-PAGE as follows: the gel was cut into six parts according to the retardation factor (Rf). Then each gel fraction was instead of crude extract in the enzymatic reaction, carried out in 200 µL (20 µL pyrrothine, 20 µL acyl-CoA solution with same concentration indicated above and 160 µL Tris-HCl buffer pH= 8). The reaction mixture was incubated 15 h at 30 °C, and the dithiolopyrrolones were quantified by HPLC.

2.5. Automatic amino acid sequence determination and localization

The protein sample (F2 obtained from Native-PAGE) was digested by proteolytic enzyme [30]. These peptides were analyzed by NanoLC-MS/MS using an Ultimate 3000 system (Dionex, Amsterdam, Netherlands) coupled with an LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) [31]. Amino acid sequences were compared against the *Sa. algeriensis* databank contigs (i.e. tblastn), and the GenBank database.

2.6. Nucleic acid extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from *Sa. algeriensis* using the Kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, France) with little modification. Seven hundred microlitres of *Sa. algeriensis* homogenate cultures were mixed with the same volume of solution I without washing or centrifugation.

The quality and quantity of the RNA was checked by the A_{260} / A_{280} ratio via a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA), and 1 % agarose gels were run to visualize the integrity of the RNA according to standard protocols[32]. cDNAs were obtained through reverse transcription of 2 μ g of DNase I-treated total RNA using Advantage RT-for-PCR Kit (BD Biosciences) and random hexamer primers according to the manufacturer's instructions. The cDNA products were diluted 1:10 and stored at -80 °C.

2.7. Primer design and RT- qPCR conditions

Primers were designed using Clone Manger 9 software (Sci-Ed Software, USA) to produce amplicons between 100 and 250 bp. Primer synthesis was performed by GeneCust (Luxembourg) (Table 1). The PCR was performed with the *Taq* DNA Polymerase kite (*Qiagen*, France) according to the user manual provided. PCR conditions were as follows: 96 °C for 10 min, (96 °C for 30 s, 52 °C for 30 s and 72 °C for 30 s) x 30 cycles followed by an incubation at 72 °C for 10 min. The amplified products were examined by agarose gel electrophoresis.

The 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) was used for RT-qPCR amplification and detection. Samples for RT-qPCR were prepared in 25 μ L reaction mixture in MicroAmp optical 96-well reaction plates and sealed with optical adhesive covers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Each reaction contained 2 μ L of template cDNA, 12.5 μ L of 2 x Quantitect SYBRR® Green I Mix (*Qiagen*, Courtaboeuf, France), and 1.25 μ L each of forward and reverse primers(10 μ M), and 0.05 μ L ROX solution 5 μ M (fermentase 50 μ M). Reactions were run using the manufacturer's recommended cycling parameters of 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, 40 cycles of 95 °C for 15 s, and 60 °C for 1 min. Negative controls (No-template controls) were included in all RT-qPCR assays, and each experiment was performed in triplicate. Dissociation curves for each amplicon were then analyzed to verify the specificity of each amplification reaction; the dissociation curve was obtained by heating the amplicon from 60 °C to 95 °C. SYBR fluorescence was analyzed by StepOne software version 2.0 (Applied Biosystems). The C_q (quantification cycle, previously known as the threshold cycle C_t) was automatically determined for each reaction by the Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System set with default parameters and then the C_q value was calculated and reported using the $2^{-\Delta\Delta C_q}$ method [33]. A *FtsZ*-like gene [*FtsZ* is

homologous to tubulin, the building block of the microtubule cytoskeleton in eukaryotes [34]] was used as reference gene to quantify the relative expression of target genes, as it is expressed constantly throughout cellular growth.

2.8. Data analysis and sequence accession number

The protein-protein Blast (Blastp) searches were conducted at the GenBank database: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. For consensus sequence, the alignments were conducted using <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>. For local Blast (tblastn and tblastn), BioEdit Sequence Alignment Editor Version 7. 1. 3. 0 was used. GeneMark™ - Free gene prediction software (Version 2.8) was used for contigs-gene prediction. For statistical analysis SPSS 16.0.2 program was used.

The sequence of ActA and ActB was deposited in Genbank under the accession number AHB86989.1 and AHA46881.1 respectively.

3. RESULTS

3.1. Identification of a putative acyltransferase ActA

A local Blast search using BioEdit (tblastx of *hlmA* and tblastn of HlmA) in *S. clavuligerus* against *Sa. algeriensis* genome database allowed the identification of an amino acid sequence with 51 % identity and 60 % similarity located in one contig whose size of 7.4 Kb. Using GeneMark™ software and *Streptomyces coelicolor* as reference, nine ORFs were found in the this contig, the previous amino acid sequence was found to be coded by one ORF which designed as *actA*. The product of *actA* shares a percentage of identity/similarity (51 %/60 %) with the product of *hlmA* of *S. clavuligerus* (Fig. 2a). ActA showed low identity (about 30 %) to Hom3 and HleE, which have been already identified in biosynthetic gene clusters of the holomycin in *Y. ruckeri* and of pyrrothine derivatives in *Pseudoalteromonas sp* respectively (Fig. 2b).

a

	1		80
ActA	VTTTDVTNQHHDL	EDFTVDATVDDWRQITAWGNQEGWNIGFHD	AECEFFAADPGGFFIGRVGGRPVSAVSMVNYSEFSAW
HlmA	MNSH---	DAFTVSTATLEDWYQVAEWADGEGWNVGDGVACFHP	TDPAAGFFIGRLGARPVAAVSIVNYDDRYAVL
Consensus	mNQH...	#aFTVdTATL#DWrQ!aaWa#qEGWN!GdgDaaCFhaaDpa	GFFIGRLGaRPVAAVSiVNYdDr%aal
	81		160
ActA	GHYLVDPRLRGRGYGQGVWEVAVRHAGSRAASGDAMP	GVVGFYRREGMVPVHHTVHWAGRLARAGREVDGVEPVRPEQLG	
HlmA	GHYLTDPERFRGRGYGLATWKAAPPHSGNRTVGLDAMPAQRANY	ETHGFKAHDTVHFAGSPARPTGPVQGVAPVTPEHAE	
Consensus	GHYLTDPRLRGRGYGqatWeaAfrHaGnRaaggDAMPAqranYrreGmkaaHdTVHfAGrLARagreV#GvaPvrPEqae		

161 240

ActA AVADYDGECPFAHRPGFLGRWLFAPGHVARARWAGGRVTGYGVLRPAPAGYRIGPLVADTPRIAEEVFDALTAHLRPGAE

HlmA ALAAYDRGCFPADRSQFVGRWLTAPGRTARVRLRDGAVAGYGVIRPAGRGHRIGPLFADTPEDAAALFDGLVGHFGPGEE

Consensus ALAaYDreCFPAhrpGfLGRWLFAPGRtARaRladGaVaGYGVIRPAGaGhRIGPLfADTPrdAAaLFdaLtaHlrPGaE

241 292

ActA VSAFSPVQEAAAPLLSAGGLAERFRLVRVHRGAPPAHRARNVYAIASLELG

HlmA VSLDIPGTHAASADLLTSRGLAAQFHTVVMYTGVPVETAEERVFAITTTLELG

Consensus VSadiPetqaAaAdLLsarGLAaFrLVRmhrGapPahaarrV%AIasLELG

b

1 80

ActA VTTTQVNDQHHLEDFTVDTATVDDWRQITAWGNQEGWNIGFHDACFFAADPGGFFIGRVGGRPVSAVSMVNYSDFFS

HlmA MNSH---DAFTVSTATLEDWYQVAEWADGEGWNVGDGDVACFHPTDPAGFFIGRLGARPVAAVSIVNYDDRYA

Hom3 MMKNVVKSTDKAFSVHLATPAEQSAVEMARNEHWDLGHGDDRIFLNVKNGFFIGRTGRIVASISIVNFDPGYA

HolE MSEKLDYKLMQEHQWTSTKPAASLEEWQIVNEWIAIEKWDGLGDTERRFNIDEEGFYLGYNDEPVASVSVVNYTDEYA

Consensusaftv..Atle#wq.v.ewa..E.W#lg.gd.e.ffn.D..GF%iGrv.grpvas!SiVn%dde%a

81 160

ActA AWGHYLVDPRLRGRGYGQGVWEVAVRHAGSRAASGDAMPGVVGFYRREGMVPVHHTVHWAGRLARAGREVdGVEPVRPEQ

HlmA VLGHYLTDPFGRGRGYGLATWKAAPFHSNRTVGLDMPAQRAYETHGFKAAMDTHVFAGSPARPTGPVQGVAPVTPEH

Hom3 HLGHYLVTPYRGKGLGLELWTAIEHAGERCIGLDGMPMQEENYKKWGFRTHYHTYRIQGRASGIAIKADNISEVSSH

HolE YAGFYLVAPGARCKGYGLRLSYDAFRHCDKRSVGLDGMPEQEENYKKGGFVTHYETSLRVGIHNQQVDAPDGVQNIADN

Consensus .LghYlv.Pe.RGkGygl.lw.aAfrHag.R.vglDgMP.qeenYkk.Gfvthyht.r..Gr.....#g!...t..h

161 240

ActA LGAVADYDGECPFAHRPGFLGRWLFAPGHVARARWAGGRVTGYGVLRPAPAGYRIGPLVADTPRIAEEVFDALTAHLRPG

HlmA AEALAYDRGCFPADRSQFVGRWLTAPGRTARVRLRDGAVAGYGVIRPAGRGHRIGPLFADTPEDAAALFDGLVGHFGPG

Hom3 LSAIADFDTSTSGCNRASLLSSWFTADNRQGFVTEGASVKGVIALRPSDEGYRIGPFYAPDENHAIALLQTALGALPKN

HolE IDEVIKFDEKITGYPRAALLKDWFSGEGRHGFVINSQDGVIGVVGIRRTDGYRLGPLYSENQAVCDKLFAMALAQVPQG

Consensus l.avad%D....g..Ra.ll..Wfta.gr.gfv...g..V.Gv..iRps..GyRiGplya.....a.alf..ala.lp.g

241 294

ActA AEVSASFSPVQEAAAPLLSAGGLAERFRLVRVHRGAPPAHRARNVYAIASLELG

HlmA EEVSLDIPGTHAASADLLTSRGLAAQFHTVVMYTGVPVETAEERVFAITTTLELG

Hom3 ALVTLDVPEQAGATLDVLKVAGFSPLFHTCRMVYRGTPPVSYQKGNNAVASLELG

HolE TQVTIDAPTLDLGFINGLKKMGFEIIFHTFRMYRGKEPQGEKHKIQAIASLELG

Consensus a.Vtld.Pe....a..d.Lk..Gf.e.Fht.RmyrG.pP.....A!asLELG

Fig.2. Alignment of *Sa. algeriensis* ActA (Assession N°: AHB86989.1) with: a, HlmA in *S. clavuligerus* (WP_003955866.1). b, HlmA in *S. clavuligerus*, Hom3 in *Y. ruckeri* (WP_004721324.1) and HolE in *Pseudoaltermonas sp* (YP_004661191.1). High consensus is colored in red 90 %, Low consensus of 50 % is colored in blue. Consensus symbols: ! is anyone of IV, \$ is anyone of LM, % is anyone of FY, # is anyone of NDQEBZ. The coenzyme A binding pocket (cd04301) is highlighted in yellow

3.2. Enzyme purification

Ammonium sulfate precipitation of the crude extract of *Sa. algeriensis* yielded five fractions (Fig. 3). The higher quantity of protein was obtained in the fraction 40-60 % (31.2 mg). This fraction also presented the highest specific benzoyltransferase activity, while specific acetyltransferase activity was maximal in the fraction 60-80 %. The first purification step of benzoyltransferase activity had a maximum yield and purification factor of 69.9% and

2.02 respectively (Table 2). The ammonium sulfate precipitation yield of acetyltransferase activity was 11.7 % with a purification factor of less than one. (data not shown).

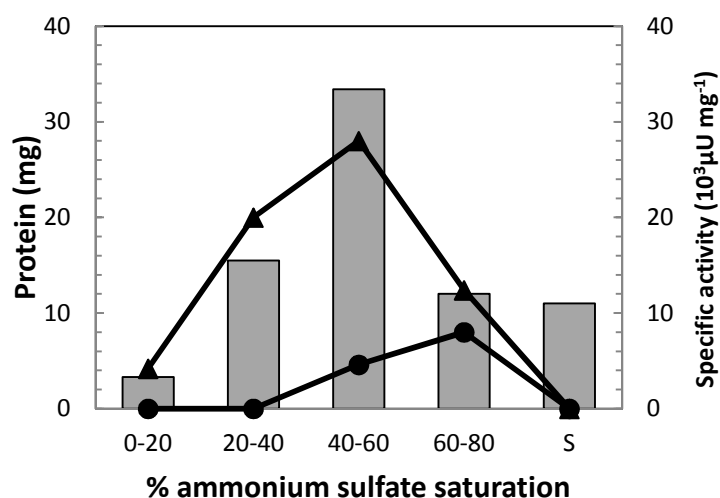


Fig.3. Protein quantity and acyltransferase specific activity in the fractions according to the saturation with ammonium sulfate. Total protein (■) and specific activity for; acetyltransferase (- ● -), and benzoyltransferase (-▲-) versus percentage saturation of ammonium sulfate

The fraction 40-60 % was further purified by interaction hydrophobic chromatography. The two fractions that presented the maximal benzoyltransferase activity were grouped as pool1. Acetyltransferase activity was no longer detected in this step. An Anion Exchange Chromatography (AEC) was performed on pool1. Benzoyltransferase activity was detected only in 4 fractions (F18 to F21). This activity was maximal in the fractions 19 and 20, and it was recovered with a yield of 0.4 and 0.6 % and purified to 8.1 and 12.2 respectively (Table 2).

Native-PAGE shows that, even after AEC chromatography, a large number of contaminating proteins were still present in the extract, and the activity is far to be purified to homogeneity (Fig. 4). The presence of benzoyltransferase activity was tested by following the enzymatic activity in the Native-PAGE which had been previously cut in six fractions. The enzyme of interest was localized in the fractions F2 and F3 with R_f of 0.16 to R_f of 0.32, and its molecular weight could be estimated about 66.2 kDa.

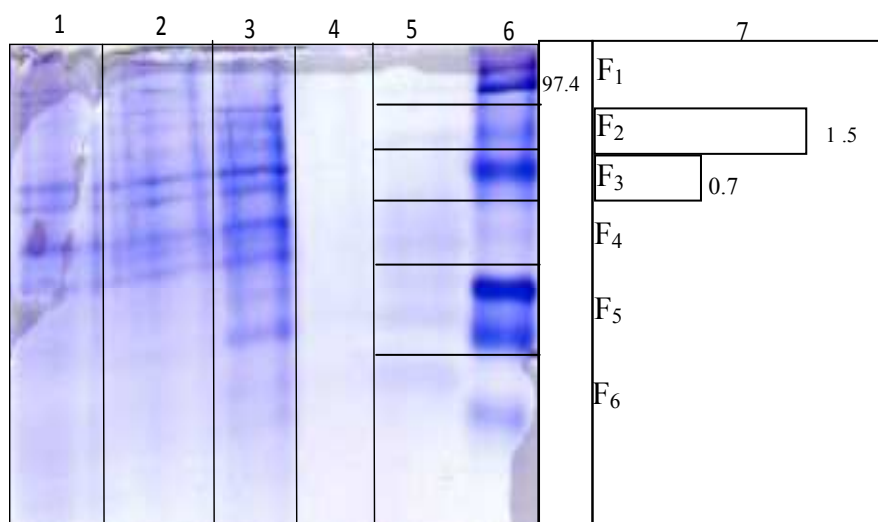


Fig.4. Native-page of the enzyme preparations obtained at each step of the purification. Lane1, cell-free extract; Lane2, 40-60 % ammonium sulfate fraction; Lane3, F5+F6 (HIC); Lane4 and 5, F19 and F20 (AEC); Lane6 molecular weight markers. Lane 7 BEP appeared in $\mu\text{moles.L}^{-1}$ after 15 h of incubation of the band in the reaction medium at 30° C.

3.3. Peptide microsequencing

The F2 fraction was excised from a Coomassie stained gel and digested with trypsin, the resulting peptides were analyzed yielding the sequences of eight different fragments. The alignment of these peptides against databank of *Sa. algeriensis* contigs (tblastn) showed that two of them YTGLADAVTDLASSR and RLGMRDGVVL were located in the same contig whose size of 4.3 Kb. GeneMark™ software for gene prediction using *Streptomyces coelicolor* as a reference allowed for the prediction of four ORFs in this contig. The two previous fragments were also found to be coded by the same ORF, which was designated as *actB*. Amino acid sequence comparison of ActA and ActB revealed that they were completely different (Fig. 5).

```

1                               80
ActA VTTTVDVNQHHDLEDFVDTATVDDWRQITAWGNQEGWNIGFHDAECFFAADPGGFFIGRVGGRPVSAVSMVNYSDEFSAW
ActB      MFSIPLGDDGAGLHPLEPWQA----EFLAHVDRGREFIGRYTGLADAVTDLASSRAYLQGY
Consensus .....mas!ddgr#gaaIgnqEgW#a.....aEc laaaDrGrefIGRygGradaatd$ansraelqaw

81                               160
ActA GHYLVDPRLRGRGYGQGVWEVAVRHAGSRAASGDAMPGVVGFYRREGMVPVHHTVHWAGRLARAGREVDGVEPVRPEQLG
ActB ADRAAADT--GRIWGTRLDGLVGGVLFRALDVARGTAEAGCWLEPSAAGRGLATRAARVIIDWAVRQRGVH--RVEWLV
Consensus adraaadr..GRgwGqrldeVaVrgagfRAadgaagpaeaGcwrregaagrghatraArriaraarrqrGve..RpEqLg

161                               240
ActA AVADYDGECEFAHRPGFLGRWLFAPGHVARARWAGGRVTGYGVLRPAPAGYRIGPLVADTPRIAAEVFDALTAHLRPGAE
ActB AAGN-DSSVAVARRLGMTRDGVLREHFPHRGERYDTEV--WSVLAPEWEAGGHGSAAALRRPR
Consensus Aaa#.DgecapArRLGmlrrgllaeghpaRarradgrv..wgVLaPapaagrghGpaaarrPR.....

241                               292
ActA VSAFSPEVQEAAAPLLSAGGLAERFRLVRVHRGAPPAHRARNVYAIASLELG
ActB
Consensus .....

```

Fig.5. Amino acid sequence comparison of ActA and ActB (Assession N° for ActB: AHA46881.1) in *Sa. algeriensis*. High consensus sequence of 90 % is colored in red, low consensus sequence of 50 % is colored in blue. Consensus symbols: ! is anyone of IV, \$ is anyone of LM, % is anyone of FY, # is anyone of NDQEBZ. Peptide sequences which were identified by microsequencing are highlighted in yellow

The alignment of ActB against GenBank database indicated that it shares a high homology to other acyltransferases in several bacteria, which are already known as dithiolopyrrolone producers (i. e. 66 % to N-acetyltransferase in *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* NRPC 13350, 62 % in *Streptomyces albus* J1074, and 60 % to N-acetyltransferase in *S. clavuligerus*) (Fig. 6). The sequences of the other fragments (5 fragments) led the identification of five ORFs in five different contigs. The products of these ORFs did not show any significant homology to any known acyltransferases. Finally, sequences of the remaining peptide fragments did not show any homology to known protein sequences.

```

1                               80
Sa.algerie MFSIPLGDD----GAGLHPLEPWQAEEFLAHVDRGREFIGRYTGLADAVTDLASSRAYLQGYADRAAADTGRIWGTRLDGL
S.griseus MFAVSLGDD----GAQLCPLEWQAEELLAHMDRARELVDAWIPLASAVTDPDSARALLRRYAEKQATDTGRLYGIRLDG
S.albus MFTLPLGPE----GAELRPLEIWQADEFLAHMDRARETVGERNGLPDVVRDLTESRAFLRTYAERQAADAGRLYGIWLDG
S.clavulig MFAIPLGSDADGTGAELRPLEPWAEEFFAHTERGREHIGRHVPLPDVNRTVEESRAFLERYAEKQAADGGRIYGIWQGG
Consensus MfaipLG.#....GAELRPLEpWA#EflAHm#RaRE.!gr..gLpdvvrdl.esRAFLrrYA#rqAaD.GRIyGiwlDg

81                               160
Sa.algerie VLVGGVLFFRALDVARGTAEAGCWLEPSAAGRGLATRAARVIIDWAVRQRGVHRVEWLVAAGNDSVAVARRLGMTRDGVL
S.griseus VLVGGVLFRTFDAESGTCEIGVWLEPAAQGRGLVTTRAERLIDWAVHERGMHRVEWVASAANTRSVAVAKRLGMTRDGVL
S.albus TLVGGVLFRTFDDPVHGVAEAGCWLEPAAVGRGLVTRACRTVIDWAFTVRGMRRVEWVHVATDNAPSIAVARRLGMTRREGVQ
S.clavulig TLVGGVLFRLFDAGQGTCEVGCWLEPAAVGQGLVTRALRLIDWAVDVRGIHRVEWVASAENAPSLRTAERLGMRCDGVL
Consensus tLVGGVLFRTtDa..GtaEaGcWLEPAavGrGLVTRA.r.lIDWAV.vRGmhRVEWvaaa.NapS.avArRLGMtr#GVL

161                               197
Sa.algerie REHFPHRGERYDTEVWSVLAPEWEAGGHGSAAALRRPR
S.griseus RQNYLHRGVRHDSEVWSVLAPEWARTAR
S.albus RSAYVHRGRRLDMELWAVLSEEWDQPASS
S.clavulig RDGDLHRGKRTDLEIWSVLAPEWRQARASAS

```

Consensus R..y^lHRG.R.D.E.WsVLapEWrq..as.....

Fig.6. Alignment of *Sa. algeriensis* ActB with other acyltransferase in species already known as dithiolopyrrolone producers; *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* NPRC 13350, (NCBI reference sequence: YP_001823524.1), *Streptomyces albus* J1074(NCBI reference sequence: YP_007746570.1), *S. clavuligerus* (NCBI reference sequence: WP_003961938.1). High consensus of 90 % is colored in red, Low consensus of 50 % is colored in blue and the peptide sequences which were identified by microsequencing are highlighted in yellow. The asterisks indicate coenzyme A binding pocket (cd04301)

3.4. Biomass, thiolutin and BEP production

Neither thiolutin nor BEP was detected on TSB medium, unlike on SSM and SSM+BA (Fig. 7), despite that *Sa. algeriensis* presented similar growth in the three studied media (Fig. 8).

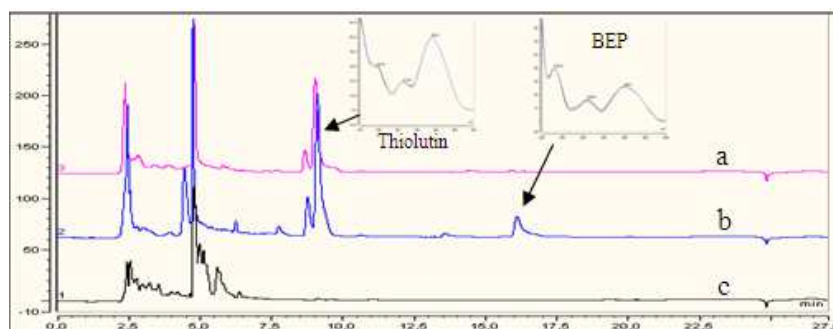
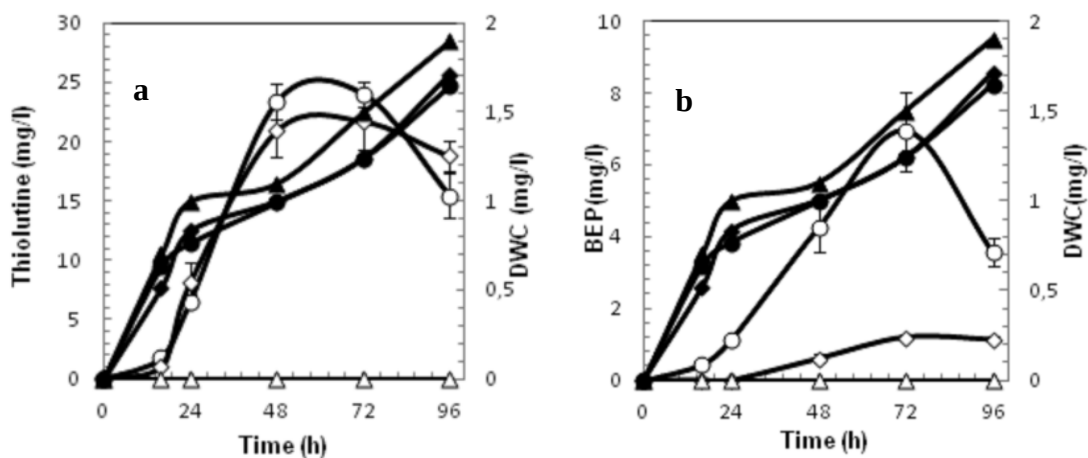


Fig.7. Dithiolopyrrolones production; (a) Under standard conditions (in SSM). (b) Addition of 1.25mM of benzoic acid (SSM+BA). (c) TSB. HPLC analysis at 390 nm was done on supernatant of *S. algeriensis* culture.

Kinetic of antibiotics production showed that, thiolutin production reached the maximum values of 21 and 23.2 mg.g⁻¹ at 48 h of culture. The maximum specific production rate of 0.94 and 0.78 mg g⁻¹ h⁻¹ was reached at 24 h on SSM and SSM+BA respectively (Fig. 8a). The addition of benzoic acid to SSM medium increased BEP production by 50 fold, and the maximum specific production rate was 0.006 and 0.11 mg g⁻¹ h⁻¹ at 48 h on SSM and SSM+BA respectively (Fig. 8b).



FFig.8. Time course of dry cell weight (DCW) during cultures of *Sa. algeriensis* NRRL B-24137 on: (SSM, ♦), (SSM+BA, ●) and (TSB, ▲), with the production of ; thiolutin (a) and BEP (b); (SSM, ◇) (SSM+BA, ○), (TSB, Δ); Dry cell weight (DCW) is given in g L⁻¹, antibiotic productions in mg L⁻¹ and the time in hours.

3.5. Pyrrothine-acyltransferase activities

No acyltransferase activities (neither acetyltransferase nor benzoyltransferase) were detected in TSB medium. In the two other media, acetyltransferase specific activity showed a peak at 24 h, followed by a sharp decrease. It is clear that this activity was not significantly modified by the addition of benzoic acid to SSM (Fig. 9a). However, benzoyltransferase specific activity was considerably modified by benzoic acid addition shown by an increase in activity on SSM+BA than on SSM. Benzoyltransferase specific activity reached a maximum value of 20 $\mu\text{U mg}^{-1}$ at 48 h, 1.6 times higher than without benzoic acid (Fig. 9b).

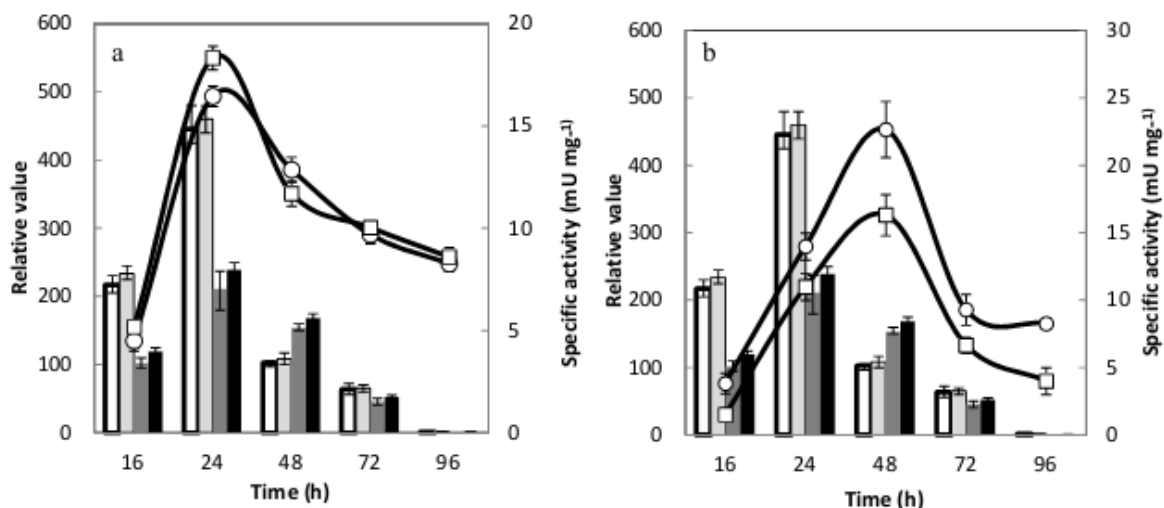


Fig.9. Relationship of differential expressions with the specific activities of acetyltransferase (a) and benzoyltransferase (b) in two media; SSM (-□-) and SSM+BA (-○-). Differential expressions were presented as follows: *actA* for SSM white bare, *actA* for SSM+BA light gray bare, *actB* for SSM dark gray bare and *actB* for SSM+BA black bare. Specific activity presented in mU mg⁻¹protein, and the time in hours. Relative values are in comparison to *FtsZ*-like, which was used as a reference gene. The relative value for the 96 h sample was arbitrarily assigned as 1

3.6. Transcriptional analyses of *actA* and *actB* in *Sa. algeriensis*

The result from RT-PCR for the two genes *actA* and *actB* revealed that both genes were not expressed in TSB and were only expressed in SSM and SSM+BA medium. To verify the relationship between these expressions and acyltransferase activities we analyzed the transcription of these genes in two media. Total RNAs were extracted from the *Sa. algeriensis* at 16, 24, 48, 72 and 96 h of growth in SSM and SSM+BA and were used to perform RT-qPCR with the same protocol as previously described. The results showed that *actA* and *actB* expressions started at 16 h and increased to its maximum at 48 h. Relative values of 445 and 460 for *actA* and of 211 and 240 for *actB* for both media SSM and SSM+BA respectively at 24 h of culture. Then *actA* expression level decreased sharply while *actB* decreased slowly (Fig. 9a). The effect of benzoic acid addition was not significant and minimum *p* values done by Ttest were 0.16 and 0,052 for *actA* and *actB* respectively, which confirm no significant difference between the two media through-out the time period.

However, both *actA* and *actB* showed similar levels of expression in both media. Maximum relative values of expression were reached at the same time of acetyltransferase activity (Fig. 9a) and 24 h before of the benzoyltransferase activity (Fig. 9b).

3.7. Effect of benzoyl-CoA precursors supply on benzoyltransferase activity

To study the effect of benzoyl-CoA precursors on BEP specific production in *S. algeriensis*, we selected compounds that are already known to be involved in benzoyl-CoA biosynthesis, and to be inducer of BEP production.

We observed that the growth of *Sa. algeriensis* was influenced only by the addition of L-phenylalanine and shikimic acid, whereas no change was observed for cinnamic acid, benzoic acid or benzoyl-CoA (Fig. 10a). L-phenylalanine significantly stimulated the growth of *S. algeriensis* and the highest value of dry cell weight of 1.3 g L^{-1} was obtained in the presence of 5mM of L-phenylalanine at 96 h. Shikimic acid, However, caused a reduction in growth throughout culture and maximal dry cell weight was 0.8 g L^{-1} at 96 h comparing with 1.1 g L^{-1} for control (Fig. 10a).

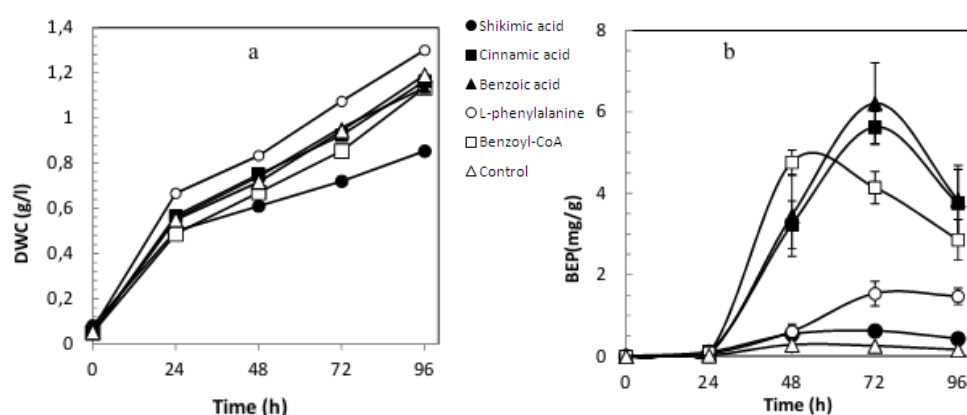


Fig.10. Growth and benzoyl-pyrrothine specific production of *Sa. algeriensis* during fermentation in SSM(Δ) as control, SSM+ shikimic acid (●), Cinnamic acid (■), benzoic acid (▲), L-phenylalanine (○) and Benzoyl-CoA (□). (a) growth curves measured as dry weight. (b) BEP specific production.

Analysis of the results indicated that the addition of cinnamic and benzoic acids had a strong influence on BEP specific production (Fig. 10b). Benzoic acid and cinnamic acid supported higher BEP production (6.2 and 5.6 mg g^{-1} respectively) than benzoyl-CoA (4.1 mg g^{-1}).

g^{-1}) at 72h, This latter supported more than L-phenylalanine (1.5 mg g^{-1}) and shikimic acid (0.6 mg g^{-1}) (Fig. 10b). Results of the effect of these supplementations on benzoyltransferase activity at 72h showed that cinnamic acid considerably enhanced benzoyltransferase activity and increased this activity by 3.5 fold when compared to the control. However, benzoic acid increased benzoyltransferase activity only by 1.7 fold. Benzoyltransferase activity was slightly increased by L-phenylalanine. In the presence of shikimic acid, there was no significant impact on benzoyltransferase activity (Fig. 11).

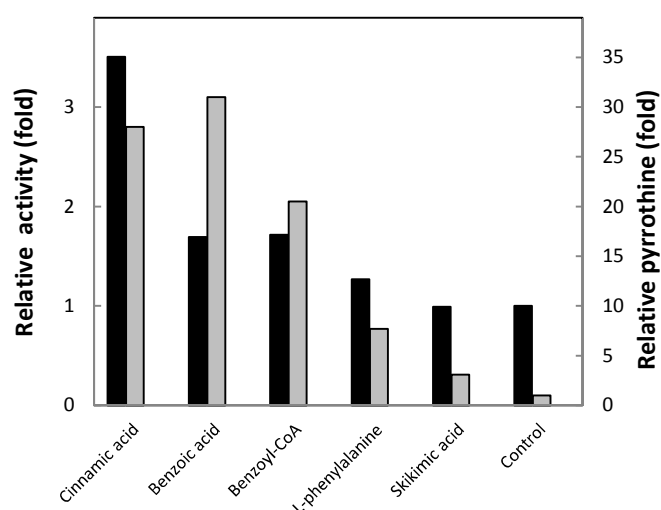


Fig.11. Effect of medium supplementations on benzoyltransferase activity (black bar) and benzoyl-pyrrothine production (grey bar). SSM which served as control medium was supplemented by 5mM of: cinnamic acid, benzoic acid, L-phenylalanine and shikimic acid, and 0,05mM of benzoyl-CoA. The activity and BEP production were expressed in relative values in comparison to control medium values at 72 h of fermentation, which is the optimal time for BEP production.

4. DISCUSSION

Sa. algeriensis has the ability to produce a wide range of pyrrothine derivatives with different radicals (R₂s) depending on the precursors added to the culture medium [3, 20-22]. Acyltransferase activities were previously reported to be responsible for the structural diversity of pyrrothine by transferring different acyls groups from acyl-CoA to the pyrrothine core [25]. Here in, two methods were followed to identify acyltransferase genes potentially implicated in dithiolopyrrolone biosyntheses in *Sa. algeriensis*.

Firstly, bioinformatic analyses by analogy to an acetyltransferase, HlmA, mentioned to be implicated in holomycin biosynthesis *S. clavuligerus* led the identification a putative acyltransferase, ActA, with a percentage of identity/similarity (51 %/60 %). This percentage is slightly higher than that found between the two acyltransferases, Hom3 and HolE (42 %/57 %), in marine Gram-negative bacteria *Y. ruckeri* and *Pseudoalteromonas*, which belong to same class of *Gammaproteobacteria*. We also compared ActA with Hom3 in *Y. ruckeri* and HolE in *Pseudoalteromonas*, which revealed a low of about 30% homology (about 30 %). However, these proteins show high conserved amino acid residues that may be significant for the acyl-CoA binding pocket (Fig. 3). Only HlmA was characterized biochemically, *in vitro*, was able to transfer different acyl-groups from acyl-CoA to holothine core forming different holothin derivatives which have never been naturally produced by *S. clavuligerus*. No mutations of *hlmA* have shown as that HlmA is the only acetyltransferase implicated in holomycin biosynthesis in *S. clavuligerus*.

In order to identify additional acyltransferase genes that may have a role in dithiolopyrrolone biosynthesis in *Sa. algeriensis*, the purification of two acyltransferases (acetyltransferase and benzoyltransferase) previously proposed by Chorin *et al.* (2009) were investigated. An ammonium sulfate precipitation followed by a hydrophobic interaction chromatography (HIC) and an anion exchange chromatography (AEC) supplied only a semi-purified benzoyltransferase with purification factor of 12.23. The loss of acetyltransferase activity and the low purification factor for benzoyltransferase could be due to the stability of these activities during purification stages. In fact these activities were exposed to different inactivation conditions (e.g. pH change, oxidizing environment, proteases, decreased protein concentration, etc.). Furthermore, the stability of these activities, perhaps, influenced by the low concentration of protein. Some enzymes could be stabilized by high concentration of

proteins [35, 36]. As benzoyltransferase has not been purified to homogeneity, the meager increased in fold activity could also be due to contaminating residual activity. However, the acetyltransferase and the benzoyltransferase showed different ammonium sulfate precipitation profiles and acetyltransferase activity was significantly less stable. The microsequencing of peptide sequences derived from F2 fraction of Native-PAGE (Fig. 3) provided 8 peptide fragments, two of them located in the *Sa. algeriensis* genome and encoded by one gene *actB*. ActB was completely different from ActA and the other identified acyltransferases (HlmA, HolE and Hom3). On the other hand, ActB was homologous to acetyltransferases in other bacteria, specifically *S. griseus*, *S. albus* and *S. clavuligerus*, which are known holomycin producers [37].

Unfortunately, the genetic manipulations on *Sa. algeriensis* have not resulted in any mutants. Thus, to verify the involvement of *actA* and *actB* genes in DTPs biosynthesis in *Sa. algeriensis*, another strategy was adopted. This strategy based on the association of gene expression of both acyltransferases activities and antibiotic productions in two media, SSM, which promotes DTPs production and TSB medium in which no DTPs have been detected.

The results showed that *actA* and *actB* are expressed only in SSM. In addition, this expression was accompanied with the acetyltransferase activity and DTP productions. This result allowed us to suggest that these genes may be involved in DTPs biosyntheses. Thus, we associated *actA* and *actB* expressions with the previously reported *N*-pyrroline acetyltransferase activity by realizing a kinetic on SSM. Analysis of acetyltransferase specific activity and both *actA* and *actB* expressions showed that they presented the same profile throughout the culture with a maximum at 24 h. This similarity between acetyltransferase activity and gene expression profiles reinforce our hypothesis about the involvement of these genes in dithiolopyrrolones biosynthesis.

In order to identify the enzymes encoded by *actA* and *actB*, we based our research on the hypothesis proposed by Chorin *et al.* (2009), in which benzoic acid increased BEP production by inducing benzoyltransferase gene. Since, both benzoyltransferase activity and *actA* and *actB* expressions were followed and compared on SSM and SSM supplemented by 1.25 mM of benzoic acid. Our results showed that benzoic acid addition strongly increased BEP production and slightly benzoyltransferase activity at 48 h (50 and 1.6 fold respectively). In contrary, this addition did not influence *actA* or *actB* expressions. These results suggest,

according to hypothesis proposed by Chorin, that neither *actA* nor *actB* encode for benzoyltransferase. But the poor influence of benzoic acid addition benzoyltransferase activity compared to BEP production render the hypothesis of weak gene induction. In this case the possibility for benzoyltransferase to be encoded by *actA* or *actB* cannot be excluded. In *S. clavuligerus*, the acetyltransferase specific activity was proportional to the level of holomycin produced by different mutants, and was leveled or increased along the fermentation. In *S. clavuligerus oppA2::aph*, increased *hlmA* transcription level (*hlmA* encodes for acetyltransferase) by 61.5 fold, accompanied by an increase of acetyltransferase activity by 172-fold and holomycin production of 120 folds compared with wild type strain [38, 39]. Due to the poor influence of benzoic acid addition on benzoyltransferase activity, we suggest that benzoic acid can play other roles as a direct supplier of benzoyl-CoA precursor. To confirm our suggestion, the effect of benzoyl-CoA precursor supply on BEP production and benzoyltransferase activity were investigated. Our results showed that BEP production is not only dependant on benzoyltransferase activity, but also benzoyl-CoA availability. The addition of cinnamic acid produced a greater increase in benzoyltransferase activity than seen with the addition of benzoic acid, while benzoic acid produced more of BEP (26 fold and 32 fold respectively). The addition of L-phenylalanine also considerably increased BEP production by 8 fold and increased slightly benzoyltransferase activity, but less than cinnamic and benzoic acid. The difference in BEP production between these three compounds is strongly consistent with previous biosynthetic feeding studies on the conversion of these compounds to benzoyl-CoA. Marine bacterium *S. maritimus* is able to convert L-phenylalanine to cinnamic acid and then to benzoyl-CoA [40]. Furthermore, a biosynthetic pathway of benzoyl-CoA from L-phenylalanine and cinnamic acid was recently proposed in this bacterium [41]. We suggest that *Sa. algeriensis* could convert cinnamic acid and benzoic acid to benzoyl CoA. We also observed that the addition of shikimic acid increased BEP production by 3 fold, with no affect on benzoyltransferase activity. It was reported that 4-hydroxybenzoic acid can be formed directly from by early intermediates in the shikimate pathway, e.g. 3-dehydroshikimic acid. In addition, a direct conversion of shikimic acid to benzoic acid was already seen in *Streptomyces* [42].

Finally, the capacity of *Sa. algeriensis* to directly incorporate benzoyl-CoA in BEP synthesis is very interesting despite of the limitation of used concentration. According to our

results, we suggest that the principle role for these supplementations is to delivery benzoyl-CoA and less for inducing benzoyltransferase activity.

In conclusion, this study resulted in the first identification of two putative acyltransferases ActA and ActB in *Sa. algeriensis*. Transcriptional analyses support our hypothesis of the involvement of *actA* and *actB* in dithiolopyrrolones biosynthesis in this bacterium. Our results also suggest that the role of benzoic acid as well as the similar compounds is more important to benzoyl-CoA precursor supply than their role as gene inducer.

1 **Table 1.** Oligonucleotides used for PCR and RT-PCR

Primer name	Sequence (5'-3')	gene	PCR product size Base pair
actA-F	GAACACCTCGGCGGCGATCC	<i>actA</i>	94
actA-R	TCACCGGCTACGGCGTGCTG		
actB-F	CAGCACGCCGTCCCTGGTCATC	<i>actB</i>	90
actB-R	GTGCACCGGGTGGAGTGGTTGG		
FtsZ-F	CGCCGTGAACCGGATGATCG	<i>FtsZ-like</i>	94
FtsZ-R	GTCGGCGTCGGACATCAGCAG		

2

3 **Table 2.** Purification of benzoyltransferase activity

Purification step	Protein mg	Activity mU	Activity specific μu/mg	Yield %	Purification fold
Crude extract	90.2	1150	12749	100	1
40-60 (NH ₄) ₂ SO ₄ fraction	31.2	804	25769	69.9	2.02
<i>HIC</i>	1.18	105	88983	9.1	6.79
<i>AEC</i>	0.05	7.8	156000	0.6	12.23

Reference

- [1]McInerney, B. V., Taylor, W. C., Lacey, M. J., Akhurst, R. J., Gregson, R. P. (1991) Biologically-active metabolites from *Xenorhabdus* spp .2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity. *J. Nat. Prod.* **54**, 785-795.
- [2]Celmer, W. D., Solomons, I. A. (1955) The structures of thiolutin and aureothricin, antibiotics containing a unique pyrrolinonodithiole nucleus. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 2861-2865.
- [3]Lamari, L., Zitouni, A., Dob, T., Sabaou, N., Lebrihi, A., Germain, P., Seguin, E., Tillequin, F. (2002) New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp SA 233 - II. Physicochemical properties and structure elucidation. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **55**, 702-706.
- [4]Okamura, K., Soga, K., Shimauchi, Y., Ishikura, T. (1977) Holomycin and n-propionyl-holothin, antibiotics produced by a cephamycin c producer. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **30**, 334-336.
- [5]Shiozawa, H., Shimada, A., Takahashi, S. (1997) Thiomarinols D, E, F and G, new hybrid antimicrobial antibiotics produced by a marine bacterium; Isolation, structure, and antimicrobial activity. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **50**, 449-452.
- [6]Webster, M., J., Li, Chen, G., (2000) Anticancer property of dithiolopyrrolones, United States.
- [7]Webster, J. M., Chen, G., Hu, K., Li, J. (2002) Bacterial metabolites, in: Entomopathogenic Nematology, R. Gaugler, CAB International. p 99-114.
- [8]Lamari, L., Zitouni, A., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Lebrihi, A., Lefebvre, G., Seguin, E., Tillequin, F. (2002) New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp SA 233 - I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **55**, 696-701.
- [9]Guan, Q. N., Zheng, W., Tang, S. J., Liu, X. S., Zinkel, R. A., Tsui, K. W., Yandell, B. S., Culbertson, M. R. (2006) Impact of nonsense-mediated mRNA decay on the global expression profile of budding yeast. *Plos Genetics* **2**, 1924-1943.

- [10] Tipper, D. J. (1973) Inhibition of yeast ribonucleic acid polymerases by thiolutin. *J. Bacteriol.* **116**, 245-256.
- [11] Jimenez, A., Tipper, D. J., Davies, J. (1973) Mode of action of thiolutin, an inhibitor of macromolecular synthesis in *saccharomyces-cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **3**, 729-738.
- [12] Pelechano, V., Perez-Ortin, J. E. (2008) The transcriptional inhibitor thiolutin blocks mRNA degradation in yeast. *Yeast* **25**, 85-92.
- [13] Jia, Y. F., Wu, S. L., Isenberg, J. S., Dai, S. J., Sipes, J. M., Field, L., Zeng, B. X., Bandle, R. W., Ridnour, L. A., Wink, D. A., Ramchandran, R., Karger, B. L., Roberts, D. D. (2010) Thiolutin inhibits endothelial cell adhesion by perturbing Hsp27 interactions with components of the actin and intermediate filament cytoskeleton. *Cell Stress Chaperones* **15**, 165-181.
- [14] Oliva, B., O'Neill, A., Wilson, J. M., O'Hanlon, P. J., Chopra, I. (2001) Antimicrobial properties and mode of action of the pyrrothine holomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 532-539.
- [15] Li, B., Lyle, M. P. A., Chen, G., Li, J., Hu, K., Tang, L., Alaoui-Jamali, M. A., 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. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 4601-4608.
- [16] Guo, Y., Chen, G., and Bin, L. (2008) Novel dithiolopyrrolones and their therapeutical applications. Patent WO2008038175. April 3rd 2008.
- [17] Yamagishi, S., Koyama, Y., Fukakusa, Y., Kyomura, N., Ohishi, Y. I., Hamamichi, N., Arai, T. (1971) On the metabolites of *Streptomyces luteoreticuliti* Katoh et Aral. Isolation of the metabolites. *Yakugaku Zasshi.* **91**, 351-357.
- [18] Paik, S., Park, Y. H., Suh, S. I., Kim, H. S., Lee, I. S., Park, M. K., Lee, C. S., Park, S. H. (2001) Unusual cytotoxic phenethylamides from *Xenorhabdus nematophilus*. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **22**, 372-374.

- [19] Bouras, N., Mathieu, F., Sabaou, N., Lebrihi, A. (2006) Nutritional requirements for the production of dithiolopyrrolone antibiotics by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 1423-1429.
- [20] Bouras, N., Mathieu, F., Sabaou, N., Lebrihi, A. (2006) Effect of amino acids containing sulfur on dithiolopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *J. Appl. Microbiol.* **100**, 390-397.
- [21] Bouras, N., Mathieu, F., Sabaou, N., Lebrihi, A. (2007) Influence on dithiolopyrrolone antibiotic production by organic acids in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochemistry* **42**, 925-933.
- [22] Bouras, N., Merrouche, R., Lamari, L., Mathieu, F., Sabaou, N., Lebrihi, A. (2008) Precursor-directed biosynthesis of new dithiolopyrrolone analogs by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochemistry* **43**, 1244-1252.
- [23] Merrouche, R., Bouras, N., Coppel, Y., Mathieu, F., Sabaou, N., Lebrihi, A. (2011) New dithiolopyrrolone antibiotics induced by adding sorbic acid to the culture medium of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *FEMS Microbiol. Lett.* **318**, 41-46.
- [24] Merrouche, R., Bouras, N., Coppel, Y., Mathieu, F., Monje, M. C., Sabaou, N., Lebrihi, A. (2010) Dithiolopyrrolone Antibiotic Formation Induced by Adding Valeric Acid to the Culture Broth of *Saccharothrix algeriensis*. *J. Nat. Prod.* **73**, 1164-1166.
- [25] Chorin, A. C., Bijeire, L., Monje, M. C., Baziard, G., Lebrihi, A., Mathieu, F. (2009) Expression of pyrrothine N-acyltransferase activities in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137: new insights into dithiolopyrrolone antibiotic biosynthetic pathway. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 1751-1762.
- [26] Huang, S., Zhao, Y., Qin, Z., Wang, X., Onega, M., Chen, L., He, J., Yu, Y., Deng, H. (2011) Identification and heterologous expression of the biosynthetic gene cluster for holomycin produced by *Streptomyces clavuligerus*. *Process Biochemistry* **46**, 811-816.
- [27] Li, B., Walsh, C. T. (2010) Identification of the gene cluster for the dithiolopyrrolone antibiotic holomycin in *Streptomyces clavuligerus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 19731-19735.

- [28] Davis, B. J. (1964) Disc electrophoresis .2. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427.
- [29] Ornstein, L. (1964) Disc electrophoresis .i. Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 321-&.
- [30] Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaeve, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T., Mann, M. (1996) Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature* **379**, 466-469.
- [31] Bouyssié, D., de Peredo, A. G., Mouton, E., Albigot, R., Roussel, L., Ortega, N., Cayrol, C., Burlet-Schiltz, O., Girard, J.-P., Monsarrat, B. (2007) Mascot File Parsing and Quantification (MFPaQ), a New Software to Parse, Validate, and Quantify Proteomics Data Generated by ICAT and SILAC Mass Spectrometric Analyses: Application To the Proteomics Study of Membrane Proteins from Primary Human Endothelial Cells. *Molecular & Cellular Proteomics* **6**, 1621-1637.
- [32] Sambrook, J., Russell, D. W., Cold Spring Harbor, L. (2001) Molecular cloning : a laboratory manual / Joseph Sambrook, David W. Russell, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. :.
- [33] Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* **25**, 402-408.
- [34] Margolin, W. (2005) FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 862-871.
- [35] Benyon, R. J. (1989) Initial planning: prevention of uncontrolled proteolysis In: Protein purification methods: a practical approach. Oxford university press. New York: Harris, E.L.V. and Angal, S. 317 p.
- [36] Harris, E. L. V. (1989) Initial planning: purification strategy In: Protein purification methods: a practical approach. Oxford university press. New York: Harris, E.L.V. and Angal, S., 1989, . 317.

- [37] Medema, M. H., Trefzer, A., Kovalchuk, A., van den Berg, M., Muller, U., Heijne, W., Wu, L., Alam, M. T., Ronning, C. M., Nierman, W. C., Bovenberg, R. A. L., Breitling, R., Takano, E. (2010) The Sequence of a 1.8-Mb Bacterial Linear Plasmid Reveals a Rich Evolutionary Reservoir of Secondary Metabolic Pathways. *Genome Biology and Evolution* **2**, 212-224.
- [38] Robles-Reglero, V., Santamarta, I., Álvarez-Álvarez, R., Martín, J. F., Liras, P. (2012) Transcriptional analysis and proteomics of the holomycin gene cluster in overproducer mutants of *Streptomyces clavuligerus*. *J. Biotechnol.* **163**, 69-76.
- [39] de la Fuente, A., Lorenzana, L. M., Martín, J. F., Liras, P. (2002) Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin: Possible cross-regulation of two unrelated secondary metabolic pathways. *J. Bacteriol.* **184**, 6559-6565.
- [40] Hertweck, C., Moore, B. S. (2000) A plant-like biosynthesis of benzoyl-CoA in the marine bacterium 'Streptomyces maritimus'. *Tetrahedron* **56**, 9115-9120.
- [41] Noda, S., Kitazono, E., Tanaka, T., Ogino, C., Kondo, A. (2012) Benzoic acid fermentation from starch and cellulose via a plant-like beta-oxidation pathway in *Streptomyces maritimus*. *Microbial Cell Factories* **11**, 49.
- [42] Grond, S., Langer, H. J., Henne, P., Sattler, I., Thiericke, R., Grabley, S., Zahner, H., Zeeck, A. (2000) Secondary metabolites by chemical screening, 39 - Acyl alpha-L-rhamnopyranosides, a novel family of secondary metabolites from *Streptomyces* sp.: Isolation and biosynthesis. *European Journal of Organic Chemistry*, 929-937.

III.3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons envisagé l'identification des gènes codant des acyltransférases potentiellement impliquées dans la biosynthèse des dithiolopyrrolones chez *Sa. algeriensis*. Ces gènes sembleraient se situer à l'extérieur du cluster *thi* comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent.

Tout d'abord, les analyses bioinformatiques ont conduit à l'identification d'un gène *actA* codant pour une acyltransférase putative homologue à *hlmA* impliquée dans la biosynthèse de l'holomycine chez *S. clavuligerus* (Li & Walsh, 2010) avec de 51 et de 60 % d'identité et de similarité respectivement. Nous avons également comparé ActA avec les autres acyltransférases (*hom3* et *holE*) déjà identifiées dans le cluster de la biosynthèse de l'holomycine, *hom*, chez *Y. ruckeri* et des dérivés de l'holothine, *hol*, chez *Pseudoalteromonas* (Fukuda *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2013). Cette comparaison a révélé que malgré le niveau bas d'homologie entre ces protéines (environ 30 %), le résidu d'acides aminés probablement importants pour la liaison à l'acyl-CoA était hautement conservé. Seule *hlmA* a été biochimiquement, *in vitro*, caractérisée, elle a montré une capacité de transférer des différents acyl-groupes à partir d'acyl-CoA au noyau de l'holothine pour former différents dérivés qui n'ont jamais été produits naturellement par *S. clavuligerus* (Li & Walsh, 2010). Par contre, aucun mutant déficient pour ce gène n'a jamais été obtenu pour confirmer que HlmA est la seule acétyltransférase impliquée dans la biosynthèse de l'holomycine chez *S. clavuligerus*.

Ensuite, et afin d'identifier des autres acyltransférases pouvant jouer un rôle dans la biosynthèse des dithiolopyrrolones chez *Sa. algeriensis*, la purification des deux activités *N*-pyrrothine acyltransférases précédemment proposées par Chorin *et al.* (2009) a été envisagée. La purification des activités pyrrothine *N*-acétyltransférase et *N*-benzoyltransférase présentes dans l'extrait intracellulaire de *Sa. algeriensis* a été donc entreprise. Une étape de concentration au sulfate d'ammonium (récupération de la fraction 40-60 %) est suivie d'une étape de chromatographie d'interactions hydrophobes (HIC) et puis d'une de chromatographie d'échange d'anions (AEC). Ces étapes ont permis de purifier partiellement l'enzyme liée à l'activité benzoyltransférase avec un facteur de purification de 12.23. L'analyse par Native-PAGE de l'extrait semi-purifié indique cependant que l'enzyme est loin d'être purifiée à

homogénéité. Par ailleurs le rendement global de la purification s'avère très faible (0.6 %). En effet, la baisse de l'activité au cours des différentes étapes de purification, peut-être liée aux paramètres et aux conditions de purification. Lors de cette purification, les protéines sont exposées à des conditions pouvant causer leur inactivation (changement de pH, environnement oxydant, protéases, baisse de la concentration protéique, etc.). Enfin, les activités acétyltransférase et benzoyltransférase ont encore montré des comportements différents au cours de cette étude. Nos résultats supportent l'idée sur la présence de deux acyltransférases catalysant l'acylation de noyau pyrrothine chez *Sa. algeriensis*.

Le microséquençage de la fraction active (F2) issue de l'électrophorèse de type Native-PAGE a permis d'identifier un gène, *actB*, dans le génome de *Sa. algeriensis*. Ce gène code pour une acyltransférase putative ActB complètement différente d'ActA mais homologue à une acétyltransférase chez des autres bactéries, en particulier chez *S. clavuligerus* qui est déjà connue comme productrice de l'holomycine (Medema *et al.*, 2010).

Les résultats de l'expression d'*actA* et *actB* sur deux milieux différents, SS et TSB, ont montré qu'*actA* et *actB* sont exprimés uniquement sur le milieu (SS) qui favorise la production des dithiolopyrrolones. Cette expression d'*actA* et d'*actB* accompagnée par la production des dithiolopyrrolones, et son absence sur milieu TSB, suggèrent que les deux gènes pourraient être impliqués dans la biosynthèse des dithiolopyrrolones. Afin de vérifier cette suggestion, nous avons associé les expressions d'*actA* et *actB* avec les deux activités *N*-pyrrothine acyltransférases précédemment mentionnées, l'acétyltransférase et benzoyltransférase, en réalisant une cinétique sur le milieu SS. L'évolution de l'expression d'*actA* et d'*actB* a montré que non seulement les deux profils d'expressions étaient similaires tout au long de la culture, mais aussi qu'ils atteignaient leur valeur maximale en même temps à 24 h. Bien que l'activité acétyltransférase ait été détectée tout au long de la culture, elle s'est surexprimée pendant un temps très court qui coïncide avec le pic de productivité de la thiolutine (taux de production spécifique). En outre, l'activité acétyltransférase a été fortement liée au profil de l'expression d'*actA*, le pic d'activité spécifique acétyltransférase a été associée à une augmentation de l'expression d'*actA*. En revanche, l'évolution de l'activité spécifique benzoyltransférase était différente et elle atteint son maximum à 48 h. Bien que, son profil soit moins lié aux expressions des deux gènes, l'hypothèse d'être codée par un de deux gènes ne peut pas être exclue. Finalement, la similitude entre les activités acyltransférase et les profils de

l'expression des gènes renforcent notre hypothèse concernant leur implication dans la biosynthèse des dithiolopyrrolones.

Afin d'identifier les enzymes codées par les gènes *actA* et *actB*, nous nous sommes basés sur l'hypothèse proposée par Chorin *et al.* (2009), dans laquelle l'acide benzoïque augmente la production de BEP en induisant le gène codant pour une benzoyltransférase. Donc, l'activité benzoyltransférase et les expressions d'*actA*, *actB* ont été suivies et comparées sur milieu SS et SS supplémenté par 1,25 mM d'acide benzoïque. Nos résultats ont montré que l'addition de l'acide benzoïque amélioré légèrement l'activité benzoyltransférase, et considérablement la production de BEP à 48 h (1,6 et 50 fois respectivement), tandis que cet ajout n'a pas influencé les expressions d'*actA* ou d'*actB*. Ce résultat suggère que, soit *actA* ou *actB* ne codent pas pour une benzoyltransférase, ou l'un d'entre eux code pour une benzoyltransférase. Dans ce cas là, l'acide benzoïque ne peut pas être un inducteur de gène, les niveaux des expressions des deux gènes n'ont pas été significativement augmentés par l'ajout de l'acide benzoïque. En fait, cette légère augmentation de l'activité benzoyltransférase par rapport à la production de BEP rend l'hypothèse sur l'induction du gène peu fiable. Chez *S. clavuligerus*, l'activité spécifique acétyltransférase est proportionnelle au niveau de l'holomycine produit par différents mutants. Chez *S. clavuligerus oppA2::aph*, l'augmentation du niveau de transcription *hlmA* est de 61,5 fois accompagnée par une augmentation de l'activité acétyltransférase de 172 fois et de la production de l'holomycine de 120 fois par rapport à la souche sauvage (de la Fuente *et al.*, 2002; Robles-Reglero *et al.*, 2012).

Ainsi, nous suggérons que l'acide benzoïque peut jouer d'autres rôles en tant que précurseur direct de benzoyl-CoA. Afin de confirmer cette suggestion, l'effet de l'ajout des précurseurs directs de benzoyl-CoA sur la production de BEP et de l'activité benzoyltransférase a été étudié. Notre résultat a montré que la production de BEP non seulement dépend de l'activité benzoyltransférase mais aussi la disponibilité de la benzoyl-CoA. L'addition de l'acide cinnamique a permis d'augmenter l'activité benzoyltransférase plus que l'acide benzoïque, alors que ce dernier a produit plus de BEP (26 fois et 32 fois respectivement). L'addition de L-phénylalanine a également augmenté la production de BEP de 8 fois et légèrement l'activité benzoyltransférase, mais moins que l'acide cinnamique et l'acide benzoïque. La différence de la production de BEP entre ces trois composés oriente fortement vers la possibilité de la conversion de ces composés en benzoyl-CoA. La bactérie marine *Streptomyces maritimus* a présenté une capacité à convertir la L-phénylalanine en

acide cinnamique et enfin en benzoyl-CoA (Hertweck & Moore, 2000). En outre, une voie de biosynthèse de la benzoyl-CoA à partir de la L-phénylalanine et l'acide cinnamique a été récemment proposée dans cette bactérie (Noda *et al.*, 2012). En conséquence, nous proposons que *Sa. algeriensis* pourrait convertir l'acide cinnamique et l'acide benzoïque en benzoyl-CoA. Nous avons également observé que l'ajout de l'acide shikimique a augmenté la production de BEP de 3 fois tandis que cet ajout n'a pas affecté l'activité benzoyltransférase. la conversion directe de l'acide shikimique en acide benzoïque a été déjà rapportée chez *Streptomyces* (Grond *et al.*, 2000) . Enfin, la capacité de *Sa. algeriensis* d'incorporer directement le benzoyl-CoA ajouté au milieu de culture pour synthétiser BEP est très intéressant malgré la limitation de la concentration utilisée. Selon nos résultats, nous suggérons que le rôle principal de ces supplémentations est de livrer le benzoyl-CoA et moins pour induire l'activité benzoyltransférase.

CHAPITRE IV

**Caractérisation de deux pyrrothine *N*-acyltransférases intracellulaires
dans l'extrait brut de *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137**

Caractérisation de deux pyrrothine *N*-acyltransférases intracellulaires dans l'extrait brut de *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137

IV.1 Introduction

Lors de la purification des activités acyltransférases nous avons constaté que cette opération semblait très influencée par les conditions expérimentales et notamment par la température et le changement d'environnement (le pH). Donc la caractérisation de ces activités, surtout l'effet de la température et du pH, est primordial pour le succès de la purification. Dans ce contexte, nous avons envisagé la caractérisation des enzymes présentes dans l'extrait brut de *Sa. algeriensis* et particulièrement l'acétyltransférase et la benzoyltransférase.

Plusieurs questions se posent concernant l'activité acyltransférase mise en évidence chez *Sa. algeriensis*. En effet, cette activité enzymatique comprend-t-elle une seule enzyme ou plusieurs? Quelles sont les caractéristiques cinétiques de cette enzyme? Enfin, cette caractérisation permettra-t-elle d'améliorer la purification et la détection de ces activités? La recherche des réponses à ces interrogations fait l'objet du chapitre suivant.

L'activité acyltransférase présente dans l'extrait brut de *Sa. algeriensis* a été mesurée à des températures de 25 à 60 °C. L'optimum de l'activité acétyltransférase est observée à 40 °C, et seulement environ 3 % de l'activité est inactivé après une exposition à 45 °C pendant 10 min. La température optimale de l'activité benzoyltransférase est à 55 °C, au delà de cette température, l'activité diminue fortement. D'après ce résultat, la température utilisée pour doser l'activité lors de la purification, à 30 °C, n'est pas la température optimale.

L'étude de la stabilité thermique des activités acyltransférases a été effectuée pour des températures de 20 à 50 °C. Le profil de stabilité thermique montre que les deux activités sont instables, même à 20 °C après 60 minutes d'incubation, l'activité est alors réduite à 15 % et 47 % pour l'acétyltransférase et la benzoyltransférase respectivement. L'activité acétyltransférase semble être plus stable lorsque la température augmente et diminue progressivement avec l'augmentation de la température, alors que l'activité benzoyltransférase baisse considérablement au dessus de 30 °C avec seulement 9 % et 1 % restant activité à 40 et 50 °C respectivement. On peut supposer que la température optimale ne signifie pas

nécessairement thermostabilité plus élevée. Afin de clarifier cette hypothèse, les deux activités enzymatiques ont été suivies à 50 °C pendant 30 minutes. Le résultat obtenu montre que la quantité de benzoyl-pyrrothine formée se stabilise après 15 min, alors que la quantité de thiolutine augmente encore. Cette observation signifie qu'à 50 °C, la benzoyltransférase est devenue inactive après 15 minutes alors que l'acétyltransférase est toujours active. La thermostabilité à 4 °C à long terme a été étudiée pour les deux activités. Le résultat montre que la perte maximale de l'activité se produit après 8h d'incubation, puis que l'activité diminue progressivement. L'activité résiduelle est de 28 et 16 % après 72 h pour la benzoyltransférase et acétyltransférase respectivement à 4 °C.

Les deux activités acyltransférases sont actives sur une gamme de pH de 3 à 10. Le pH optimal est observé à pH 7 et à pH 9 avec une activité spécifique d'environ 114 % et 160 % pour l'acétyltransférase et la benzoyltransférase respectivement, si l'activité à pH 8 est considérée comme référence.

Ainsi, le résultat de stabilité en fonction du pH indique que les deux enzymes restent actives après pré-incubation à 4 °C pendant 24 h dans la gamme de pH de 3-10. L'activité benzoyltransférase semble plus stable que l'activité acétyltransférase et elle conserve plus de 65 % de son activité après 24 h d'incubation à 4 °C tandis que la dernière conserve 44 %.

La stabilité à long terme (72 h) a été étudiée pour les deux activités acyltransférases aux trois valeurs de pH (7, 8 et 9) qui présentent les meilleures valeurs de stabilité pendant 24 h à 4 °C. L'activité acétyltransférase présente la meilleure stabilité sur les trois jours à pH 7. Cependant, la perte de l'activité sur les premières 24 heures est tout de même de 65 %. Par contre, l'activité benzoyltransférase s'avère plus stable que celle de l'acétyltransférase après 3 jours. Elle présente aussi des profils différents. La stabilité à pH 9 est maximale pour le premier jour seulement, puis pour le deuxième et le troisième jour, elle est maximale à pH 8.

IV.2 **Article III: Enzymatic synthesis of dithiolopyrrolone antibiotics using cell-free extract of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 and biochemical characterization of two pyrrothine *N*-acyltransferases in this extract**

Journal of Microbiology and Biotechnology

S. SAKER¹, Z. ALMOUSA ALMAKSOUR¹, A.C. CHORIN¹, A. LEBRIHI¹ and F. MATHIEU¹

Université de Toulouse, Laboratoire de Génie Chimique, UMR 5503(CNRS/INPT/UPS), Département BioSyM, INPT-ENSAT, 1 Avenue de l'Agrobiopôle, B.P. 32607, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex 1, France.

Author for correspondence:

F. MATHIEU. Université de Toulouse, Laboratoire de Génie Chimique, Département of BioSyM, INPT-ENSAT, 1 Avenue de l'Agrobiopôle, B.P. 32607, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex 1, France. Phone: +33 05 34 32 39 35. Fax: +33562193901.

E-mail: mathieu@ensat.fr

ABSTRACT

Saccharothrix algeriensis NRRL B-24137 produced naturally different dithiolopyrrolone derivatives. An enzymatic activity pyrrothine *N*-acyltransferase was targeted to be responsible for the transfer of acyl group from acyl-CoA to pyrrothine core. This activity was also reported to be responsible for the diversity of dithiolopyrrolone derivatives. Basing on this fact, nine dithiolopyrrolone derivatives were produced *in vitro* via the crude extract of *Sa. algeriensis*. Three of them have never been obtained before by natural fermentation: acetoacetyl-pyrrothine, hydroxybutyryl-pyrrothine, and dimethyl thiolutin (holomyicin). Two acyltransferase activities, acetyltransferase and benzoyltransferase catalyzing the incorporation of linear and cyclic acyl group to pyrrothine core respectively, were biochemically characterized in this crude extract. The first one is responsible for acetyl-pyrrothine formation and the second for benzoyl-pyrrothine one. Both enzymes were sensible to the temperature changes: For example, the loss of acetyltransferase and benzoyltransferase activity was 53 % and 80 % respectively after pre-incubation of crude extract 60 minutes at 20 °C. The two enzymes were more active in the neutral and basal media (pH 7-10) than the acidic one (pH 3-6). The optimum temperature and pH of acetyltransferase were 40 °C and 7 with K_m value of 7.9 μM and a $V_{\max}$ of 0.63 $\mu\text{M min}^{-1}$ when acetyl-CoA was used as limited

substrate. Benzoyltransferase had a temperature and a pH optimum at 55 °C and 9, a K_m value of 14.7 μM and a V_{max} of 0.67 $\mu\text{M min}^{-1}$ when benzoyl-CoA was used as limited substrate.

INTRODUCTION

Saccharothrix algeriensis NRRL B-24137 produces naturally at least five pyrrothine derivatives characterized by their different *N*-acyl groups such as thiolutin (acetyl-pyrrothine), senecieryl-pyrrothine (SEP), tigloyl-pyrrothine (TIP), isobutyrylpyrrothine (ISP) and butanoyl-pyrrothine (BUP) (Figure 1A) (Lamari *et al.*, 2002a; Lamari *et al.*, 2002b). Furthermore, the addition of precursors to the culture medium led to modify the production levels of known dithiolopyrrolones [2, 3]. Precursor-directed biosynthesis (PDB) method led also to produce new dithiolopyrrolone analogues. The addition of benzoic and valeric acids led to the production of unnatural dithiolopyrrolones valeryl-pyrrothine benzoyl-pyrrothine (BEP), demethyl-benzoyl-pyrrothine (benzoyl-holothin) [4]. Further exploitation of PDB method revealed the remarkable flexibility of the dithiolopyrrolone biosynthetic pathway in *Sa. algeriensis*. The addition of 5 mM sorbic acid in the culture medium induced the production of new dithiolopyrrolone derivatives: crotonyl-pyrrothine, sorbyl-pyrrothine, 2-hexonyl-pyrrothine and 2-methyl-3-pentenyl (Figure 1B).

Dithiolopyrrolone antibiotics have strong activities against a variety of Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeasts, filamentous fungi and amoeboid parasites (Celmer & Solomons, 1955; Lamari *et al.*, 2002a; Webster *et al.*, 2000). Thiolutin was also reported to inhibit in yeast all RNA polymerases (Guan *et al.*, 2006; Jimenez *et al.*, 1973; Tipper, 1973) and the degradation of mRNA (Pelechano & Perez-Ortin, 2008). Recent study showed that thiolutin also potently inhibits developmental angiogenesis in zebrafish and vascular outgrowth from tissue explants in 3D cultures (Jia *et al.*, 2010). Biological activity of dithiolopyrrolones is strongly influenced by the nature of acyl groups (Guo *et al.*, 2008; Lamari *et al.*, 2002a; Li *et al.*, 2007; Oliva *et al.*, 2001).

In *Sa. algeriensis*, a pyrrothine *N*-acyltransferase activity was reported to be responsible for the transfer of the acyl groups from the acyl-CoA to pyrrothine core leading to produce different dithiolopyrrolone derivatives (Chorin *et al.*, 2009). Early studies already reported the involvement of various acyltransferases in the antibiotics biosynthesis produced by the filamentous, Gram-positive bacteria genus *Streptomyces*. In *S. clavuligerus*, an

acetyltransferase activity, holomycin synthase, was reported to be responsible, *in vitro*, for holomycin formation (de la Fuente *et al.*, 2002). Recently, the gene encoding this enzyme and its role in holomycin biosynthesis were identified as *N*-pyrrothine-acyltransferase. This enzyme catalyzed the transferring of acyl group from acyl-CoA to holothin core (Li & Walsh, 2010). Another acyltransferase called ornithine acetyltransferase appeared to act as a modulator for clavulanic acid biosynthesis (de la Fuente *et al.*, 2004). An arylamine *N*-acetyltransferase (NAT) responsible for the *N*-acetylation of exogenous 3-amino-hydroxybenzoic acid in *S. griseus* was mentioned to be involved in the metabolism of xenobiotic compounds (Suzuki *et al.*, 2007). An acyltransferase called *N*-benzoyltransferase had also been reported to be involved in the last step of biosynthesis of the anticancer drug Taxol in yew *Taxus* species (Long *et al.*, 2008).

The study of pyrrothine *N*-acyltransferase activities in the cell-free extract of *Sa. algeriensis* obtained on semi-synthetic medium supplemented or non-supplemented with benzoic acid was already investigated by Chorin *et al.* (2009). In particular, the transfer of acetyl and benzoyl groups on pyrrothine core resulted in the thiolutin and BEP respectively. This study suggested that two different enzymes could support these enzymatic reactions. This hypothesis was emphasized by the fact that the addition of 1.25 mM of benzoic acid induced the pyrrothine *N*-benzoyltransferase activity specifically and did not affect the pyrrothine *N*-acetyltransferase activity. In addition, the ratio of the both specific activities was not constant throughout culture (Chorin *et al.*, 2009).

Here, we assayed the enzymatic synthesis of several dithiolopyrrolones using the crude extract of *Sa. algeriensis*. Different length acyl chains and cyclic acyl chains branched or no branched were tested using two substrates holothin and pyrrothine. Next, we investigated the characterization of two intracellular acyltransferases present in this crude extract. This characterization could confirm the hypothesis of the presence of, at least, two *N*-acyltransferases in *Sa. algeriensis*.

MATERIALS AND METHODS

Producing strain, and culture conditions

Saccharothrix algeriensis NRRLB-24137 (= DSM 44581) was used for this study. A stock of spores was prepared as follows. *Sa. algeriensis* was grown on International

Streptomyces Project 2 (ISP2) agar plates for seven days at 30 °C. Spores were suspended in 0.1 % Tween 80 (Fisher, Waltham, MA, USA), harvested and stored in 20 % glycerol (Fisher) at -20 °C. The spores were counted and represented as colony-forming units per milliliter (CFU mL⁻¹).

The semi synthetic medium (SSM) (Bouras *et al.*, 2006b) containing 15 g L⁻¹ of D (+) glucose (Acros) was used. *Sa. algeriensis* pre-cultures were prepared in 250-mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of culture medium inoculated with spores (2×10⁷ CFU mL⁻¹). Cultures were grown in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of SSM were inoculated with 5 mL of 48h aged pre-culture. Culture was incubated at 30 °C at 240 rpm for 72 h on a rotary shaker (New Brunswick Scientific Company, NJ, USA).

Cell-free extract preparation (crude extract)

Sa. algeriensis was grown in SSM for 72 h, then the biomass was separated by centrifugation at 5,000 *g* for 15 min at 4 °C (4K15, Sigma, Osterode am Harz, Germany). Then, the biomass was washed twice with physiological water (0.9 % NaCl), and once with lysis buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 8). Wet cells were finally recovered by filtration using 0.2 µm membrane filters (Advantec, Dublin, Ireland). 0.6 g of wet cells were re-suspended in 1 mL of lysis buffer and transferred to a Fast Protein Blue tube (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA). Two disruption cycles (30 sec, 5 m s⁻¹) were carried out in a Fast Prep disruptor (MP Biomedicals, California, USA). The lysing matrix was discarded and then the sample was centrifuged at 10,000 *g* for 15 min (centrifuge 1-15K, Sigma, Missouri, USA) to remove the cellular debris. The supernatant which constitutes soluble cell-free extract of *Sa. algeriensis* (crude extract) was used to synthesis the dithiolopyrrolones derivatives and to characterize both pyrrothine *N*-acyltransferase activities. The proteins were determined in the crude extract by the method of Bradford (Bradford, 1976).

Assay of enzymatic activity

For enzymatic assay, the reaction mixture was carried out in the following order: 10 µL of pyrrothine solution in methanol (final concentration at 0.25 mM), 10 µL of acyl-CoA solution in deionized water (final concentration at 0.5 mM), and 80 µL of enzyme extract whose addition started the enzymatic reaction (T₀). The reaction mixture was incubated at 30 °C for 10 min (standard assay conditions). The reaction was stopped by adding fresh

trichloroacetic acid at 2.5 % (w /v) (Fisher). The cell-free extract was properly diluted with Tris-HCl buffer (50 mM, pH 8) before the assay to obtain a linear product formation with time within 10 min. Enzymatic activity was identified as either acetyltransferase or benzoyltransferase activity according to the acyl group donor used during the assay, i.e. acetyl-CoA and benzoyl-CoA respectively. A unit of enzyme is defined as the enzyme activity producing 1 μmol of thiolutin or BEP per minute. Specific enzymatic activity was expressed in $\mu\text{U mg}^{-1}$ of protein.

Dithiolopyrrolones detection and quantification

For enzyme characterization, thiolutine and benzoyl-pyrrothine were quantified by HPLC (Bio-Tek instruments, Milan, Italy). The analytical column was ProntoSIL 120-5-C18 SH, 150×4.6 mm (Bischoff chromatography, Leonberg, Germany) fitted with a pre-column of 10×4 mm and detection was achieved with a diode array detector (UV-vis 545 V, Bio-tek instruments). The samples were analyzed by linear gradient elution using acetonitrile as solvent A and ultra pure water as solvent B. The separation gradient started with 0 % solvent A and 100 % solvent B, reached 30 % solvent A and 70 % solvent B in 5 min, continued from 30 % to 100 % solvent A in 25 min, using a flow rate of 0.8 mL min^{-1} . The injection volume was 80 μL . The detection of dithiolopyrrolones was carried out at 390 nm. Quantification of antibiotics was performed using a thiolutin standard calibration curve. The molar extinction coefficient ($\log e$) of thiolutin is nearly the same for all fractions ($\log e_{390} = 3.92\text{--}3.97$) as described by Lamari *et al.* [3].

The identity of the formed products ‘i.e. dithiolopyrrolone derivatives’ throughout the enzymatic synthesis was determined as follows: 10 μL of reaction mixture was injected after filtration using 0.2 μm membrane filters (Advantec, Dublin, Ireland) in LC-MS instrument (Agilent system 1100). All analyzes are performed on a reverse phase column Prontosil 120-5 C18-SH, 150×4.6 mm (Bischoff Chromatography, Leonberg, Germany). The ionization is performed by electrospray. Then the mass spectrum is determined with a Q TRAP device (Applied Biosystems) with a triple quadrupole.

Biochemical characterization

Effect of temperature on acyltransferase activity (optimum temperature)

The effect of temperature on acyltransferase activity was determined by realizing the enzymatic reaction described above at various temperatures, i.e.: 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, and 60 °C. Control reaction without the extract enzymatic was achieved in order to verify no transformation of pyrrothine to thiolutin or BEP whatever the chosen temperature.

Effect of temperature on acyltransferase stability

The thermal stability was studied by pre-incubating the crude extract at 20, 30, 40, and 50 °C. Appropriate aliquots were withdrawn at different time intervals (i.e. 30, 40 and 60 min), then they were transferred rapidly on ice for 10 min. The activity of the enzyme before pre-incubation was taken as 100 %. The temperature stability was studied by measuring the residual activities.

Effect of pH on acyltransferase activity and stability

For optimum pH determination, the crude extract was prepared in Tris-HCl 50 mM adjusted to different pH values, i.e.: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 and 12, then the acyltransferase activity was measured at 30 °C using the protocol described above. Control reaction was performed for each value of pH buffer without the crude extract. For pH stability studies, the crude extracts prepared at different pH values were pre-incubated at 4 °C for 24 h, then the residual activity was determined as indicated above.

Determination of Kinetic Parameters for acetyltransferase and benzoyltransferase

In all kinetics studies, appropriate enzyme extract dilution and incubation times were chosen, so that the reaction velocity was linear during the incubation time period. To determine the K_m value for acyl-CoA as limited substrate, pyrrothine concentration was fixed at a saturated level and the concentration of the acyl-CoA was varied. Lineweaver-Burk was used to report the apparent K_m value.

RESULTS

Characterization of the *in vitro* enzymatically synthesized dithiolopyrrolones

Synthesis of pyrrothine and holothin derivatives was assessed *in vitro* using crude extract of *Sa. algeriensis* obtained as described above with different acyl group donors. From

mass spectrometry and UV spectrometric analyses, as well as by comparison with all dithiolopyrrolone derivatives reported in the literature (data not show), we identified the structures of six dithiolopyrrolone derivatives naturally produced by *Sa. algeriensis* there are: thiolutin, benzoyl-pyrrothine, butyryl-pyrrothine, crotonoyl-pyrrothine, hexanoyl-pyrrothine, acetoacetyl-pyrrothine (Table 1). These analyses also revealed three acylated pyrrothine and holothin products, their calculated (cald.) and observed (obsd) masses for $[M+H]^+$ are as follows: hydroxybutyryl-pyrrothine $C_{10}H_{12}N_2O_3S_2$, cald. 272.029, absd. 273, hexanoyl-pyrrothine $C_{12}H_{16}N_2O_2S_2$, cald. 270.013 absd. 271.00, and acetyl-holothin (holomycin) $C_7H_6N_2O_2S_2$ cald. 213.987, absd. 214.9 (Figure 2). For more length acyl chain (lauroyl) as well as for branched cyclic acyl group (phenylacetyl), no acylated pyrrothine products were detected.

Biochemical characterization

Optimum temperature

Acyltransferase activities in the crude extract of *Sa. algeriensis* were measured at temperatures ranging from 25 to 60 °C. The optimum acetyltransferase activity was observed at 40 °C, and only about 3 % of the activity was inactivated after exposure to 45 °C for 10 min (Figure 3). The optimum temperature of benzoyltransferase activity was 55 °C, and up to this temperature the specific activity decreased sharply (i.e. at 60 °C it was 42 % lower than at 55 °C).

Thermal stability

The thermostability of acyltransferase activities was carried out at temperature ranging from 20 to 50 °C. The thermal stability profile of acyltransferases showed that the two activities decrease after 60 min regardless to the incubation temperature (Figure 4). The residual activities were 15 % and 47 % for acetyltransferase and benzoyltransferase respectively after 60 min at 20 °C. The acetyltransferase activity decreases progressively till 40 °C-50 °C with a residual activity of 47 % et 20 % after 30 min respectively (Figure 4A). In contrast, benzoyltransferase activity decreased dramatically with the increasing of temperature up to 30 °C with only 9 % and 1 % of residual activity at 40 and 50 °C after 30 min respectively (Figure 4B).

Long term thermal stability

The thermostability at 4 °C for 72 h was investigated for both activities. Figure 5 shows that the maximum loss of activity accrued in the first day of incubation at 4 °C. The residual activities were 54 and 71 % after 8 h of incubation, and then they decrease progressively. At 72 h, they were 16 and 28 % for acetyltransferase benzoyltransferase respectively.

Effect of pH on enzyme activity

Both acyltransferase activities were active in the pH range of 3–10, with an optimum at pH 7 and 9 for acetyltransferase and benzoyltransferase, respectively (Figure 6). The specific activities at pH 7 and 9 were about 114 % and 160 %, respectively, when the activity at pH 8 was considered as reference.

Effect of pH on enzyme stability

The result indicates that although both enzymes were affected by the pre-incubation at 4 °C for 24 h in the pH range of 3-10, they still active in these conditions (Figure 7). Acetyltransferase was more stable in the acidic and neutral media with maximum residual activity of 44 % at pH 7. Contrariwise, benzoyltransferase activity was more stable at the basic medium with maximum residual activity of 44 % at pH 9.

However, the pH stability profile showed that the benzoyltransferase activity is more affected by the change of pH than the acetyltransferase. The loss of activity between the maximal and the minimal benzoyltransferase activity was of 40 % while it was 19 % for acetyltransferase activity.

Effect of stock time on acyltransferase stability

The stability of both acyltransferase activities were investigated for three days in three pH values which represented the best stability values 7, 8 and 9 at 4 °C. The result revealed that whatever the pH value, acetyltransferase loses more than 65 % of its activity after 24 h of incubation. Then it seemed to be more stable, the loss of the activity between 24 and 72 h was 50 % (Figure 8A). Concerning benzoyltransferase activity, the maximal loss of its activity, more than 40 %, accrued after 24 h, then it decreased progressively and at 72 h the residual

activity was more than 20 %. Acetyltransferase presents best stability at pH 7 during the three days (Figure 8A), while benzoyltransferase was more stable at pH 9 only for the first day, then it was more stable at pH 8 (Figure 8B).

Enzymatic kinetic parameters

The kinetic model of the global enzymatic activity using acyl-CoA as a reaction limited substrate could be expressed using the simple Michaelis-Menten kinetics. The resulted plot has a slope equal K_m/V_{max} and an intercept equal $1/V_{max}$. The values of V_{max} and K_m were $0.63 \mu\text{mole min}^{-1}$ and $7.9 \mu\text{M}$ for acetyltransferase; and $0.67 \mu\text{mole min}^{-1}$ and $14.7 \mu\text{M}$ for benzoyltransferase (Figure 9).

DISCUSSION

Sa. algeriensis produced either natural dithiolopyrrolone products or unnatural products i.e. using precursor-directed biosynthesis (PDB method). Thus fourteen dithiolopyrrolone derivatives belong to pyrrothine and holothin family with different chain length of acyl groups were identified (Bouras *et al.*, 2008; Lamari *et al.*, 2002a; Merrouche *et al.*, 2009; Merrouche *et al.*, 2011). This unordinary flexibility of the dithiolopyrrolone biosynthetic pathway in *Sa. algeriensis* may render to the enzymatic system which reported to be responsible of this diversity by incorporating different acyl groups at pyrrothine or holothin cores (Bouras *et al.*, 2006a; Chorin *et al.*, 2009). In *Sa. algeriensis*, two acyltransferase activities, pyrrothine *N*-acetyltransferase and pyrrothine *N*-benzoyltransferase, were proposed to be responsible for the last step of thiolutin and benzoyl-pyrrothine biosynthesis respectively (Chorin *et al.*, 2009).

Here in, we investigated, *in vitro*, the enzymatic synthesis of different dithiolopyrrolone derivatives using the crude extract of *Sa. algeriensis* and the acyl-CoA as donor groups with different length of acyl moiety and two forms linear and cyclic acyl. The pyrrothine and the holothin were used as substrate. Then we investigated the characterization of the two acyltransferases, acetyltransferase and benzoyltransferase, responsible for the incorporation of linear and cyclic acyl groups respectively.

Firstly, the enzymatic synthesis of dithiolopyrrolone derivatives via the crude extract of *Sa. algeriensis* obtained after 72 h of growth on SSM led to synthesize nine

dithiolopyrrolone derivatives, three of them have never been naturally produced in *Sa. algeriensis*. There are acetoacetyl-pyrrothine, hydroxybutyryl-pyrrothine and demethyl thiolutin (holomycin). These data are consistent with fermentation reports on alternative acyl chain incorporations on the amino group of the holothin scaffold and the detection of longer acyl chain variants as natural products, notably the octanoyl-holomycin framework in (Li & Walsh, 2010; Shiozawa *et al.*, 1997). Interestingly, when the pyrrothine and the holothin were used as substrates with benzoyl-CoA, benzoyl-pyrrothine and benzoyl-holothin were detected in the reaction medium. Furthermore, for longer chain acyl (lauroyl group), as well as for branched cyclic group (phenylacetyl group), no products were detected. Recombinant ORF3483 from *S. clavuligerus* produced very small amount of benzoyl-holothin. But this enzyme was able to use longer chain acyl Co-As (hexanoyl, octanoyl- and palmitoyl-CoA) as substrates with much less efficiently. For example, an apparent K_m of 30 μ M was obtained for octanoyl-CoA in the presence of 20 μ M holothin (Li & Walsh, 2010). However, holomycine biosynthetic gene cluster in two bacteria *S. clavuligerus* and *Yersinia ruckeri* revealed the presence of one gene which encode such enzyme, but these bacteria have never been reported to produce other dithiolopyrrolone apart the holomycin in all conditions (Huang *et al.*, 2011; Li & Walsh, 2010; Qin *et al.*, 2013).

Secondly, biochemical characterization of these two acyltransferase activities in the cell-free extract of *Sa. algeriensis* was investigated. The activities were measured in reaction mixtures of 50 mM Tris-HCl buffer with varying pH values, the optimum pH was found to be 7 and 9 for acetyltransferase and benzoyltransferase activity respectively. However, at basic pH, both enzymes were more active than in acidic pH. Other acyltransferases seem to share this basic optimum pH, spermidine/spermine acetyltransferase from *Streptomyces* sp. 139, ornithine acetyltransferase from *S. clavuligerus*, and streptothricin acetyltransferase from *S. lividans* were maximal at pH of 7.5, 7.8, and 8.5, respectively (Bai *et al.*, 2011; de la Fuente *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 1987). Furthermore, in *S. murayamaensis* a kinamycin acetyltransferase I was more active in pH slightly acidic and its optimum pH was found to be 6.2 (Gould *et al.*, 1996).

Our results for long-term stability at 4 °C for both enzymes indicated that benzoyltransferase was more stable than the acetyltransferase at the three chosen values of pH 7, 8 and 9. Benzoyltransferase residual activity was maximal at pH 9 only at the first day, this activity became more stable at pH 8 for the second and the third day. The acetyltransferase

residual activity was maximal at pH 7 along the three days. Consequently, the long-term stability of the two enzymes appeared to be different in this pH range.

Benzoyltransferase activity was more thermostable than the acetyltransferase over 60 minutes until 30 °C. Up this temperature rapid inactivation occurred for benzoyltransferase, and at 50 °C it seems to be inactive, whereas acetyltransferase still active. Similar stabilities were already observed for other acetyltransferases under the same conditions as spermidine/spermine acetyltransferase which was stable at 35 °C, it become inactive at 50 °C (Kobayashi *et al.*, 1987). BEBT which catalyzes the formation of benzylbenzoate was 100 % stable for 30 min at 30 °C and 80 % stable for 30 min at 37 °C. After incubation at 50 °C for 30 min, the enzyme was completely inactivated (D'Auria *et al.*, 2002).

Although, benzoyltransferase appeared more sensible to temperature (i.e. at 50 °C benzoyltransferase was inactive whereas acetyltransferase was still active), its optimum temperature was higher than the acetyltransferase, for the first one it was 55 °C while it was 40 °C for the second. The optimum temperature for known acetyltransferases were near to this found for Pyrrothine *N*-acetyltransferase investigated. The optimum temperature measured in 0.1 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) was found to be 37 °C for spermidine/spermine acetyltransferase and ornithine acetyltransferase (Bai *et al.*, 2011; de la Fuente *et al.*, 2004).

A Lineweaver-Burk representation of the acetyltransferase and benzoyltransferase activities on increasing concentrations of acetyl-CoA (50 to 200 μ M) and benzoyl-CoA (50 to 200 mM) indicated that K_m and V_{max} were in the same range for both enzymes. These parameters are also in the same range as those found for holomycin synthase which catalyzed the acylation of holothin core in *S. clavuligerus* (Li & Walsh, 2010). Spermidine/spermine acetyltransferase had also a K_m of 45.7 μ M when acetyl CoA used as limited substrate (Bai *et al.*, 2011). The K_m values of BEBT for the substrate benzoyl-CoA was 20.5 μ M (D'Auria *et al.*, 2002).

As a consequence, this study provided new insights into dithiolopyrrolone synthesis. Today, the presence of more than one acyltransferase in *Sa. algeriensis* has never been proofed by purification of these enzymes. However, the temperature and pH profiles of these acyltransferases in the cell-free extract of *Sa. algeriensis* indicated clearly that the two enzymes have different kinetic constants and optimal pHs and temperatures. These results

support the hypothesis of the presence of, at least, two acyltransferases responsible for formation of dithiolopyrrolones in *Sa. algeriensis*.

The presence of such derivatives *in vitro* and *in vivo* in *Sa. algeriensis* revealed the importance of *Sa. algeriensis* as source of dithiolopyrrolones production. This could be render to the enzymatic-system flexibility and to the capacity of *Sa. algeriensis* to adapt to the culture medium composition to synthesize different acyl Co-As.

REFERENCES

1. Bai L, Chang M, Shan J, Jiang R, Zhang Y, Zhang R, and Li Y. 2011. Identification and characterization of a novel spermidine/spermine acetyltransferase encoded by gene *ste26* from *Streptomyces* sp 139. *Biochimie*. **93**: 1401-1407.
2. Bouras N, Mathieu F, Sabaou N, and Lebrihi A. 2006. Effect of amino acids containing sulfur on dithiolopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *J Appl Microbiol*. **100**: 390-397.
3. Bouras N, Mathieu F, Sabaou N, and Lebrihi A. 2006. Nutritional requirements for the production of dithiolopyrrolone antibiotics by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Enzyme Microb Technol*. **39**: 1423-1429.
4. Bouras N, Merrouche R, Lamari L, Mathieu F, Sabaou N, and Lebrihi A. 2008. Precursor-directed biosynthesis of new dithiolopyrrolone analogs by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochemistry*. **43**: 1244-1252.
5. Bradford MM. 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **72**: 248-254.
6. Celmer WD and Solomons IA. 1955. The structures of thiolutin and aureothricin, antibiotics containing a unique pyrrolinonodithiole nucleus. *J Am Chem Soc*. **77**: 2861-2865.
7. Chorin AC, Bijeire L, Monje MC, Baziard G, Lebrihi A, and Mathieu F. 2009. Expression of pyrrothine N-acyltransferase activities in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137: new insights into dithiolopyrrolone antibiotic biosynthetic pathway. *J Appl Microbiol*. **107**: 1751-1762.
8. D'Auria JC, Chen F, and Pichersky E. 2002. Characterization of an acyltransferase capable of synthesizing benzylbenzoate and other volatile esters in flowers and damaged leaves of *Clarkia breweri*. *Plant Physiol*. **130**: 466-476.

9. de la Fuente A, Lorenzana LM, Martin JF, and Liras P. 2002. Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin: Possible cross-regulation of two unrelated secondary metabolic pathways. *J Bacteriol.* **184**: 6559-6565.
10. de la Fuente A, Martin JF, Rodriguez-Garcia A, and Liras P. 2004. Two proteins with ornithine acetyltransferase activity show different functions in *Streptomyces clavuligerus*: Oat2 modulates clavulanic acid biosynthesis in response to arginine. *J Bacteriol.* **186**: 6501-6507.
11. Gould SJ, Ohare T, Seaton P, Soodsma J, and Tang ZW. 1996. Kinamycin acetyltransferase I from *Streptomyces murayamaensis*, an apparently large, membrane-associated enzyme. *Bioorg Med Chem.* **4**: 987-994.
12. Guan QN, Zheng W, Tang SJ, Liu XS, Zinkel RA, Tsui KW, *et al.* 2006. Impact of nonsense-mediated mRNA decay on the global expression profile of budding yeast. *Plos Genetics.* **2**: 1924-1943.
13. Guo Y, Chen G, and Bin L. 2008. Novel dithiolopyrrolones and their therapeutical applications. Patent WO2008038175. April 3rd 2008.
14. Huang S, Zhao Y, Qin Z, Wang X, Onega M, Chen L, *et al.* 2011. Identification and heterologous expression of the biosynthetic gene cluster for holomycin produced by *Streptomyces clavuligerus*. *Process Biochemistry.* **46**: 811-816.
15. Jia YF, Wu SL, Isenberg JS, Dai SJ, Sipes JM, Field L, *et al.* 2010. Thiolutin inhibits endothelial cell adhesion by perturbing Hsp27 interactions with components of the actin and intermediate filament cytoskeleton. *Cell Stress Chaperones.* **15**: 165-181.
16. Jimenez A, Tipper DJ, and Davies J. 1973. Mode of action of thiolutin, an inhibitor of macromolecular synthesis in *saccharomyces-cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother.* **3**: 729-738.
17. Kobayashi T, Horinouchi S, Uozumi T, and Beppu T. 1987. Biochemical-characterization of streptothricin acetyltransferase coded by the cloned streptothricin-resistance gene of *streptomyces-lavendulae*. *J Antibiot (Tokyo).* **40**: 1016-1022.
18. Lamari L, Zitouni A, Boudjella H, Badji B, Sabaou N, Lebrihi A, *et al.* 2002. New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp SA 233 - I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J. Antibiot.* **55**: 696-701.
19. Lamari L, Zitouni A, Dob T, Sabaou N, Lebrihi A, Germain P, *et al.* 2002. New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp SA 233 - II. Physicochemical properties and structure elucidation. *J. Antibiot.* **55**: 702-706.

20. Li B, Lyle MPA, Chen G, Li J, Hu K, Tang L, *et al.* 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. *Bioorg Med Chem.* **15**: 4601-4608.
21. Li B and Walsh CT. 2010. Identification of the gene cluster for the dithiolopyrrolone antibiotic holomycin in *Streptomyces clavuligerus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **107**: 19731-19735.
22. Long RM, Lagiseti C, Coates RM, and Croteau RB. 2008. Specificity of the N-benzoyl transferase responsible for the last step of Taxol biosynthesis. *Arch Biochem Biophys.* **477**: 384-389.
23. Merrouche R, Bouras N, Coppel Y, Mathieu F, Monje MC, Sabaou N, and Lebrihi A. 2009. Dithiolopyrrolone Antibiotic Formation Induced by Adding Valeric Acid to the Culture Broth of *Saccharothrix algeriensis*. *J Nat Prod.* **73**: 1164-1166.
24. Merrouche R, Bouras N, Coppel Y, Mathieu F, Sabaou N, and Lebrihi A. 2011. New dithiolopyrrolone antibiotics induced by adding sorbic acid to the culture medium of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *FEMS Microbiol Lett.* **318**: 41-46.
25. Oliva B, O'Neill A, Wilson JM, O'Hanlon PJ, and Chopra I. 2001. Antimicrobial properties and mode of action of the pyrrothine holomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**: 532-539.
26. Pelechano V and Perez-Ortin JE. 2008. The transcriptional inhibitor thiolutin blocks mRNA degradation in yeast. *Yeast.* **25**: 85-92.
27. Qin Z, Baker AT, Raab A, Huang S, Wang T, Yu Y, *et al.* 2013. The Fish Pathogen *Yersinia ruckeri* Produces Holomycin and Uses an RNA Methyltransferase for Self-resistance. *J Biol Chem.* **288**: 14688-14697.
28. Shiozawa H, Shimada A, and Takahashi S. 1997. Thiomarinols D, E, F and G, new hybrid antimicrobial antibiotics produced by a marine bacterium; Isolation, structure, and antimicrobial activity. *J Antibiot (Tokyo).* **50**: 449-452.
29. Suzuki H, Ohnishi Y, and Horinouchi S. 2007. Arylamine N-acetyltransferase responsible for acetylation of 2-aminophenols in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol.* **189**: 2155-2159.
30. Tipper DJ. 1973. Inhibition of yeast ribonucleic acid polymerases by thiolutin. *J Bacteriol.* **116**: 245-256.
31. Webster, M. J, Li, and Chen G. 2000. *Anticancer property of dithiolopyrrolones.* United States patent application 6020360.

Figure legends

Figure 1. Dithiopyrrolones produced by *Sa. algeriensis*. A, natural products; B, unnatural products using precursor-directed biosynthesis (PDB method)

Figure 2. Structures and mass spectra of dithiopyrrolone derivatives synthesized with a free-cell extract of *Sa. algeriensis*; A, hydroxybutyryl-pyrrothine; B, acetoacetyl-pyrrothine and C, acetyl-holothin (holomycin)

Figure 3. Optimum temperatures of acyltransferase activities. Acetyltransferase (■), benzoyltransferase (●). Optimum temperatures were measured by realizing the enzymatic reaction at different temperature values at pH 8, and then the specific activities were measured. The assays were carried out in triplicates. Error bars were represented in the graphs

Figure 4. Thermal stabilities of acyltransferases at 20 (■), 30 (▲), 40 (●) and 50 °C (◆). A, acetyltransferase; B, benzoyltransferase. The thermal stabilities were determined by pre-incubating the crude extract in different temperature values. Aliquots were withdrawn at regular time intervals after incubating, cooled rapidly in ice, and then the residual activities were measured at 30 °C. The activity of the enzyme before pre-incubation was taken as 100 %

Figure 5. Thermal stabilities of acyltransferase activities at 4 °C. Acetyltransferase (■), benzoyltransferase (●). The thermal stabilities were determined by pre-incubating the crude extract at 4 °C. Aliquots were withdrawn at regular time intervals after incubating, and then the residual activities were measured at 30 °C. The activity of the enzyme before pre-incubation was taken as 100 %.

Figure 6. pH optimums of acyltransferase activities, (■) acetyltransferase, (●) benzoyltransferase. pH optimums were measured by realizing the enzymatic reaction at different pH values at 30 °C, then the specific activities were measured. Assays were carried out in triplicates with error bars shown in the graphs

Figure 7. Effect of pH on acyltransferase stabilities, (acetyltransferase activity, gray column) benzoyltransferase activity, black column). The pH stabilities were determined by pre-incubating the enzymes in different pH values for 24 h at 4 °C, then the residual activities

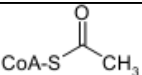
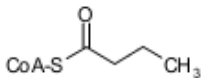
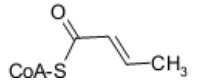
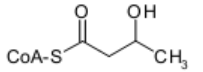
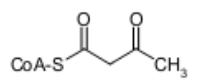
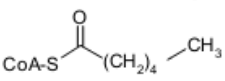
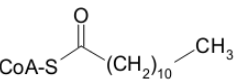
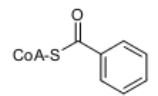
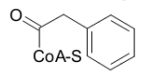
were measured at 30 °C. The activities of the enzyme before pre-incubation were taken as 100 %.

Figure 8. Effect of stock time on acyltransferase stabilities according to different pH values. A, acetyltransferase; B, benzoyltransferase, pH 7 black column; pH 8 gray column; pH 9 white column. The pH stabilities were determined by pre-incubating the enzymes in three different pH values for 24, 48, and 72 h at 4 °C, then the residual activities were measured at 30 °C. The activities of the enzyme before pre-incubation were taken as 100 %

Figure 9. Lineweaver-Burk for acyltransferase activities at 30 °C and pH 8, (■) acetyltransferase; (●) benzoyltransferase

Table 17. Enzymatic synthesis of dithiopyrrolone derivatives; A, pyrrothine derivatives; B, holothin derivatives . Synthesis performed with a cell extract of *Sa.algeriensis* (obtained after 72 h of culture on SSM)

A

Group donors	Acyl-coA structure	Time retention of peak (min)	m/z for the formed ion [M+H] ⁺	formula of the product formed (molar mass * g mol ⁻¹)	Name of product formed
Acetyl-CoA		13,5	228,9	C ₈ H ₈ N ₂ O ₂ S ₂ (228,002)	Tthiolutin
Butyryl-CoA		24,8	257,0	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₂ S ₂ (256,034)	Butyryl-pyrrothine
Crotonoyl-CoA		24,2	255,2	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₂ S ₂ (254,018)	Crotonoyl-pyrrothine
β-hydroxybutyryl-CoA		12,6	273	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃ S ₂ (272,029)	hydroxybutyryl-pyrrothine
Acetoacetyl-CoA		13,5	271,0	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₃ S ₂ (270,013)	Acetoacetyl-pyrrothine
Hexanoyl-CoA		31,5	285,0	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₂ S ₂ (284,065)	Hexanoyl-pyrrothine
Lauroyl-CoA		Not detected	Not detected	-	-
Benzoyl-CoA		29,5	291,2	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₂ S ₂ (290,018)	Benzoyl-pyrrothine
Phenylacetyl-CoA		Not detected	Not detected	-	-

B

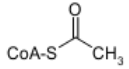
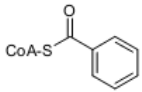
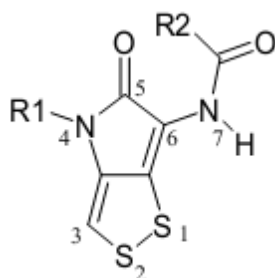
Acetyl-CoA		10	214,9	$C_7H_6N_2O_2S_2$ (213,987)	Holomycin
Benzoyl-CoA		29	277,0	$C_{12}H_8N_2O_2S_2$ (276,003)	Benzoyl-holothin

Figure 1



A

R1=CH3

R2

CH ₃	Acetyl-pyrrothine (thiolutin)
C ₆ H ₅	Benzoyl-pyrrothine
CH(CH ₃)	Iso-butyryl-pyrrothine
CH ₂ CH ₂ -CH ₃	Butanoyl-pyrrothine
CH=C(CH ₃) ₂	Senecioid-pyrrothine
C(CH ₃)=CH(CH ₃)	Tigloyl-pyrrothine

B

H

CH ₂ -CH ₃	Fomoyl-pyrrothine
CH=CH(CH ₃)	Propionol-pyrrothine (aureothricin)
CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	Crotonyl-pyrrothine
CH(CH ₃)(CH ₂ CH ₃)	Valeryl-pyrrothine
CH=CHCH=CH(CH ₃)	Isovaleryl-pyrrothine
CH=CHCH ₂ CH ₂ (CH ₃)	Sorbyl-pyrrothine
CH=C(CH ₃)(CH ₂ CH ₃)	2-hexonyl-pyrrothine
	2-methyl-3-pentenyl-pyrrothine

R1=H

R2

C ₆ H ₅	Demethyl-benzoyl-pyrrothine (benzoyl-holothin)
-------------------------------	--

Figure 2

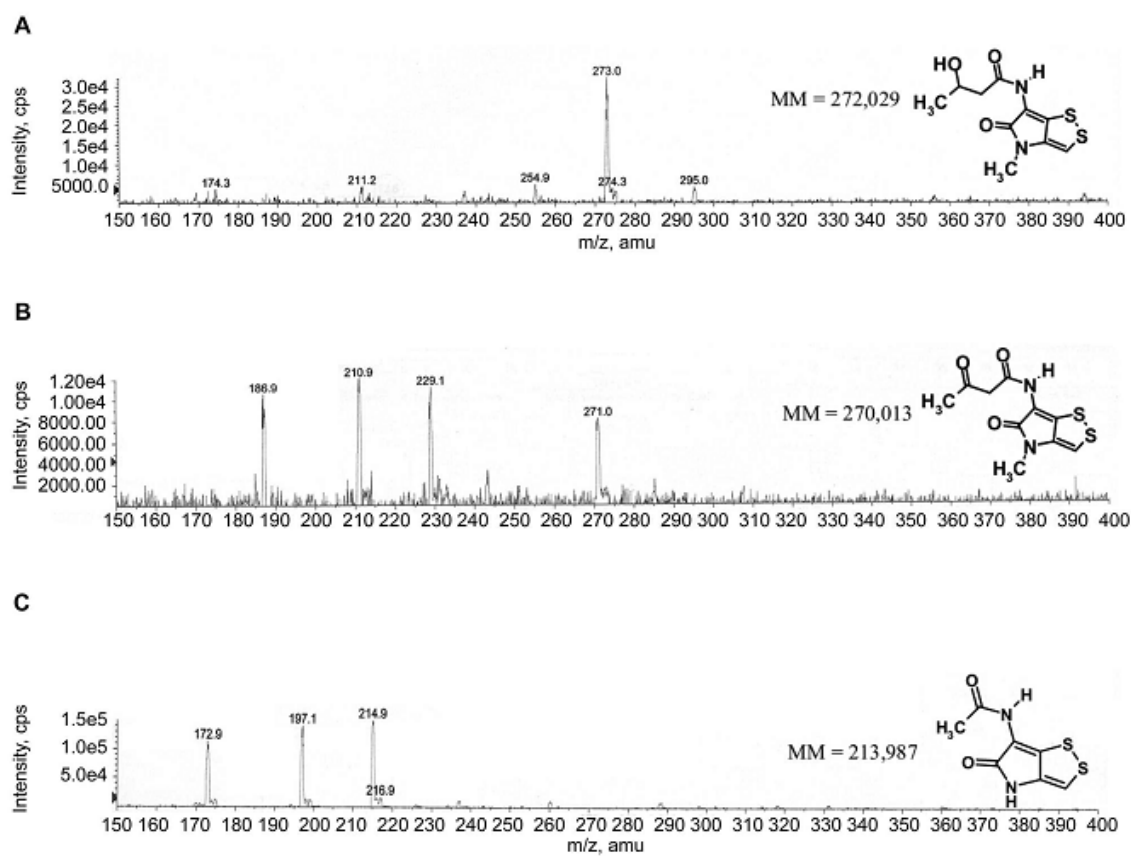


Figure 3

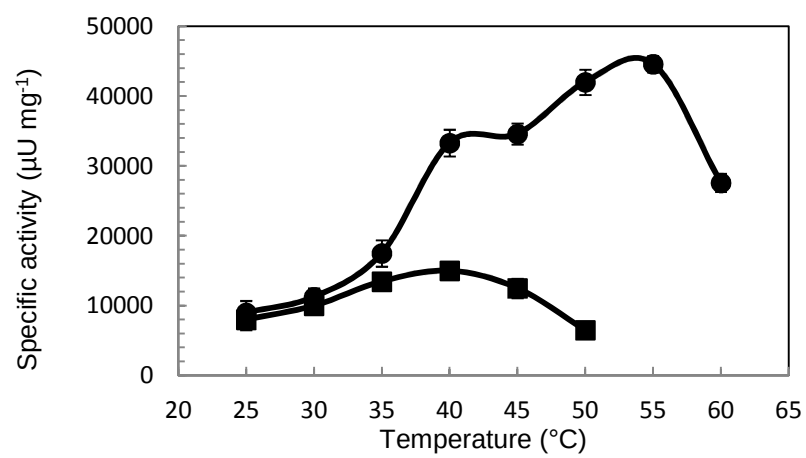


Figure 40

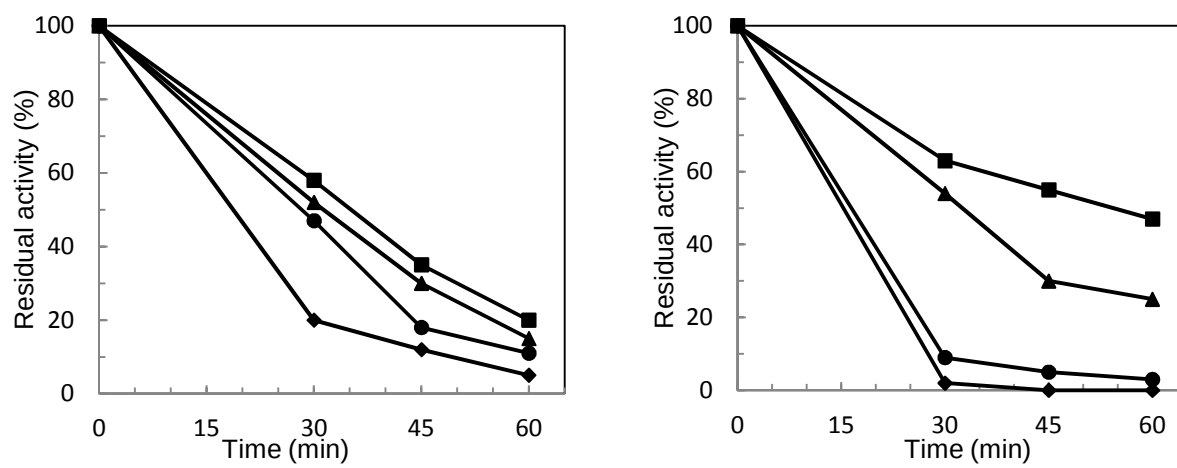


Figure 41

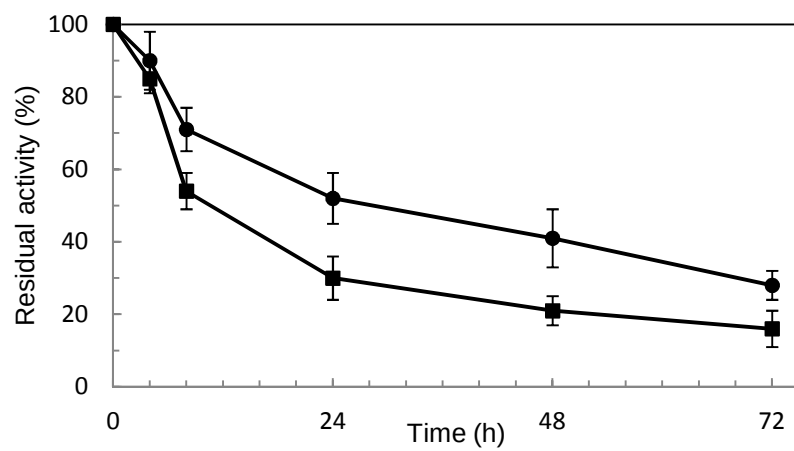


Figure 6

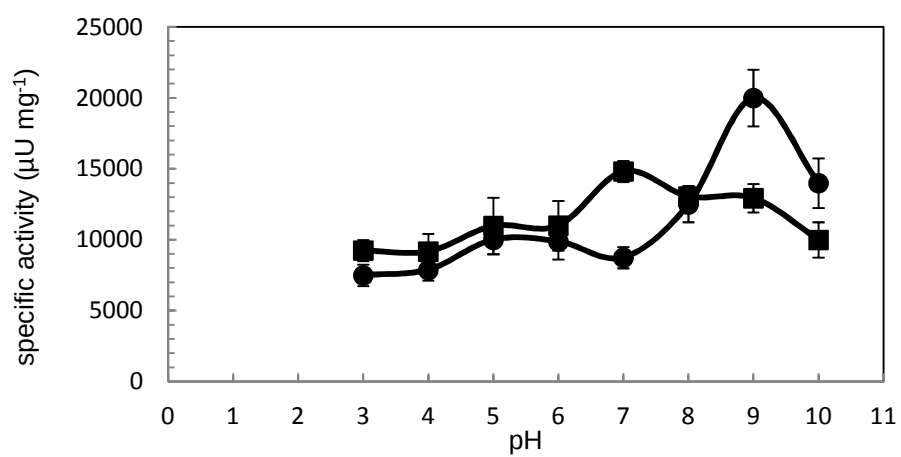


Figure 7

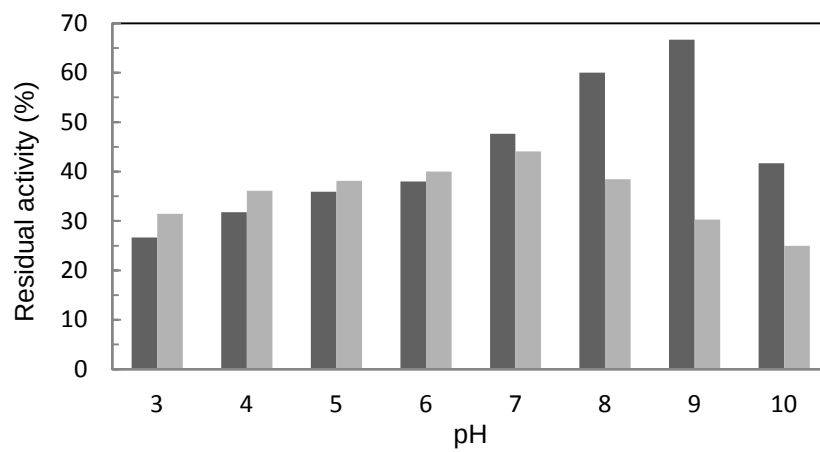


Figure 8

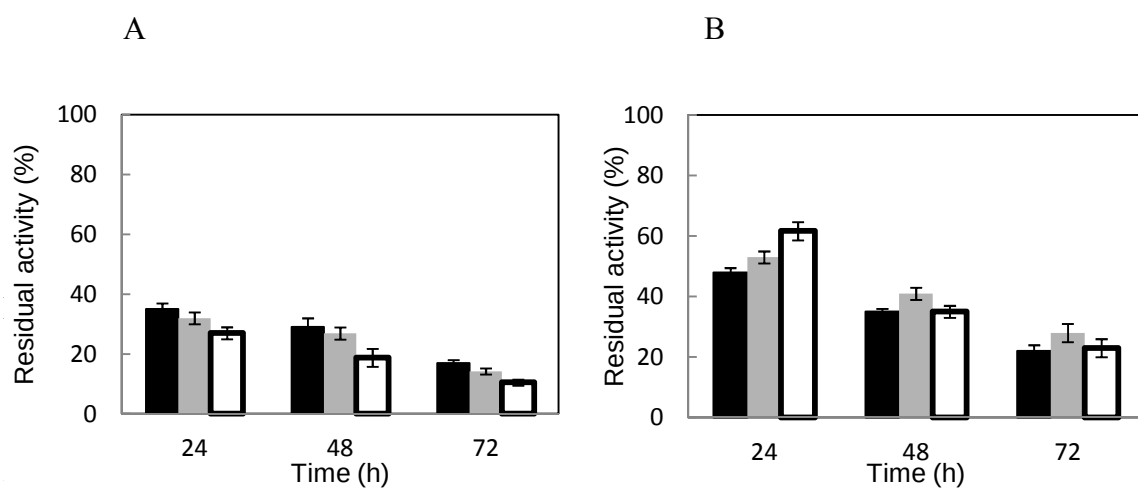
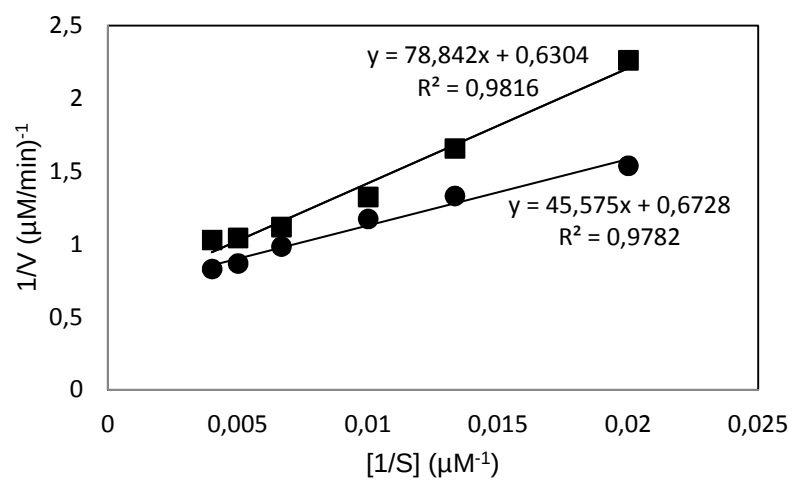


Figure 9



IV.3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons caractérisé les deux activités acyltransférases, acétyltransférase et benzoyltransférase, présentes dans l'extrait brut de *Sa. algeriensis* obtenu sur le milieu SS. Le but était d'étudier l'effet de la température et du pH sur ces activités afin d'optimiser par la suite les conditions de purification et de détection de ces activités. De plus, cette caractérisation permettra également de confirmer la présence de deux activités acyltransférases responsables de l'acylation de noyau pyrrothine chez *Sa. algeriensis*. Nos résultats ont d'abord permis de déterminer les paramètres optimaux de la réaction de détection de ces activités (T et pH). La température optimale de l'activité benzoyltransférase (55 °C) est supérieure à celle de l'acétyltransférase (40 °C). Bien que, l'activité benzoyltransférase semble plus active à haute température (entre 30 et 55 °C), elle est moins thermostable que l'activité acétyltransférase dans cette gamme de température. A une température supérieure à 30 °C, une inactivation rapide a lieu pour cette activité, et à 50 °C, elle semble être inactive, alors que l'acétyltransférase est toujours active. Le pH optimum a été déterminé, il est de 7 et de 9 pour l'activité acétyltransférase et benzoyltransférase respectivement. Cependant, à pH basique, la benzoyltransférase est plus active et plus stable que pour un pH acide, contrairement à l'acétyltransférase qui était plus active et plus stable à pH 7.

Nos résultats sur la stabilité à long terme à 4 °C pour les deux enzymes indiquent que la benzoyltransférase est plus stable que l'acétyl pour les trois valeurs de pH choisies (pH 7, 8 et 9). L'activité résiduelle de la benzoyltransférase est maximale à pH 9 seulement le premier jour, puis cette activité est plus stable à pH 8 lors du deuxième et du troisième jour. L'activité résiduelle de l'acétyltransférase est plus stable à pH 7 tout au long des trois jours. Par conséquent, la stabilité à long terme des deux enzymes semble être différente dans cette gamme de pH.

Une représentation de Lineweaver-Burk des activités acétyltransférase et benzoyltransférase présentes dans l'extrait brute de *Sa. algeriensis* a indiqué que ; pour une concentration croissante de l'acétyl-CoA et de la benzoyl-CoA (50 à 200 μM), K_m et $V_{\max}$ sont de 0,63 $\mu\text{mol min}^{-1}$ et 7.9 μM pour acétyltransférase et de 0.67 $\mu\text{mol min}^{-1}$ et 14.7 μM pour benzoyltransférase.

D'après ces résultats, nous pouvons constater que les conditions utilisées lors de la détection des activités acyltransférases (30 °C et pH 8) n'étaient pas les conditions optimales.

Ainsi, les résultats concernant l'effet de la température sur ces activités ont montré qu'elles semblent très influencées par la température et le temps d'exposition à cette température. Les paramètres cinétiques de ces deux activités ont montré des valeurs complètement différentes, ce qui confirme les études qui ont déjà été réalisées sur ces activités (Chorin, 2009).

Selon nos résultats, les conditions utilisées lors de la précédente purification (chapitre III) n'étaient pas les conditions optimales et la prochaine purification devra prendre en compte ces nouvelles conditions.

A l'heure actuelle, la présence de plus d'une acyltransférase impliquée dans la biosynthèse des dithiolopyrrolones chez *Sa. algeriensis* n'a jamais été confirmée par une purification de ces enzymes. Cependant, les profils de stabilité de ces enzymes en fonction de température et de pH dans l'extrait cellulaire de *Sa. algeriensis* indiquent clairement que les deux activités ont des paramètres cinétiques (pH et températures) complètement différents. Ces résultats supportent l'hypothèse sur la présence d'au moins deux acyltransférases responsables de la formation des dithiolopyrrolones à *Sa. algeriensis*.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Saccharothrix algeriensis s'avère être une souche particulièrement prometteuse pour la production des dithiolopyrrolones par voie biologique. En effet, elle produit sur un milieu semi-synthétique plusieurs dithiolopyrrolones avec des activités biologiques complètement différentes qui dépendent fortement des radicaux acyls R1 et R2. De plus, elle est capable de s'adapter au milieu de culture pour synthétiser de nouveaux dérivés en fonction des précurseurs ajoutés au milieu de culture (comme par exemple l'ajout d'acides organiques). Les dithiolopyrrolones possèdent un large spectre d'activités contre les bactéries (Gram positif et négatif), les champignons microscopiques, les protozoaires et les insectes (Gaeumann *et al.*, 1961; Lamari *et al.*, 2002a; Lamari *et al.*, 2002b; Lamari, 2006; McInerney *et al.*, 1991a; Oliva *et al.*, 2001; Otoguro *et al.*, 1988). Depuis l'an 2000, l'intérêt porté à ces molécules est grandissant grâce à leurs propriétés anticancéreuses (Minamiguchi *et al.*, 2001; Webster *et al.*, 2000). Aujourd'hui, les composés qui semblent les plus prometteurs en termes d'activité anti-cancéreuse possèdent des radicaux R1 et R2 aromatiques. Ils sont produits par voie chimique et n'ont pas d'origine biologique connue (Li *et al.*, 2007).

L'identification de la voie de biosynthèse de ces molécules permettrait donc de mieux contrôler leurs productions (rendement accru, synthèse d'un composé choisi) et aussi d'augmenter la diversité de leurs dérivés pour représenter une véritable alternative à la synthèse chimique. Dans ce contexte, nous avons essayé d'identifier la voie de biosynthèse des dithiolopyrrolones chez *Sa. algeriensis*.

Le travail s'est divisé en deux axes principaux : le première avec une approche génétique qui s'est divisée en deux parties : l'identification *in silico* du cluster de gènes de la voie de biosynthèse de dithiolopyrrolones chez *Sa. algeriensis* et la vérification de l'implication de ce cluster dans la formation des dithiolopyrrolones. Le deuxième axe avec une approche enzymatique qui s'est également divisée en deux parties : la purification et le microséquençage des acyltransférases obtenues à partir de l'extrait brut de *Sa. algeriensis* afin d'identifier les gènes codant ces enzymes, et la caractérisation de ces enzymes dans l'extrait brut de *Sa. algeriensis*.

Tout d'abord, l'analyse *in silico* du génome de *Sa. algeriensis* a montré la présence d'un cluster *thi* très homologu au cluster *hlm* responsable de la biosynthèse de l'holomycine chez *S. clavuligerus*. Les différences clés entre ces deux clusters sont : i) l'absence du gène qui code pour une acyltransférase et celui qui code pour un domaine de condensation dans le cluster *thi*. ii) la présence d'un gène qui code pour une N-formimidoyl synthase putative dans le cluster *thi*. Nous avons aussi comparé le cluster *thi* avec les clusters de la voie de biosynthèse de l'holomycine chez les bactéries Gram-négatives *Y. ruckeri*, *hom*, (Qin *et al.*, 2013), *Pseudoalteromonas*, *hol*, (Fukuda *et al.*, 2011) (Fukuda *et al.*, 2011) et *X. bovienii* (cette étude). Nous avons observé que les cinq clusters partagent 5 gènes homologues directement impliqués dans la biosynthèse des dithiopyrrolones. Ces gènes codent pour une NRPS multi-domaines, une acyl Co-A déshydrogénase, une thioestérase, une glucose méthanol choline oxidoréductase, et une lantibiotique décarboxylase. Trois différences principales entre ces clusters ont été constatées. La première est l'absence du gène codant pour une thioredoxine réductase chez les bactéries Gram-négatives, la deuxième est l'absence du gène qui code pour une acyltransférase chez les bactéries produisant des plusieurs dithiopyrrolones et la présence d'une acétyltransférase chez les *S. clavuligerus*, *Y. ruckeri* qui produisent seulement l'holomycine. La troisième est la présence d'un gène codant pour un domaine de condensation seulement chez *S. clavuligerus* et l'absence de ce gène chez les quatre autres bactéries. Ce gène est responsable de la formation des liaisons peptidiques dans la chaîne peptidique en cours de croissance.

L'analyse détaillée du cluster *thi* a montré que ce cluster code pour une seule NRPS multi-domaines dans l'ordre suivant Cy-A-T. Ces mêmes domaines sont également présents, et dans le même ordre, dans les NRPS des bactéries mentionnées productrices des dithiopyrrolones. De plus, tous les domaines Cy présentent le même motif conservé du domaine de cyclisation DXXXXDXXS (Hur *et al.*, 2012). Le mode de formation de la liaison peptidique entre les deux cystéines reste inconnu, cependant le domaine Cy a été déjà rapporté pour pouvoir remplacer le domaine C avec le motif conservé du domaine de condensation HHXXDX₁₄Y (Koglin and Walsh, 2009). Par contre, aucune des cinq souches ne présente ce motif, par conséquent, la condensation des deux molécules de cystéine pourrait être réalisée par ce domaine de cyclisation mais avec d'autres motifs qui ne sont pas encore connus comme motifs de condensation, ou alors cette condensation pourrait être réalisée avec une autre enzyme.

La séquence du site actif du domaine d'adénylation (A) a montré que c'est la cystéine qui est l'acide aminé préférentiellement activé (100 % de similarité). Ceci est en accord avec des précédentes études qui montrent que la L-cystéine est un précurseur intervenant dans la biosynthèse des dithiopyrrolones (Furumai *et al.*, 1982). Bien qu'il ait été montré que les domaines A sont les principaux domaines exerçant un contrôle sur le choix du substrat, ces domaines ne sont pas les seuls à déterminer les substrats. Les domaines C ou Te présentent également un certain degré de sélectivité du substrat (Lautru & Challis, 2004). Enfin, la présence d'une seule NRPS dans le cluster *thi* suggère qu'elle fonctionne de manière itérative pour activer le même substrat, la cystéine. D'après nos résultats, ce cluster semblerait être un bon candidat pour la biosynthèse des dithiopyrrolones chez *Sa. algeriensis*.

La vérification de l'implication du cluster *thi* dans la biosynthèse des dithiopyrrolones chez *Sa. algeriensis* a ensuite été entreprise. Une stratégie basée sur la corrélation entre l'expression des gènes clés de ce cluster et la production de la thiolutine sur deux milieux différents SS et TSB a été utilisée. Les trois gènes choisis sont *thiE*, *thiC* et *thiI* qui codent respectivement pour une NRPS, une thioestérase et une thiorédoxine. D'abord l'absence d'expression de ces gènes sur le milieu TSB, qui ne permet pas de produire des dithiopyrrolones, et l'expression de ces gènes sur le milieu SS, qui favorise la production des dithiopyrrolones, indiquent l'implication de ces gènes dans la biosynthèse des dithiopyrrolones. Par ailleurs, la quantification de l'expression de ces gènes au cours du temps sur le milieu SS accompagnée par le suivi de la vitesse de production spécifique de la thiolutine, présentent le même profil au cours du temps. De plus, l'expression maximale coïncide avec le pic de la productivité de la thiolutine. Ce résultat renforce l'hypothèse sur l'implication de ces gènes dans la biosynthèse de la thiolutine et par la suite la responsabilité du cluster *thi* qui contient ces gènes.

Dans un troisième temps, et dans le but de mieux comprendre le système enzymatique responsable de l'acylation de noyau pyrrothine chez *Sa. algeriensis*, nous avons essayé d'identifier les gènes codant les acyltransférases présentes à l'extérieur du cluster *thi*. La recherche de ces gènes s'est donc basée sur deux approches, dont une analyse bioinformatique permettant d'identifier le gène homologues à l'*hlmA* codant pour une acétyltransférase chez *S. clavuligerus*. Cela nous a conduit à identifier un gène *actA* dans un contig à l'extérieur du cluster *thi* avec de 51 et 60 % d'identité et de similarité au niveau des acides aminés respectivement. De plus, ce contig ne semble présenter aucun gène

responsable de la formation des métabolites secondaires. ActA présente une faible homologie (30 %) avec les acyltransférases identifiées dans le cluster de la voie de biosynthèse de l'holomycine chez *Y. ruckeri* et des dérivés de l'holothine chez *Pseudoalteromonas*. La deuxième approche s'est basée sur la purification des deux activités acyltransférases dans l'extrait brut de *Sa. algeriensis* obtenu sur le milieu SS supplémenté en acide benzoïque à 1,25 mM après 48 h. La purification a été réalisée en plusieurs étapes : une étape de précipitation au sulfate d'ammonium suivie par une chromatographie d'interactions hydrophobes (HIC) et par une chromatographie d'échange d'anions (AEC). Le protocole de purification a permis d'obtenir une activité benzoyltransférase partiellement purifiée avec un facteur de purification de 12.23. Par contre, l'activité acétyltransférase n'a pu être détectée. Les raisons qui ont limité la réussite de cette purification peuvent être liées aux paramètres utilisés lors de la purification et aussi aux conditions de détection de ces enzymes. Cela a été confirmé lors de la caractérisation de ces enzymes. Le microséquençage de la fraction active (F2) issue de l'électrophorèse Native-PAGE a permis d'identifier un gène candidat, *actB*, qui pourrait être impliqué dans la biosynthèse de la thiolutine.

L'implication des deux gènes *actA* et *actB* a été envisagée en se basant sur une analyse transcriptionnelle de ces deux gènes sur les deux milieux SS et TSB. Cette analyse a montré qu'*actA* et *actB* sont exprimés uniquement sur le milieu SS qui favorise la production des dithiolopyrrolones et pas du tout sur le milieu TSB. Ceci suggère que ces gènes pourraient être impliqués dans la biosynthèse des dithiolopyrrolones. Cette hypothèse est renforcée par les résultats de la cinétique de l'expression d'*actA* et d'*actB* avec la cinétique des deux activités *N*-pyrrothine acyltransférases, l'acétyltransférase et benzoyltransférase. Cette cinétique a montré que les deux profils d'expressions étaient similaires tout au long de la culture et que les activités atteignent une valeur maximale en même temps à 24 h. En outre, l'activité acétyltransférase est fortement liée au profil d'expression d'*actA*, le pic d'activité spécifique de l'acétyltransférase est associée à une augmentation de l'expression d'*actA*. En revanche, l'évolution de l'activité spécifique benzoyltransférase était différente et elle atteint son maximum à 48 h. Bien que, son profil soit moins lié à l'expression des deux gènes, l'hypothèse d'être codée par un de ces deux gènes ne peut pas être exclue. Nos essais pour identifier les enzymes codées par ces gènes en se basant sur l'effet de l'addition de l'acide benzoïque n'a pas permis d'identifier si ces gènes codent pour une acétyltransférase ou pour une benzoyltransférase.

Par ailleurs, l'addition des précurseurs potentiels du benzoyl-CoA dans le milieu de culture (acides organiques, acides aminés et benzoyl-CoA) mène à une importante modification du niveau de production de BEP et de son activité benzoyltransférase. Notre résultat a clairement montré que la production de BEP n'est pas forcément liée à l'induction de l'activité acyltransférase mais beaucoup plus à la disponibilité du groupe donneur, le benzoyl-CoA. Ces résultats ont également permis d'émettre l'hypothèse sur la capacité de *Sa. algeriensis* à transformer les molécules ajoutées au benzoyl-CoA et aussi à introduire le benzoyl-CoA directement et de l'incorporer sur le noyau de la pyrrothine.

La caractérisation des deux activités acyltransférases, l'acétyltransférase et la benzoyltransférase dans l'extrait brut de *Sa. algeriensis* nous a permis de déterminer la température et le pH optimum pour chaque activité. De plus, cette caractérisation nous a permis de déterminer leur stabilité en fonction de la température et du pH. Finalement, nous avons pu déterminer la spécificité approximative de chaque activité. Les résultats de cette caractérisation montrent une grande différence pour les paramètres cinétiques entre les deux activités et renforce ainsi l'hypothèse sur la présence des deux activités acyltransférases. De plus, ces paramètres devraient être pris en compte lors de la prochaine purification pour augmenter les chances d'obtenir des protéines pures et pour améliorer la détection de ces enzymes.

A l'issue de cette étude, nous avons donc pu proposer un cluster de la voie de biosynthèse des dithiolopyrrolones chez *Sa. algeriensis*. Bien que ce cluster semble être un bon candidat pour la biosynthèse des dithiolopyrrolones chez *Sa. algeriensis*, il reste des étapes nécessaires à démontrer dans cette voie par rapport à la voie de biosynthèse de l'holomycine : l'incorporation du groupe méthyle (CH₃) sur l'atome N4 par apport à l'atome H dans l'holomycine, le gène *thiK* codant pour une N-formimidoyl synthase, peut-être, joue un rôle dans cette incorporation, ou bien il possède un autre rôle reste à illustrer, la formation de la liaison peptidique qui généralement se fait par un domaine de condensation.

Les résultats préliminaires ont permis de renforcer notre proposition sur l'implication du cluster *thi* dans la biosynthèse des dithiolopyrrolones chez *Sa. algeriensis*. Les prochains travaux devront se focaliser sur la construction des mutants déficients pour les gènes clés dans ce cluster. L'expression hétérologue pourrait être un autre moyen pour cette vérification. Cependant, nos essais n'ont pas donné les résultats attendus. Il serait aussi important de

vérifier l'expression des gènes clés dans le cluster *thi* cloné dans une bactérie hôte pour savoir pourquoi le transformant obtenu n'a pu produire ni la thiolutine ni un de ses intermédiaires. Une troisième méthode de vérification est la production de protéines recombinantes de certains gènes clés du cluster *thi* suivie par une étape d'identification de fonction de chaque protéine purifiée.

Nos résultats de purification et de microséquençage ont permis de proposer deux gènes candidats codant pour des acyltransférases putatives. La production de ces enzymes en protéines recombinantes suivie par une purification pourraient confirmer la fonction exacte de ces enzymes. Il serait aussi possible de savoir si l'enzyme responsable de cette activité présente une haute spécificité ou bien si elle présente au contraire une grande flexibilité et qu'elle catalyse la réaction d'acylation avec de nombreux substrats. Alors que nos résultats n'ont pas permis de montrer à titre sûr la présence de plusieurs enzymes catalysant l'acylation de noyau pyrrothine, mais il semblerait que l'existence de plusieurs enzymes ne soit pas à exclure.

Enfin, l'identification de la voie de biosynthèse des dithiolopyrrolones chez *Sa. algeriensis* pourrait ouvrir la porte sur la combinaison de la biosynthèse et de la mutasynthèse afin de produire de nouveaux dérivés des dithiolopyrrolones plus actifs et moins toxiques. Ensuite, des études doivent être menées pour mieux définir les activités biologiques des composés synthétisés par *Sa. algeriensis* et ceux synthétisés par voie enzymatique. Par ailleurs, il serait important de déterminer pour chaque activité biologique des dithiolopyrrolones, l'index thérapeutique des composés c'est-à-dire le ratio entre la dose efficace et la dose toxique et de mener des études pharmacocinétiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

-A-

Adams, C. C. & Gross, D. S. (1991). The yeast heat-shock response is induced by conversion of cells to spheroplasts and by potent transcriptional inhibitors. *J Bacteriol* **173**, 7429-7435.

Arnold, J. T., Wilkinson, B. P., Sharma, S. & Steele, V. E. (1995). Evaluation of chemopreventive agents in different mechanistic classes using a rat tracheal epithelial-cell culture transformation assay. *Cancer Res* **55**, 537-543.

-B-

Bai, L., Chang, M., Shan, J., Jiang, R., Zhang, Y., Zhang, R. & Li, Y. (2011). Identification and characterization of a novel spermidine/spermine acetyltransferase encoded by gene *ste26* from *Streptomyces sp* 139. *Biochimie* **93**, 1401-1407.

Begley, T. P., Kinsland, C. & Strauss, E. (2001). The biosynthesis of coenzyme A in bacteria. *Vitamins and Hormones - Advances in Research and Applications, Vol 61* **61**, 157-171.

Benyon, R. J. (1989). Initial planning: prevention of uncontrolled proteolysis In: Protein purification methods: a practical approach. Oxford university press. New York: Harris, E.L.V. and Angal, S. 317 p.

Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites - A personal view. *J Antibiot (Tokyo)* **58**, 1-26.

Bergey (1989). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1989). – Vol 4. Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds.) Williams and Wilkins Co., Baltimore, p. 2648.

Bibb, M. J. (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol* **8**, 208-215.

Boudjella, H. (1994). Influence des milieux de culture, des antibiotiques et du pré-traitement des échantillons à la chaleur sur la sélection des genres et des espèces d'actinomycètes rares de quelques sols sahariens. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba. 177 p.

Bouras, N. (2005). Régulation de la production d'antibiotiques dithiolopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL-B 24137. Thèse de doctorat, Université de Toulouse, INP-ENSAT (France), 238 .

Bouras, N., Mathieu, F., Sabaou, N. & Lebrihi, A. (2006a). Nutritional requirements for the production of dithiolopyrrolone antibiotics by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Enzyme Microb Technol* **39**, 1423-1429.

Bouras, N., Mathieu, F., Sabaou, N. & Lebrihi, A. (2006b). Effect of amino acids containing sulfur on dithiolopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *J Appl Microbiol* **100**, 390-397.

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

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

Bouyssié, D., de Peredo, A. G., Mouton, E. & other authors (2007). Mascot File Parsing and Quantification (MFPaQ), a New Software to Parse, Validate, and Quantify Proteomics Data Generated by ICAT and SILAC Mass Spectrometric Analyses: Application To the Proteomics Study of Membrane Proteins from Primary Human Endothelial Cells. *Molecular & Cellular Proteomics* **6**, 1621-1637.

Bradford, M. M. (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

Brown, N. L., Ford, S. J., Pridmore, R. D. & Fritzinger, D. C. (1983). Nucleotide sequence of a gene from the *Pseudomonas* transposon Tn501 encoding mercuric reductase. *Biochem Cell Biol*, 4089-4095.

Bruner, S. D., Weber, T., Kohli, R. M., Schwarzer, D., Marahiel, M. A., Walsh, C. T. & Stubbs, M. T. (2002). Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure* **10**, 301-310.

Buchi, G. & Lukas, G. (1964). Total synthesis of holomycin. *J Am Chem Soc* **86**, 5654-5658.

Buntin, K., Irschik, H., Weissman, K. J., Luxenburger, E., Bloecker, H. & Mueller, R. (2010). Biosynthesis of Thuggacins in Myxobacteria: Comparative Cluster Analysis Reveals Basis for Natural Product Structural Diversity. *Chem Biol* **17**, 342-356.

-C-

Cavener, D. R. (1992a). GMC oxidoreductases- a newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities. *J Mol Biol* **223**, 811-814.

Cavener, D. R. (1992b). GMC oxidoreductases - a newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities. *J Mol Biol* **223**, 811-814.

Celmer, W. D., Tanner, F. W., Harfenist, M., Lees, T. M. & Solomons, I. A. (1952). Characterization of the antibiotic thiolutin and its relationship with aureothricin. *J Am Chem Soc* **74**, 6304-6305.

Celmer, W. D. & Solomons, I. A. (1955). The structures of thiolutin and aureothricin, antibiotics containing a unique pyrrolinonodithiole nucleus. *J Am Chem Soc* **77**, 2861-2865.

Chang, Z. X., Sitachitta, N., Rossi, J. V., Roberts, M. A., Flatt, P. M., Jia, J. Y., Sherman, D. H. & Gerwick, W. H. (2004). Biosynthetic pathway and gene cluster analysis of curacin A, an antitubulin natural product from the tropical marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J Nat Prod* **67**, 1356-1367.

Chaston, J. M., Suen, G., Tucker, S. L. & other authors (2011). The Entomopathogenic Bacterial Endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: Convergent Lifestyles from Divergent Genomes. *PLoS ONE* **6**.

Chiu, M. L., Folcher, M., Katoh, T., Puglia, A. M., Vohradsky, J., Yun, B. S., Seto, H. & Thompson, C. J. (1999). Broad spectrum thiopeptide recognition specificity of the *Streptomyces lividans* TipAL protein and its role in regulating gene expression. *J Biol Chem* **274**, 20578-20586.

Choi, K. I., Cha, J. H., Pae, A. N., Co, Y. S., Chang, M. H. & Koh, H. Y. (1998). Studies on novel 3-isoxazolylvinylcephalosporins: I. Synthesis and biological activity of 7-[2(2-aminothiazol-4-yl)-2-(alkoxy)iminoacetamido] derivatives. *J Antibiot (Tokyo)* **51**, 1117-1121.

Chorin, A. C. (2009). Synthèse enzymatique de nouveaux dérivés dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat, Université de Toulouse, INP-ENSAT (France), 210 p.

Chorin, A. C., Bijeire, L., Monje, M. C., Baziard, G., Lebrihi, A. & Mathieu, F. (2009). Expression of pyrroline N-acyltransferase activities in *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137: new insights into dithiopyrrolone antibiotic biosynthetic pathway. *J Appl Microbiol* **107**, 1751-1762.

Cole, M. & Rolinson, G. N. (1972). Microbial metabolites with insecticidal properties. *Appl Microbiol* **24**, 660-662.

Compant, S., Clément, C. & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry* **42**: 669-678.

Compant, S. p., Muzammil, S., Lebrihi, 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**, 583-591.

Condurso, H. L. & Bruner, S. D. (2010). Structure and noncanonical chemistry of nonribosomal peptide biosynthetic machinery. *Nat Prod Rep* **29**, 1099-1110.

Concurso, H. L. & Bruner, S. D. (2012). Structure and noncanonical chemistry of nonribosomal peptide biosynthetic machinery. *Nat Prod Rep* **29**, 1099-1110.

-D-

D'Auria, J. C., Chen, F. & Pichersky, E. (2002). Characterization of an acyltransferase capable of synthesizing benzylbenzoate and other volatile esters in flowers and damaged leaves of *Clarkia breweri*. *Plant Physiol* **130**, 466-476.

Dairi, T., Yamaguchi, K. & Hasegawa, M. (1992). N-formimidoyl fortimicin-a synthase, a unique oxidase involved in fortimicin a biosynthesis - purification, characterization and gene cloning. *Mol Gen Genet* **236**, 49-59.

Davis, B. J. (1964). Disc electrophoresis .2. Method and application to human serum proteins. *Ann N Y Acad Sci* **121**, 404-427.

de la Fuente, A., Lorenzana, L. M., Martin, J. F. & Liras, P. (2002). Mutants of *Streptomyces clavuligerus* with disruptions in different genes for clavulanic acid biosynthesis produce large amounts of holomycin: Possible cross-regulation of two unrelated secondary metabolic pathways. *J Bacteriol* **184**, 6559-6565.

de la Fuente, A., Martin, J. F., Rodriguez-Garcia, A. & Liras, P. (2004). Two proteins with ornithine acetyltransferase activity show different functions in *Streptomyces clavuligerus*: Oat2 modulates clavulanic acid biosynthesis in response to arginine. *J Bacteriol* **186**, 6501-6507.

Dell I., Godfrey, C. R. A. & Wadsworth, D. J. (1992). Total synthesis of naturally occurring 1,2-dithiolo (4,3-b) pyrrolones and compounds. *American Chemical Society*, 384-394.

Demain, A. L. & Fang, A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **69**, 1-39.

DiPietro, G., Giannini, G., Iafrate, E. M., Monteagudo, E., Dentini, M., Animati, F., Lombardi, P. & Arcamone, F. (1996). N-formimidoyl analogues of distamycin. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*, 1333-1335.

Donadio, S., Shafiee, A. & Hutchinson, C. R. (1990). Disruption of a rhodanese-like gene results in cysteine auxotrophy in *saccharopolyspora erythraea*. *J Bacteriol* **172**, 350-360.

Du, L. C. & Shen, B. (1999). Identification and characterization of a type II peptidyl carrier protein from the bleomycin producer *Streptomyces verticillus* ATCC 15003. *Chem Biol* **6**, 507-517.

Durante-Rodriguez, G., Andres Valderrama, J., Miguel Mancheno, J. & other authors (2010). Biochemical Characterization of the Transcriptional Regulator BzdR from *Azoarcus* sp. CIB. *J Biol Chem* **285**, 35694-35705.

-E-

Ellis, J. E., Fried, J. H., Harrison, I. T., Rapp, E. & Ross, C. H. (1977). Synthesis of holomycin and derivatives. *J Org Chem* **42**, 2891-2893.

Embley, M. T., Smida, J. & Stackebrandt, E. (1988). The phylogeny of mycolate-less wall chemotype-iv actinomycetes and description of pseudonocardiae fam-nov. *Syst Appl Microbiol* **11**, 44-52.

-F-

Feng, Z. Y., Qi, J. H., Tsuge, T., Oba, Y., Kobayashi, T., Suzuki, Y., Sakagami, Y. & Ojika, M. (2005). Construction of a bacterial artificial chromosome library for a myxobacterium of the genus *Cystobacter* and characterization of an antibiotic biosynthetic gene cluster. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **69**, 1372-1380.

Fischbach, M. A. & Walsh, C. T. (2006). Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Logic, machinery, and mechanisms. *Chem Rev* **106**, 3468-3496.

Forst, S. & Nealson, K. (1996). Molecular biology of the symbiotic pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp and *Photorhabdus* spp. *Microbiol Rev* **60**, 21-&.

Fukuda, D., Haines, A. S., Song, Z. & other authors (2011). A Natural Plasmid Uniquely Encodes Two Biosynthetic Pathways Creating a Potent Anti-MRSA Antibiotic. *Plos One* **6**, e18031.

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*. *J Antibiot (Tokyo)* **35**, 1367-1373.

-G-

Gaeumann, E., Prelog, V. & and Visser, E. (1961). Holothin and derivatives thereof. Patent US3014922. 26th December 1961.

Gaur, N. K., Oppenheim, J. & Smith, I. (1991). The bacillus-subtilis sin gene, a regulator of alternate developmental processes, codes for a dna-binding protein. *J Bacteriol* **173**, 678-686.

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.

Gottschalk, G. (1969). Partial purification and some properties of the (R)-citrate synthase from *Clostridium acidi-urici*. *European journal of biochemistry / FEBS* **7**, 301-306.

Gould, S. J., Ohare, T., Seaton, P., Soodsma, J. & Tang, Z. W. (1996). Kinamycin acetyltransferase I from *Streptomyces murayamaensis*, an apparently large, membrane-associated enzyme. *Bioorg Med Chem* **4**, 987-994.

Grigull, J., Mnaimneh, S., Pootoolal, J., Robinson, M. D. & Hughes, T. R. (2004). Genome-wide analysis of mRNA stability using transcription inhibitors and microarrays reveals posttranscriptional control of ribosome biogenesis factors. *Mol Cell Biol* **24**, 5534-5547.

Grond, S., Langer, H. J., Henne, P., Sattler, I., Thiericke, R., Grabley, S., Zahner, H. & Zeeck, A. (2000). Secondary metabolites by chemical screening, 39 - Acyl alpha-L-rhamnopyranosides, a novel family of secondary metabolites from *Streptomyces* sp.: Isolation and biosynthesis. *European Journal of Organic Chemistry*, 929-937.

Grosso, J. J. (1954). Control of tobacco blue mould by antibiotics. *Plant Dis. Repr.* *Plant Dis Repr* **38**, 333-334.

Grund, E. & Kroppenstedt, R. M. (1989). Transfer of 5 nocardiosis species to the genus *saccharothrix* labeda et-al 1984. *Syst Appl Microbiol* **12**, 267-274.

Guan, Q. N., Zheng, W., Tang, S. J., Liu, X. S., Zinkel, R. A., Tsui, K. W., Yandell, B. S. & Culbertson, M. R. (2006). Impact of nonsense-mediated mRNA decay on the global expression profile of budding yeast. *Plos Genetics* **2**, 1924-1943.

Guo, Y., Chen, G. & Bin, L. (2008). Novel dithiolopyrrolones and their therapeutical applications. Patent WO2008038175. April 3rd 2008.

Guoping, W. & Quanhai, L. (2009). Dithiolopyrrolone compounds, the preparation and the use thereof. Patent WO2009033396. 19th March 2009. .

Gust, B., Kieser, T. & 2002., K. C. (2002). PCR targeting system in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). Disponible en ligne. 1-39.

-H-

Hagio, K. & Yoneda, N. (1974). Total syntheses of holomycin, thiolutin, and aureothricin. *Bull Chem Soc Jpn* **47**, 1484-1489.

Hardison, R. (1998). Hemoglobins from bacteria to man: Evolution of different patterns of gene expression. *J Exp Biol* **201**, 1099-1117.

Harris, E. L. V. (1989). Initial planning: purification strategy In: Protein purification methods: a practical approach. Oxford university press. New York: Harris, E.L.V. and Angal, S., 1989, . 317.

Hertweck, C. & Moore, B. S. (2000). A plant-like biosynthesis of benzoyl-CoA in the marine bacterium 'Streptomyces maritimus'. *Tetrahedron* **56**, 9115-9120.

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

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

Hur, G. H., Vickery, C. R. & Burkart, M. D. (2012). Explorations of catalytic domains in non-ribosomal peptide synthetase enzymology. *Nat Prod Rep* **29**, 1074-1098.

-I-

Isaacson, P. J. & Webster, J. M. (2002). Antimicrobial activity of *Xenorhabdus* sp RIO (Enterobacteriaceae), symbiont of the entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* (Rhabditida : Steinernematidae). *J Invertebr Pathol* **79**, 146-153.

-J-

Jia, Y. F., Wu, S. L., Isenberg, J. S. & other authors (2010). Thiolutin inhibits endothelial cell adhesion by perturbing Hsp27 interactions with components of the actin and intermediate filament cytoskeleton. *Cell Stress Chaperones* **15**, 165-181.

Jimenez, A., Tipper, D. J. & Davies, J. (1973). Mode of action of thiolutin, an inhibitor of macromolecular synthesis in *saccharomyces-cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* **3**, 729-738.

Juguet, M., Lautru, S., Francou, F.-X., Nezbedova, S., Leblond, P., Gondry, M. & Pernodet, J.-L. (2009). An Iterative Nonribosomal Peptide Synthetase Assembles the Pyrrole-Amide Antibiotic Congocidine in *Streptomyces ambofaciens*. *Chem Biol* **16**, 421-431.

-K-

Keating, T. A., Marshall, C. G., Walsh, C. T. & Keating, A. E. (2002). The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains. *Nat Struct Biol* **9**, 522-526.

Kenig, M. & Reading, C. (1979). Holomycin and an antibiotic (mm-19290) related to tunicamycin, metabolites of *streptomyces clavuligerus*. *J Antibiot (Tokyo)* **32**, 549-554.

Khachatourians, G. G. & Tipper, D. J. (1974a). In vivo effect of thiolutin on cell growth and macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **6**, 304-310.

Khachatourians, G. G. & Tipper, D. J. (1974b). Inhibition of messenger ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli* by thiolutin. *J Bacteriol* **119**, 795-804.

Kieser, T. (2000). *Practical Streptomyces Genetics*, John Innes, Foundation edn: John Innes Foundation.

Kiess, M., Hecht, H. J. & Kalisz, H. M. (1998). Glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense* - Primary structure and comparison with other glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductases. *Eur J Biochem* **252**, 90-99.

Kobayashi, T., Horinouchi, S., Uozumi, T. & Beppu, T. (1987). Biochemical-characterization of streptothricin acetyltransferase coded by the cloned streptothricin-resistance gene of streptomyces-lavendulae. *J Antibiot (Tokyo)* **40**, 1016-1022.

Koglin, A. & Walsh, C. T. (2009). Structural insights into nonribosomal peptide enzymatic assembly lines. *Nat Prod Rep* **26**, 987-1000.

Kohli, R. M. & Walsh, C. T. (2003). Enzymology of acyl chain macrocyclization in natural product biosynthesis. *Chem Commun*, 297-307.

Kumaraswami, M., Newberry, K. J. & Brennan, R. G. (2010). Conformational Plasticity of the Coiled-Coil Domain of BmrR Is Required for bmr Operator Binding: The Structure of Unliganded BmrR. *J Mol Biol* **398**, 264-275.

-L-

Labeda, D. P. (1986). Transfer of nocardia-aerocolonigenes (shinobu and kawato 1960) pridham 1970 into the genus saccharothrix labeda, testa, lechevalier, and lechevalier 1984 as saccharothrix-aerocolonigenes sp-nov). . *Int J Syst Bacteriol* **36**, 109-110.

Labeda, D. P. & Lechevalier, M. P. (1989). Amendment of the genus saccharothrix labeda et-al 1984 and descriptions of *saccharothrix-espanaensis* sp-nov, *saccharothrix-cryophilis* sp-nov, and *saccharothrix-mutabilis* comb-nov. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 420-423.

Labeda, D. P. & Kroppenstedt, R. M. (2000). Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa: proposal for Actinosynnemataceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 331-336.

Labeda, D. P., Hatano, K., Kroppenstedt, R. M. & Tamura, T. (2001). Revival of the genus Lentzea and proposal far Lechevalieria gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1045-1050.

LaCelle, M., Kumano, M., Kurita, K., Yamane, K., Zuber, P. & Nakano, M. M. (1996). Oxygen-controlled regulation of the flavohemoglobin gene in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**, 3803-3808.

Lam, K.S., Schroeder, D.R., Veitch, J.M., Colson, K.L., Matson, J.A., Rose, W.C., Doyle, T.W. and Forenza, S. (2001). Production, isolation and structure determination of novel fluorindolocarbazoles from *Saccharothrix aerocolonigenes* ATCC 39243. *J Antibiot (Tokyo)* **54**, 1-9

Lamari, L., Zitouni, A., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Lebrihi, A., Lefebvre, G., Seguin, E. & Tillequin, F. (2002a). New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp SA 233 - I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)* **55**, 696-701.

Lamari, L., Zitouni, A., Dob, T., Sabaou, N., Lebrihi, A., Germain, P., Seguin, E. & Tillequin, F. (2002b). New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp SA 233 - II. Physicochemical properties and structure elucidation. *Journal of Antibiotics* **55**, 702-706.

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), 177 p.

Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C. & Walsh, C. T. (1996). A new enzyme superfamily - The phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol* **3**, 923-936.

Laskin, A. I. & Lechevalier, H. (1984). *Handbook of Microbiology*: CRC Press.

Lautru, S. & Challis, G. L. (2004). Substrate recognition by nonribosomal peptide synthetase multi-enzymes. *Microbiology-Sgm* **150**, 1629-1636.

Lautru, S., Deeth, R. J., Bailey, L. M. & Challis, G. L. (2005). Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Nature Chemical Biology* **1**, 265-269.

Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. & Marinelli, F. (2000). Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **78**, 399-405.

Leslie, A. G. W. (1990). Refined crystal-structure of type-iii chloramphenicol acetyltransferase at 1.75 Å resolution. *J Mol Biol* **213**, 167-186.

Lewin, A., Crow, A., Hodson, C. T. C., Hederstedt, L. & Le Brun, N. E. (2008). Effects of substitutions in the CXXC active-site motif of the extracytoplasmic thioredoxin ResA. *Biochem J* **414**, 81-91.

Li, B., Lyle, M. P. A., Chen, G., Li, J., Hu, K., Tang, L., Alaoui-Jamali, M. A. & 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. *Bioorg Med Chem* **15**, 4601-4608.

Li, B. & Walsh, C. T. (2010). Identification of the gene cluster for the dithiolopyrrolone antibiotic holomycin in *Streptomyces clavuligerus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 19731-19735.

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., Forseth, R. R., Bowers, A. A., Schroeder, F. C. & Walsh, C. T. (2012). A Backup Plan for Self-Protection: S-Methylation of Holomycin Biosynthetic Intermediates in *Streptomyces clavuligerus*. *Chembiochem* **13**, 2521-2526.

Li, J., Chen, G. & Webster, J. M. (1996). N-(Indol-3-ylethyl)-2'-hydroxy-3'-methylpentanamide, a novel indole derivative from *Xenorhabdus nematophilus*. *J Nat Prod* **59**, 1157-1158.

Li, J. X., Chen, G. H., Webster, J. M. & Czyzewska, E. (1995). Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont. *Journal of Natural Products-Lloydia* **58**, 1081-1086.

Li, J. Y., Vrielink, A., Brick, P. & Blow, D. M. (1993). Crystal-structure of cholesterol oxidase complexed with a steroid substrate - implications for flavin adenine-dinucleotide dependent alcohol oxidases. *Biochemistry (Mosc)* **32**, 11507-11515.

Li, Y., Weissman, K. J. & Mueller, R. (2008). Myxochelin biosynthesis: Direct evidence for two- and four-electron reduction of a carrier protein-bound thioester. *J Am Chem Soc* **130**, 7554-+.

Linne, U., Schwarzer, D., Schroeder, G. N. & Marahiel, M. A. (2004). Mutational analysis of a type II thioesterase associated with nonribosomal peptide synthesis. *Eur J Biochem* **271**, 1536-1545.

Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* **25**, 402-408.

Lombardi, P. & Crisanti, A. (1997). Antimalarial activity of synthetic analogues of distamycin. *Pharmacol Ther* **76**, 125-133.

Long, R. M., Lagisetti, C., Coates, R. M. & Croteau, R. B. (2008). Specificity of the N-benzoyl transferase responsible for the last step of Taxol biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* **477**, 384-389.

Lorenzana, L. M., Perez-Redondo, R., Santamarta, I., Martin, J. F. & Liras, P. (2004). Two oligopeptide-permease-encoding genes in the clavulanic acid cluster of *Streptomyces clavuligerus* are essential for production of the beta-lactamase inhibitor. *J Bacteriol* **186**, 3431-3438.

-M-

Ma, J., Wang, Z., Huang, H. & other authors Biosynthesis of Himastatin: Assembly Line and Characterization of Three Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Post-tailoring Oxidative Steps. *Angewandte Chemie-International Edition* **50**, 7797-7802.

Mack, D., Davies, A. P., Harris, L. G., Rohde, H., Horstkotte, M. A. & Knobloch, J. K. M. (2007). Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**, 399-408.

Marahiel, M. A., Stachelhaus, T. & Mootz, H. D. (1997). Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem Rev* **97**, 2651-2673.

Margolin, W. (2005). FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 862-871.

Marvil, D. K. & Leisinger, T. (1997). N-acetylglutamate synthase of *Escherichia coli*: purification, characterization, and molecular properties. *J Biol Chem* 1977 May 25;252(10):3295-303.

McInerney, B. V., Gregson, R. P., Lacey, M. J., Akhurst, R. J., Lyons, G. R., Rhodes, S. H., Smith, D. R. J., Engelhardt, L. M. & White, A. H. (1991a). Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part 1. Dithiolopyrrolone derivatives with antibiotic activity. *J Nat Prod* **54**, 774-784.

McInerney, B. V., Taylor, W. C., Lacey, M. J., Akhurst, R. J. & Gregson, R. P. (1991b). Biologically-active metabolites from *Xenorhabdus* spp .2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity. *J Nat Prod* **54**, 785-795.

Medema, M. H., Trefzer, A., Kovalchuk, A. & other authors (2010). The Sequence of a 1.8-Mb Bacterial Linear Plasmid Reveals a Rich Evolutionary Reservoir of Secondary Metabolic Pathways. *Genome Biology and Evolution* **2**, 212-224.

Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., Weber, T., Takano, E. & Breitling, R. (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res* **39**, W339-W346.

Meklat, A. (2004). Effet des antibiotiques de deux souches d'actinomycètes sur la maladie tache chocolat et l'antracnose de la fève et sur la fusariose vasculaire du lin. Magister de microbiologie, E.N.S. de Kouba, 97p.

Merrouche, R., Bouras, N., Coppel, Y., Mathieu, F., Monje, M. C., Sabaou, N. & Lebrihi, A. (2009). Dithiolopyrrolone Antibiotic Formation Induced by Adding Valeric Acid to the Culture Broth of *Saccharothrix algeriensis*. *J Nat Prod* **73**, 1164-1166.

Merrouche, R., Bouras, N., Coppel, Y., Mathieu, F., Monje, M. C., Sabaou, N. & Lebrihi, A. (2010). Dithiolopyrrolone Antibiotic Formation Induced by Adding Valeric Acid to the Culture Broth of *Saccharothrix algeriensis*. *J Nat Prod* **73**, 1164-1166.

Merrouche, R., Bouras, N., Coppel, Y., Mathieu, F., Sabaou, N. & Lebrihi, A. (2011). New dithiolopyrrolone antibiotics induced by adding sorbic acid to the culture medium of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *FEMS Microbiol Lett* **318**, 41-46.

Miller, D. A., Luo, L. S., Hillson, N., Keating, T. A. & Walsh, C. T. (2002a). Yersiniabactin synthetase: A four-protein assembly line producing the nonribosomal peptide/polyketide hybrid siderophore of *Yersinia pestis*. *Chem Biol* **9**, 333-344.

Miller, D. A., Luo, L. S., Hillson, N., Keating, T. A. & Walsh, C. T. (2002b). Yersiniabactin synthetase: A four-protein assembly line producing the nonribosomal peptide/polyketide hybrid siderophore of *Yersinia pestis*. *Chem Biol* **9**, 333-344.

Minamiguchi, K., Kumagai, H., Masuda, T., Kawada, M., Ishizuka, M. & Takeuchi, T. (2001). Thiolutin, an inhibitor of HUVEC adhesion to vitronectin, reduces paxillin in HUVECS and suppresses tumor cell-induced angiogenesis. *Int J Cancer* **93**, 307-316.

Mitchell, C. A., Shi, C., Aldrich, C. C. & Gulick, A. M. (2012). Structure of PA1221, a Nonribosomal Peptide Synthetase Containing Adenylation and Peptidyl Carrier Protein Domains. *Biochemistry (Mosc)* **51**, 3252-3263.

Mootz, H. D., Schwarzer, D. & Marahiel, M. A. (2002). Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem* **3**, 490-504.

Moreira, K. A., Albuquerque, B. F., Teixeira, M. F. S., Porto, A. L. F. & Lima, J. L. (2002). Application of protease from *Nocardiosis* sp as a laundry detergent additive. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **18**, 307-312.

Murphy, A. C., Fukuda, D., Song, Z., Hothersall, J., Cox, R. J., Willis, C. L., Thomas, C. M. & Simpson, T. J. (2011). Engineered Thiomarinol Antibiotics Active against MRSA Are Generated by Mutagenesis and Mutasynthesis of *Pseudoalteromonas* SANK73390. *Angewandte Chemie-International Edition* **50**, 3271-3274.

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, INP-ENSAT (France). 155-159.

Muzammil, S., Graillon, C., Saria, R., Mathieu, F., Lebrihi, A. & Compant, S. p. (2013). The Saharan isolate *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* seedlings against *Botrytis cinerea*. *Plant and Soil*, 1-12.

-N-

Nardiz, N., Santamarta, I., Lorenzana, L. M., Martin, J. F. & Liras, P. (2011). A rhodanese-like protein is highly overrepresented in the mutant *S. clavuligerus*

oppA2::aph: effect on holomycin and other secondary metabolites production. *Microbial Biotechnology* **4**, 216-225.

Nickell, L. G., Finlay & A.C. (1954). Growth modifiers, antibiotics and their effects on plant growth, *Agricultural and Food Chemistry*, **2**, 178-182.

Ninomiya, Y. T., Yamada, Y., Shirai, H., Onitsuka, M., Suhara, Y. & Maruyama, H. B. (1980). Biochemically active substances from microorganisms .5. Pyrrothines, potent platelet-aggregation inhibitors of microbial origin. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **28**, 3157-3162.

Noda, S., Kitazono, E., Tanaka, T., Ogino, C. & Kondo, A. (2012). Benzoic acid fermentation from starch and cellulose via a plant-like beta-oxidation pathway in *Streptomyces maritimus*. *Microbial Cell Factories* **11**, 49.

-O-

O'Rourke, S., Wietzorrek, A., Fowler, K., Corre, C., Challis, G. L. & Chater, K. F. (2009). Extracellular signalling, translational control, two repressors and an activator all contribute to the regulation of methylenomycin production in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **71**, 763-778.

Oestergaard, P. R. & Sjoeholm, C. (2001). Use of acid-stable proteases in animal feed. *PCT Int. Appl.*, p. 49.

Oliva, B., O'Neill, A., Wilson, J. M., O'Hanlon, P. J. & Chopra, I. (2001). Antimicrobial properties and mode of action of the pyrrothine holomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 532-539.

Ornstein, L. (1964). *Disc electrophoresis .i. Background and theory.*

Otoguro, K., Oiwa, R., Iwai, Y., Tanaka, H. & Omura, S. (1988). Screening for new antitrichomonal substances of microbial origin and antitrichomonal activity of trichostatin-a. *J Antibiot (Tokyo)* **41**, 461-468.

-P-

Paik, S., Park, Y. H., Suh, S. I., Kim, H. S., Lee, I. S., Park, M. K., Lee, C. S. & Park, S. H. (2001). Unusual cytotoxic phenethylamides from *Xenorhabdus nematophilus*. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **22**, 372-374.

Pao, S. S., Paulsen, I. T. & Saier, M. H. (1998). Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1-+.

Patel, H. M. & Walsh, C. T. (2001). In vitro reconstitution of the *Pseudomonas aeruginosa* nonribosomal peptide synthesis of pyochelin: Characterization of backbone tailoring thiazoline reductase and N-methyltransferase activities. *Biochemistry (Mosc)* **40**, 9023-9031.

Pelechano, V. & Perez-Ortin, J. E. (2008). The transcriptional inhibitor thiolutin blocks mRNA degradation in yeast. *Yeast* **25**, 85-92.

Perry, D. A., Tone, J. & Maeda H. (1990). Antiparasitic menaquinones from *Saccharothrix*. (Pfizer Ltd., UK). Brit. UK Pat. Appl. p. 28.

Peypoux, F., Bonmatin, J. M. & Wallach, J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**, 553-563.

-Q-

Qin, Z., Baker, A. T., Raab, A., Huang, S., Wang, T., Yu, Y., Jaspars, M., Secombes, C. J. & Deng, H. (2013a). The Fish Pathogen *Yersinia ruckeri* Produces Holomycin and Uses an RNA Methyltransferase for Self-resistance. *J Biol Chem* **288**, 14688-14697.

-R-

Raty, K., Kantola, J., Hautala, A., Hakala, J., Ylihonko, K. & Mantsala, P. (2002). Cloning and characterization of *Streptomyces galilaeus* aclacinomycins polyketide synthase (PKS) cluster. *Gene* **293**, 115-122.

Rausch, C., Hoof, I., Weber, T., Wohlleben, W. & Huson, D. H. (2007). Phylogenetic analysis of condensation domains in NRPS sheds light on their functional evolution. *Bmc Evolutionary Biology* **7**.

Reimmann, C., Patel, H. M., Serino, L., Barone, M., Walsh, C. T. & Haas, D. (2001). Essential PchG-dependent reduction in pyochelin biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**, 813-820.

Retzlaff, L. & Distler, J. (1995). The regulator of streptomycin gene-expression, strR, of *Streptomyces griseus* is a dna-binding activator protein with multiple recognition sites. *Mol Microbiol* **18**, 151-162.

Robles-Reglero, V., Santamarta, I., Álvarez, R., Martín, J. F. & Liras, P. (2012). Transcriptional analysis and proteomics of the holomycin gene cluster in overproducer mutants of *Streptomyces clavuligerus*. *J Biotechnol* **163**, 69-76.

Rodriguez-Garcia, A., de la Fuente, A., Perez-Redondo, R., Martin, J. F. & Liras, P. (2000). Characterization and expression of the arginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **2**, 543-550.

RodriguezGarcia, A., Ludovice, M., Martin, J. F. & Liras, P. (1997). Arginine boxes and the argR gene in *Streptomyces clavuligerus*: evidence for a clear regulation of the arginine pathway. *Mol Microbiol* **25**, 219-228.

-S-

Sambrook, J., Russell, D. W. & Cold Spring Harbor, L. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual / Joseph Sambrook, David W. Russell.* Cold Spring Harbor, N.Y. :: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sattely, E. S., Fischbach, M. A. & Walsh, C. T. (2008). Total biosynthesis: in vitro reconstitution of polyketide and nonribosomal peptide pathways. *Nat Prod Rep* **25**, 757-793.

Schaffner, C. P. (1954). Studies on orchid media inhibitory to fungi. American Orchid Society Bulletin, 798-802.

Scharf, D. H., Remme, N., Heinekamp, T., Hortschansky, P., Brakhage, A. A. & Hertweck, C. (2010). Transannular Disulfide Formation in Gliotoxin Biosynthesis and Its Role in Self-Resistance of the Human Pathogen *Aspergillus fumigatus*. *J Am Chem Soc* **132**, 10136-10141.

Schmidt, U. & Geiger, F. (1963). Totalsynthese der antibiotika thiolutin und holomycin. *Annalen Der Chemie-Justus Liebig* **664**, 168-170.

Schneider, T. L., Shen, B. & Walsh, C. T. (2003). Oxidase domains in epothilone and bleomycin biosynthesis: Thiazoline to thiazole oxidation during chain elongation. *Biochemistry (Mosc)* **42**, 9722-9730.

Seneca, H., Kane, J. H. & Rockenbach, J. (1952). Bacterial, protozoal and fungicidal properties of thiolutin. *Antibiot Chemother* **2**, 375-360.

Shiozawa, H., Kagasaki, T., Kinoshita, T., Haruyama, H., Domon, H., Utsui, Y., Kodama, K. & Takahashi, S. (1993). Thiomarinol, A New Hybrid Antimicrobial Antibiotic Produced By A Marine Bacterium Fermentation, Isolation, Structure, And Antimicrobial Activity. *J Antibiot (Tokyo)* **46**, 1834-1842.

Shiozawa, H. & Takahashi, S. (1994). Configurational studies on thiomarinol. *J Antibiot (Tokyo)* **47**, 851-853.

Shiozawa, H., Kagasaki, T., Torikata, A., Tanaka, N., Fujimoto, K., Hata, T., Furukawa, Y. & Takahashi, S. (1995). Thiomarinol-b and thiomarinol-c, new antimicrobial antibiotics produced by a marine bacterium. *J Antibiot (Tokyo)* **48**, 907-909.

Shiozawa, H., Shimada, A. & Takahashi, S. (1997). Thiomarinols D, E, F and G, new hybrid antimicrobial antibiotics produced by a marine bacterium; Isolation, structure, and antimicrobial activity. *J Antibiot (Tokyo)* **50**, 449-452.

Shirling, E. B. & Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 313-340.

Sieber, S. A. & Marahiel, M. A. (2005). Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: Approaches to new antibiotics. *Chem Rev* **105**, 715-738.

Sivasubramanian, N. & Jayaraman, R. (1976). Thiolutin resistant mutants of *escherichia-coli* - are they RNA chain initiation mutants. *Mol Gen Genet* **145**, 89-96.

Stachelhaus, T., Mootz, H. D., Bergendahl, V. & Marahiel, M. A. (1998). Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis - Catalytic role of the condensation domain. *J Biol Chem* **273**, 22773-22781.

Stachelhaus, T., Mootz, H. D. & Marahiel, M. A. (1999). The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**, 493-505.

Stahl, P., Seidel, H., Von der Eltz, H., Wilhelms, O.-H. & Roesch (1988). Pyrrothine derivatives and pharmaceutical use thereof. Patent US4760077. 26th July 1988.

Steller, S., Vollenbroich, D., Leenders, F., Stein, T., Conrad, B., Hofemeister, J., Jacques, P., Thonart, P. & Vater, J. (1999). Structural and functional organization of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213 and A1/3. *Chem Biol* **6**, 31-41.

Stoecker, K., Dorninger, C., Daims, H. & Wagner, M. (2010). Double-labeling of oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization (DOPE-FISH) improves signal intensity and increases rRNA accessibility. *Appl Environ Microbiol*, 922-926.

Strieker, M., Tanovic, A. & Marahiel, M. A. (2010). Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Curr Opin Struct Biol* **20**, 234-240.

Strub, C. (2008). Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat, Université de Toulouse, INP-ENSAT (France), 174 p.

Strub, C., Brandam, C., Meyer, X. & Lebrihi, A. (2008). Investigations of *Saccharothrix algeriensis* Growth on Synthetic Media. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **106**, 148-153.

Summers, A. O. (1992). Untwist and shout - a heavy metal-responsive transcriptional regulator. *J Bacteriol* **174**, 3097-3101.

Suzuki, H., Ohnishi, Y. & Horinouchi, S. (2007). Arylamine N-acetyltransferase responsible for acetylation of 2-aminophenols in *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol* **189**, 2155-2159.

-T-

Thaden, J. T., Lory, S. & Gardner, T. S. (2010). Quorum-Sensing Regulation of a Copper Toxicity System in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **192**, 2557-2568.

Thamm, S. & Distler, J. (1997). Properties of C-terminal truncated derivatives of the activator, StrR, of the streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *FEMS Microbiol Lett* **149**, 265-272.

Tipper, D. J. (1973). Inhibition of yeast ribonucleic acid polymerases by thiolutin. *J Bacteriol* **116**, 245-256.

Tiwari, K. & Gupta, R. K. (2012). Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. *Crit Rev Biotechnol* **32**, 108-132.

-V-

Vasudevan, S., Armarego, W. F., Shawl, D., Lilley, P., Dixon, N. & Poole, R. (1991). Isolation and nucleotide sequence of the hmp gene that encodes a haemoglobin-like protein in *Escherichia coli* K-12. *Molecular and General Genetics MGG* **226**, 49-58.

Vondaehn.W, Godtfred.Wo, Tybring, L. & Schaumbu.K (1969). New antibiotics containing 1,2-dithiolo[4,3-b]pyrrole ring system. *J Antibiot (Tokyo)* **22**, 233-235.

-W-

Waksman, S. A. & Woodruff, H. B. (1940). Bacteriostatic and Bactericidal Substances Produced by a Soil Actinomyces. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* **45**, 609-614.

Wang, C., Wesener, S. R., Zhang, H. & Cheng, Y.-Q. (2009). An FAD-Dependent Pyridine Nucleotide-Disulfide Oxidoreductase Is Involved in Disulfide Bond Formation in FK228 Anticancer Depsipeptide. *Chem Biol* **16**, 585-593.

Webber, M. A. & Piddock, L. J. V. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* **51**, 9-11.

Weber, G., Schorgendorfer, K., Schneiderscherzer, E. & Leitner, E. (1994). The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *tolypocladiumniveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame. *Curr Genet* **26**, 120-125.

Webster, M., J., Li & Chen, G. (2000). Anticancer property of dithiolopyrrolones. United States.

Webster, J. M., Chen, G., Hu, K. & Li, J. (2002). *Bacterial metabolites*, in: *Entomopathogenic Nematology*, R. Gaugler: CAB International. p 99-114.

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**, 2946-2960.

Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaeve, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T. & Mann, M. (1996). Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature* **379**, 466-469.

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.

-Y-

Yamagishi, S., Koyama, Y., Fukakusa, Y., Kyomura, N., Ohishi, Y. I., Hamamichi, N. & Arai, T. (1971). On the metabolites of *Streptomyces luteoreticuliti* Katoh et Aral. Isolation of the metabolites. *Yakugaku Zasshi* **91**, 351-357.

Yan, N. (2001). Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends Biochem Sci* **38**, 151-159.

Yan, N. (2013). Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends Biochem Sci* **38**, 151-159.

Yassin, A. F., Rainey, F. A., Brzezinka, H., Jahnke, K. D., Weissbrodt, H., Budzikiewicz, H., Stackebrandt, E. & Schaal, K. P. (1995). *Lentzea* gen.-nov., a new genus of the order actinomycetales. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 357-363.

Yin, H., Xiang, S., Zheng, J. & other authors (2012). Induction of Holomycin Production and Complex Metabolic Changes by the *argR* Mutation in *Streptomyces clavuligerus* NP1. *Appl Environ Microbiol* **78**, 3431-3441.

-Z-

Zentmyer, G. A. (1995). A laboratory method for testing soil fungicides, with *Phytophthora cinnamomi* as test organism. *Phytopathology* **45**, 398-404.

Zitouni, A. (1995). Les genres *Nocardiopsis* et *Saccharothrix* (Actinomycetales) dans les sols sahariens: taxonomie numérique; extraction; purification et caractérisation de quelques antibiotiques synthétisés. Magister de microbiologie, E.N.S. de Kouba, 177 p.

Zitouni, A., Boudjella, H., Mathieu, F., Sabaou, N. & Lebrihi, A. (2004a). Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp SA 103 - I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)* **57**, 367-372.

Zitouni, A., Mathieu, F., Coppel, Y., Pont, F., Sabaou, N. & Lebrihi, A. (2004b). Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp SA 103 - II. Physico-chemical properties and structure elucidation. *J Antibiot (Tokyo)* **57**, 373-378.

ANNEXES

ANNEXE 1

Appareillage, produits et consommables

Liste de l'appareillage utilisé

- Agitateur rotatif New Brunswick Scientific (Edison, New Jersey, USA) classic series C1
- Armoire Liebherr (Bulle, Suisse) LKPv 6522
- Bain-marie Lauda (Lauda-Königshofen, Allemagne) A100
- Balance Ohaus (Pine Brook, New Jersey, USA) Scout Pro
- Balance de précision Sartorius analytic (Bradford, Massachusetts, USA) A200S-F1 classe I
- Centrifugeuse ThermoFisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) Sigma 4K15
- Congélateur -20 °C Liebherr Comfort
- Congélateur -80 °C ThermoFisher Scientific Forma - 86C ULT freezer
- Disrupteur ThermoFisher Scientific Fast Protein 120
- Eau ultrapure Elga groupe Véolia water (Antony, France) Purelab Maxima
- Etuve Heraeus Instrument (Hanau, Germany) Function line B12
- Four Memmert (Schwabach, Allemagne) V40
- Générateur Biorad (Hercules, Californie, USA) Power Pac 300
- Incubateur Liebherr Aqualytic
- Microcentrifugeuse Heraeus Instrument Biofuge Pico
- Microcentrifugeuse réfrigérée ThermoFisher Scientific Sigma 1K15
- pH-mètre Consort (Turnhout, Belgique) C832 Multi-Channel analyzer
- Rotavapor Heidolph (Kelheim, Germany) Laborota 4000
- Spectromètre Bruker (Billerica, MA, USA) DPX 300
- Spectrophotomètre Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, USA) UV/Vis Spectrometer Lambda 20
- Speed-vac composé d'un groupe réfrigérant Huber (Offenburg, Germany) Minichiller, (référence 4660010), d'une pompe Ilmvac (Ilmenau, France) LVS 210 Tp Ecoflex, d'une cuve de concentration et son système de contrôle Genevac (Ipswich, England) Mivac Duo Concentration
- Système d'électrophorèse de protéines Biorad Mini-PROTEAN Tetra Cell pour la réalisation de mini gels 10 puits d'1 mm d'épaisseur, référence 1658001
- Table agitante Edmund Bühler (Hechingen, Allemagne) SM30 Control

- Vortex ThermoFisher Scientific Top mix, référence FB15024

Liste du consommable utilisé

- Boudins de dialyse Spectrum laboratories (Rancho Dominguez, California, USA)
Spectra/Por Biotech cellulose ester MWCO 15000, référence 131303
- Colonne d'échange d'anions Biorad Bioscale Mini UNOsphere Q, référence 732-4102
- Colonne d'interactions hydrophobes GE healthcare (Chalfont St. Giles, Royaume-Uni)
Colonne HiTrap HIC, Phenyl Sepharos 6 Fast Flow (high sub), référence 17-1355-01
- Colonne de filtration de gel Biorad Econopac 10DG, référence 732-2010
- Filtre membrane nylon ϕ 47 mm seuil 0,2 μ m Whatmann (Maidstone, Royaume-Uni),
référence 7404-004
- Filtre membrane en nitrate de cellulose ϕ 47 mm seuil 0,45 μ m Sartorius Stedim Biotech
GmbH, Goettingen, Germany, référence 11406-47-N
- Filtre seringue en acétate de cellulose ϕ 30 mm seuil 0,2 μ m ThermoFisher Scientific,
référence 5174E
- Tubes pour disrupteur Fast Prep MP biomedical (Irvine, California, USA) Tubes Fast
Protein Blue 6911-050

Liste des produits chimiques utilisés

- Acétate d'ammonium Acros organics (Geel, Belgique), groupe ThermoFisher
scientific, référence 169880025
- Acétonitrile grade HPLC ThermoFisher scientific, référence A/0626/17
- Acide acétique Acros organics, 222140025
- Acide benzoïque Acros organics, référence 221802500
- Acide humique Fluka, groupe Sigma Aldrich (St Louis, Missouri, USA), référence 53680
- Acide hydrochlorique ThermoFisher scientific, référence H/1200/PB15
- Acide trichloroacétique ThermoFisher scientific, référence T/3000/50
- Acrylamide 30 %/Bis ratio 37,5 :1 Biorad, référence 161-0158
- Agar ThermoFisher Scientific, référence 2801W
- Albumine de sérum bovin Sigma Aldrich, référence A2153
- Bleu de Bromophénol Biorad, référence 161-0404
- Butanol ThermoFisher scientific, référence B/4850/15
- Carbonate de calcium Merck, référence 1.02066.1000

- Chlorure de sodium Sigma Aldrich, référence S6191
- Chlorure de titanium Acros organics, référence 197232500
- Chlorure d'oxalyle Acros organics, référence 129611000
- Cocktail anti-protéase Sigma Aldrich, référence P8215
- D(+) glucose Acros Organics, référence 170080025
- 1,3-dichloroacétone Acros organics, référence 173630500
- Dichlorométhane ThermoFisher scientific D/1850/17
- 1,4-dioxane VWR Prolabo (West Chester, Pennsylvanie, USA), référence 23539.291
- Extrait de levure BD diagnostics (Sparks, Maryland, USA), référence 212750
- Extrait de malt BD diagnostics, référence 218630
- Glycérol ThermoFisher scientific, référence G/0650/17
- Glycine Biorad, référence 161-0717
- Hydroxyde de sodium Sigma Aldrich, référence S8045
- Kit de coloration au nitrate d'argent Pierce, groupe ThermoFisher scientific, référence 24597
- 2-Mercaptoéthanol Biorad, référence 161-0710
- Méthanol grade HPLC ThermoFisher scientific, référence M/4056/17
- 4-méthoxybenzylamine Acros organics, référence 125780250
- Méthoxyde de sodium Acros organics, référence 173125000
- p-methoxybenzylthiol (ou 4-methoxy-alpha-toluenethiol) Acros organics, référence 150950250
- Persulfate d'ammonium Biorad, référence 161-0700
- Phosphate de potassium dibasique Acros organics, référence 215470010
- Phosphate de potassium monobasique Acros organics, référence 205925000
- Réactif de Bradford Sigma Aldrich, référence B6916
- Silice GF 254 Fluka, référence 60765
- Sodium Dodécyl Sulfate Biorad, référence 161-0301
- Solution de coloration à base de coomassie colloïdal G-250 Fermentas (Burlington, Ontario, Canada) Page Blue Protein Staining solution, référence R0571
- Solution de staining à base de coomassie R-250 Biorad, référence 161-0436
- Standards de protéines Biorad, standards broad range référence 161-0317
- Sulfate d'ammonium VWR Prolabo, référence 21332.293
- Sulfate de magnésium heptahydraté Acros organics, référence 213115000
- Sulfate de sodium Acros organics, référence 196640025

- TEMED Biorad, référence 161-0800
- Triéthyle amine Acros organics, référence 157911000
- Tris-HCl MP Biomedicals, référence 194855
- Tween 80 ThermoFisher scientific, référence Fisher labosi A4920901

Liste des acyls-CoA utilisés

- Acétyl coenzyme A Sigma Aldrich, référence A2181
- Benzoyl coenzyme A Sigma Aldrich, référence B1638

ANNEXE 2

Abaque utilisé pour la réalisation de la précipitation au sulfate d'ammonium

Table 4. The amount of solid ammonium sulphate to be added to a solution to give the desired final saturation at 0°C.

Final concentration of ammonium sulphate, % saturation at 0°C																		
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
Initial concentration of ammonium sulphate																		
g solid ammonium sulphate to add to 100 ml of solution																		
0	10.7	13.6	16.6	19.7	22.9	26.2	29.5	33.1	36.6	40.4	44.2	48.3	52.3	56.7	61.1	65.9	70.7	
5	8.0	10.9	13.9	16.8	20.0	23.2	26.6	30.0	33.6	37.3	41.1	45.0	49.1	53.3	57.8	62.4	67.1	
10	5.4	8.2	11.1	14.1	17.1	20.3	23.6	27.0	30.5	34.2	37.9	41.8	45.8	50.0	54.5	58.9	63.6	
15	2.6	5.5	8.3	11.3	14.3	17.4	20.7	24.0	27.5	31.0	34.8	38.6	42.6	46.6	51.0	55.5	60.0	
20	0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.5	17.7	21.0	24.4	28.0	31.6	35.4	39.2	43.3	47.6	51.9	56.5	
25	0	2.7	5.7	8.5	11.7	14.8	18.2	21.4	24.8	28.4	32.1	36.0	40.1	44.2	48.5	52.9	57.9	
30	0	2.8	5.7	8.7	11.9	15.0	18.4	21.7	25.3	28.9	32.8	36.7	40.8	45.1	49.5	54.1	58.5	
35	0	2.8	5.8	8.8	12.0	15.3	18.7	22.1	25.8	29.5	33.4	37.4	41.6	45.9	50.4	55.1	59.9	
40	0	2.9	5.9	9.0	12.2	15.5	19.0	22.5	26.2	30.0	34.0	38.1	42.4	46.7	51.2	55.9	60.7	
45	0	2.9	6.0	9.1	12.3	15.8	19.3	22.9	26.7	30.6	34.7	38.8	43.1	47.4	52.0	56.7	61.5	
50	0	3.0	6.1	9.3	12.7	16.1	19.7	23.3	27.2	31.2	35.3	39.5	43.8	48.1	52.6	57.3	62.1	
55	0	3.0	6.2	9.4	12.9	16.3	20.0	23.8	27.7	31.7	35.9	40.1	44.4	48.7	53.2	57.9	62.7	
60	0	3.1	6.3	9.6	13.1	16.6	20.4	24.2	28.3	32.3	36.5	40.7	45.0	49.3	53.8	58.5	63.3	
65	0	3.1	6.4	9.8	13.4	17.0	20.8	24.7	28.7	32.9	37.1	41.3	45.6	49.9	54.4	59.1	63.9	
70	0	3.2	6.6	10.0	13.6	17.3	21.2	25.2	29.2	33.4	37.6	41.9	46.2	50.5	55.0	59.7	64.5	
75	0	3.2	6.7	10.2	13.9	17.6	21.5	25.5	29.5	33.7	37.9	42.2	46.5	50.8	55.3	60.0	64.7	
80	0	3.3	6.8	10.4	14.1	17.8	21.7	25.7	29.7	33.9	38.1	42.4	46.7	51.0	55.5	60.2	64.9	
85	0	3.4	6.9	10.6	14.3	18.0	21.9	25.9	30.0	34.1	38.3	42.6	46.9	51.2	55.7	60.4	65.1	
90	0	3.4	7.1	10.8	14.5	18.2	22.1	26.1	30.2	34.3	38.5	42.8	47.1	51.4	55.9	60.6	65.3	
95	0	3.5	7.2	10.9	14.6	18.3	22.2	26.2	30.3	34.4	38.6	42.9	47.2	51.5	56.0	60.7	65.4	
100	0	3.5	7.3	11.0	14.7	18.4	22.3	26.3	30.4	34.5	38.7	43.0	47.3	51.6	56.1	60.8	65.5	

Résumé

Du fait de l'apparition de microorganismes pathogènes ayant une résistance aux antibiotiques actuels, la recherche de nouvelles molécules bioactives possédant une application médicale est devenue une préoccupation mondiale. *Saccharothrix algeriensis*, une bactérie filamenteuse de l'ordre des actinomycètes a montré une étonnante capacité à produire des molécules bioactives qui appartiennent aux dithiolopyrrolones, ayant de remarquables propriétés à la fois antibiotiques et anticancéreuses. Lors de ce projet de thèse, l'identification du cluster de gènes de la voie de biosynthèse des dithiolopyrrolones chez *Sa. algeriensis* est envisagée. Suite au séquençage du génome de *Sa. algeriensis*, une approche génomique ou « genome mining » est suivie, cette approche a révélé un cluster *thi* potentiellement responsable de la voie de biosynthèse des dithiolopyrrolones chez *Sa. algeriensis*. Ce cluster contient 12 gènes, dont 8 gènes de biosynthèse, 3 gènes régulateurs et un gène transporteur. Les analyses *in silico* des gènes ont montré que la cystéine est le substrat d'une NRPS. Les analyses transcriptionnelles ont montré que les trois gènes clés codent pour une NRPS, une thiorédoxine et une thioestérase qui pourraient être impliquées dans la biosynthèse des dithiolopyrrolones. Deux gènes *actA* et *actB* codant pour des acyltransférases putatives ont été identifiés. Les analyses transcriptionnelles suggèrent qu'*actA* et *actB* pourraient être responsables de l'acylation de la pyrrothine. Finalement, la caractérisation de deux activités enzymatiques, acétyltransférase et benzoyltransférase, présentes dans l'extrait brut de *Sa. algeriensis*, ont permis de déterminer les paramètres optimaux (pH et T °C) de la réaction enzymatique. Enfin, les paramètres cinétiques de ces activités ont des valeurs complètement différentes, ce qui confirme la présence d'au moins deux activités différentes chez *Sa. algeriensis*.

Mots clés: *Saccharothrix algeriensis*, biosynthèse des dithiolopyrrolones, cluster de gènes, expression des gènes, purification d'enzyme, acétyltransférase, benzoyltransférase, caractérisation d'enzyme

Abstract

Due to the emergence in the last decades of new and old infectious diseases to existing antibiotics, the research for new bioactive molecules which possess medical applications become a global occupation. *Saccharothrix algeriensis*, filamentous bacteria of actinomycetes order showed a surprising ability to produce bioactive molecules belongs to dithiolopyrrolones with remarkable properties of both antibiotics and anticancer. In this thesis, the identification of dithiolopyrrolones biosynthetic gene cluster in *Sa. algeriensis* was investigated. Through *S. algeriensis* genome sequencing, a genomics approach "genome mining" was followed, this approach has revealed a potentially *thi* cluster responsible for dithiolopyrrolones biosynthesis pathway in *Sa algeriensis*. This cluster contains 12 genes, including 8 biosynthesis genes, three regulatory genes and one transporter gene. The *in silico* analysis of this cluster showed that the cysteine is the substrate of the NRPS. The transcriptional analyzes showed that the three key genes which encode for NRPS, thioredoxin and thioesterase could be involved in dithiolopyrrolone biosyntheses. Two genes, *actA* and *actB*, encode for two putative acyltransferases were identified, the transcriptional analyzes suggests that these genes may be responsible for the acylation of pyrrothine core. The characterizations of two activities, acetyltransferase and benzoyltransferase, in the crude extract of *Sa. algeriensis* led the determination of the optimal parameters (pH and T °C) to detect these activities. Moreover, the effect of temperature and pH on these activities was determined. Finally, the kinetic parameters of these activities showed different values, which confirm the presence of, at least, two activities in *Sa. algeriensis*.

Keywords: *Saccharothrix algeriensis*, dithiolopyrrolone biosyntheses, gene cluster, gene expression, enzyme purification, acetyltransferase, benzoyltransferase, enzyme characterization