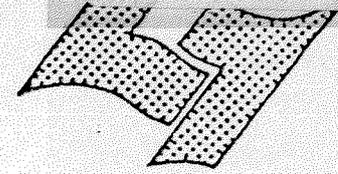


0673

DESS  
1984  
13  
A

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON-I  
43, Boulevard du 11 Novembre 1918  
69621 VILLEURBANNE



*Diplôme d'Etudes Supérieures Spécialisées*

**Informatique documentaire**

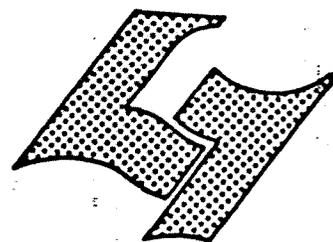
\* NOTE DE SYNTHÈSE

BIOSYNTHESE DES ANTIBIOTIQUES  
PEPTIDIQUES DE BACILLUS

AUTEUR : SERARI Yamina

DATE : Mai 1984

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON-I  
43, Boulevard du 11 Novembre 1918  
69621 VILLEURBANNE



*Diplôme d'Etudes Supérieures Spécialisées*

**Informaticque documentaire**



\* NOTE DE SYNTHÈSE

BIOSYNTHESE DES ANTIBIOTIQUES  
PEPTIDIQUES DE BACILLUS

AUTEUR : SERARI Yamina

DATE : Mai 1984

# PREMIERE PARTIE

.....

## RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE INFORMATISÉE

- I - DEFINITION DU SUJET. LES CONCEPTS
- II - CHOIX DES BANQUES DE DONNEES
- III - BIOSIS (années 73-83)
- IV - PASCAL (années 77-83)
- V - MEDLINE (années 82-83)
- VI - COMPARAISON DES RESULTATS
- VII - ACCES AUX DOCUMENTS PRIMAIRES

# DEUXIEME PARTIE

.....

## BIOGENESE DES ANTIBIOTIQUES PEPTIDIQUES PRODUITS PAR BACILLUS

- I - ANTIBIOTIQUES PEPTIDIQUES DE BACILLUS
- II - FORMATION DES ANTIBIOTIQUES EN RELATION AVEC LA CROISSANCE DU BACILLUS PRODUCTEUR
  - a) Influence de la composition en acides aminés du milieu de culture sur la production de bacitracine
  - b) Rôle de l'Arginine sur la synthèse de Gramicidine S
  - c) Biosynthèse de la Polymyxine par Bacillus Polymyxa
  - d) Biosynthèse des Butirosines par Bacillus Circulans
  - e) Biosynthèse de la Bacitracine par Bacillus Lichenformis en relation avec la croissance, la sporulation et l'excrétion de protéases

.../...

### III - BIOSYNTHESE PAR DES SYSTEMES ACELLULAIRES

- a) Synthèse enzymatique de la Gramicidine S
- b) Synthèse des Tyrocidines
- c) Synthèse des Gramicidines linéaires
- d) Synthèse des Bacitracines
- e) Synthèse des Edeines
- f) Synthèse de la Mycobacilline
- g) Synthèse des Polymixines et Colistines

### IV - ETUDE DE MUTANTS

### V - ROLE POSSIBLE DES ANTIBIOTIQUES SUR LES SOUCHES PRODUCTRICES

### VI - REMARQUES ET CONCLUSIONS

ANNEXES

BIBLIOGRAPHIE

Le sujet de cette note de synthèse "Biogénèse des antibiotiques peptidiques chez Bacillus" m'a été proposé par Monsieur G. MICHEL, Professeur à l'Université Claude Bernard LYON I et Madame F. BESSON, Chargée de Recherches au CNRS.

L'équipe de recherches de F. BESSON travaille sur des antibiotiques peptidolipidiques produits par Bacillus subtilis. Ces peptidolipides forment une famille d'antibiotiques caractérisée par la présence d'acides  $\beta$ -aminés à longue chaîne carbonée. La structure et le mode d'action de ces antibiotiques ont été déterminés. Depuis octobre 1982, l'équipe de recherches de F. BESSON étudie la biogénèse de ces antibiotiques. Une recherche bibliographique sur l'étude de la biogénèse d'autres antibiotiques produits par Bacillus était nécessaire. Mon travail a donc été de réaliser cette recherche.



## I - DEFINITION DU SUJET. LES CONCEPTS

" Un antibiotique est un composé chimique produit par un microorganisme et ayant le pouvoir, en solution diluée, d'inhiber la croissance d'autres microorganismes, ou même de les détruire " (Waksman, 1953).

On connaît actuellement plus d'un millier d'antibiotiques différents, mais un petit nombre seulement est utilisé en thérapeutique.

La plupart des antibiotiques n'ont pas d'effet sur les champignons et les quelques antifongiques connus sont plus ou moins toxiques.

En 1928, Chambers et Weidman ont isolé une souche de Bacillus subtilis qui inhibe la croissance de certains champignons pathogènes (1). Depuis 1940, beaucoup d'antifongiques provenant de Bacillus subtilis ont été isolés et caractérisés.

Par la suite, il a été démontré que Bacillus subtilis produit des substances peptidiques antifongiques quand il est cultivé à basse température. Ce sont des polypeptides contenant des acides aminés D et L. Certains ont une structure cyclique.

On peut dégager trois concepts principaux qui sont :

- biogénèse
- antibiotique ou antifongique
- Bacillus

.../...

## II - CHOIX DES BASES DE DONNEES

Le sujet de synthèse bibliographique proposé porte sur un thème nouveau pour les demandeurs. Il fallait donc faire une recherche large en interrogeant les trois principales bases de données en Biologie.

Il s'agit de :

- Biosis sur la période 73-83.
- Pascal sur la période 77-83.
- Medline sur la période 82-83.

Les interrogations ont été effectuées sur trois serveurs différents. Nous présentons brièvement chacune de ces bases de données.

.../...

## BIOSIS

C'est la plus importante Base de données en langue anglaise. Les domaines couverts sont la biologie, l'agriculture, la bactériologie, la botanique, la biologie moléculaire, la génétique, l'immunologie, la nutrition, la pharmacologie et la zoologie.

Elle reprend les Biologicals Abstracts et est automatisée depuis 1969. Le fond documentaire est composé de plus de 9 000 périodiques (Europe 38 %, Amérique du Nord 24 %, Asie et Océanie 15 %, Moyen Orient 12 %, Amérique du Sud et Centrale 7 %, Afrique 4 %), actes de congrès, rapports de recherches, ouvrages. L'analyse est faite par des spécialistes bénévoles du monde entier.

Régulièrement un examen des revues retenues est effectué. Le fond documentaire s'accroît d'environ 300 000 références chaque année.

L'interrogation de la base peut s'effectuer à partir de 3 types de données :

- un thème : Biosis a établi une classification : les concept codes (C.C) correspondant aux grands domaines couverts par la Base.
- un thésaurus, le concept Index, permet de choisir des descripteurs. Mais on peut interroger aussi par des mots du titre.
- le biosystematic Index, contient un classement systématique des espèces : l'interrogation se fait grâce aux biosystématique codes (B.C).

La Base de données est disponible sur les serveurs suivants :

- Agence Spatiale Européenne.
- System Development Corporation : SDC.
- Lockheed.
- Data-Star.
- B.R.S.

.../...

PASCAL

Produite par le Centre de Documentation Scientifique et Technique du CNRS, c'est une banque de données pluridisciplinaire. Cependant elle fait une large place à la documentation biomédicale.

Le Bulletin Signalétique est la publication imprimée correspondante. C'est près de 500 000 références bibliographiques par an, extraites de la littérature mondiale (périodiques à 90 % environ, compte rendus de congrès, thèses, rapports) qui rejoignent la banque de données depuis 1973, soit plus de 4 000 000 de références actuellement. La mise à jour est mensuelle. Il n'existe pas de thésaurus comme aide à l'interrogation.

Les indéxeurs caractérisent chaque article en utilisant des descripteurs appartenant au lexique bilingue du CDST.

L'interrogation s'effectuera à partir de mots du lexique mais aussi à partir de mots extraits automatiquement du titre et du résumé.

La banque de données est disponible sur les serveurs suivants :

- Agence Spatiale Européenne
- Télésystèmes

.../...

## MEDLINE

La banque de données MEDLINE est produite par la National Library of Medicine (USA).

Les références proviennent d'environ 3 000 périodiques publiés dans le monde et couvrent tous les domaines de la médecine : biologie, pathologie, pharmacologie, biochimie etc...

Elle contient plus de 4 000 000 de notices pour la période 1966-1983. Les mises à jour sont mensuelles : environ 25 000 références nouvelles s'ajoutent au fond documentaire.

Les articles retenus sont indexés à l'aide de termes appartenant à un thésaurus, le Medical Subject Headings : MeSH, par des scientifiques formés à ce travail. Le MeSH est un langage normalisé, structuré et évolutif : il comprend actuellement environ 15 000 descripteurs et s'enrichit chaque année de centaines de mots nouveaux.

Il comprend :

- une liste systématique des descripteurs présentés par domaine : " MeSH Tree Structures "
- une liste alphabétique des descripteurs qui fait apparaître les relations associatives : " MeSH Annotated Alphabétic List "

De plus une liste de QUALIFICATIFS désignant des concepts généraux permet d'en préciser le champ d'utilisation.

La banque de données est directement diffusée par la NLM, mais aussi disponible sur :

- Agence Spatiale Européenne
- Data-Star
- Lockheed
- BRS
- DIMDI

L'interrogation des trois bases de données doit assurer une très bonne couverture du sujet.

Elle permet aussi une comparaison des réponses fournies.

Cependant ces trois banques de données ont été interrogées à partir de logiciels différents (QUEST, ELHILL, QUESTEL).

De plus, chaque producteur a une politique d'indexation qui lui est propre.

Ces remarques indiquent que les conclusions tirées de ces interrogations ne seront en rien généralisables à l'ensemble du contenu des banques de données.

B. D.	SERVEUR	LOGICIEL
BIOSIS	ASE	QUEST
MEDLINE	NLM	ELHILL
PASCAL	TELESYSTEMES	QUESTEL

L'interrogation de Biosis a été effectuée au cours d'une journée de démonstration à l'U.R.F.I.S.T. par Madame LECOCQ, représentante BIOSIS pour l'Europe.

C'est Madame Chevalier, INSERM, qui a interrogé MEDLINE.

PASCAL a été interrogée par nos soins au cours de deux séances à l'U.R.F.I.S.T., après une formation au logiciel QUESTEL.

.../...

III BIOSIS (Années 73-83).

Equation de recherche :

- 1 BIOGENE? + ANABOL? + SYNTHESSES?
- 2 BACILLUS
- 3 ANTIBIOTIC? \* PEPTIDE?
- 4 1 \* 2 \* 3
- 5 GRAMICIDIN + BACITRAN + TYRODICIN
- 6 5 \* 2 \* 1
- 7 4 + 6

Résultats :

42 références.

Après étude de ces références, 24 ont été retenues, soit 57 %.

Le signe ? permet de tronquer les mots et de faire la recherche sur une racine.

Le signe + indique l'opération d'union, le signe \* indique l'intersection de 2 ensembles.

.../...

IV PASCAL (Années 77-83).

Equation de recherche :

- 1 BIOGENESE OU BIOSYNTHESE OU ANABOLISME
- 2 ANTIBIOTIQU+ OU ANTIBACTERIEN? OU ANTIFONGIQUE?
- 3 1 ET 2
- 4 3 ET BACILLUS

Résultats :

100 références.

Après étude de ces références, 60 ont été retenues, soit 60 % mais le tiers de ces références a été éliminé en raison de la langue : russe, hollandais et même un article de synthèse en langue amharique (Ethiopie).

L'absence de thésaurus pour interroger PASCAL oblige à multiplier les synonymes.

Les signes ? et + sont des masques permettant de tronquer la fin de mots et ainsi de faire rechercher toutes les formes possédant la racine du mot tronqué.

.../...

v MEDLINE ( Années 82-83).

Equation de recherche :

1 ANTIBIOTICS (PX) AND BI AND EXP PEPTIDES

2 EXP BACILLUS AND 1

Résultats :

31 références.

Après étude de ces références, 11 ont été retenues, soit 35 %.

L'explosion EXP d'un descripteur permet de rechercher en une seule fois tous les articles indexés sous un descripteur générique, donc avec tous les termes spécifiques contenus dans le MESH : ici PEPTIDES et BACILLUS.

La pré-explosion (PX) correspond à la mise en mémoire par le producteur du résultat de l'explosion de certains descripteurs importants.

C'est le cas pour ANTIBIOTICS.

C'est un moyen puissant pour élargir la recherche à tout un domaine.

C'est spécifique à la banque de données MEDLINE.

On peut interroger directement par un Qualificatif, qui est un terme correspondant à un concept général.

BI signifie BIOSYNTHESIS.

.../...

## VI - COMPARAISON DES RESULTATS

C'est donc un total de 75 références qui ont été retenues après étude des listes de chacune des 3 interrogations.

En fait on trouve 7 notices communes à deux listes. Cependant on remarque que les trois interrogations se complètent. Un article donné par une base n'apparaît que rarement dans une autre, contrairement à ce que l'on aurait pu penser. Ce résultat peut provenir de politiques d'indexation spécifiques à chaque producteur, les interrogations partant, elles, des mêmes concepts et présentant une forme assez proche.

### Origine des revues :

USA	JAP	GB	NL	GER	DANK	INDE	BELG	FRA
24	18	8	9	4	1	1	1	1

On note l'absence totale d'article de revues françaises, puisqu'en fait la référence trouvée correspond à une thèse.

Nombre de titre de journaux différents : 25

### Langue des articles :

Seule Pascal, nous donne la langue du document sur 100 références, 60 ont été retenues mais 20 sont de langue autre qu'anglaise.

Nous avons interrogé par Bacillus subtilis ainsi que par Antibiotiques peptidolipidiques. Les résultats ont été très faibles.

Il fallait donc élargir par :

- Bacillus
- Antibiotiques

.../...

## VII - ACCES AUX DOCUMENTS PRIMAIRES

Les documents primaires ont été recherchés :

- d'une part à la bibliothèque d'UER
- d'autre part à la section sciences de la BIU de Lyon.

S'ils n'existaient pas dans les bibliothèques de Lyon, quand les renseignements obtenus à partir des banques de données le permettaient (Pascal et Biosis) nous avons écrit aux auteurs des articles pour avoir des tirés à part. Malheureusement très peu nous sont arrivés dans les délais du rapport.

Nous avons ainsi pu consulter 30 références.

DEUXIEME PARTIE



BIOGENESE DES ANTIBIOTIQUES PEPTIDIQUES PRODUITS PAR BACILLUS

Les résultats de ces trois interrogations sont très positifs.

L'ensemble des références d'articles obtenu permet de cerner le problème de la biogénèse des antibiotiques de Bacillus. En effet un article de Synthèse (2) présente en détail tous les antibiotiques de Bacillus et leur mode de biosynthèse jusqu'au mécanisme moléculaire de la réaction enzymatique (quand il est connu). Cet article datant de 1977, nous avons pu compléter la connaissance des modes de biosynthèse des antibiotiques de Bacillus avec les articles postérieurs soulevant des problèmes plus ponctuels de cette biosynthèse.

## I - ANTIBIOTIQUES PEPTIDIQUES DE BACILLUS

Le genre Bacillus produit environ 167 antibiotiques qui sont principalement des peptides (3). Certains de ces antibiotiques sont utilisés en thérapeutique : polymyxine, colistine, bacitracine, tyrothricine, gramicidine S. La plupart sont actifs sur les bactéries tandis que la mycobacilline, la fungistatine et les antibiotiques étudiés par F. Besson et al (bacillomycines D, F et L, mycosubtiline et iturine A) sont actifs essentiellement sur les champignons et les levures.

Les antibiotiques peptidiques de Bacillus ont généralement un poids moléculaire compris entre 270 (bacilysine) et 4 500 (lichenniformine). La plupart de ces antibiotiques sont composés entièrement d'acides aminés mais peuvent renfermer en plus des acides aminés non protéiques (D-amino-acides, ornithine, acide diaminobutyrique, dehydroaminoacides, acides aminés anormaux renfermant du soufre, acides  $\beta$ -aminés). Ces antibiotiques sont souvent cycliques.

## II - FORMATION DES ANTIBIOTIQUES EN RELATION AVEC LA CROISSANCE DU

### BACILLUS PRODUCTEUR

De nombreuses expériences ont montré que la synthèse des antibiotiques peptidiques est amorcée après la phase de croissance rapide. Toutefois dans certains cas, les antibiotiques peuvent être synthétisés pendant la croissance et des modifications génétiques ou nutritionnelles peuvent déplacer la période de synthèse de l'antibiotique pendant la croissance (4). Plus récemment, G.W. HANLON et N.A. HODGES ont démontré que la production de bacitracine et de protéase ainsi que la sporulation pouvaient avoir lieu au cours de la phase exponentielle du Bacillus producteur quand il était cultivé sur un milieu contenant des sources de carbone et d'azote à consommation lente (acide glutamique, alanine, acides pyruvique, lactique et citrique, glycérol) (5).

#### a) Influence de la composition en acides aminés du milieu de culture sur la production de bacitracine

La composition en acides aminés du milieu de culture du Bacillus producteur modifie la production d'antibiotique.

H.I. HAAVIK (6,7) a étudié l'influence de la composition en acides aminés sur deux souches productrices de bacitracine. Il a démontré que certains amino-acides favorisaient la synthèse de bacitracine et que les deux souches ne présentaient pas la même sensibilité à ces acides aminés. Ceci refléterait un mécanisme de contrôle des acides aminés différent pour les deux souches.

#### b) Rôle de l'arginine sur la synthèse de Gramicidine S

O. NIMI et A.L. DEMAIN (8), A. POIRIER et A.L. DEMAIN (9) ont étudié l'action de quelques acides aminés sur la croissance du Bacillus brevis producteur de gramicidine S en parallèle avec la synthèse de gramicidine S. Ils ont montré que l'arginine avait un effet original sur la croissance de Bacillus brevis.

.../...

L'arginine augmente beaucoup la croissance et la production de gramicidine S et diminue l'activité de l'enzyme de synthèse de la gramicidine S. Ils ont montré que l'arginine ne represse pas la gramicidine S synthétase lourde.

L'acide-amino stimule la croissance et augmente spécifiquement la production d'antibiotique probablement en apportant un précurseur limitant de la production d'antibiotique.

Bien que l'acide-amino diminue l'activité spécifique de la gramicidine S synthétase lourde, il augmente beaucoup l'activité de l'enzyme particulaire qui persiste des heures après la disparition de la gramicidine S synthétase lourde.

Ensuite O. NIMI et al (10) ont démontré que le précurseur limitant apporté par l'arginine est l'ornithine. On observe une consommation totale de l'arginine et une accumulation d'ornithine dans les cellules. Quand la L. ornithine remplace la L. arginine dans le milieu de culture, la croissance cellulaire et la production de gramicidine S sont stimulées avec une augmentation de la concentration en ornithine sans diminution de l'activité de l'enzyme soluble.

### c) Biosynthèse de la polymyxine par Bacillus polymyxa

B.R. SRINIVASA et L.K. RAMACHANDRAN (11) ont montré que la biosynthèse de la polymyxine n'est pas ribosomale car le chloramphénicol, l'actinomycine D et la puromycine n'inhibent pas la synthèse de polymyxine alors qu'ils inhibent la synthèse protéique.

L'addition d'acides aminés en milieu de culture (D. leucine ou D. phénylalanine) inhibent la production de polymyxine de 80 % et 50 % respectivement.

N. VASANTHA et al (12) ont montré une relation entre la synthèse de polymyxine et la sporulation de Bacillus polymyxa. En effet, ils ont isolé un mutant qui ne produit pas de polymyxine et qui ne sporule pas.

d) Biosynthèse des butirosines par Bacillus circulans

Y. MATSUHASHI et al (13) ont étudié la synthèse de butirosine A en relation avec la synthèse d'enzymes (phosphotransférase intracellulaire et phosphatase alcaline) et ils ont mis en évidence une phosphotransférase qui transfère le phosphate de l'ATP sur le groupement OH 3' de la butirosine A.

e) Biosynthèse de la bacitracine par Bacillus licheniformis en relation avec la croissance, la sporulation et l'excrétion de protéases

L.J. VITKOVIC et H.L. SADOFF (14) ont montré que les cellules qui sporulent excrètent trois sortes de sérilprotéases de taille similaire ( 28 000 daltons) qui diffèrent par leur charge à pH6. La bacitracine, antibiotique peptidique, est excrétée des cellules au même moment que les protéases et existe en partie associée sous forme de complexe avec les protéases, complexe stable au cours des purifications des enzymes par chromatographie. Toutefois une extraction au chloroforme détruit le complexe et une filtration sur gel sépare les enzymes et la bacitracine.

.../...

### III - BIOSYNTHESE PAR DES SYSTEMES ACELLULAIRES

Les systèmes acellulaires responsables de la synthèse de gramicidine S, de tyrocidine, de gramicidine linéaire, d'édéine, de bacitracine, de colistine, et de mycobacilline ont été étudiés. Ces systèmes de biosynthèse sont totalement différents des systèmes de la synthèse protéique. La synthèse d'antibiotique nécessite, outre les acides aminés constitutifs de l'antibiotique, de l'ATP, des ions magnésium, un agent réducteur et le surnageant acellulaire.

Beaucoup de synthétases ont été purifiées par chromatographie sur colonne (DEAE - cellulose, hydroxylapatite, sephadex G 200).

Les systèmes synthétisant les antibiotiques sont insensibles au chloramphénicol, à la puromycine, aux désoxyribonucléases et aux ribonucléases et il est clair que les ARN de transfert, les ARN messagers et les ribosomes ne sont pas directement impliqués dans la biosynthèse.

#### a) Synthèse enzymatique de la gramicidine S

12

La gramicidine S (figure 1 page 28 ) synthétisée par certaines souches de Bacillus brevis est un décapeptide cyclique constitué de deux pentapeptides identiques (D-Phe-L-Pro-L-Val-L-Orn-L-Leu).

On note que la D. phénylalanine (D-Phe) et la L-Ornithine (L-Orn) constitutifs de la gramicidine S ne se trouvent pas dans les protéines.

Le système responsable de la biosynthèse de la gramicidine S est un système multienzymatique. Le 1er acide aminé incorporé au cours d'une synthèse in vivo est la phénylalanine ; in vitro, il peut être remplacé par la tyrosine mais pas par le tryptophane (15). La phénylalanine (ou la tyrosine) est incorporée sous la forme D. Une enzyme de poids moléculaire 100 000 active la phénylalanine soit sous la forme L soit sous la forme D et la racémise si elle est sous la forme L (16, 17, 18, 19, 20).

.../...

L'activation est un processus ATP-dépendant. Les quatre autres amino acides restants (L-Pro, L-Val, L-Orn et L-Leu) sont activés par une deuxième protéine de poids moléculaire 280 000 (16, 18, 21).

En plus des acides aminés, il faut de l'ATP et des ions magnésium. Chacun des quatre amino-acides est activé indépendamment sur des sites différents du système polyenzymatique.

La synthèse de la gramicidine S se fait de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale comme dans le cas de la synthèse protéique mais elle n'implique que des intermédiaires liés à l'enzyme sous forme de thioesters réactifs.

Récemment, il a été démontré que les thioesters réactifs intermédiaires de la gramicidine S synthétase sont hydrolysés beaucoup plus rapidement en présence de certains agents protecteurs des groupements thiols (dithioerythritol) et que cette modification de la vitesse d'hydrolyse dépend du complexe intermédiaire considéré (22).

Il a également été démontré que les extraits acellulaires de Bacillus brevis perdaient leur activité gramicidine S - synthétase quand ils n'étaient pas rapidement conservés sous atmosphère d'azote ou d'hélium. Les activités d'activation de la L-ornithine et de la D-phénylalanine du complexe de la gramicidine S - synthétase sont également perdues au cours d'une aération des cellules ou des extraits cellulaires (23).

#### b) Synthèse des tyrocidines

Le mécanisme de biosynthèse des tyrocidines est semblable à celui de la gramicidine S (24, 25, 26, 27).

Les tyrocidines A, B et C sont des décapeptides cycliques (figure 2 page 28 ) produits par les mêmes souches de Bacillus brevis que celles qui synthétisent les gramicidines linéaires. Ces souches ne peuvent produire la gramicidine S.

.../...

La purification de systèmes synthétisant les tyrocidines donne trois enzymes complémentaires : une fraction légère de poids moléculaire 1000 000, une fraction intermédiaire de poids moléculaire 230 000 et une enzyme lourde de poids moléculaire 440 000. Comme dans le cas de la gramicidine S, chaque fraction d'enzyme active et racémise des acides aminés bien définis.

### c) Synthèse des gramicidines linéaires

Les gramicidines A, B et C sont des pentadécapeptides linéaires produits par les mêmes souches de Bacillus brevis que celles qui synthétisent les tyrocidines ; la figure 3 page 28 donne les structures des différentes gramicidines linéaires. Elles diffèrent seulement par l'acide aminé aromatique (tryptophane, tyrosine ou phénylalanine) incorporé en position 11 du peptide. Les peptides consistent en une alternance de résidus d'acides aminés L et D.

K. BAUER et al (28) ont obtenu la biosynthèse partielle de gramicidine linéaire en utilisant un système enzymatique soluble obtenu à partir d'extraits cellulaires de Bacillus brevis isolés par fractionnement au sulfate d'ammonium et chromatographie sur colonne de sephadex G 200.

H.A. AKERS et al (29) ont recherché dans les extraits de Bacillus brevis une activité d'activation de la glycine et de l'alanine. Ils ont isolé deux polyenzymes désignés glycine-enzyme et alanine-enzyme (de poids moléculaire 160 000 et 350 000 respectivement) qui synthétisent la portion initiale des gramicidines linéaires.

Très récemment, K. KUBOTA (30) a mis en évidence de l'acide formique et de l'éthanolamine provenant de sérine au cours de la biosynthèse de gramicidine linéaire par une préparation acellulaire de Bacillus brevis.

.../...

#### d) Synthèse des bacitracines

Les bacitracines sont synthétisées par des souches de Bacillus licheniformis (31). Bien que plusieurs bacitracines aient été décrites dans la littérature, la bacitracine A est la seule qui ait été bien étudiée (figure 4 page 29 ). C'est un dodécapeptide contenant quatre acides aminés (acide glutamique, ornithine, phénylalanine et asparagine) de configuration D. La molécule renferme un hexapeptide cyclique et un cycle thiazoline.

Plusieurs laboratoires ont étudié la synthèse acellulaire de bacitracine (32, 33, 34, 35). La bacitracine synthétase purifiée (de poids moléculaire 800 000) a été fractionnée en trois parties complémentaires par chromatographie d'affinité sur colonne de Sepharose (36) ou par combinaison de chromatographie sur colonne d'hydroxylapatite et centrifugation sur gradient de densité de saccharose. Ces trois fractions sont nécessaires à une activité de synthèse maximale. Les poids moléculaires de ces trois fractions sont 200 000, 210 000 et 380 000. L'activation des acides aminés demande de l'ATP et des ions magnésium.

L. VITKOVIC et H.L. SADOFF (37) ont étudié la production in vitro de bacitracine par protéolyse de protéines de cellules végétatives de Bacillus licheniformis. L'action de sérilprotéases spécifiques de la sporulation sur des extraits sans antibiotique de cellules de Bacillus licheniformis donne un peptide qui a été identifié à la bacitracine.

Ce peptide présente la même activité biologique, les mêmes propriétés spectrales et la même migration par chromatographie sur papier et sur couches minces. La protéine substrat donnant la bacitracine par protéolyse représente une fraction constante des protéines cellulaires tout au long de la croissance exponentielle et au cours des stades très précoces de la sporulation.

.../...

#### e) Synthèse des édéines

Les édéines (figure 5 page 29 ) sont très fortement basiques. Ce sont des antibiotiques oligopeptidiques linéaires produits par Bacillus brevis. Les acides aminés constitutifs sont inhabituels : mis à part la glycine, ce sont l'isosérine, la  $\beta$ .tyrosine, l'acide  $\alpha$ ,  $\beta$ .diaminopropionique et l'acide 2,6 - diamino 7 - hydroxyazoléique. La différence entre les édéines A et B est indiquée sur la figure 5 page .

Beaucoup d'articles sont parus sur la synthèse acellulaire de l'édéine mais le mécanisme de la biosynthèse n'est pas encore complètement compris.

Des fractions polyenzymatiques qui sont spécifiques de l'activation et de la polymérisation des amino-acides constitutifs ont été isolés (38). Ces étapes nécessitent de l'ATP et des ions  $Mg^{++}$ .

#### f) Synthèse de la mycobacilline

La mycobacilline (figure 6 page 29 ) est un antibiotique peptidique cyclique qui contient 13 résidus de sept amino-acides différents.

Le surnageant des protoplastes lysés de Bacillus subtilis catalyse la synthèse de l'antibiotique (39). Le processus requiert de l'ATP et est insensible à l'action de ribonucléases et aux inhibiteurs de la synthèse protéique tels que la streptomycine, le chloramphénicol et la puromycine.

Certaines caractéristiques de la biosynthèse de la mycobacilline permettent de la distinguer de la biosynthèse des autres antibiotiques peptidiques (gramicidine S, tyrocidine, bacitracine et édéine).

Par exemple, l'étape d'activation semble faire intervenir une réaction d'échange ATP - orthophosphate inorganique . SENGUPTA et BOSE ont noté qu'un tel échange se produit avec la L.proline, amino-acide constitutif de la mycobacilline (40).

Cet échange est stimulé par les autres acides aminés constitutifs de l'antibiotique. L'omission de certains de ces amino-acides (acide D.aspartique, acide D.glutamique, L.tyrosine et L.sérine) diminue la stimulation observée. Le pyrophosphate inhibiteur de la synthèse de la gramicidine S stimule la synthèse de la mycobacilline in vitro.

La nature et les propriétés des systèmes polyenzymatiques qui catalysent les réactions de polymérisation ne sont pas encore bien connues.

#### g) Synthèse des polymyxines et colistines

Les polymyxines sont synthétisées par Bacillus polymyxa et les colistines par Bacillus colistinus. Les circulines sont des antibiotiques structurellement très voisins des polymyxines et des colistines. Ces antibiotiques sont des décapeptides cycliques ramifiés liés à un résidu d'acide gras. La figure 7 page 30 donne la structure de la colistine B.

Une synthèse acellulaire des colistines A et B a été réalisée en utilisant des extraits solubles de Bacillus colistinus et un mélange d'incubation contenant l'acide gras lié sur l'azote  $\alpha$  de l'acide diamino butyrique, la thréonine, la leucine, de l'ATP et des ions magnésium. Le système enzymatique n'est sensible ni aux ribonucléases ni aux inhibiteurs de la synthèse protéique.

.../...

#### IV - ETUDE DE MUTANTS

Les mutants ont très souvent fourni des moyens d'investigation des mécanismes de la biosynthèse des antibiotiques et de détermination du contrôle génétique de la formation des métabolites. Ainsi des mutants ont été obtenus qui étaient incapables de synthétiser certains antibiotiques peptidiques (pour Bacillus brevis dans le cas de la gramicidine S (41, 42), pour Bacillus licheniformis dans le cas de la bacitracine (43), pour Bacillus polymyxa dans le cas de la polymyxine (44), et pour Bacillus subtilis dans le cas de la mycobacilline (45)).

Certains de ces mutants ont des déficiences dans les gènes structuraux tandis que d'autres sont affectés dans les sites régulateurs du génome qui contrôle la formation des synthétases des antibiotiques.

Ainsi K. TAKETA et al ont isolé des mutants des butirosines et la synthèse de ces antibiotiques dans différents milieux de culture a été étudiée (46, 47, 48, 49).

Plus récemment, la biosynthèse des polymyxines par Bacillus polymyxa a également été étudiée à l'aide de mutants (12).

N. VASANTHA et al ont montré que des mutants qui ne produisent pas de polymyxines sont bloqués au stade 0 de la sporulation. Dans les souches parentes, au cours des stades précoces de la synthèse de polymyxine, on observe (a) une incorporation des acides aminés précurseurs dans une fraction acido-précipitable en absence de synthèse protéique (b) la présence des enzymes d'activation des acides aminés constitutifs et (c) l'association de polymyxine que l'on peut doser par son activité antibiotique dans les fractions de membranes purifiées.

Dans les souches mutantes, on note l'absence d'un ou plusieurs enzymes d'activation des acides aminés.

.../...

V - ROLE POSSIBLE DES ANTIBIOTIQUES SUR LES SOUCHES PRODUCTRICES

Beaucoup d'hypothèses ont été émises sur le rôle des antibiotiques. Certaines hypothèses ont été définitivement exclues (ils seraient des reliques d'évolution ou des déchets du métabolisme). Une hypothèse qui peut être retenue est que les souches produisant un antibiotique auraient un avantage de compétition en tuant les autres microorganismes dans la nature (50). Une variante de cette hypothèse de compétition fait intervenir l'excrétion de l'antibiotique au cours de la germination des spores.

Parmi les différentes fonctions possibles des antibiotiques, celle qui a retenu le plus souvent l'attention des auteurs au cours des dernières années est que les antibiotiques seraient des composés qui joueraient un rôle important au cours de la différenciation cellulaire, par exemple au cours de la phase de transition des cellules végétatives en spores (51, 52, 53).

Très récemment, H. RISTOW et H. PAULUS (54) ont montré que dans des conditions de privation très sévères en source d'azote, Bacillus brevis ATCC 8185 était incapable de sporuler si on ne lui apportait pas l'antibiotique qu'il synthétise, la tyrocidine. L'induction de la sporulation est spécifique de la tyrocidine et s'accompagne des événements spécifiques typiques de la sporulation (production de protéases extracellulaires et synthèse de dipicolinate).

Dans le cas de Bacillus brevis, producteur de gramicidine S, W. DANDERS et M.A. MARHIEL (55) ont étudié la relation entre l'inhibition de la synthèse précoce de RNA au cours de la germination des spores du bacille producteur et la régulation de la croissance en présence de gramicidine S. Leur étude de la transcription in vitro avec la RNA polymérase de spores exclut un effet de la gramicidine S sur la biosynthèse de novo de RNA et suggère que l'antibiotique est actif au niveau du transport.

.../...

## VI - REMARQUES ET CONCLUSIONS

Il est maintenant évident que la biosynthèse des antibiotiques de Bacillus est dirigée par un système multienzymatique qui implique des liaisons avec un atome de soufre. Les acides aminés utilisés comme substrat pour la synthèse des antibiotiques sont activés par l'ATP pour former des complexes enzyme-amino-acyladénylates. La moitié aminoacyl est alors transférée sur un accepteur secondaire. Les t-RNA, m-RNA et les ribosomes ne sont pas directement impliqués dans cette synthèse.

Peu de progrès ont été réalisés pour déterminer la (les) fonction(s) des antibiotiques dans les souches productrices. On pense qu'ils ont effectivement une fonction et qu'ils sont synthétisés dans la nature spécialement dans des microenvironnements contenant de la matière organique. Il est impossible que tous les antibiotiques jouent le même rôle.

Une question reste entière : "Si l'antibiotique ne fait pas obligatoirement partie de la sporulation, pourquoi production d'antibiotique et sporulation sont-elles si souvent liées ?".

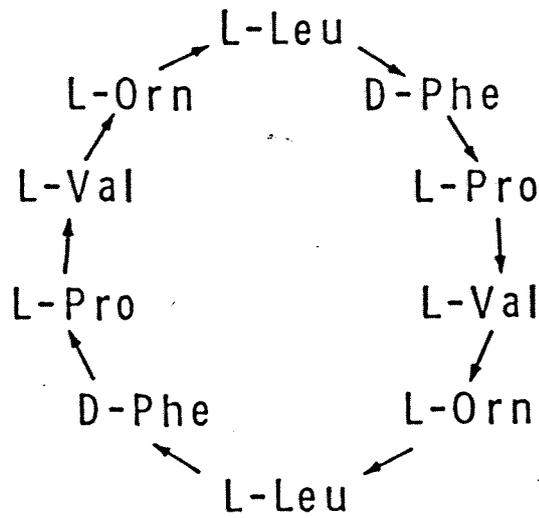


FIG. 1. Gramicidin S.

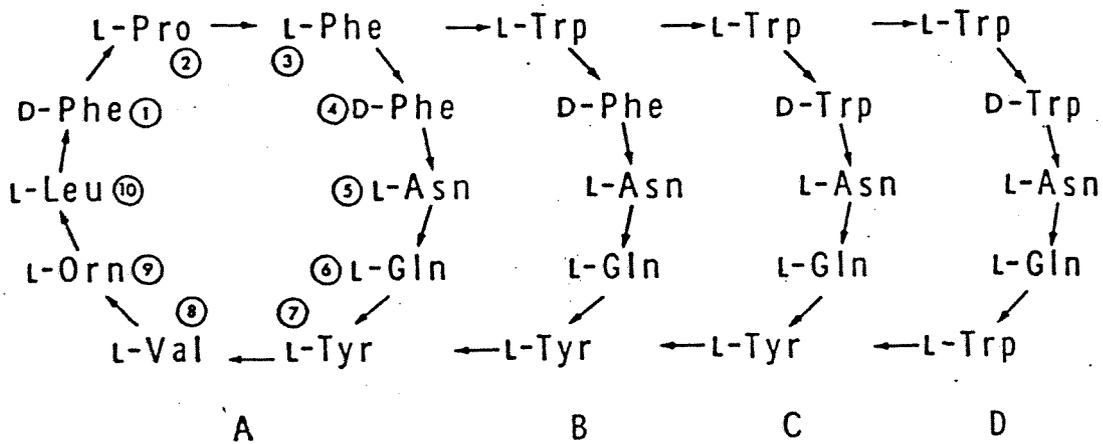


FIG. 2. Amino acid sequence of tyrocidines A, B, C, and D. The left half sequences, omitted in the diagrams of tyrocidines B, C, and D, are identical to that of tyrocidine A.

COMPOSITION OF GRAMICIDIN

Compd.	Positions														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
I	<u>Valine-gramicidin A:</u>														
	HCO-L-Val-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH														
II	<u>Isoleucine-gramicidin A:</u>														
	HCO-L-Ileu-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH														
III	<u>Valine-gramicidin B:</u>														
	HCO-L-Val-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Phe-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH														
IV	<u>Isoleucine-gramicidin B:</u>														
	HCO-L-Ileu-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Phe-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH														
V	<u>Valine-gramicidin C:</u>														
	HCO-L-Val-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Tyr-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH														
VI	<u>Isoleucine-gramicidin C:</u>														
	HCO-L-Ileu-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Tyr-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH														

FIG. 3. Composition of linear gramicidins A, B, and C.

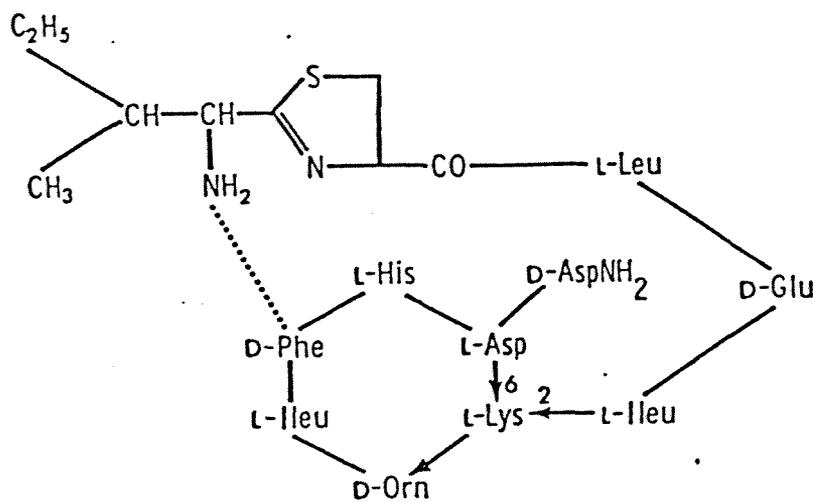


FIG. 4. Bacitracin A.

EDEINE

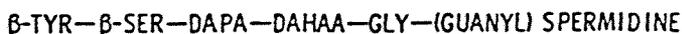


FIG. 5. Structure of edeine A and B. Abbreviations:  $\beta$ -TYR,  $\beta$ -tyrosine;  $\beta$ -SER,  $\beta$ -serine (isoserine); DAPA, diaminopropionic acid; DAHAA, diaminohydroxyazelaic acid; GLY, glycine. In edeine B, guanylspermidine substitutes for spermidine present in edeine A.

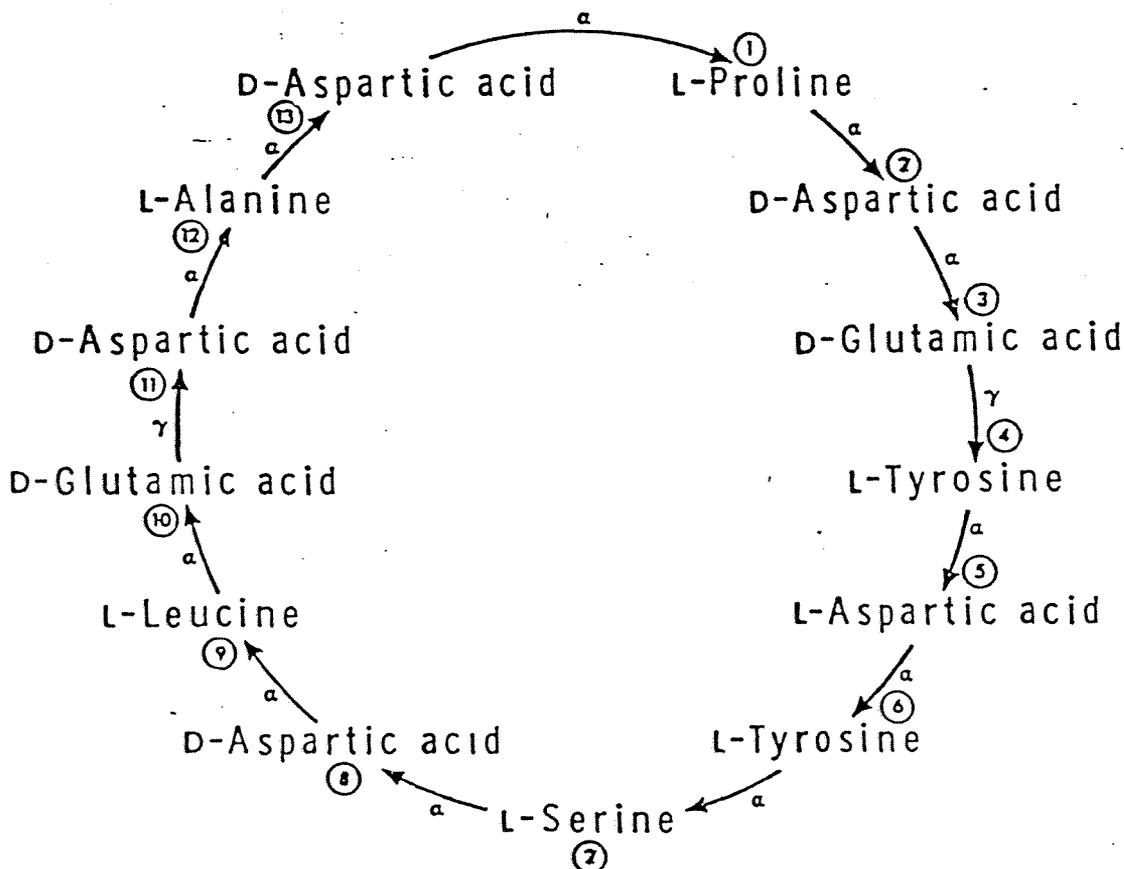


FIG. 6-. Structure of mycobacillin.

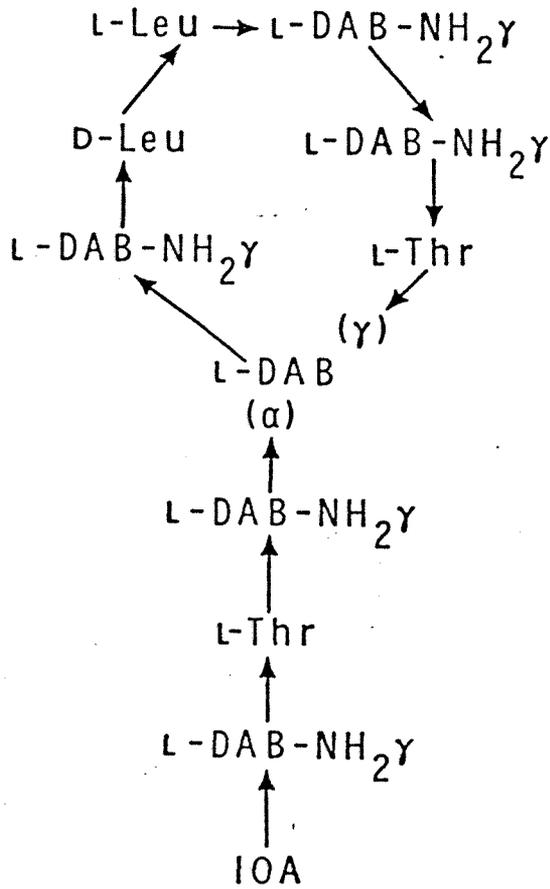


FIG. -7- Structure of colistin B. Abbreviations: IOA, isooctanoic acid; DAB, diaminobutyric acid; Thr, threonine; Leu, leucine. In colistin A, the fatty acid present is 6-methyloctanoic acid.

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) - CHAMBERS, S.O., et WEIDMAN, F.D. (1928). Arch. Derm. and Syph. 18-568.
- (2) - KATZ, E., et DEMAIN, A.L. (1977). Bacteriol. Rev. 41-449-474.
- (3) - BERDY, J. (1974). Adv. Appl. Microbiol. 18-309-406.
- (4) - DEMAIN, A.L. (1972). J. Appl. Chem. Biotechnol. 22-345-362.
- (5) - HANLON, G.W et HODGES, N.A (1981). J. Bacteriol. 147-427-431.
- (6) - HAAVIK, H.I. (1979) Folia Microbiol. 24-234-239.
- (7) - HAAVIK, H.I. (1981). FEMS microbiol. LETT. 10-111-114.
- (8) - NIMI, O. et DEMAIN, A.L. (1981). J. Antibiotics 34-255-257.
- (9) - POIRIER, A. et DEMAIN, A.L. (1981). Antimicrob. Agents Chemother. 20-508-514.
- (10) - NIMI, O., KUBOTA, H. et SUGIYAMA, M. (1982). J. Antibiotics 35-615-621.
- (11) - SRINIVASA, B.R. et RAMACHANDRAN, L.K. (1979). J. Scient. Ind. Res. 38-695-709.
- (12) - VASANTHA, N., BALAKRISHNAN, R., KAUR, S. et JAYARAMAN, K. (1980). Arch. Biochem. Biophys. 200-40-44.
- (13) - MATSUHASHI, Y., SAWA, T., KONDO, S. et TAKEUCHI, T. (1977). J. Antibiotics 30-435-437.
- (14) - VITKOVIC, L.J. et SADOFF, H.L. (1977). J. Bacteriol. 31-891-896.
- (15) - ROSKOSKI, R, Jr., KLEINKAUF, H., GEVERS, W. et LIPMANN, F. (1970). Biochemistry 9-4846-4851.
- (16) - GEVERS, W, KLEINKAUF, H. et LIPMANN, F. (1968). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60-269-276.
- (17) - GEVERS, W, KLEINKAUF, H. et LIPMANN, F. (1969). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63-1335-1342.
- (18) - TOMINO, S., YAMADA, M., ITOH, H. et KURAHASHI, K. (1967). Biochemistry 6-2552-2560.
- (19) - YAMADA, M. et KURAHISHI, K. (1968). J. Biochem. 63-59-69.
- (20) - YAMADA, M, TOMINO, S. et KURAHASHI, K. (1964). J. Biochem. 56-616-618.
- (21) - KLEINHAUF, H., GEVERS, W et LIPMANN, F. (1969). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62-226-233.
- (22) - GADOW, A., VATER, J., SCHLUMBOHM, W., PALACZ, Z., SALNIKOW, J. et KLEINKAUF, H. (1983). Eur. J. Biochem. 132-229-234.
- (23) - FRIEBEL, T.E. et DEMAIN, A.L. (1977). J. Bacteriol. 130-1010-1016.

.../...

- (24) - KURAHASHI, K. (1974). Annu. Rev. Biochem. 43-445-449.
- (25) - LIPMANN, F. (1971). Science 173-875-884.
- (26) - LIPMANN, F. (1973). Acc. Chem. Res. 6-361-367.
- (27) - LIPMANN, F., GEVERS, W., KLEINKAUF, H. et ROSKOSKI, R. Jr. (1971). Adv. Enzymol. 35-1-34.
- (28) - BAUER, K., ROSKOSKI, R., Jr., KLEINKAUF, H. et LIPMANN, F. (1972). Biochemistry 11-3266-3271.
- (29) - AKERS, H.A., S.G., et LIPMANN, F. (1977). Biochemistry 16-5722-5728.
- (30) - KUBOTA, K. (1982). Biochem. Biophys. Res. Commun. 105-688-697.
- (31) - WEINBERG, E.D. (1967). p 240-253. Dans D. GOTTLIEB and P. SHAW (ed) Antibiotics Springer-Verlag (Berlin).
- (32) - FROYSHOV, O., et LALAND, S.G. (1974). Eur. J. Biochem. 46-235-242.
- (33) - ISHIHARA, H., ENDO, Y., ABE, S. et SHIMURA, K. (1968). FEBS. LETT. 50-43-46.
- (34) - SHIMURA, K., SASAKI, T. et SUGAWARA, K. (1964). Biochim. Biophys. Acta. 86-46-55.
- (35) - SIMLOT, M.M., PFAENDER, P. et SPECHT, D. (1973). FEBS. LETT. 35-231-235.
- (36) - FROYSHOV, O. (1974). FEBS. LETT. 44-75-78.
- (37) - VITKOVIC, L. et SADOFF, H.L. (1977). J. Bacteriol. 131-897-905.
- (38) - KURYLO-BOROWSKA, Z. et SEDKOWSKA, J. (1974). Biochim. Biophys. Acta 351-42-56.
- (39) - SENGUPTA, S. et BOSE, S.k. (1971). Biochim. Biophys. Acta 237-120-122.
- (40) - SENGUPTA, S. et BOSE, S.K. (1972). Biochem. J. 128-47-52.
- (41) - KAMBE, M., IMAE, Y. et KURAHASHI, K. (1974). J. Biochem. 75-481-493.
- (42) - SHIMURA, K., IWAKI, M., KANDA, M., HORI, K., KAJI, E., HASEGAWA, S. et SAITO, Y. (1974). Biochim. Biophys. Acta. 338-577-587.
- (43) - HAAVIK, H.I., et FROYSHOV, O. (1975). Nature (London) 254-79-82.
- (44) - JAYARAMAN, K., MONTEAL, J. et PAULUS, H. (1969). Biochim. Biophys. Acta 185-447-457.
- (45) - RAY, B. et BOSE, S.K. (1971). J. Gen. Appl. Microbiol. 17-491-498.

.../...

- (46) - TAKEDA, K., KINUMAKI, A., FURUMAI, T., YAMAGUCHI, T., OHSHIMA, S. et ITO, Y. (1978). J. Antibiotics 31-247-249.
- (47) - TAKEDA, K., OKUNO, S., OHASHI, Y. et FURUMAI, T. (1978). J. Antibiotics 31-1023-1030.
- (48) - TAKEDA, K., AIHARA, K., FURUMAI, T. et ITO, Y. (1979). J. Antibiotics 32-18-28.
- (49) - FURUMAI, T., TAKEDA, K., KINUMAKI, A., ITO, Y. et OKUDA, T. (1979). J. Antibiotics 32-891-899.
- (50) - GOTTLIEB, D. (1976). J. Antibiotics 29-987-1000.
- (51) - HODGSON, B. (1970). J. Theor. Biol. 30-111-119.
- (52) - SADOFF, H.L. (1972). pages 157-166 dans H.O. HALVORSON, R. HANSEN et L.L. CAMPBELL (ed) Spores V American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- (53) - SCHAEFFER, P. (1969). Bacteriol. Rev. 33-48-71.
- (54) - RISTOW, H. et PAULUS, H. (1982). Eur.J.Biochem. 129-395-401.
- (55) - DANDERS, W. et MARHIEL, M.A. (1981). FEMS Microbiol. LETT. 10-277-283.

