

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

11 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 570 390

21 N° d'enregistrement national :

85 13637

51 Int Cl<sup>\*</sup> : C 12 P 17/08; A 01 N 43/24; A 61 K 31/35;  
C 07 D 493/22 // (C 12 P 17/08, C 12 R 1:465).

12

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 13 septembre 1985.

30 Priorité : GB, 14 septembre 1984, n° 8423278 et 21 décembre 1984, n° 8432519.

43 Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 12 du 21 mars 1986.

60 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

71 Demandeur(s) : Société dite : GLAXO GROUP LIMITED.  
— GB.

72 Inventeur(s) : John Barrie Ward, Hazel Mary Noble, Neil Porter, Richard Alan Fletton et David Noble.

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire(s) : Cabinet Lavoix.

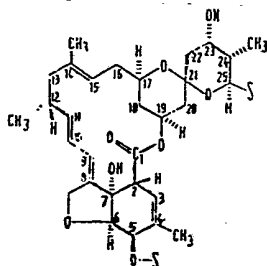
54 Nouveaux composés antibiotiques et procédé de préparation.

57 L'invention concerne des composés antibiotiques et leur préparation.

Les composés répondent à la formule I.

Ces composés peuvent posséder un groupe 5—OH ou —OMe et, en position 25, un radical isopropylène à substitution méthylique, éthylique ou isopropylique.

Ces composés conviennent en agriculture ou en médecine comme substances antiparasitaires et se préparent par la culture de souches de *Streptomyces*, plus particulièrement de *Streptomyces thermoarchaensis* NCIB 12015.



FR 2 570 390 - A1

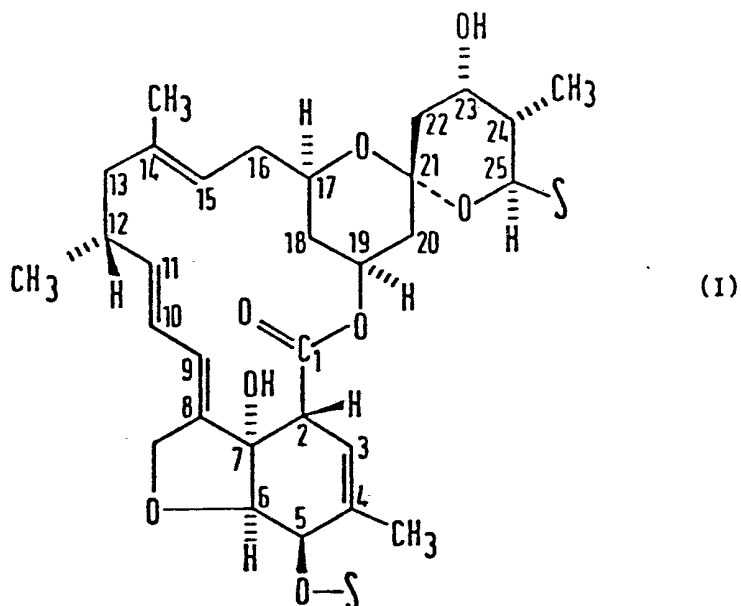
D

La présente invention concerne de nouveaux composés antibiotiques et des procédés de préparation de ces substances. De manière plus particulière, l'invention concerne des composés antibiotiques que l'on peut obtenir par  
5 la fermentation d'organismes du genre Streptomyces.

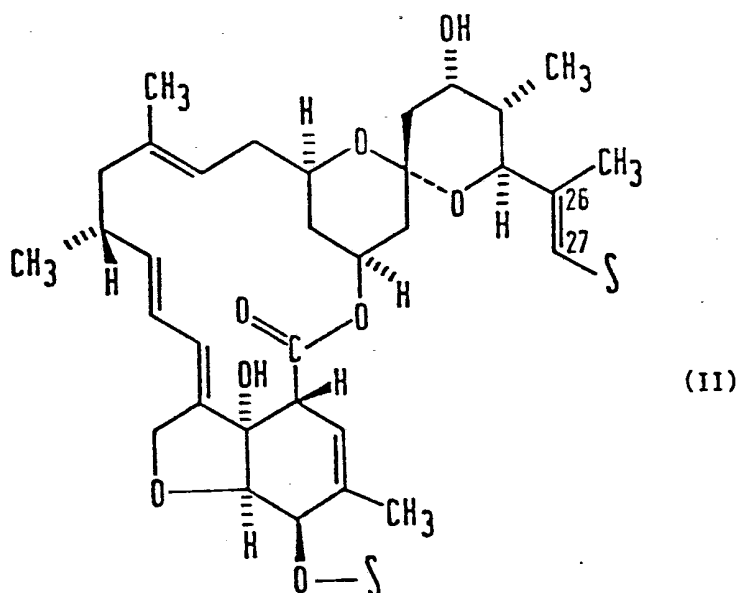
Suivant l'un de ses caractéristiques, la présente invention a pour objet une nouvelle classe de substances que la demanderesse a appelé Antibiotiques S541 et que l'on peut préparer en faisant croître une souche d'un micro-  
10 organisme non encore antérieurement décrite, dans des conditions réglées. Les Antibiotiques S541 possèdent une activité antibiotique et, plus particulièrement, une activité anti-endoparasite, anti-ectoparasite, antifongique, insecticide, nématocide et acaricide et leur utilisation  
15 pour l'agriculture, l'horticulture, la santé animale et humaine, présente un intérêt spécial. On peut également employer les composés à titre d'intermédiaires pour la préparation d'autres composés actifs. On peut obtenir les substances par fermentation et les récupérer sous une for-

me sensiblement pure de la manière décrite dans le présent mémoire.

Les Antibiotiques S541 constituent un groupe de composés apparentés répondant à la formule partielle (I) :



plus particulièrement, la formule partielle (II)



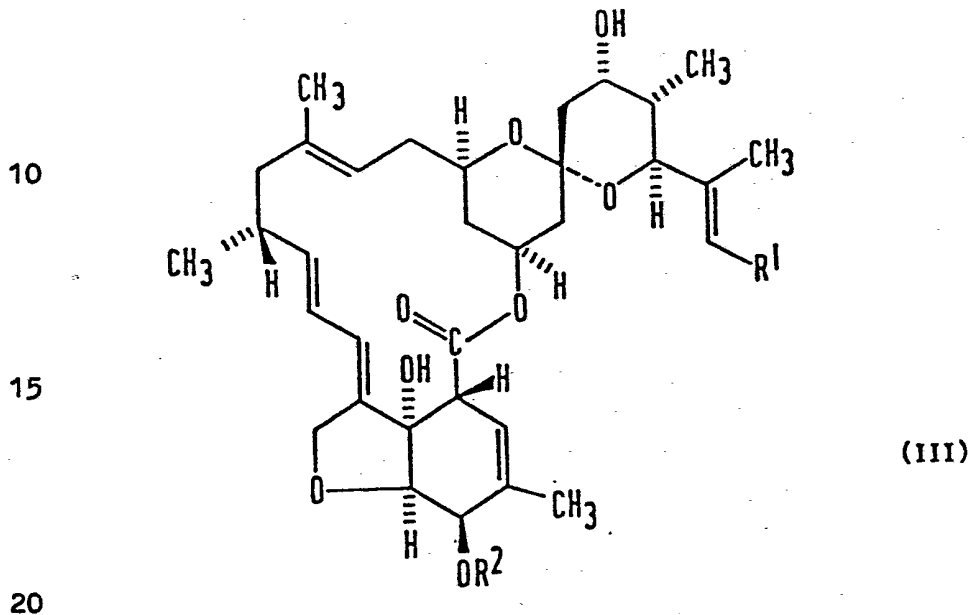
Six composés répondant à la formule partielle (II) seront décrits de manière plus particulière dans la suite du présent mémoire. La présente invention concerne les composés qui répondent aux formules partielles sus-  
5 mentionnées, tant individuellement qu'en combinaison. Pour certaines utilisations, par exemple en agriculture ou en horticulture, ou en médecine vétérinaire, il peut encore se révéler commode d'utiliser les Antibiotiques S541 sans  
10 séparation en leurs composants individuels, mais, à d'autres fins, par exemple en médecine humaine, il peut être préférable de faire appel aux composés individuels. La portée de la présente invention s'étend par conséquent aussi à un composé suivant l'invention lorsqu'il se trouve en mélange à au moins un autre composé suivant l'in-  
15 vention, comme aussi aux composés individuels, par exemple, sous forme sensiblement pure, ou sensiblement en l'absence d'autres substances du type des macrolides.

Les Antibiotiques S541 tels qu'initialement isolés, peuvent être aisément séparés par chromatographie sur silice de la manière décrite dans la suite du présent mé-  
20 moire, en deux composants possédant une activité antibiotique, par exemple anthelminthique et qui éteignent la fluorescence U.V. à 254 nm. Le composant I se caractérise par une valeur Rf qui fluctue de 0,70 à 0,75 et le compo-  
25 sant II se caractérise par une valeur Rf qui fluctue de 0,39 à 0,46, les valeurs Rf étant déterminées par chromatographie en couche mince sur des plaques de silice 60 Merck 5735, en procédant à l'élution avec un mélange de chloroforme et d'acétate d'éthyle (3 : 1). Les composants  
30 I et II (dans lesquels R<sup>2</sup> représente respectivement -CH<sub>3</sub> et -H) des Antibiotiques S541 forment une caractéristique supplémentaire de la présente invention.

Les composants I et II peuvent eux-mêmes être d'avantage purifiés et ont engendré 6 composés de la formule

partielle (I) possédant une activité antibiotique, par exemple anthelminthique. Par conséquent, suivant une autre de ses caractéristiques, la présente invention a pour objet des composés de la formule générale (III) :

5



20

dans laquelle R<sup>1</sup> représente un radical méthyle, éthyle ou isopropyle et R<sup>2</sup> représente un atome d'hydrogène ou le radical méthyle.

25

La demanderesse a appelé les 6 composés de la formule (III) facteur A (R<sup>1</sup> = isopropyle, R<sup>2</sup> = hydrogène), facteur B (R<sup>1</sup> = méthyle, R<sup>2</sup> = méthyle), facteur C (R<sup>1</sup> = méthyle, R<sup>2</sup> = hydrogène), facteur D (R<sup>1</sup> = éthyle, R<sup>2</sup> = hydrogène), facteur E (R<sup>1</sup> = éthyle, R<sup>2</sup> = méthyle) et facteur F (R<sup>1</sup> = isopropyle, R<sup>2</sup> = méthyle). On préfère tout particulièrement les facteurs A et C.

30

On obtient les facteurs B, E et F à partir du composant I, alors que les facteurs A, C et D s'obtiennent à par-

tir du composant II.

Les composés conformes à la présente invention possèdent une activité antibiotique, par exemple une activité anthelminthique, plus particulièrement contre des nématodes et, plus spécialement, une activité anti-endoparasite et anti-ectoparasite. Plus généralement, les composés sont intéressants pour combattre des parasites tels que les ectoparasites et les endoparasites. Les ectoparasites et les endoparasites infectent les êtres humains et toute une série d'animaux et prévalent tout particulièrement chez les animaux des fermes, comme les porcs, les moutons, le bétail, les chèvres et la volaille, les chevaux et les animaux domestiques, comme les chiens et les chats. L'infection du cheptel vivant par des parasites, conduisant à une anémie, une malnutrition et une perte de poids, est une cause majeure d'une importante perte économique de par le monde.

A titre d'exemples de genres d'endoparasites qui infectent les animaux précités et/ou les êtres humains, on peut citer les suivants :

Ancylostoma, Ascaridia, Ascaris, Aspicularis,  
Bunostomum, Capillaria, Chabertia, Cooperia, Dictyocaulus,  
Dirofilaria, Enterobius, Haemonchus, Heterakis, Necator, Nematodirus,  
Nematospiroides, Nippostrongylus, Oesophagostomum, Ostertagia,  
Oxyuris, Parascaris, Strongylus, Strongyloides, Syphacia, Toxascaris,  
Toxocara, Trichonema, Trichostrongylus, Trichinella, Trichuris, and  
Uncinaria.

A titre d'exemples d'ectoparasites infectant les animaux et/ou les êtres humains, on peut citer des ectoparasites du type des arthropodes, comme les insectes à morsures, la lucilie, les puces, les poux, les mites, les insectes suceurs, les tiques et d'autres insectes nuisi-

bles diptères.

A titre d'exemples de genres d'ectoparasites qui infectent les animaux et/ou les êtres humains, on peut citer ceux qui suivent :

- 5                                    Ambylomma, Boophilus, Coroptes, Culliphore, Damodex,  
Damolonia, Gastrophilus, Haematobia, Haematopinus, Haemophysalis,  
Hyalomma, Linognathus, Lucilia, Melophyqus, Oestrus, Psorergates,  
Psoroptes, Rhipicephalus, Sarcoptes and Stomoxys.

10                                    Les composés suivant la présente invention se sont  
révélés être efficaces, tant in vitro qu'in vivo, contre  
toute une gamme d'endoparasites et d'ectoparasites. De  
manière plus particulière, la demanderesse a constaté  
que les composés conformes à la présente invention étai-  
ent actifs contre des nématodes parasites, tels que ceux  
15                                    qui suivent : Haemonchus contortus, Ostertagia circumcincta,  
Trichostrongylus colubiformis, Dictyocaulus viviparis,  
Cooperia oncophora, Ostertagia ostertagi et Nippostrongylus braziliensis, ainsi que des mites parasites,  
comme Sarcoptes sp. et Psoroptes sp.

20                                    Les composés conformes à la présente invention sont  
par conséquent intéressants pour le traitement des animaux  
et des êtres humains présentant des infections endoparasitiques et/ou ectoparasitiques.

25                                    L'espèce du parasite varie en fonction de l'hôte et  
du site ou endroit prédominant de l'infection. Ainsi, par  
exemple, les organismes nuisibles Haemonchus contortus,  
Ostertagia circumcincta et Trichostrongylus colubiformis  
infectent généralement les moutons et se logent, de ma-  
nière prédominante, dans l'estomac et l'intestin grêle,  
30                                    tandis que Dictyocaulus viviparus, Cooperia oncophora et  
Ostertagia ostertagi infectent généralement le bétail et  
se logent de manière, prédominante, dans les poumons, les

intestins ou l'estomac respectivement.

Au surplus, on a constaté que les composés suivant la présente invention possédaient une activité antifongique, par exemple, contre des souches de Candida sp. comme Candida albicans et Candida glabrata et contre des levures, comme Saccharomyces carlsbergensis.

On a également constaté que les composés suivant la présente invention étaient actifs contre le nématode vivant libre Caenorhabditis elegans.

On a également constaté que les composés suivant la présente invention étaient efficaces pour combattre des organismes nuisibles appartenant aux insectes, aux acariens et aux nématodes, dans le domaine agricole, horticole, forestier, de la santé publique et des produits emmagasinés. On peut traiter utilement des parasites ou organismes nuisibles du sol et des récoltes végétales, y compris les céréales (par exemple le blé, l'orge, le maïs et le riz), les légumes (par exemple le soja), les fruits (par exemple les pommes, les raisins et les citruses), comme aussi les récoltes à racines ou tubercules (par exemple betterave sucrière, pomme de terre).

De manière plus particulière encore, la demanderesse a découvert que les composés suivant la présente invention étaient actifs, contre par exemple, des aphides et des mites des fruits, tels que les suivants : Aphis fabae, Aulacorthum circumflexum, Myzus persicae, Nephotettix cincticeps, Nilparvata lugens, Panonychus ulmi, Phorodon humuli, Phyllocoptruta oleivora, Tetranychus urticae et des membres des genres Trialeuroides; des nématodes, comme des membres des genres Aphelencoides, Globodera, Heterodera, Meloidogyne et Panagrellus; des lépidoptères, tels que Heliothis, Plutella et Spodoptera; des charençons du grain, comme Anthonomus grandis et Sitophilus granarius; des ténébrions, tels que Iribolium castaneum;



des mouches, comme Musca domestica; des fourmis du genre solénopsis; des adèles; Pear psylla; Thrips tabaci; des blattes comme Blatella germanica et Periplaneta americana et des moustiques comme Aedes aegypti.

5           La présente invention a par conséquent pour objet des composés répondant à la formule partielle (I) telle que précédemment définie, que l'on peut utiliser à titre d'antibiotiques. De manière plus particulière, on peut  
10           utiliser ces substances pour le traitement d'animaux et d'êtres humains infestés d'endoparasites, d'ectoparasites et/ou à infestations fongiques et également dans la domaine agricole, horticole ou forestier, à titre de pesticides, pour combattre des insectes, des acariens et des  
15           nématodes nuisibles. On peut également les utiliser de manière générale comme pesticides pour combattre ou maîtriser le développement d'organismes nuisibles en d'autres circonstances, par exemple dans les magasins, les immeubles ou d'autres pièces publiques ou endroits où se logent les organismes nuisibles en question. En général, on  
20           peut appliquer les composés soit à l'hôte (animal ou être humain ou plante ou tout autre végétation) ou aux organismes nuisibles ou à leur biotope. On préfère particulièrement les facteurs A, B, C, D, E et F tels que précédemment définis. On peut présenter les composés suivant  
25           l'invention sous forme de compositions convenant à l'administration de toute manière commode pour l'usage en médecine humaine ou en médecine vétérinaire et, par conséquent, l'invention a également pour objet des compositions pharmaceutiques qui comprennent un composé suivant  
30           l'invention adapté à l'usage en médecine humaine ou en médecine vétérinaire. Les compositions de ce genre peuvent être présentées pour l'usage d'une manière classique à l'aide d'un ou de plusieurs excipients ou véhicules appropriés.

Les compositions suivant la présente invention englobent celles qui se présentent sous une forme spécialement destinée à l'administration par la voie parentérale (y compris l'administration intramammaire), orale, 5 rectale, topique ou sous forme d'implant. Lorsqu'on l'incorpore à une composition dont on exige qu'elle soit stérile, par exemple des injections (y compris des préparations intramammaires), des collyres ou gouttes ophtalmiques, des pommades et des implants, l'ingrédient actif 10 doit lui-même être fabriqué de manière aseptique ou stérilisé après sa fabrication par mise en oeuvre de procédés comme une irradiation par des rayons gamma ou une exposition à l'oxyde d'éthylène.

On peut présenter les composés conformes à l'invention sous une forme convenant à l'usage en médecine vétérinaire ou en médecine humaine par injection et on peut 15 les présenter sous la forme de doses unitaires, dans des ampoules, ou dans d'autres récipients contenant des doses unitaires, ou encore dans des récipients qui en contiennent des doses multiples, avec un conservateur additionnel si cela se révèle nécessaire. Les compositions destinées à l'injection peuvent se présenter sous la forme 20 de suspensions, de solutions ou d'émulsions dans des véhicules huileux ou aqueux et peuvent contenir des agents de mise en composition, comme des agents de mise en suspension, de stabilisation, de solubilisation et/ou de dispersion. L'ingrédient actif peut aussi se présenter sous 25 la forme d'une poudre stérile destinée à être ajoutée à un véhicule stérile en vue de la reconstitution du médicament avant son emploi, par exemple de l'eau apyrogène, stérile. Comme véhicules huileux, on peut citer des alcools polyhydroxylés et leurs esters, comme des esters de glycérol, des acides gras, des huiles végétales, comme 30 l'huile d'arachide ou l'huile de graines de coton,

des huiles minérales, comme la paraffine liquide et l'oléate d'éthyle et d'autres composés similaires. On peut également utiliser d'autres véhicules, comme le propylène glycol. On peut également présenter les compositions destinées à l'usage en médecine vétérinaire sous la forme de préparations intramammaires dans des bases à libération prolongée ou à libération rapide de la substance médicamenteuse et elles peuvent se présenter sous la forme de suspensions ou de solutions stériles dans des véhicules aqueux ou huileux. Les véhicules huileux peuvent être, par exemple, ceux décrits plus haut et peuvent également contenir un agent de mise en suspension ou un agent épaississant, comme des paraffines molles ou dures, la cire d'abeille, la 12-hydroxy-stéarine, l'huile de ricin hydrogénée, des stéarates d'aluminium, ou le monostéarate de glycéryle. On peut incorporer des agents tensioactifs non ioniques, cationiques ou anioniques, classiques, seuls ou en combinaison, à la composition.

Les composés conformes à la présente invention peuvent également se présenter pour l'usage en médecine humaine ou en médecine vétérinaire, sous une forme qui convient à l'administration par la voie orale, par exemple sous la forme de solutions, de sirops ou de suspensions, ou sous la forme d'une poudre sèche destinée à être incorporée à de l'eau ou à tout autre véhicule en vue de la reconstitution du médicament avant son emploi, éventuellement avec addition d'agents colorants et de sapidité. On peut également utiliser des compositions solides, comme des comprimés, des gélules, des pilules, des pastilles, des bols, des poudres, des pâtes ou des granules.

Les compositions solides et liquides destinées à l'administration par la voie orale peuvent se préparer selon des procédés bien connus des spécialistes de la technique. Des compositions de ce genre peuvent également contenir un ou plusieurs excipients et/ou véhicules pharma-

ceutiquement acceptables qui peuvent se trouver sous forme solide ou liquide. A titre d'exemples de véhicules ou excipients pharmaceutiquement acceptables, appropriés à l'emploi sous forme de doses solides, on peut citer des  
5 liants (par exemple amidon de maïs prégélatinisé, polyvinylpyrrolidone ou hydroxypropylméthylcellulose); des charges (par exemple lactose, cellulose microcristalline ou phosphate de calcium); des lubrifiants (par exemple stéarate de magnésium, talc ou silice); des agents de  
10 désintégration (par exemple amidon de pomme de terre ou glycolate d'amidon sodique); ou des agents mouillants (par exemple laurylsulfate de sodium). Les comprimés peuvent être enrobés par mise en oeuvre de procédés bien connus des spécialistes de la technique. Comme exemples d'  
15 additifs pharmaceutiquement acceptables, appropriés à l'usage sous des formes de dosage liquides, on peut citer des agents de mise en suspension (par exemple sirop de sorbitol, méthylcellulose ou graisses comestibles hydrogénées); agents émulsifs (par exemple lécithine ou gomme  
20 d'acacia); véhicules non aqueux (par exemple l'huile d'amande, esters huileux ou alcool éthylique); et des conservateurs (par exemple p-hydroxybenzoates de méthyle ou de propyle ou acide sorbique); des agents de stabilisation et de solubilisation pouvant également être incorporés  
25 aux compositions en question.

On peut préparer des pâtes destinées à l'administration par la voie orale par mise en oeuvre de procédés bien connus des spécialistes de la technique. A titre d'exemples d'additifs pharmaceutiquement acceptables appropriés  
30 que l'on peut utiliser dans des compositions de pâte, on peut citer des agents de mise en suspension ou de gélification, par exemple distéarate d'aluminium ou huile de ricin hydrogénée; agents dispersants, par exemple polysorbates, véhicules non aqueux, par exemple huile d'

arachide ou esters huileux; agents de stabilisation et de solubilisation. Les composés suivant la présente invention peuvent également s'administrer en médecine vétérinaire en les incorporant à la nourriture solide ou  
5 liquide quotidienne des animaux, par exemple comme composants de l'alimentation quotidienne de l'animal ou de son eau de boisson.

Aux fins d'administration par la voie buccale, les compositions peuvent prendre la forme de comprimés, de  
10 pâtes ou de pastilles que l'on fabrique et présente de manière classique.

On peut également administrer les composés suivant la présente invention par la voie orale en médecine vétérinaire sous la forme d'une potion liquide qui se présente, par exemple, comme une solution, suspension ou dispersion de l'ingrédient actif en association avec un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable.  
15

Les composés suivant l'invention peuvent également se présenter sous la forme de suppositoires, par exemple  
20 contenant une base pour suppositoires classique destinée à l'usage en médecine humaine ou en médecine vétérinaire.

Les composés suivant la présente invention peuvent également se présenter sous une forme convenant à l'administration par la voie topique, pour l'usage en médecine humaine et en médecine vétérinaire, comme des pommades,  
25 des crèmes, des lotions, des poudres, des pessaires, des sprays, des bains, des aérosols ou des gouttes (par exemple des gouttes ophtalmiques ou nasales). Les pommades et les crèmes peuvent, par exemple, être composées avec une  
30 base aqueuse ou huileuse en recourant à l'addition d'agents épaississants et/ou gélifiants appropriés. Les pommades destinées à être administrées à l'oeil peuvent se fabriquer d'une manière stérile en utilisant des composants stérilisés.

Des lotions peuvent être composées avec une base aqueuse ou huileuse et contiennent également, en général, un ou plusieurs agents émulsifs, agents stabilisants, agents dispersifs, agents de mise en suspension, agents  
5 épaississants ou agents colorants.

Des poudres peuvent être formées à l'aide de n'importe quelle base pulvérulente appropriée.

Des gouttes peuvent être composées avec une base aqueuse ou non aqueuse et comprennent également un ou plusieurs agents dispersifs, agents stabilisants, agents solubilisants ou agents de mise en suspension. Elles peuvent également contenir un conservateur.  
10

Pour l'administration par la voie topique par inhalation, on peut fournir les composés conformes à la présente invention à des fins destinées à l'usage en médecine vétérinaire ou en médecine humaine, sous la forme d'un spray d'aérosol ou d'un produit destiné à être administré par l'intermédiaire d'un insufflateur.  
15

Les composés suivant la présente invention peuvent s'administrer en combinaison à d'autres ingrédients pharmaceutiquement actifs. Les doses quotidiennes totales des composés suivant l'invention que l'on utilise tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire, varient dans la gamme de 1 à 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de poids corporel, de préférence de 10 à 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de poids corporel, plus avantageusement encore de 100 à 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de poids corporel et peuvent s'administrer en doses subdivisées, par exemple de 1 à 4 fois par jour.  
20  
25

On peut présenter les composés conformes à la présente invention de n'importe quelle manière commode pour l'usage en horticulture ou en agriculture et, par conséquent, la portée de la présente invention s'étend également aux compositions comprenant un composé suivant la présente invention, qui sont adaptées à l'usage horticole ou agricole.  
30

Ces compositions comprennent des types secs ou liquides, par exemple des poussières, comprenant des concentrés ou bases pour poussières, des poudres, comprenant des poudres solubles ou mouillables, des granules, y compris des microgranules et des granules dispersibles, des bou-  
5  
10  
15  
20  
25  
30  
lettes ou des grains, des produits fluides, des émulsions, comme des émulsions diluées ou des concentrés émulsifiables, des bains, comme des bains pour racines et des bains pour semences, des apprêts pour semences, des grains ou boulettes pour semences, des concentrés d'huile, des solutions d'huile, des injections, par exemple des injections pour souches, des sprays, des fumées et des brouillards.

Généralement, des compositions de ce genre comprennent le composé en association avec un diluant ou véhicule approprié. Ces véhicules peuvent se présenter sous la forme liquide ou solide et être destinés à faciliter l'application du composé, que ce soit en le dispersant à l'endroit où il doit être appliqué, ou que ce soit pour fournir une composition qui peut être transformée par l'utilisateur en une préparation dispersible. Des compositions de ce genre sont bien connues des spécialistes de la technique et peuvent être préparées par mise en oeuvre de procédés classiques, tels que, par exemple, en mélangeant et/ou en broyant le ou les ingrédients actifs en même temps que le véhicule ou le diluant, par exemple le véhicule solide, le solvant ou l'agent tensio-actif.

On peut choisir des véhicules solides appropriés à la confection de compositions comme des poudres, des granulés et des poussières, par exemple, parmi les charges minérales naturelles, comme la terre à diatomées, le talc, la kaolinite, la montmorillonite, la pyrophyllite et l'attapulгите. Si on le souhaite, de l'acide silicique fortement dispersé ou des polymères absorbants fortement dispersés peuvent être incorporés à la composition. Les

véhicules absorbateurs granulés que l'on peut utiliser peuvent être poreux (par exemple pierre ponce, brique pilée, sépiolite ou bentonite), ou non poreux (par exemple calcite ou sable). A titre de matières prégranulées, appropriées que l'on peut utiliser et qui peuvent être de nature organique ou inorganique, on peut citer la dolomie et des résidus de végétaux broyés.

Comme solvants appropriés à utiliser comme véhicules ou diluants, on peut citer des hydrocarbures aromatiques, des hydrocarbures aliphatiques, des alcools et des glycols ou leurs éthers, des esters, des cétones, des amides d'acides, des solvants fortement polaires, l'eau et des huiles végétales éventuellement époxydées.

Les compositions en question peuvent également contenir, seuls ou en combinaison, des agents tensio-actifs non ioniques, cationiques ou anioniques, classiques, par exemple des alcools et des alkylphénols éthoxylés, des sels de métaux alcalins ou de métaux alcalino-terreux d'acides alkylbenzène sulfoniques, d'acides lignosulfoniques ou d'acides sulfosucciniques ou des sulfonates de phénols polymères qui possèdent de bonnes propriétés émulsives, dispersives et/ou mouillantes.

Si on le souhaite, on peut incorporer des stabilisants, des agents antiagglutination, des agents anti-mousses, des agents de régulation de la viscosité, des liants et des additifs, des photostabilisants, comme aussi des agents de fertilisation, des agents de stimulation de l'alimentation ou d'autres substances actives, aux compositions en question. Les composés suivant la présente invention peuvent également entrer dans les compositions appropriées en mélange à d'autres insecticides, acaricides et nématocides.

La concentration en principe actif dans les compositions varie généralement de 0,01 à 99 % et, plus avanta-



geusement, de 0,01 % à 40 %, en poids.

Les produits industriels sont généralement fournis sous la forme de compositions concentrées destinées à être diluées jusqu'à une concentration appropriée du principe actif, par exemple de 0,001 à 0,0001 % en poids, en vue de leur application.

Pour l'usage en horticulture et en agriculture ou pour l'usage en médecine vétérinaire, il peut être souhaitable d'utiliser le bouillon de fermentation entier ou complet, sans séparation en composants ou facteurs, comme source des composés actifs. Il peut convenir d'utiliser le bouillon séché (contenant les mycéliums) ou d'utiliser les mycéliums lysés, des mycéliums vivants ou morts, séparés du bouillon par mise en oeuvre de techniques d'évaporation ou de séparation solide/liquide, ou d'utiliser le bouillon de fermentation qui subsiste après la séparation des mycéliums. Si on le souhaite, les mycéliums peuvent être pasteurisés ou, plus avantageusement, séchés, par exemple par séchage par pulvérisation ou séchage au rouleau. Si on le souhaite, le bouillon ou les mycéliums peuvent être transformés en compositions comprenant des diluants, excipients ou véhicules inertes ou classiques, de la manière précédemment décrite.

Il faut bien comprendre de ce qui précède qu'en général, on peut utiliser les composés conformes à la présente invention pour combattre des infections ou des infestations en appliquant une quantité efficace d'un ou plusieurs des composés précités à l'organisme responsable de l'infection ou de l'infestation ou à l'endroit où il se loge.

Suivant une autre de ses caractéristiques, la présente invention a également pour objet un procédé de production des Antibiotiques S541 ou d'un composant ou facteur de ceux-ci, répondant à la définition précédemment

donnée, caractérisé en ce qu'il comprend l'étape consistant à cultiver un organisme du genre Streptomyces capable de produire au moins l'un des composés suivant l'invention, de manière qu'au moins l'un desdits composés soit produit et, si on le souhaite, à isoler le composé souhaité. L'organisme en est de préférence un qui produit principalement un ou plusieurs composés suivant l'invention.

Sur base d'études taxonomiques, un micro-organisme particulier capable de produire les substances susmentionnées appartient à une nouvelle espèce du genre Streptomyces et a été dénommé Streptomyces thermoarchaensis. Un échantillon de ce micro-organisme, qui est un isolat du sol, a été déposé à la collection permanente de cultures de l'institution britannique dénommée : National Collections of Industrial and Marine Bacteria, Torry Research Station, Aberdeeen, Royaume-Uni et on lui a attribué le numéro d'accès NCIB 12015. Les caractéristiques morphologiques et relatives à la culture du Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12015 sont indiquées dans la suite du présent mémoire et cet organisme, en même temps que d'autres souches de Streptomyces productrices d'Antibiotiques S541, constitue une autre caractéristique de la présente invention. De manière plus particulière, l'invention s'étend à la nouvelle espèce de Streptomyces dont les membres possèdent les mêmes caractéristiques essentielles de morphologie et de culture que Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12015.

La portée de la présente invention s'étend également à n'importe quels composés qui sont susceptibles d'être produits par fermentation de Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12015 et qui sont les isomères optiques des composés de la formule (I).

L'organisme du genre Streptomyces sera de préférence

Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12015 ou un mutant de celui-ci.

Des mutants de Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12015 peuvent surgir spontanément ou peuvent être produits par mise en oeuvre de toute une série de procédés, y compris ceux esquissés dans les techniques pour le développement de micro-organismes par H.I. Adler dans "Radiation and Radioisotopes for Industrial Microorganisms", Proceedings of the Symposium, Vienna 1973, p241, International Atomic Energy Authority. Des procédés de ce genre comprennent un rayonnement ionisant, des procédés chimiques, par exemple le traitement par de la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG), de la chaleur, des techniques génétiques comme la recombinaison, la transduction, la transformation, la lysogénéisation et la conversion lysogénique et des techniques sélectives pour l'obtention de mutants spontanés. Ainsi, par exemple, la demanderesse a obtenu 4 souches mutantes de Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12015 et chacune d'entre elles a été déposée à la collection permanente de cultures de l'institution britannique National Collections of Industrial and Marine Bacteria, Torry Research Station, Aberdeen, Royaume-Uni et on a attribué les numéros d'accès NCIB 12111, NCIB 12112, NCIB 12113 et NCIB 12114 à ces souches. Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12111, 12112, 12113 et 12114 et leurs mutants constituent une caractéristique supplémentaire de la présente invention.

La souche NCIB 12015 a été déposée le 10 Septembre 1984 et les souches NCIB 12111-4 le 20 Juin 1985.

Les souches mutantes NCIB 12111, 12112 et 12113 ont été obtenues par le traitement de spores de Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12015 par de la NTG et ont ensuite été caractérisées par le procédé en une étape de Holliday (R. Holliday (1956) Nature 178 987).

La souche mutante NCIB 12114 surgit par mutation spontanée de Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12015 et fut identifiée comme étant résistante à la streptomycine

après être demeurée viable suite à l'exposition à 100 µg/ml de sulfate de streptomycine à 28°C pendant 5 jours.

Des études taxonomiques indiquent que Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12015 constitue un micro-organisme antérieurement non encore révélé d'une nouvelle espèce dont les caractéristiques sont décrites dans la suite du présent mémoire et sont essentiellement celles de l'espèce comme un tout. Il faut bien comprendre que la portée de l'invention s'étend à tous les membres de cette espèce, y compris n'importe quel organisme possédant des caractéristiques essentielles sensiblement similaires.

Sur les milieux de sporulation préférés, à savoir farine d'avoine gélose, malt-levure gélose et sels inorganiques-amidons gélose (Shirling, E.B. et Gottlieb, D. (1966) Int. J. Syst. Bacteriol. 16, 313-340), Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12015 croît abondamment, produisant un mycélium substrat stable et un mycélium aérien portant des spores en chaînes à spirales ouvertes comme ramifications hors des hyphes principales. Sur ces milieux, la pigmentation de l'envers est jaune/brun et les sporophores sont gris. A un agrandissement centuple, les sporophores contiennent 2 à 5 tours par chaîne avec 5 à 10 spores dans chaque tour de la spirale. En moyenne, les sporophores contiennent entre 20 et 50 spores. La microscopie électronique à balayage avec un agrandissement de 12000 fois révèle que les spores sont à parois lisses et de forme ellipsoïdale avec des dimensions de 0,7 µm x 1,4 µm à leurs points les plus larges. Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12015 est Gram-positif et est capable de croître et de sporuler à des températures qui fluctuent de 20°C à 50°C.

Une comparaison des données susmentionnées à des descriptions publiées dans l'ouvrage de Bergey "Manual

of Determinative Bacteriology (8ème édition) indique que l'organisme Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12015 appartient au genre Streptomyces.

5 L'identification du Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12015 au niveau du groupe d'espèce a été effectuée en utilisant une matrice d'identification associée à un ordinateur, décrite par Williams et coll. (J. Gen. Microbiol (1983) 129, 1815-1830). Les résultats de 41  
10 tests taxonomiques décrits par les auteurs susmentionnés sont les suivants pour Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12015 :

	<u>CARACTERE</u>	<u>RESULTAT</u>
	Chaines de spores verticillati	-
	Chaines de spores retinaculiaperti	-
15	Chaines de spores rectiflexibles	-
	Chaines de spores spirales	+
	Fragmentation de mycélium	-
	Spores à surface lisse	+
	Spores à surface rugueuse	-
20	Couleur des spores grise	+
	Couleur des spores rouge	-
	Couleur des spores verte	-
	Envers jaune/brun	+
	Envers rouge/orange	-
25	Production de mélanine	-
	Utilisation d'adonitol	-
	Utilisation de cellobiose	+
	Utilisation de D-fructose	+
	Utilisation de méso-inositol	-
30	Utilisation d'insuline	+
	Utilisation de mannitol	-
	Utilisation de raffinose	+
	Utilisation de rhamnose	+

	<u>CHARACTERE</u>	<u>RESULTAT</u>
	Utilisation de D-xylose	+
	Utilisation d'acide DL- $\alpha$ -aminobutyrique	-
	Utilisation de L-histidine	+
5	Utilisation de L-hydroxyproline	-
	Dégradation d'allantoïne	+
	Dégradation d'arbutine	+
	Dégradation de xanthine	+
	Dégradation de pectine	+
10	Dégradation de lécithine	-
	Réduction de nitrate	+
	Production d'hydrogène sulfuré	+
	Tolérance à l'azoture de sodium (0,01%,p/v)	-
	Tolérance au chlorure de sodium (7%, p/v)	-
15	Tolérance au phénol (0,1%,p/v)	+
	Croissance à 45°C	+
	Résistance à la néomycine (50 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ )	-
	Résistance à la rifampicine (50 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ )	+
	Antibiose vis-à-vis de <i>Aspergillus niger</i> LIV 131	+
20	Antibiose vis-à-vis de <i>Bacillus subtilis</i> NCIB 3610	-
	Antibiose vis-à-vis de <i>Streptomyces murinus</i> ISP 5091	+

25 L'organisme n'a pas été identifié comme appartenant à l'un quelconque des 23 groupes d'espèces principaux (Williams, S.T. et coll. (1983) J. Gen. Microbiol 129 , 1815-1830), ni à l'un quelconque des groupes d'espèces mineurs et des amas de membres uniques définis par Williams et collaborateurs (J. Gen. Microbiol. (1983) 129, 1743-30 1813). Les caractéristiques de *Streptomyces thermoarchaensis* NCIB 12015 ont également été comparées aux descriptions d'espèces de *Streptomyces* connues dans l'ouvrage de Bergey Manual of Determinative Bacteriology (8ème édition), en rapports ISP par Shirling et Gottlieb (Int. J. Syst.

Bacteriol. (1968) 18, 69-189; Int. J. Syst. Bacteriol. (1968) 18, 279-392; Int. J. Syst. Bacteriol. (1969). 19, 391-512; Int. J. Syst. Bacteriol (1972) 22, 265-394) et à quelques nouvelles espèces validement décrites dans l'ouvrage International Journal of Systematic Bacteriology depuis 1980.

Aucun appariement n'a pu être établi entre Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12015 et une espèce décrite et, sur cette base, la demanderesse suppose que Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12015 est le premier membre connu d'une nouvelle espèce appartenant au genre Streptomyces.

Les souches mutantes NCIB 12111, 12112, 12113 et 12114 possèdent toutes des caractéristiques essentielles sensiblement semblables à celles de Streptomyces thermoarchaensis. Cependant, la souche NCIB 12111 exige de l'adénine pour sa croissance, la souche NCIB 12112 exige de la sérine pour sa croissance, la souche NCIB 12113 exige de l'histidine pour sa croissance et la souche NCIB 12114 résiste à la streptomycine.

La production d'Antibiotiques S541 par fermentation d'un organisme du type Streptomyces approprié peut s'effectuer par mise en oeuvre de moyens classiques, c'est-à-dire par la culture de l'organisme du type Streptomyces en présence de sources assimilables de carbone, d'azote et de sels minéraux.

Les sources assimilables de carbone, d'azote et de substances minérales peuvent être fournies par des substances nutritives simples ou complexes. Les sources de carbone englobent généralement le glucose, le maltose, l'amidon, le glycérol, des mélasses, la dextrine, le lactose, le saacharose, le fructose, des acides carboxyliques, des acides aminés, des glycérides, des alcools, des alcanes et des huiles végétales. Les sources de carbone constituent généralement de 0,5 à 10 % en poids du

milieu de fermentation.

Des sources d'azote comprennent généralement la farine de fèves de soja, des liqueurs de macération de maïs, des produits solubles de distilleries, des extraits  
5 de levure, la farine de graines de coton, des peptones, la farine de noix broyées, l'extrait de malt, des mélasses, la caséine, des mélanges d'acides aminés, l'ammoniac (gaz ou en solution), des sels d'ammonium ou des nitrates. On peut également utiliser l'urée et d'autres  
10 amines. Les sources d'azote constituent généralement de 0,1 à 10 % en poids du milieu de fermentation.

Des sels minéraux nutritifs que l'on peut incorporer au milieu de culture, englobent les sels généralement utilisés qui sont capables d'engendrer des ions sodium, potassium, ammonium, fer, magnésium, zinc, nickel,  
15 cobalt, manganèse, vanadium, chrome, calcium, cuivre, molybdène, bore, phosphate, sulfate, chlorure et carbonate.

Un antimousses peut être présent pour maîtriser un moussage excessif et on peut l'ajouter par intervalles selon les besoins.  
20

La culture de l'organisme du type Streptomyces s'effectue généralement à une température de 20 à 50°C, de préférence de 25 à 40°C, plus particulièrement aux environ  
25 ns de 34°C et elle peut avantageusement avoir lieu sous aération et agitation, par exemple secouage ou remuage. Initialement, on peut inoculer une petite quantité d'une suspension du micro-organisme sporulé au milieu, mais, afin d'éviter un retard ou un décalage de croissance, on peut préparer un inoculum végétatif de l'orga-  
30 nisme en inoculant la forme spore de l'organisme à une petite quantité du milieu de culture et on peut transférer l'inoculum végétatif ainsi obtenu dans le milieu de fermentation, ou bien de manière plus avantageuse encore,



dans un ou plusieurs étages d'ensemencement où une croissance supplémentaire se produit, avant de procéder au transfert dans le milieu de fermentation principal. La fermentation se réalise généralement dans une gamme de pH de 5,5 à 8,5, de préférence de 5,5 à 7,5. On peut procéder à la fermentation pendant une période de 2 à 10 jours, par exemple environ 5 jours.

Lorsqu'il est souhaitable de séparer la matière contenant les Antibiotiques S541 et n'importe quels composants ou facteurs de ceux-ci du milieu de fermentation entier ou d'isoler n'importe lesquels des composants ou facteurs, on peut procéder à cette séparation ou à cet isolement par des techniques de séparation et d'isolement classiques. Les Antibiotiques S541 suivant la présente invention sont contenus de manière prédominante dans les mycéliums des cellules, mais on peut également les trouver dans le bouillon de fermentation et on peut aussi appliquer les techniques d'isolement au bouillon de fermentation avant ou après sa clarification. Il faut bien comprendre que le choix des techniques d'isolement peut varier entre de larges limites.

On peut isoler et séparer les Antibiotiques S541 par mise en oeuvre de toute une série de procédés de fractionnement, par exemple en ayant recours à une absorption-élu-tion, une précipitation, une cristallisation fractionnée et une extraction par solvant que l'on peut combiner de diverses manières. On a constaté que l'extraction par solvant et la chromatographie et la cristallisation fractionnée convenaient de la meilleure manière possible à l'isolement et à la séparation des composés suivant la présente invention.

Après la fermentation, on peut récolter les mycéliums en utilisant des méthodes classiques, par exemple la filtration ou la centrifugation. Ensuite, on peut, par exemple, extraire la matière des mycéliums à l'aide d'

un solvant organique approprié, comme une cétone, par exemple l'acétone, la méthyléthylcétone ou la méthylisobutylcétone; un hydrocarbure, par exemple l'hexane; un hydrocarbure halogéné, par exemple le chloroforme, le tétrachlorure de carbone ou le chlorure de méthylène; un alcool, par exemple le méthanol ou l'éthanol; ou un diol, par exemple le propane-1,2-diol; ou un ester, par exemple l'acétate de méthyle ou l'acétate d'éthyle. Il faut bien comprendre que si les mycéliums contiennent de notables proportions d'eau, il est préférable d'utiliser un solvant soluble dans l'eau.

De manière générale, plus d'une extraction est souhaitable pour obtenir une récupération optimale. De préférence, on procède à la première extraction en utilisant un solvant miscible à l'eau, comme le méthanol ou l'acétone. On peut récupérer les antibiotiques sous la forme d'un extrait brut par élimination du solvant. Les extraits au solvant eux-mêmes peuvent être extraits, si on le souhaite, après réduction du volume du solvant, par exemple, par évaporation. A ce stade, il est préférable d'utiliser un solvant non miscible à l'eau, tel que l'hexane, le chloroforme, le chlorure de méthylène ou l'acétate d'éthyle ou leurs mélanges, une proportion suffisante d'eau étant ajoutée pour obtenir une répartition satisfaisante des composés antibiotiques. L'élimination de la phase non miscible à l'eau engendre une matière contenant les Antibiotiques S541. Si on le souhaite, on peut séparer le facteur B par cristallisation à partir d'un solvant approprié, par exemple l'isopropanol.

La purification et/ou la séparation des facteurs et/ou des composants actifs (complètement ou d'autres composés du type macrolide présents) peut s'effectuer par mise en oeuvre de procédés classiques, tels que, par exemple la chromatographie (y compris la chromatographie en phase liquide à haute performance) sur un support approprié,

comme la silice, une résine d'adsorption macroréticulairé non fonctionnelle, par exemple des résines de polystyrène réticulées, comme l'amberlite XAD-2, XAD-4 ou XAD-1180 (Rohm et Haas Ltd), ou une résine S112 (Kastell Ltd) ou sur un dextrane réticulé compatible avec un sol-  
5 organique, comme le Sephadex LH20 (Pharmacia UK Ltd), ou, dans le cas de la chromatographie en phase liquide à haute performance, des supports de phase inverse, comme une silice liée à un hydrocarbure, par exemple la silice liée  
10 à un hydrocarbure en  $C_{18}$ . Le support peut se présenter sous la forme d'un lit, ou bien, de préférence, sous une forme tassée dans une colonne. Dans le cas de résines macroréticulaires non fonctionnelles, telles que XAD-1180 ou S112, on peut utiliser des mélanges de solvants orga-  
15 niques, comme de l'acétonitrile et d'eau, pour procéder à l'élution.

On charge généralement une solution des composés dans un solvant approprié dans la ou les colonnes de silice ou de Sephadex, si on le souhaite, après avoir d'  
20 abord réduit le volume du solvant. On peut éventuellement laver la colonne et l'éluer ensuite avec un solvant jusqu'à la polarité convenable. Dans le cas du Sephadex et de la silice, on peut utiliser, à titre de solvants, des alcools, tels que le méthanol; des hydrocarbures, tels  
25 que l'hexane; l'acétonitrile; des hydrocarbures halogénés, tels que le chloroforme ou le chlorure de méthylène; ou des esters, tels que l'acétate d'éthyle. On peut également employer des combinaisons de ces solvants, seuls ou avec  
de l'eau.

30 L'élution et la séparation/purification des composés suivant l'invention peut être surveillée par des techniques classiques, comme par chromatographie, par exemple chromatographie en couche mince et chromatographie en phase liquide à haute performance, ou en utilisant des

propriétés des composés précédemment décrites.

La chromatographie sur silice, réalisée de préférence en utilisant un éluant tel qu'un mélange de chloroforme et d'acétate d'éthyle, sépare aisément les Antibiotiques S541 en composants I et II, le composant I étant élué en premier lieu. Les facteurs B, E et F peuvent ensuite être aisément obtenus à partir du composant I en se servant d'une chromatographie, par exemple une chromatographie en phase liquide à haute performance. De manière similaire, les facteurs A, C et D peuvent être aisément isolés à partir du composant II. On peut aussi séparer le facteur B à partir des facteurs E et F par cristallisation dans un alcool, tel que le méthanol ou l'isopropanol. Si on le souhaite, les liqueurs mères contenant les facteurs E et F peuvent être soumises à une purification plus poussée, par exemple par chromatographie sur silice et les facteurs E et F peuvent être isolés en se servant d'une chromatographie en phase liquide à haute performance. Une fois obtenus, les facteurs peuvent être davantage purifiés par cristallisation, par exemple dans du méthanol, de l'isopropanol ou un mélange méthanol/eau et la portée de l'invention s'étend également aux composés suivant l'invention sous forme cristalline.

Les composés suivant l'invention ont été isolés sous forme de solides par une combinaison appropriée des procédés susmentionnés. Il faut comprendre que l'ordre dans lequel on effectue les étapes de purification précitées et le choix des procédés de purification que l'on met en oeuvre peuvent varier fortement.

Ainsi, le facteur B a été obtenu sous forme d'un solide cristallin possédant une pureté supérieure à 90 %. De manière similaire, les facteurs A, C, D, E et F ont également été obtenus en possédant une pureté supérieure à 90 %. Cependant, comme on l'a décrit plus haut, on peut utiliser les facteurs à des taux de pureté appropriés à

leur utilisation envisagée. Pour l'emploi en médecine humaine, des puretés d'au moins 90 % et de préférence supérieures à 95 % sont souhaitables. Pour la mise en oeuvre à l'échelle agricole ou horticole ou en médecine vétérinaire, des puretés moins élevées suffisent, par exemple des puretés égales ou inférieures à 50 %.

Les exemples qui suivent illustrent la présente invention. Dans ces exemples, on a utilisé les abréviations suivantes : tlc = chromatographie en couche mince (réalisée en utilisant des plaques de silice 60 Merck 5735 et en procédant au développement avec le système  $\text{CHCl}_3$  : acétate d'éthyle (3 : 1), sauf spécification contraire); CCM = chromatographie sur colonne en utilisant de la silice 60 Merck 7734 tassée (colonne de 200 x 4 cm sauf spécification contraire) et en procédant à l'élution avec le système  $\text{CHCl}_3$  : acétate d'éthyle (3 : 1), sauf spécification contraire; hplc = chromatographie en phase liquide à haute performance ; PE = éther de pétrole (P.E. 60-80°C sauf spécification contraire); l = litre; EA = acétate d'éthyle.

Les milieux A, B et C auxquels on se réfère dans les exemples sont les suivants :

Milieu A

	<u>g l<sup>-1</sup></u>
D-glucose	15,0
Glycérol	15,0
Peptone de soja	15,0
NaCl	3,0
CaCO <sub>3</sub>	1,0

Eau distillée jusqu'à un litre, pH ajusté à une valeur de 7,0 à l'aide de NaOH aqueux avant le passage à l'autoclave.

Milieu B

	<u>g l<sup>-1</sup></u>
D-glucose	2,5
Dextrine de malt MD 30E (Roquette (UK)Ltd)	25,0
5 Arkasoy 50 (British Arkady C°. Ltd)	12,5
Mélasses	1,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,125
Carbonate de calcium	1,25
MOPS (Acide 3-(N-morpholino)propane-sulfonique)	21,0
10 Eau distillée jusqu'à un litre, pH ajusté à une valeur de 6,5 à l'aide de NaOH 5N avant le passage à l'autoclave.	

Milieu C

	<u>g l<sup>-1</sup></u>
15 D-glucose	2,5
Dextrine de malt 30E (Roquette (UK) Ltd)	25,0
Arkasoy 50	12,5
Mélasses de betteraves	1,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,125
20 CaCO <sub>3</sub>	1,25
Silicone 1520 (Dow Corning)	0,625

Eau distillée jusqu'à un litre, pH ajusté à une valeur de 6,5 avant la stérilisation.

Exemple 1

- 25 On a inoculé des spores de Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12015 à des cultures inclinées sur gélose préparées à partir des ingrédients qui suivent :

	<u>g l<sup>-1</sup></u>
Extrait de levure (Oxoïd L21)	0,5
Extrait de malt (Oxoïd L39)	30,0
Peptone mycologique (Oxoïd L40)	5,0
5 Gélose N° 3 (Oxoïd L13)	15,0

Eau distillée jusqu'à un litre, pH d'environ 5,4

et on a incubé les cultures à 28°C pendant 10 jours.

On a ensuite couvert la culture inclinée arrivée à maturation avec une solution à 10 % de glycérol (6 ml) et on  
 10 l'a grattée avec un outil stérile de façon à libérer les spores et le mycélium. On a transféré des fractions aliquotes de 0,4 ml de la suspension de spores ainsi obtenue dans des pailles en polypropylène stérile que l'on a ensuite thermoscellées et conservées sous vapeur d'azote  
 15 liquide jusqu'au moment où l'on en eut besoin.

On a utilisé le contenu d'une paillette unique pour en inoculer 10 ml de milieu A que l'on a ensuite incubés à 28°C pendant 3 jours sur un appareil secoueur tournant à 250 tpm avec un mouvement orbital d'un diamètre de 50 mm.

20 On a utilisé ce milieu incubé pour inoculer à raison de 2 %, 15 tubes et 2 flacons d'Erlenmeyer de 250 ml contenant respectivement 10 ml et 50 ml de milieu B.

On a laissé la culture dans les tubes et flacons se poursuivre à 28°C pendant 5 jours et on a ensuite filtré  
 25 les cultures séparément sous vide et on a secoué les cellules pendant 30 minutes avec un volume de méthanol égal à celui du filtrat de culture.

On a décelé l'activité contre Caenorhabditis elegans dans des extraits de cellules dont la croissance s'était  
 30 poursuivie à la fois dans les tubes et les flacons et on a rassemblé ces extraits mycéliaux, on les évaporés jusqu'à siccité et on les a ré-extrait par du méthanol de manière à en obtenir un concentré (6 ml) que l'on a appliqué à une colonne de Sephadex LH20 (110 x 2,5 cm) tassé

et on a ensuite procédé à l'élu-tion avec du méthanol. On a recueilli des fractions de 10 ml.

5 On a rassemblé les fractions 21-28 et on les a évaporées pour recueillir un résidu huileux (156 mg) que l'on a extrait avec un mélange  $\text{CHCl}_3$  : EA (3 : 1) de façon à obtenir un extrait (3 ml) que l'on a soumis à une CCM (colonne de 55 x 2,5 cm). On a recueilli des fractions de 10 ml et on les a analysées par tlc en utilisant des plaques contenant un indicateur fluorescent. Les fractions 10 20 à 23 et les fractions 36 à 44 ont donné naissance à deux zones principales qui éteignirent la fluorescence et que la demanderesse a identifié comme étant le composant I (Rf 0,70) et le composant II (Rf 0,43). L'évaporation des fractions 20-23 a engendré le composant I 15 sous la forme d'un solide (9 mg)  $\lambda_{\text{max}} 238\text{nm}$ ,  $E_1^{340}$ ;  $\lambda_{\text{max}} 245\text{nm}$ ,  $E_1^{350}$ ; et  $\lambda_{\text{max}} 254\text{nm}$ ,  $E_1^{200}$ . L'évaporation des fractions 36 à 44 a donné le composant II dans la forme d'un solide (11 mg)  $\lambda_{\text{max}} 238\text{nm}$ ,  $E_1^{440}$ ;  $\lambda_{\text{max}} 245\text{nm}$ ,  $E_1^{460}$ ; et  $\lambda_{\text{max}} 254\text{nm}$ ,  $E_1^{280}$ .

## 20 Exemple 2

On a inoculé 0,2 ml d'une suspension de spores de Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12015 que l'on avait prélevée d'une paille préparée de la manière décrite à l'exemple 1, à 2 flacons d'Erlenmeyer d'une contenance de 25 250 ml contenant 50 ml de milieu A. On a ensuite incubé les flacons à 28°C pendant 3 jours sur un appareil secoueur tournant à 250 tpm avec un mouvement orbital d'un diamètre de 50 mm et on a ensuite utilisé le contenu des deux flacons pour inoculer un récipient de fermentation 30 de 20 litres contenant du milieu B (12 litres). On a récolté la culture après 5 jours de croissance et on l'a alors traitée de la manière décrite à l'exemple 3.



Exemple 3

On a récolté le bouillon de fermentation (12 l) obtenu de la manière décrite à l'exemple 2 après une croissance de 5 jours à 28°C et on l'a centrifugé (4200 tpm à 10°C pendant 15 minutes). On a mélangé la pastille de cellules à du méthanol (5 l) et on l'a laissé reposer à 4°C pendant 20 heures. On a filtré l'extrait mycéliel, on l'a évaporé à 40°C et on l'a soumis à une distillation azéotropique après l'addition de butane-1-ol (100 ml). On a alors traité l'extrait par du méthanol (5 fois 200 ml) et on a évaporé les extraits réunis jusqu'à un volume de 100 ml et on a appliqué ce volume à une colonne de Sephadex LH20 (112 x 5 cm). On a élué la colonne avec du méthanol et après un premier volume de 200 ml, on a recueilli des fractions de 50 ml. On a rassemblé les fractions 40-90 et on les a évaporées jusqu'à obtenir un résidu huileux (3,85 g). On a extrait le résidu avec 77 ml de CHCl<sub>3</sub> : EA (3 : 1), on l'a filtré et on l'a ensuite soumis à une CCM, des fractions d'approximativement 15 ml étant recueillies après un premier volume de 200 ml.

On a rassemblé les fractions 124 à 142 contenant le composant I et on les évaporées de façon à obtenir un solide (253 mg) dont on a purifié 216 mg par hplc (Zorbax ODS, 25 x 2,1 cm, CH<sub>3</sub>CN80 %/H<sub>2</sub>O). On a rassemblé les fractions 250 à 320 contenant le composant II et on les a évaporées de façon à recueillir un solide (602 mg) dont on a purifié 540 mg par hplc (comme dans le cas des fractions 124-142) et on a recueilli des fractions de plusieurs essais.

On a surveillé la matière s'éluant de la colonne d'hplc par spectroscopie UV à 243 nm. On a soumis le produit correspondant aux pics absorbant à cette longueur d'onde à une dessiccation et i) on l'a testé quant à son activité contre Caenorhabditis elegans et ii) on l'a analysé par

tlc. Les produits correspondant à 4 pics qui étaient actifs contre Caenorhabditis elegans avaient également une valeur Rf dans la gamme de 0,39 à 0,46 ou de 0,70 à 0,75.

5 Le composant I a donné un pic avec une valeur Rf de 0,70 à 0,75 et on a attribué la qualité de facteur B au produit correspondant à ce pic. Le composant II a donné 3 pics avec une valeur Rf de 0,39 à 0,46 et on a attribué les qualités de facteurs A, C et D aux produits correspondant à ces 3 pics.

10 Le facteur A s'élua de la colonne d'hplc entre 260 et 340 ml après l'injection de l'échantillon et avec une valeur Rf de 0,44 selon la tlc. Le facteur D s'élua de la colonne d'hplc entre 270 et 310 ml après l'injection de l'échantillon et avait une valeur Rf de 0,72 selon la  
15 tlc. Le facteur C s'élua de la colonne d'hplc entre 160 et 180 ml après l'injection de l'échantillon qui avait une valeur Rf de 0,4 selon la tlc. Le facteur D s'élua de la colonne d'hplc entre 220 et 250 ml après l'injection de l'échantillon et avait une valeur Rf de 0,42 selon  
20 la tlc. Les autres caractéristiques des facteurs A, B, C et D sont décrites dans la suite du présent mémoire.

#### Exemple 4

On a utilisé 0,4 ml d'une suspension de spores de l'organisme Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12015, que  
25 l'on avait prélevé d'une paille préparée de la manière décrite à l'exemple 1, pour inoculer un flacon d'Erlenmeyer d'une contenance de 250 ml contenant du milieu A (50 ml). On a incubé le flacon à 28°C pendant 4 jours sur un appareil secoueur tournant à 250 tpm avec un mouvement orbital d'un diamètre de 50 mm.  
30

On a ensuite utilisé des fractions (8 ml) pour inoculer chacun de deux flacons à fond plat d'une contenance de 2 litres, contenant chacun 400 ml du même milieu, avant

dé procéder à l'incubation dans les mêmes conditions pendant 3 jours. On a alors employé le contenu de deux flacons pour inoculer un récipient de fermentation (70 l) contenant du milieu B (40 l) additionné de silicone 525  
5 [Dow Corning; 0,0625 % (v/v)]. On a procédé à la fermentation sous agitation et avec une aération suffisant à maintenir un niveau d'oxygène dissous supérieur à 20 % de saturation, un antimousses à base de silicone étant ajouté si cela se révèle nécessaire. On a récolté le  
10 bouillon de fermentation après 10 jours et on a clarifié le bouillon (40 l) par centrifugation (15000 tpm). On a déplacé le produit surnageant résiduel par de l'eau (5 l) et on a congelé les cellules récupérées (1,4 kg) à moins 20°. Après une semaine, on a décongelé les cellules  
15 congelées, on les a mises en suspension dans du méthanol (15 l) et on les a modérément agitées pendant 15 heures. On a alors filtré la suspension et on a réextrait le résidu solide avec du méthanol (10 l). On a dilué les filtrats réunis (25 l) avec de l'eau (12 l) et on a extrait  
20 le tout par du PE (25 l). Après 30 minutes, on a séparé les phases par centrifugation.

On a réextrait la phase méthanolique inférieure à 3 reprises avec du PE (25 l, 15 l et 15 l). On a concentré les phases au PE réunies (80 l) par 3 passes à travers  
25 un évaporateur à pellicule balayée du type Pfaudler 8.8-12V-27 (tension de vapeur 0,1 bar, température de la vapeur 20°, température de la vapeur d'eau 127°) et on a séché le concentré (8 l) sur du sulfate de sodium (1 kg) et on l'a ensuite concentré sous pression réduite à 40° dans  
30 un évaporateur à film rotatif. On a dissous le résidu huileux (15 ml) dans un mélange de  $\text{CHCl}_3$  et d'EA (70 ml, 3 : 1 v/v) et on l'a soumis à une CCM, des fractions d'approximativement 40 ml étant recueillies après un prélèvement préalable de 1.400 ml.

On a réuni les fractions 45 à 65 et on les a évaporées de façon à obtenir le facteur B (940 mg; comme défini à l'exemple 3) que l'on a cristallisé à 2 reprises dans du méthanol et finalement dans du nitrométhane. On a  
5 soumis les cristaux à une analyse par diffraction des rayons X à cristal unique, qui révéla qu'ils étaient constitués de prismes clairs, orthorhombiques, avec  $a = 10,171$  (3),  $b = 13,317(5)$ ,  $c = 25,032(7)\text{Å}^3$ ,  $V = 3391\text{Å}^3$ ,  $Z = 4$ , groupe d'espace  $P2_12_12_1$ ,  $D_c = 1,18 \text{ gcm}^{-3}$ ,  $R = 0,053$   
10 pour 2169 indépendant réflexions observées ( $\theta \leq 58^\circ$ ) les mesures étant effectuées sur un diffractomètre avec rayonnement Cu-K $\alpha$  ( $\lambda = 1,54178\text{Å}$ ). La structure, telle que déterminée par cristallographie aux rayons X est présentée sur la figure 5.

#### 15 Exemple 5

On a préparé un inoculum de Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12015 de la manière décrite à l'exemple 4, la période de croissance étant de 2 jours et on l'a utilisé pour inoculer un récipient de fermentation (70 l) contenant du milieu B (40 l) additionné de polypropylène 2000 (0,06 % v/v) au lieu de silicone 525. On a ajouté du polypropylène 2000 selon les besoins au cours de la totalité de la fermentation pour maîtriser la formation de mousse. On a effectué la fermentation à 28°C, sous une agitation et une aération suffisant à maintenir un taux d'oxygène dissous supérieur à 30 % de saturation. Après une  
25 fermentation de 24 heures, on a transféré une partie du bouillon (9l) dans un fermenteur (700l) contenant du milieu (450 l) constitué des ingrédients qui suivent :

	<u>g l<sup>-1</sup></u>
D-glucose	2,8
Dextrine de malt (MD 30E)	27,8
Arkasoy 50	13,9
5 Mélasses	1,7
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,14
CaCO <sub>3</sub>	1,39
Silicone 525 (Dow Corning)	0,06% (v/v)
Ajusté à pH 6,5 avant la stérilisation.	

10 On a effectué la fermentation à 28°C sous agitation et aération suffisant à maintenir un taux d'oxygène dissous supérieur à 20 % de saturation. On a ajouté un agent anti-mousses constitué de polypropylène 2000 suivant les besoins. Après 2 jours, on a réglé le pH à 7,2 par l'addition de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. On a récolté le bouillon de fermentation après 5 jours.

15 On a clarifié le bouillon (450 l) par centrifugation et on a déplacé la couche surnageante résiduelle par de l'eau (20 l). On a agité les cellules récupérées (25,5 kg) pendant une heure dans une quantité suffisante de méthanol pour obtenir un volume total de 75 l. On a filtré la suspension et on a réextrait le résidu solide par du méthanol (35 l) et on l'a filtré. On a dilué les filtrats réunis (87 l) avec de l'eau (40 l) et on a extrait le tout par du PE. Après 30 minutes, on a séparé les phases par centrifugation et on a réextrait la phase méthanolique par du PE (30 l) après addition d'eau (40 l). Après la séparation, on a de nouveau soumis la phase intérieure à une extraction par du PE (30 l). On a concentré les phases au PE réunies (85 l) et on les a concentrées par 3 passes à travers un évaporateur à film balayé 8.8-12v-27 (tension de vapeur 0,1 bar, température de la vapeur 20°, température de la vapeur d'eau 127°). On a séché le concentré (9 l) avec du sulfate de sodium (2 kg) et on l'a davanta-

gè concentré sous pression réduite à 40° dans un évap-  
rateur à film rotatif. On a dissous le résidu huileux  
(130 g) dans du  $\text{CHCl}_3$  de façon à obtenir 190 ml et on a  
5 soumis cette solution à une ccm [colonne tassée et la-  
vée (500 ml) dans  $\text{CHCl}_3$ ], des fractions d'approximative-  
ment 40 ml étant recueillies après un volume préalable  
de 1400 ml.

On a réuni les fractions 32-46 et on les a évaporées  
de façon à obtenir une huile (21,2 g). On a réuni les  
10 fractions 47-93 et on les a évaporées de façon à obtenir  
une huile (20,1 g) que l'on a dissoute dans un mélange  
 $\text{CHCl}_3$  : EA (3 : 1) jusqu'à un volume de 50 ml et on a  
soumis la solution à une CCM, les fractions d'approximati-  
vement 40 ml étant recueillies après un volume préalable  
15 de 1400 ml. On a réuni les fractions 22-36 et on les a  
évaporées de façon à obtenir une huile (3,1 g) que l'on  
a ajoutée à l'huile obtenue au départ des fractions 32-  
46 de la première colonne. On a dissous les huiles réu-  
nies dans du méthanol bouillant (4 ml) et on a ensuite  
20 ajouté la solution à du propane-2-ol (20 ml) chaud de fa-  
çon à obtenir le facteur B (2,57 g) cristallin par repos.

On a évaporé la liqueur mère après cristallisation  
du facteur B de façon à engendrer une huile que l'on a  
dissoute dans un égal volume de  $\text{CHCl}_2$  et on a chargé la  
25 solution dans une colonne (30 x 2,2 cm) de gel de silice  
Merck 60 (70-230 mesh ASTM, Art. N°. 7734) tassé dans du  
 $\text{CHCl}_2$ . On a lavé le lit avec du  $\text{CHCl}_2$  (2 volumes de lit)  
et on a procédé à l'éluat  
avec un mélange de  $\text{CHCl}_3$  : EA (3 : 1) (2 volumes de lit).  
30 L'évaporation de l'éluat a engendré une huile que l'on a  
dissoute dans du méthanol et soumise à une hplc de prépa-  
ration sur du Spherisorb S5 ODS-2 (250 mm x 20 mm, Phase  
Sep. Ltd.). On a pompé l'échantillon (5 ml) sur une co-  
lonne en l'espace d'une minute et on a élué la colonne

avec un mélange d'acétonitrile et d'eau (7 : 3), dans les conditions suivantes :

	<u>Durée (minutes)</u>	<u>Débit (ml/min)</u>
5	0,00	0,00 ) Moment d'
	1,00	0,00 ) injection
	1,10	30,00
	39,90	30,00
	40,00	35,00
10	75,00	35,00

La matière s'éluant de la colonne d'hplc fut surveillée par spectroscopie UV à 238 nm. L'évaporation des filtrats réunis avec des pics s'éluant à 26,3 minutes a donné le facteur E sous forme d'un solide. L'évaporation des fractions réunies avec des pics s'éluant à 36,4 minutes a donné le facteur F sous forme d'un solide. Les autres caractéristiques des facteurs E et F sont décrites dans la suite du présent mémoire.

#### Exemple 6

20 On a passé un bouillon de fermentation (similaire à celui préparé à l'exemple 2), récolté après 117 heures, à l'autoclave (121°C, 1h), on l'a refroidi jusqu'à la température ambiante et on l'a agité sur un agitateur magnétique de manière à obtenir une suspension homogène de cellules.

25 On a centrifugé (12000 g, 2 minutes, température ambiante) 2 fractions (2 ml), on a decanté les couches surnageantes et on a mis les cellules résiduelles en suspension dans de l'eau (2 ml), on les a convenablement mélangées et on les a de nouveau soumises à centrifugation (12000 g,

30 2 minutes, température ambiante). Après la décantation des couches surnageantes, on a lavé les cellules à 2 reprises supplémentaires avec de l'eau distillée (fractions

de 2 ml). On a ensuite vigoureusement mélangé les cellules lavées, soit à de l'eau (2 ml), soit à du méthanol (2 ml) et on a laissé le mélange reposer à la température ambiante pendant 1,5 heure, avec agitation occasionnelle. On a de nouveau centrifugé les suspensions (1200 g, 2 minutes, température ambiante) et on a séquentiellement dilué les couches surnageantes dans de l'eau. On a remis les cellules provenant de la suspension aqueuse en suspension dans de l'eau et on les a immédiatement séquentiellement diluées dans de l'eau. On a ajouté des fractions (10  $\mu$ l) de chacune des dilutions à une suspension (200  $\mu$ l) du nématode Caenorhabditis elegans dans une solution tampon contenant les ingrédients suivants :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (6 g/l),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (3 g/l), NaCl (5 g/l) et  $\text{MgSO}_4$  (0,25 g/l) et on en a ajusté le pH à 7,0. Après 4 heures, on a examiné les suspensions de nématodes pour trouver quelles étaient les dilutions du mélange soumis à l'essai qui avaient provoqué une inhibition totale de la motilité chez plus de 98 % de nématodes présents dans la suspension testée. On a constaté que des dilutions de 1 pour 5, de 1 pour 25, de 1 pour 250 et de 1 pour 500 de l'extrait méthanolique, de 1 pour 5, de 1 pour 25, de 1 pour 250, de 1 pour 500 et de 1 pour 1000 de la suspension de cellules et de 1 pour 2, de 1 pour 4 et de 1 pour 8 de l'extrait aqueux, provoquaient une telle inhibition des nématodes, lorsque l'on en ajoutait 10  $\mu$ l à 200  $\mu$ l de suspensions de nématodes.

#### Exemple 7

On a inoculé 0,4 ml d'une suspension de spores de Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12015 que l'on avait prélevé d'une paille préparée de la manière décrite à l'exemple 1 à des flacons d'Erlenmeyer d'une contenance de 250 ml, contenant soit 50 ml de milieu A, soit 50 ml de milieu B. On a incubé les flacons contenant le milieu



A ou le milieu B à 28°C pendant 2 jours sur un appareil secoueur rotatif fonctionnant à 250 tours/minute avec un excentrique d'un diamètre de 50 mm. On a ensuite utilisé des fraction (8 ml) de chaque milieu pour inoculer des  
5 flacons à fond plat d'une contenance de 2 litres, contenant 400 ml du même milieu (A ou B respectivement). On a incubé ces flacons dans les mêmes conditions pendant 2 jours.

On a inoculé chacun des 2 fermenteurs d'une contenance de 70 l par 2 flacons de milieu A et on a inoculé  
10 un autre fermenteur d'une contenance de 70 l par 2 flacons de milieu B. Chaque fermenteur contenait 40 l de milieu C.

On a mis les fermentations en oeuvre à 34°, sous agitation et aération suffisant à maintenir un taux d'oxygène dissous supérieur à 30 % de saturation. Après approximativement 24 heures de fermentation, on a réglé le pH à  
15 7,2 par l'addition de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aqueux. On a ajouté un agent antimousse à base de polypropylène glycol 2000 suivant  
20 les besoins. Après 5 jours, on a récolté et rassemblé ces bouillons de fermentation.

Un autre fermenteur de 70 l qui était également inoculé par 2 flacons contenant du milieu B, contenait du milieu B complété de silicone 1520 (0,06 %). On a procédé  
25 à la fermentation à 28°, sous agitation et aération suffisant à maintenir un taux d'oxygène dissous supérieur à 30 % de saturation. On a ajouté du polypropylène glycol 2000 selon les besoins pour maîtriser la formation de mousse. Après 24 heures, on a transféré une fraction de  
30 9 l dans un fermenteur de 700 l contenant 450 l de milieu C.

On a procédé à la fermentation à 34°C, sous agitation et aération suffisant à maintenir un taux d'oxygène dissous supérieur à 30 % de saturation. On a réglé la

formation de mousse par l'addition de polypropylène glycol 2000 et, après approximativement 24 heures, on a réglé le pH à 7,2 par l'addition de  $H_2SO_4$  aqueux. On a récolté le bouillon de fermentation après 4 jours et on l'a  
5 réuni aux 3 bouillons de fermentation de 40 l décrits plus haut.

On a centrifugé les bouillons récoltés et rassemblés à travers une centrifugeuse Sharples AS16PY à raison d'environ 120 l/h. On a déplacé la couche surnageante résiduelle dans le bol centrifugateur par de l'eau.  
10

On a émulsionné les cellules récupérées (11,65 kg) dans du méthanol (33 l) à l'aide d'un mélangeur Silverson. Après 60 minutes, on a filtré la suspension à travers un tissu croisé et on a une fois de plus émulsionné le résidu dans du méthanol (34 l). On a de nouveau filtré la  
15 suspension après 40 minutes. On a réuni les filtrats provenant des 2 extractions méthanoliques.

On a mélangé les extraits réunis (53,5 l) à de l'eau (27 l) et du PE (27 l). Après une agitation de 20 minutes,  
20 on a séparé les 2 phases sur une centrifugeuse Westfalia MEM 1256. On a mélangé la phase méthanolique aqueuse inférieure (70 l) à de l'eau (37 l) et du PE (27 l) et on a agité le tout et on l'a soumis à séparation comme précédemment décrit. On a brisé l'émulsion à l'interface dans la  
25 phase au PE à l'aide d'acétone (4 l). On a alors mélangé la phase méthanolique aqueuse inférieure (108 l) à de l'eau (40 l) et du PE (27 l) pour la troisième fois et on a agité le tout et on l'a séparé de la manière précédemment décrite, en utilisant de l'acétone (4 l) pour clarifier l'émulsion à l'interface. On a ensuite réuni les 3  
30 extraits à l'hexane.

On a concentré les extraits au PE réunis (85 l) avec un évaporateur à film balayé (tension de vapeur 0,15 bar, température de la vapeur 26°). On a séché le concentré

(3 l) avec du sulfate de sodium (2 kg) et on l'a ensuite davantage évaporé sous pression réduite à 40°. On a dissous l'huile ainsi obtenue (639 g) dans 300 ml d'un mélange de chloroforme et d'EA (3 : 1 v/v) et on a procédé à une filtration et un lavage à travers du papier en fibres de verre. On a soumis le filtrat et les liqueurs de lavage (1060 ml) à une CCM (1500 mm x 100 mm en diamètre) avec une élution à un débit de 6 l/h.

On a rassemblé la fraction s'éluant entre 8,8 et 13,1 l et on l'a évaporée à faible pression jusqu'à l'obtention d'une huile (56,3 g), tandis que l'on a similairement réduit le volume de la fraction s'éluant entre 13,1 l et 24,6 l sous pression réduite jusqu'à l'obtention d'un solide jaune pâle (153,4 g). On a montré que la première fraction contenait en grande partie le facteur B, tandis que la dernière fraction contenait un mélange des facteurs A, B, C et D. Le facteur B dans cette dernière fraction fut progressivement enlevé en répétant 2 fois l'opération de CCM telle que décrite plus haut - la dernière fois sur de la silice fraîche - dans des conditions similaires, sauf que l'on réduisit le débit à 3 l/h.

Les pics contenant les facteurs A, C et D de la seconde de ces colonnes s'élurent entre 8,8 et 17,6 l, le facteur B résiduel qu'elle contenait étant séparé dans la troisième colonne dont les facteurs A, C et D s'élurent entre 14 et 28 l. On a réduit cet éluat rassemblé final sous faible pression jusqu'à l'obtention d'un solide (114 g). Les pics contenant le facteur B provenant des 2 colonnes (7,5 - 8,8 l et 10,3 - 13,4 l respectivement) furent évaporés jusqu'à l'obtention d'huiles (10,7 g et 10 g respectivement) et furent réunis à l'huile obtenue provenant de la première des 3 colonnes.

On a dissous les huiles contenant le facteur B dans du méthanol bouillant (25 ml) et on les a mélangées à du

propane-2-ol bouillant (100 ml). Le facteur B cristallisa lors du refroidissement jusqu'à 4°. On l'a séparé par filtration, lavé avec du méthanol (200 ml), refroidi jusqu'à -20° et séché sous vide de façon à obtenir 25,3 g de facteur B.

On a séché le solide provenant de la troisième colonne de silice qui contenait les facteurs A, C et D, sous vide et jusqu'à poids constant (87 g). On a dissous des échantillons (20 g) de ce solide dans du méthanol (190 ml) et on en a amené le volume à 230 ml avec un mélange acétonitrile : eau 7 : 3 (v/v). On a alors chromatographié des fractions (5 ml) de la solution sur une colonne (250 mm x 21,2 mm en diamètre) de spherisorb ODS-2 (diamètre des particules 5  $\mu$ m), en se servant d'un mélange d'acétonitrile et d'eau (7 : 3) comme solvant d'élution. On a maintenu le débit à 20 ml/minute pendant environ 10 secondes; on l'a ensuite constamment augmenté en l'espace de 22 minutes jusqu'à 34 ml/minute et on l'a maintenu à cette valeur pendant 3 minutes supplémentaires. On a détecté les facteurs en cours d'élution à 238 nm. Le facteur C s'élua entre 11,0 et 13,4 minutes, le facteur D entre 13,4 et 17,4 minutes et le facteur A entre 17,4 et 23,0 minutes.

On a rassemblé les fractions contenant le facteur C provenant de chaque séparation chromatographique et on les a réduites sous faible pression jusqu'à l'obtention d'un solide. On a similairement réduit les fractions contenant le facteur A jusqu'à l'obtention d'un solide. On a également rassemblé et réduit les fractions contenant le facteur D jusqu'à l'obtention d'un solide impur (7 g). On a redissous ce produit dans du méthanol (25 ml), on a mélangé la solution à un mélange d'acétonitrile et d'eau 7 : 3 et on a rechromatographié le tout sur une colonne de spherisorb ODS-2 comme on l'a déjà décrit, sauf que l'on a maintenu le débit constant à 20 ml/minute au cours de la

totalité de l'opération. Le facteur D s'éluait à présent entre 16 et 20 minutes et on a rassemblé les fractions provenant de chaque essai chromatographique. On a réduit l'éluat total jusqu'à l'obtention d'un solide. On a séché  
5 les 3 solides contenant les facteurs A, C et D sur du  $P_2O_5$ , sous vide et jusqu'à poids constant (55 g, 7,0 g et 1,21 g respectivement). On a montré que les 4 solides isolés conformément à ce procédé étaient similaires à des échantillons authentiques des facteurs A, B, C et D.

#### 10 Exemple 8

On a inoculé 0,5 ml d'une suspension de spores de chacune des souches suivantes : Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12111, 12112, 12113 et 12114 prélevées à partir de pailles préparées de la manière décrite à l'exemple  
15 1, à des flacons d'Erlenmeyer d'une contenance de 250 ml contenant 50 ml de milieu B.

On a incubé les flacons contenant Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12111, NCIB 12112 et NCIB 12113 à 31°C sur un appareil secoueur rotatif. On a incubé le flacon  
20 contenant Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12114 à 28°C pendant 2 jours et on a ensuite transféré un ml de bouillon dans un autre flacon d'Erlenmeyer d'une contenance de 250 ml, contenant 50 ml du milieu B. On a incubé ce flacon à 31°C sur un appareil secoueur rotatif. On a secoué  
25 tous les flacons à 250 tours/minute avec un excentrique d'un diamètre de 50 mm.

Après 4 jours d'incubation, on a centrifugé un échantillon de 10 ml de chaque bouillon à 1250 g pendant 45 minutes et on l'a traité comme suit. On a écarté la couche  
30 surnageante et on a remis la pastille en suspension jusqu'à un volume de 10 ml dans du méthanol. On a vigoureusement secoué la suspension et on l'a abandonnée pendant une heure sous mélange occasionnel. On a ensuite centrifugé la sus-

pension à 10000 g pendant 5 minutes et on a analysé la couche surnageante par hplc (S5 ODS-2, 10 cm x 4,6 mm, 70 % CH<sub>3</sub>CN/O, 1M NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). On a surveillé les pics à 246 nm.

5 L'analyse par hplc a révélé la présence de facteurs A, B, C et dans chaque cas.

### Exemple 9

On a constaté que les facteurs A, B, C, D, E et F possédaient les caractéristiques suivantes :

- 10 i) Ils ne contiennent que du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène seulement.
- ii) La spectroscopie de masse à impact électronique (E.I.) des facteurs A,B,C,D,E et F a donné les résultats suivants :

15	<u>Facteur</u>	<u>ion moléculaire</u>	<u>correspondant à la formule moléculaire</u>
	A	612,37	C <sub>36</sub> H <sub>52</sub> O <sub>8</sub>
	B	598,35	C <sub>35</sub> H <sub>50</sub> O <sub>8</sub>
	C	584,34	C <sub>34</sub> H <sub>48</sub> O <sub>8</sub>
	D	598,35	C <sub>35</sub> H <sub>50</sub> O <sub>8</sub>
20	E	612,3638	C <sub>36</sub> H <sub>52</sub> O <sub>8</sub>
	F	626,3807	C <sub>37</sub> H <sub>54</sub> O <sub>8</sub>

La spectroscopie de masse à bombardement atomique rapide (FAB) a donné les résultats qui suivent :

	<u>Facteur</u>	<u>+ve FAB</u>	<u>-ve FAB</u>	<u>pds. mol.</u>
	A	M/Z 635 [M+Na] <sup>+</sup> M/Z 613 [M+H] <sup>+</sup>	M/Z 611 [M-H] <sup>-</sup>	612
5	B	M/Z 691 [M+H+glycérol] <sup>+</sup> M/Z 599 [M+H] <sup>+</sup> M/Z 581 [MH-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> M/Z 563 [MH-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>		598
	C	M/Z 607 [M+Na] <sup>+</sup>	M/Z 583 [M-H] <sup>-</sup>	584
	D	M/Z 621 [M+Na] <sup>+</sup>	M/Z 597 [M-H] <sup>-</sup>	598

10 La spectroscopie de masse à désorption de champ du facteur E a donné le résultat suivant : M/Z 612 M<sup>+</sup> et celle du facteur F a donné le résultat suivant : M/Z 626 M<sup>+</sup>.

Un spectre E.I. du facteur A avec mesure de masse précise a donné des ions à

15 612,37 C<sub>36</sub>H<sub>52</sub>O<sub>8</sub>; 466,31 C<sub>30</sub>H<sub>42</sub>O<sub>4</sub>; 448,30 C<sub>30</sub>H<sub>40</sub>O<sub>3</sub>;  
425,23 C<sub>26</sub>H<sub>33</sub>O<sub>5</sub>; 354,22 C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>; 297,22 C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>O;  
278,11 C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub>; 247,17 C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>O<sub>2</sub>; 219,18 C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>O;  
95,05 C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>O.

20 Un spectre E.I. du facteur B avec mesure de masse précise a donné des ions à

598,35 C<sub>35</sub>H<sub>50</sub>O<sub>8</sub>; 438,28 C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>; 420,26 C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>O<sub>3</sub>;  
314,19 C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub>; 248,14 C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>; 151,08 C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>O<sub>2</sub>.

Un spectre E.I. du facteur C avec mesure de masse précise a donné des ions à

25 584,34 C<sub>34</sub>H<sub>48</sub>O<sub>8</sub>; 566,33 C<sub>34</sub>H<sub>46</sub>O<sub>7</sub>; 438,28 C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>.

Un spectre E.I. du facteur D avec mesure de masse précise a donné des ions à

598,35 C<sub>35</sub>H<sub>50</sub>O<sub>8</sub>; 452,29 C<sub>29</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>; 434,28 C<sub>29</sub>H<sub>38</sub>O<sub>3</sub>.

Une mesure de masse précise du facteur E dans le mode d' ionisation E.I. a donné à un ion à 452,2908  $C_{29}H_{40}O_4$  et dans le cas du facteur F, elle a donné un ion à 466,3067  $C_{30}H_{24}O_4$ .

- 5      iii) Les facteurs A, B, C, D, E et F possèdent des spectres IR caractéristiques dans le bromoforme, comprenant les pics suivants :

10      Pour le facteur A à environ 3510 (OH), 1712 (ester) et 998  $cm^{-1}$  (C-O); pour le facteur B à environ 3510 (OH), 1710 (ester) et 996  $cm^{-1}$  (C-O); pour le facteur C comprenant des pics à environ 3510 (OH), 1712 (ester) et 996  $cm^{-1}$  (C-O); pour le facteur D comprenant des pics à environ 3508 (OH), 1711 (ester) et 996  $cm^{-1}$  (C-O); pour le facteur E comprenant des pics à environ 3500 (OH), 1708 (ester) et 994  $cm^{-1}$  (C-O); et pour le facteur F comprenant des pics à environ 3500 (OH), 1708 (ester), et 997  $cm^{-1}$  (C-O).

20      Les spectres complets pour les facteurs A, B, C, D, E et F sont présentés sur les figures 1,2,3,4,6 et 7 respectivement des dessins annexés.

iv) Les facteurs A, B, C, D, E et F possèdent un spectre UV dans le méthanol ( $c = 0,002 \%$ ) montrant les résultats suivants (I = inflexion et M = maximum) :



	<u>Facteur</u>	<u><math>\lambda</math>(nm)</u>	<u><math>E_1^1</math></u>	<u>Facteur</u>	<u><math>\lambda</math>(nm)</u>	<u><math>E_1^1</math></u>
5	A	252	(I) 318	D	252	(I) 263
		244,5	(M) 468		244,5	(M) 393
		239	(I) 430		239	(I) 362
	B	252	(I) 302	*E	252	(I) 266
		244,5	(M) 426		244	(M) 402
		239	(I) 394		238	(M) 373
	C	252	(I) 316	*F	252	(I) 285
		244,5	(M) 470		244,5	(M) 421
		239	(I) 432		239	(M) 389

(\*méthanol  $c = 0,001$  %)

15 Il faut noter que tandis que les valeurs  $\lambda_{\max}$  susmentionnées sont caractéristiques de chaque facteur, les valeurs  $E_1^1$  reflètent la pureté de la matière telle qu'elle a été obtenue. Cependant, les rapports des valeurs  $E_1^1$  sont caractéristiques du composé per se.

20 v) Un spectre de résonance magnétique nucléaire protonique a 200 MHz de la solution de chaque facteur dans le deutéro-chloroforme englobe des signaux [valeurs  $\tau$  avec multiplicités, constantes de couplage (Hz) et valeurs d'intégration entre parenthèses] centrés à environ :

Facteur A: 4,1 à 4,4(m,2H); 4,61(large s,1H); 4,6 à 4,75(m,2H); 4,81(d,9,1H); 5,05(m,1H); 5,34(s,2H); 5,69(d,5,1H); 6,06(d,5,1H); 6,17(m,1H); 6,26(d,11,1H); 6,37(m,1H); 6,46(d,10,1H); 6,74(q,2,1H); 7,42(m,1H); 7,7 to 7,9(m,5H); 8,14(s,3H); 8,40(s,3H); 8,47(s,3H); 8,61(t,11,1H); 8,96(d,7,3H); 9,06(d,7,3H); 9,02(d,7,3H); 9,13(q,11,1H); 9,21(d,7,3H).

Facteur B: 4,2 à 4,4(m,2H); 4,55(q,7,1H); 4,65(large,s,1H); 4,6 à 4,8(m,2H); 5,06(m,1H); 5,3 à 5,5(m,2H); 6,01(d5,1H); 6,07(d,5,1H); 6,12(s,1H); 6,24(d,11,1H); 6,24(m,1H); 6,3 à 6,5(m,2H); 6,53(s,3H); 6,73(q,2,1H); 7,62(m,1H); 7,6-8,0(m,4H); 8,22(s,3H); 8,35(d,7,3H); 8,41(s,3H); 8,49(s,3H); 8,62(t,11,1H); 9,03(d,6,3H); 9,12(q,11,1H); 9,22(d,7,3H).

Facteur C: 4,29(d,11,t,2,1H); 4,4 à 4,6(m,3H); 4,56(large s,1H); 5,14(dd,15,10,1H); 5,23(m,1H); 5,65(large s,2H); 5,72(d,6,1H); 5,95(d,10,1H); 5,99(d,6,1H); 6,08(large s,1H); 6,1 à 6,4(m,3H); 6,62(q,3,1H); 7,7 à 8,1(m,ca7H); 8,18(s,3H); 8,33(s,3H); 8,48(d,7,3H); 8,64(s,3H); 8,68(t,11,1H); 9,00(d,7,3H); 9,08(d,7,3H); 9,12(q,12,1H).

Facteur D: 4,18 à 4,4 (m,2H); 4,47 à 4,81 (m,4H); 5,04 (m,1H); 5,35 (s,2H); 5,72 (d,7,1H); 6,07 (d,7,1H); 6,15 6,45 (m,4H); 6,74 (q,4,1H); 7.45 - 8,1 (m,8H); 8,16 (s,3H); 8,41 (s,3H); 8,49 (s,3H); 8,62 (t,11,1H); 8,92 - 9,05 (m,6H); 9,21 (d,7,3H).

Facteur E: 4,1 à 4,3 (m,2H); 4,5 à 4,8 (m,4H total); 5,04 (m,1H); 5.2 à 5,5 (m,2H); 6,01 (d,5,1H); 6,05 (d,5,1H); 6,11 (s,1H); 6,1 à 6,4 (m,3H); 6,45 (d,10,1H); 6,51 (s,3H); 6,70 (q,2,1H); 7,60 (m,1H); 8,20 (s,3H); 8,41 (s,3H); 8,47 (s,3H); 8,60 (t,11,1H); 9,00 (t,7,3H); 9,02 (d,6,3H); 9,11 (q,11,1H); 9,20 (d,7,3H).

Facteur F: 4,2 à 4,4 (m,2H); 4,62 (s,1H); ca 4,70 (m,2H); 4,80 (d,9,1H); 5,04 (m,1H); 5,2 à 5,5 (m,2H); 5,99 (d,5,1H); 6,05 (d,5,1H); 6,11 (s,1H); 6,1 à 6,3 (m,2H); ca 6,36 (m,1H); 6,45 (d,10,1H); 6,51 (s,3H); 6,70 (q,2,1H); 7,42 (m,1H); 7,58 (m,1H); 8,19 (s,3H); 8,40 (s,3H); 8,47 (s,3H); 8,60 (t,11,1H); 8,95 (d,7,3H); 9,05 (d,7,3H); 9,01 (d,7,3H); 9,10 (q,11,1H); 9,21 (d,6,3H).

- vi) Un spectre de résonance magnétique nucléaire au carbone-13 à 25,5 MHz à bruit découplé d'une solution de chaque facteur dans le deutéro-chloroforme englobe des
- 5 pics [valeurs  $\delta$  avec multiplicités de signaux dans le spectre hors résonance entre parenthèses] à environ :
- Facteur A : 173,2(s); 142,6(d); 139,2(s); 137,6(s); 137,1(s); 137,0(d); 130,4(s); 123,1(d); 120,1(d); 117,8(d); 99,5(s); 80,0(s); 79,0(d); 76,5(d); 69,0(d); 68,3\*; 67,4(d); 48,2(t); 45,5(d); 40,9(t);
- 10 40,5(t); 35,8\*; 34,5(t); 22,1(q); 34,5(t); 26,6(d); 22,6(q); 22,0(q); 19,7(q); 15,3(q); 13,7(q); 10,8(q).
- Facteur B : 173,4(s); 142,1(d); 139,5(s); 137,1(s); 135,7(s); 133,7(s); 123,6(d); 123,3(d); 120,0(d); 119,3(d); 118,2(d); 99,5(s); 80,1(s); 77,3(d); 76,6(d); 76,4(d); 69,0(d); 68,3(d); 67,9 \*; 67,6
- 15 \*; 57,5(q); 48,2(t); 45,4(d); 40,7(t); 40,5(t); 35,8\*; 34,5(t); 22,1(q); 19,6(q); 15,3(q); 13,6(q); 12,9(q); 10,5(q).
- Facteur C : 173,3(s); 142,2(d); 140,3(s); 138,5(s); 137,0(s); 134,9(s); 123,9(d); 121,1(d); 120,6(d); 118,1(d); 100,2(s); 80,6(s); 80,1(d); 77,4(d); 69,2(d); 69,0(d); 68,3 \*; 68,0(d); 67,9(d); 48,6(t);
- 20 46,3(d); 41,4(t); 36,5 \*; 36,3 \*; 36,1(d); 35,0(t); 22,6(q); 20,0(q); 15,4(q); 14,3(q); 13,1(q); 10,8(q).
- Facteur D : 173,2 (s); 142,5 (d); 139,1 (s); 137,5 (s); 137,1 (s); 132,1 (s); 131,4 (d); 123,1 (d); 120 1 (d); 117,8 (d); 99,5 (s); 79,9 (s); 79,2 (d); 76,5 (d); 69,0 (d); 68,3\*; 68,1\*; 67,6\*; 67,4 \*; 48,2
- 25 (t); 45,5 (d); 40,8 (t); 40,5 (t); 35,7 \*; 34,5 (t); 22,0 (q); 20,6 (t); 19,6 (q); 15,3q); 13,7 (q); 13,6 (q); 10,7 (q).
- \* multiplicité incertaine
- vii) Des courbes de dichroïsme circulaire pour les fac-

teurs A, B, C et D (solutions à environ 0,1 % dans le méthanol) sont montrées sur la figure 8. Les courbes sont étroitement comparables dans la région 230 à 260 nm associée à l'absorption du chromophore diénique. Ceci indique que les configurations absolues en C<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>17</sub> et C<sub>19</sub> sont les mêmes dans les 4 cas.

On donne ci-dessous des exemples de compositions suivant la présente invention.

L'expression "ingrédient actif" telle qu'on l'utilise ci-dessous désigne un composé suivant l'invention et peut être, par exemple, l'un des facteurs A, B, C, D, E ou F.

Injection à doses multiples à administrer par la voie parentérale

	<u>% p/v</u>	<u>Gamme</u>
15	Ingrédient actif	4,0
	Alcool benzylique	2,0
	Triacétate de glycérine	30,0
	Propylène glycol	jusqu'à 100,0
		1 - 5 % p/v

Dissoudre l'ingrédient actif dans l'alcool benzylique et le triacétate de glycérine. Ajouter le propylène glycol et amener à volume. Filtrer la solution pour éliminer tout agent de contamination particulaire. Introduire aseptiquement le produit dans des fioles pour injection et les fermer avec des bouchons ou des joints étanches en caoutchouc maintenus en position par des capsules de recouvrement en aluminium. Finalement stériliser le produit en le chauffant dans un autoclave.

Spray d'aérosol

	<u>% p/p</u>	<u>Gamme</u>
30	Ingrédient actif	0,1
	Trichloréthane	29,9
		0,01 à 0,50% p/p

Trichlorofluorométhane	35,0
Dichlorodifluorométhane	35,0

5 Mélanger l'ingrédient actif au trichloréthane et introduire le mélange dans le récipient pour aérosol. Purger l'espace supérieur à l'aide de propulseur gazeux et servir la soupape en position. Introduire le poids nécessaire de propulseur liquide sous pression à travers la soupape. Equiper du dispositif d'actionnement et de coiffes de pulvérisation.

10 Comprimé

Procédé de fabrication - granulation humide

		<u>mg</u>
	Ingrédient actif	250,0
	Stéarate de magnésium	1% p/p 4,5
15	Amidon de maïs	5% p/p 22,5
	Amidon glycolate de sodium	2% p/p 9,0
	Laurylsulfate de sodium	1% p/p 4,5
20	Cellulose microcristalline	jusqu'à un poids de noyau de comprimé de 450 mg.

25 Ajouter une quantité suffisante d'une pâte à 10 % d'amidon à l'ingrédient pour produire une masse humide convenant à la granulation. Préparer les granules et les sécher en utilisant un plateau ou un séchoir à lit fluidisé. Tamiser à travers un tamis, ajouter les ingrédients résiduels et comprimer en comprimés.

30 Au besoin, enrober les noyaux de comprimés d'une pellicule en utilisant de l'hydroxypropylméthylcellulose ou toute autre matière filmogène similaire, en se servant d'un système solvant aqueux ou non aqueux. Un plastifiant et un colorant approprié peuvent être incorporés

à la solution d'enrobage par une pellicule.

Comprimé vétérinaire à l'usage d'animaux petits/domestiques

Procédé de fabrication - granulation à sec

5		<u>mg</u>
	Ingrédient actif	50,0
	Stéarate de magnésium	7,5
	Cellulose microcristalline pour faire un poids de noyau de comprimé de	75,0
10	Mélanger l'ingrédient actif au stéarate de magnésium et à la cellulose microcristalline. Comprimer le mélange en boudins, briser les boudins en les faisant passer par un granulateur rotatif pour engendrer des comprimés s'écoulant librement. Procéder à la compression en comprimés.	
15	Si on le souhaite, on peut enrober les noyaux des comprimés d'une pellicule de la manière décrite plus haut.	

Injection vétérinaire intramammaire

		<u>mg/dose</u>	<u>Limites</u>
20	Ingrédient actif	150 mg	150-500 mg
	Polysorbate 60            3,0% p/p)		jusqu'à 3 ou 5 g
	Cire d'abeille blanche            6,0% p/p)	jusqu'à 3g	jusqu'à 3 ou 5 g
	Huile d'arachide            91,0% p/p)		jusqu'à 3 ou 5 g
25	Chauffer l'huile d'arachide, la cire d'abeille blanche et le polysorbate 60 jusqu'à 160°C sous agitation. Maintenir le tout à 160°C pendant 2 heures et le laisser ensuite refroidir jusqu'à la température ambiante sous agitation. Ajouter l'ingrédient de manière aseptique au véhicule et		
30	procéder à la dispersion en se servant d'un mélangeur à		

haute vitesse. Raffiner par passage à travers un broyeur à colloïdes. Introduire le produit de manière aseptique dans des seringues en matière plastique stériles.

Potion vétérinaire à administrer par la voie orale

	<u>% p/v</u>	<u>Limites</u>
5		
Ingrédient actif	0,35	0,05-0,50 % p/v
Polysorbate 85	5,0	
Alcool benzylique	3,0	
Propylène glycol	30,0	
10		
Phosphate tampon suivant pH	6,0 - 6,5	
Eau	jusqu'à 100,0	

Dissoudre l'ingrédient actif dans le polysorbate 85, l'alcool benzylique et le propylène glycol. Ajouter une proportion de l'eau et ajuster le pH à 6,0 - 6,5  
 15 avec le tampon au phosphate, si cela se révèle nécessaire. Amener au volume final avec de l'eau. Introduire le produit dans un récipient pour potions.

Pâte vétérinaire à administrer par la voie orale

	<u>% p/p</u>	<u>Limites</u>
20		
Ingrédient actif	7,5	1-10 % p/p
Saccharine	25,0	
Polysorbate 85	3,0	
Distéarate d'aluminium	5,0	
25		
Huile de noix de coco fractionnée	jusqu'à 100,0	

Disperser le distéarate d'aluminium dans l'huile de noix de coco fractionnée et le polysorbate 85 sous chauffage. Refroidir jusqu'à la température ambiante et disperser la saccharine dans le véhicule huileux. Répartir  
 30 l'ingrédient actif dans la base. Introduire le produit

dans des seringues en matière plastique.

Granules vétérinaires pour l'administration par la nourriture

	<u>% p/p</u>	<u>Limite</u>
5	Ingrédient actif	2,5
	Farine de pierre calcaire jusqu'à	100,0
		0,05-5 % p/p

Mélanger l'ingrédient actif à la farine de pierre calcaire. Préparer les granules en mettant en oeuvre un procédé de granulation à l'état humide. Procéder au séchage en utilisant un plateau ou un séchoir à lit fluidisé. Introduire le produit dans le récipient approprié.

Concentré émulsionnable

- |    |  |         |
|----|--|---------|
|    | Ingrédient actif   | 50 g    |
|    | Emulsif anionique  | 40 g    |
| 15 | (par exemple phénylsulfonate CALX)                           |         |
|    | Emulsif non ionique  | 60 g    |
|    | (par exemple Syperonic NP13)                                 |         |
|    | Solvant aromatique (par exemple Solvesso 100) jusqu'à        | 1 litre |
| 20 | Mélanger tous les ingrédients et agiter jusqu'à dissolution. |         |

Granules

- |    |  |      |
|----|--|------|
|    | (a) Ingrédient actif                   | 50 g |
|    | Résine de bois                         | 40 g |
| 25 | Granules de gypse (20-60 mesh) jusqu'à | 1 kg |
|    | (par exemple Agsorb 100A)              |      |
|    | (b) Ingrédient actif                   | 50 g |
|    | Syperonic NP13                         | 40 g |



Granules de gypse (20-60 mesh) jusqu'à 1 kg.

Dissoudre tous les ingrédients dans un solvant volatil, par exemple le chlorure de méthylène, et ajouter la solution à des granules roulant dans un mélangeur. Sécher pour éliminer le solvant.

On a déterminé l'activité des facteurs A, B, C, D, E et F en se servant de toute une série de parasites ou organismes nuisibles et de leurs hôtes, y compris les suivants :

10 Tetranychus urticae, Myzus persicae, Heliothis virescens,  
Chilo portellus, Meloidogyne incognita, Panonychus ulmi,  
Phorodon humuli, Aulacorthum circumflexum.

On a utilisé le produit sous la forme d'une préparation liquide. On a réalisé les préparations en dissolvant le produit dans de l'acétone. On a ensuite dilué les solutions avec de l'eau contenant 0,1 % ou 0,01 % en poids d'un agent mouillant jusqu'à ce que les préparations liquides continssent la concentration voulue du produit.

Le procédé d'essai adopté eu égard à chaque organisme nuisible ou parasite comprenait le support d'un certain nombre d'organismes nuisibles ou parasites par un milieu qui était habituellement une plante hôte et le traitement du milieu par la préparation (test résiduel). Dans le cas de Tetranychus urticae, on a traité à la fois les organismes nuisibles ou parasites et le milieu par la préparation (test de contact).

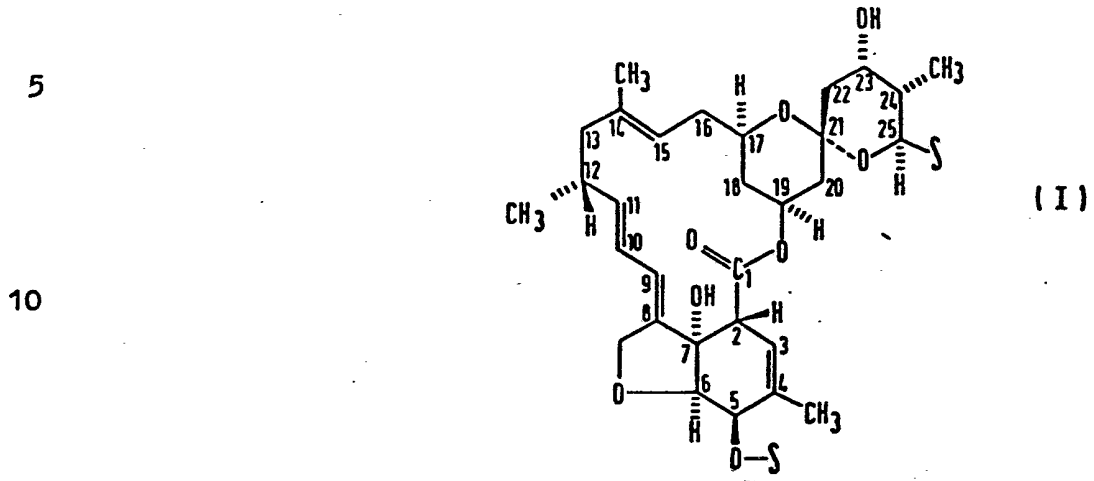
Suivant ce procédé, on a découvert que les facteurs A à F étaient efficaces en concentrations (en poids de produit) de 500 parties par million ou moins.

L'efficacité des composés selon l'invention chez des veaux infectés par *Dictyocaulus Viviparus* a été déterminée. Des veaux ont été infectés avec *Dictyocaulus Viviparus* puis traités avec une dose unique (200 microgrammes/kg) du composé selon l'invention 23 jours après l'infection. Les animaux ont été tués 29 jours après l'infection et le nombre de vers a été compté. C'est ainsi par exemple que suivant cette procédure les facteurs A, B, C et D ont éliminé *D Viviparus*.

En général, les composés selon l'invention sont non-toxiques, aux doses physiologiquement. C'est ainsi, par exemple, que les facteurs A, B, C et D ont des valeurs LD<sub>50</sub> d'au moins 25 mg/kg lorsqu'ils sont testés sur des souris CRH.

R E V E N D I C A T I O N S

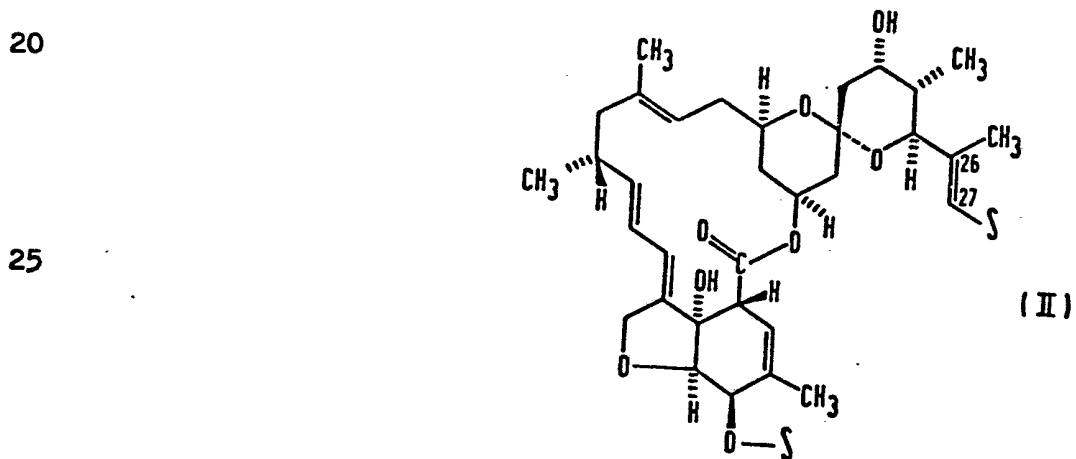
1. Composé répondant à la formule partielle (I)



10

15

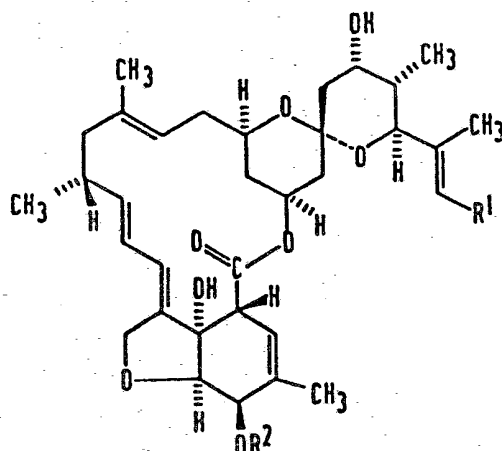
2. Composé suivant la revendication 1, répondant à la formule partielle (II)



25

30

3. Composé suivant la revendication 2, répondant à la formule générale (III)



( III )

dans laquelle  $R^1$  représente le radical méthyle, éthyle ou isopropyle et  $R^2$  représente un atome d'hydrogène ou le radical méthyle.

5 4. Composé suivant la revendication 3, caractérisé en ce que  $R^1$  représente le radical isopropyle et  $R^2$  représente un atome d'hydrogène.

5. Composé suivant la revendication 3, caractérisé en ce que  $R^1$  représente le radical méthyle et  $R^2$  représente un atome d'hydrogène.

10 6. Composé suivant l'une quelconque des revendications précédentes, sensiblement en l'absence d'autres composés du type macrolide.

7. Composé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 5, sous forme sensiblement pure.

15 8. Composé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3, en mélange à au moins un autre composé suivant les revendications précitées; ou les composés de la revendication 3 dans lesquels  $R^2$  représente un atome d'hydrogène en mélange les uns aux autres; ou les composés  
20 suivant la revendication 3, dans lesquels  $R^2$  représente

le radical méthyle, en mélange les uns aux autres.

5 9. Composé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 5, sous forme d'un bouillon de fermentation entier contenant au moins un composé de ce genre; les solides d'un bouillon de fermentation entier contenant au moins un composé de ce genre, des mycéliums intacts ou lysés, séparés d'un tel bouillon, ou les solides d'un tel bouillon, après séparation des mycéliums intacts ou lysés; ou un tel bouillon après la séparation des mycéliums.

10 10. Composé suivant la revendication 3, pour l'utilisation à titre d'antibiotique en vue du traitement des être humains ou des animaux.

15 11. Compositions pour l'utilisation en vue de combattre des parasites ou organismes nuisibles, par exemple dans le domaine agricole, horticole ou forestier, contenant une quantité efficace d'au moins un composé suivant l'une quelconque des revendication 1 à 10, ainsi qu'un ou plusieurs véhicules et/ou excipients.

20 12. Compositions suivant la revendication 11, caractérisées en ce qu'elles contiennent un composé suivant la revendication 3, éventuellement en même temps qu'un ou plusieurs agents tensio-actifs, agents antiagglutination ou anticoncrétion, agents antimousses, régulateurs de viscosité, liants, adhésifs, fertilisants, stabilisants ou autres additifs ou ingrédients actifs.

25 13. Compositions pour l'utilisation en médecine humaine ou en médecine vétérinaire, contenant une quantité efficace d'au moins un composé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 10, en même temps qu'un ou plusieurs véhicules et/ou excipients.

30 14. Compositions suivant la revendication 13, pour l'utilisation en médecine vétérinaire, caractérisées en ce qu'elles contiennent un ou plusieurs composés suivant la

revendication 3, possédant une pureté d'au moins 50 % et se présentant sous une forme appropriée à l'administration par la voie parentérale (y compris intramammaire), orale, rectale, topique ou pour l'utilisation sous forme d'implants.

15 15. Compositions suivant l'une quelconque des revendications 11 à 14, caractérisées en ce qu'elles contiennent un mélange de composés actifs, constitué principalement d'un ou plusieurs composés suivant l'une quelconque des revendications 1 à 5.

10 16. Compositions suivant l'une quelconque des revendications 11 à 15, caractérisées en ce qu'elles contiennent le composé suivant la revendication 4 ou le composé suivant la revendication 5.

15 17. Procédé de préparation d'un composé suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend l'étape de culture d'un micro-organisme du genre *Streptomyces*, si bien que ledit composé est produit et, si on le souhaite, de séparation subséquente d'un ou plusieurs desdits composés à partir du bouillon de fermentation.

20 18. Procédé suivant la revendication 17, caractérisé en ce que le micro-organisme en question est *Streptomyces thermoarchaensis* NCIB 12015 ou un mutant de ce dernier ou un autre membre de l'espèce *Streptomyces thermoarchaensis*.

25 19. Procédé suivant la revendication 17, caractérisé en ce que l'on met les mycéliums du micro-organisme en contact avec un solvant miscible à l'eau de manière à en extraire un ou plusieurs composés suivant la revendication 1.

30 20. Composés du type macrolide qui sont productibles par fermentation de *Streptomyces thermoarchaensis*.

21. Micro-organismes de l'espèce *Streptomyces thermoarchaensis* .

22. Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12015 et ses mutants.

23. Streptomyces thermoarchaensis NCIB 12111, NCIB 12112, NCIB 12113 et NCIB 12114 et leurs mutants.

5 24. Procédé pour combattre des infections ou des infestations, par exemple, dans le domaine agricole, horticole ou forestier, caractérisé en ce que l'on applique au parasite ou à tout autre organisme nuisible ou au champignon ou à tout autre organisme responsable desdites  
10 infections ou infestations, ou à l'endroit où ils logent ou à leur biotope, une quantité efficace d'un ou plusieurs composés suivant la revendication 1 ou d'une composition suivant la revendication 11.

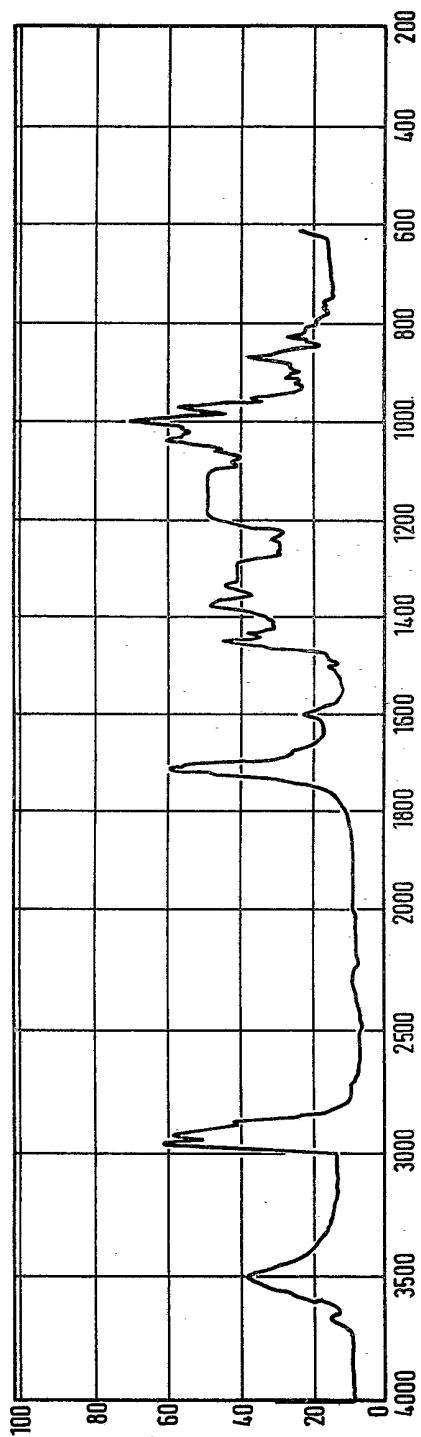


FIG. 1.

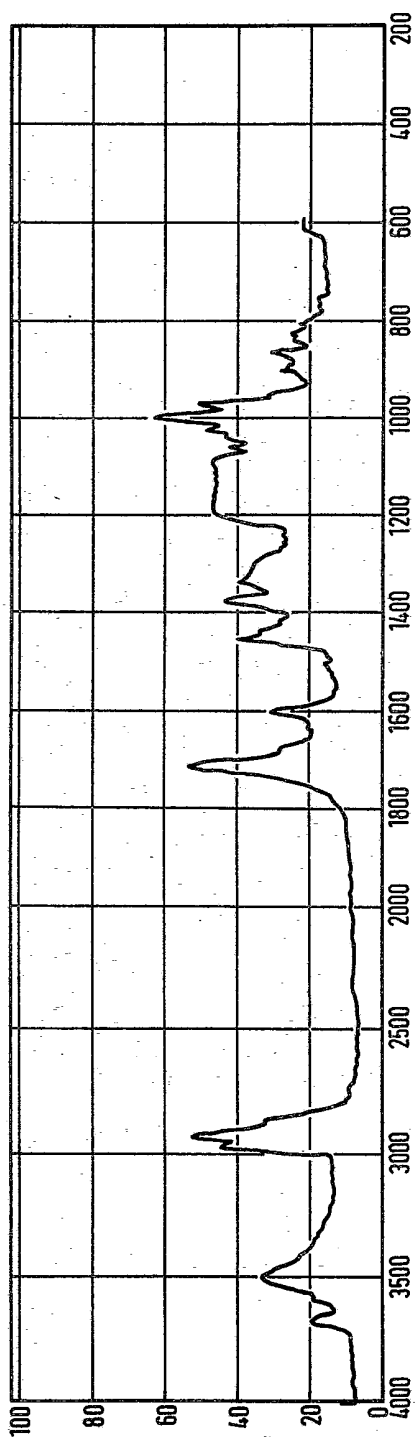
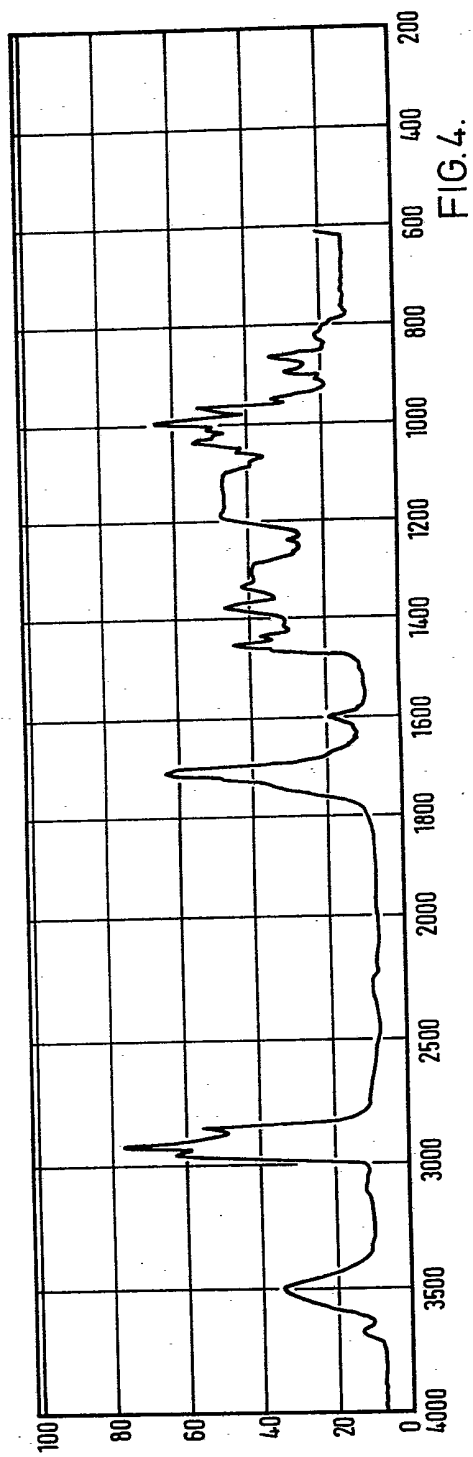
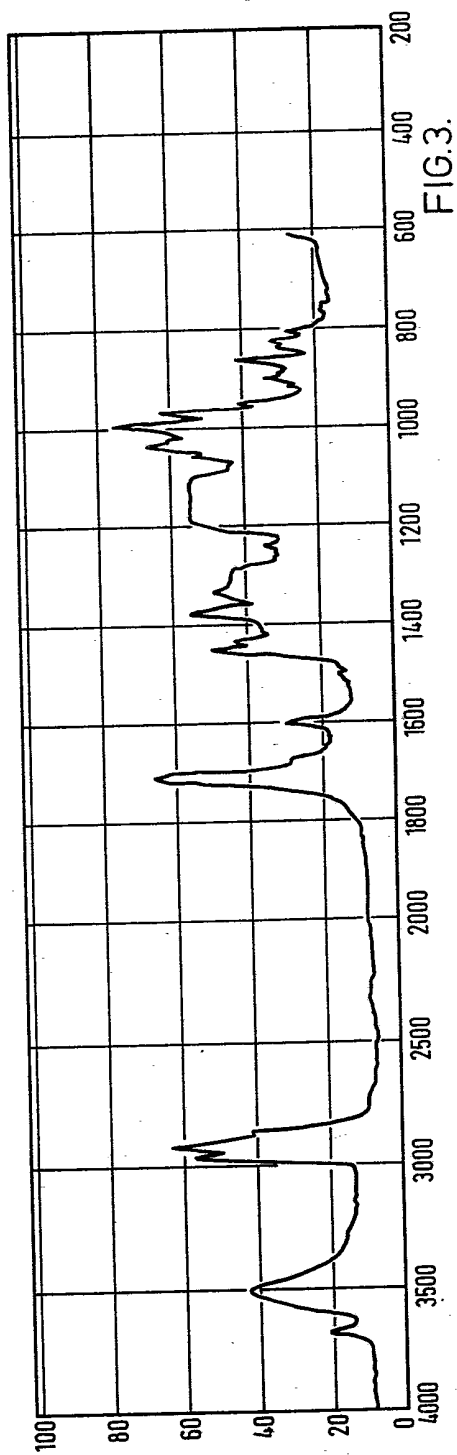


FIG. 2.





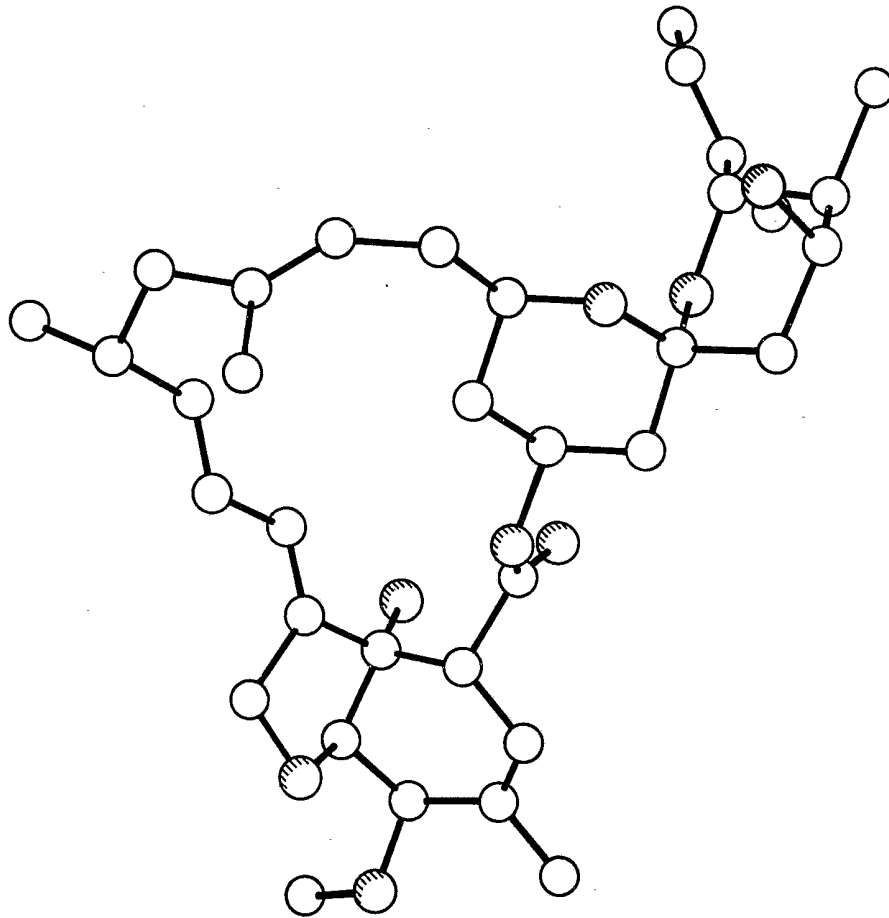


FIG. 5

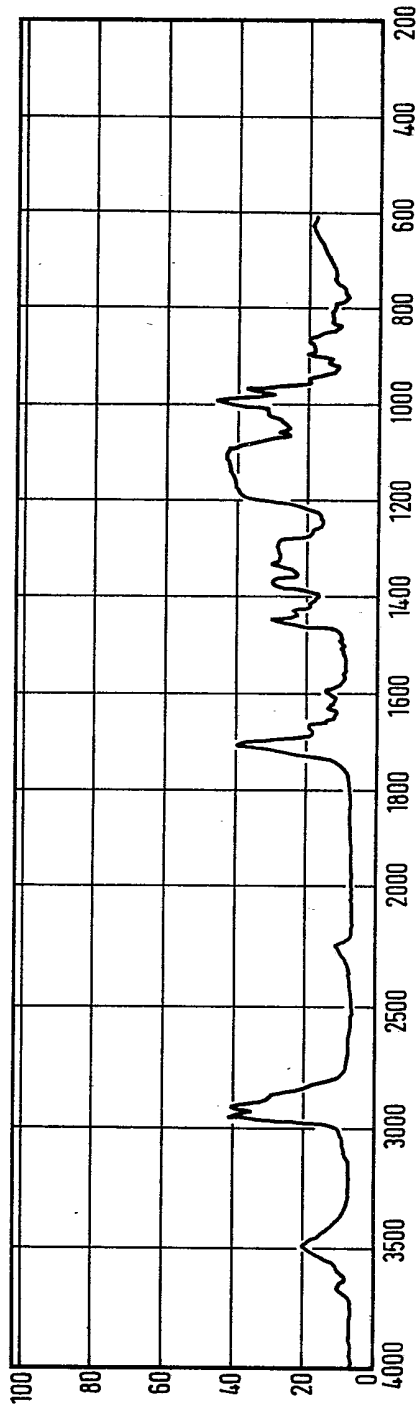


FIG. 6.

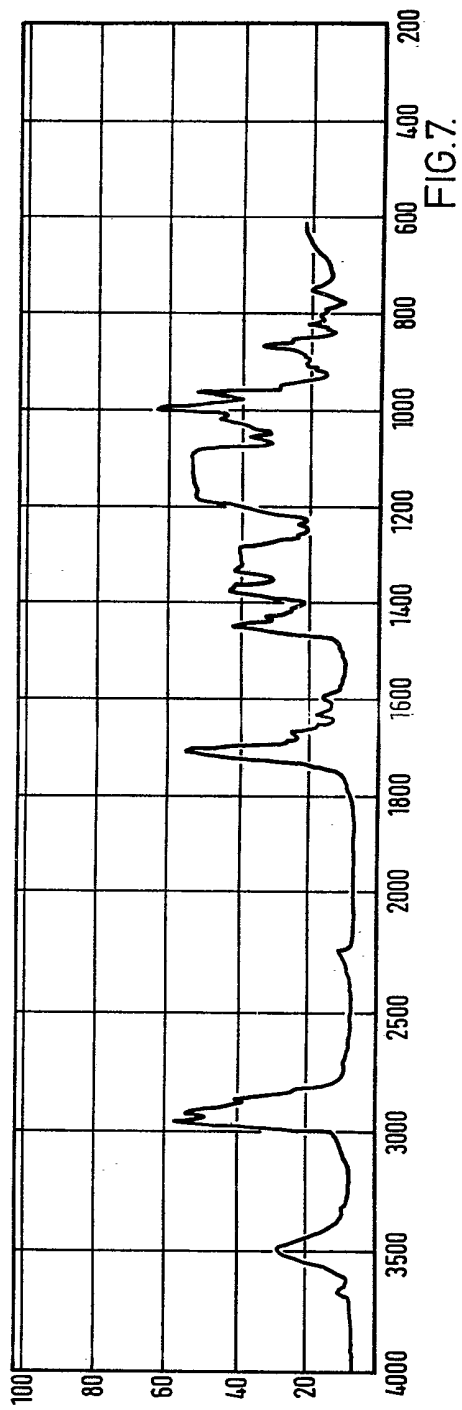


FIG. 7.

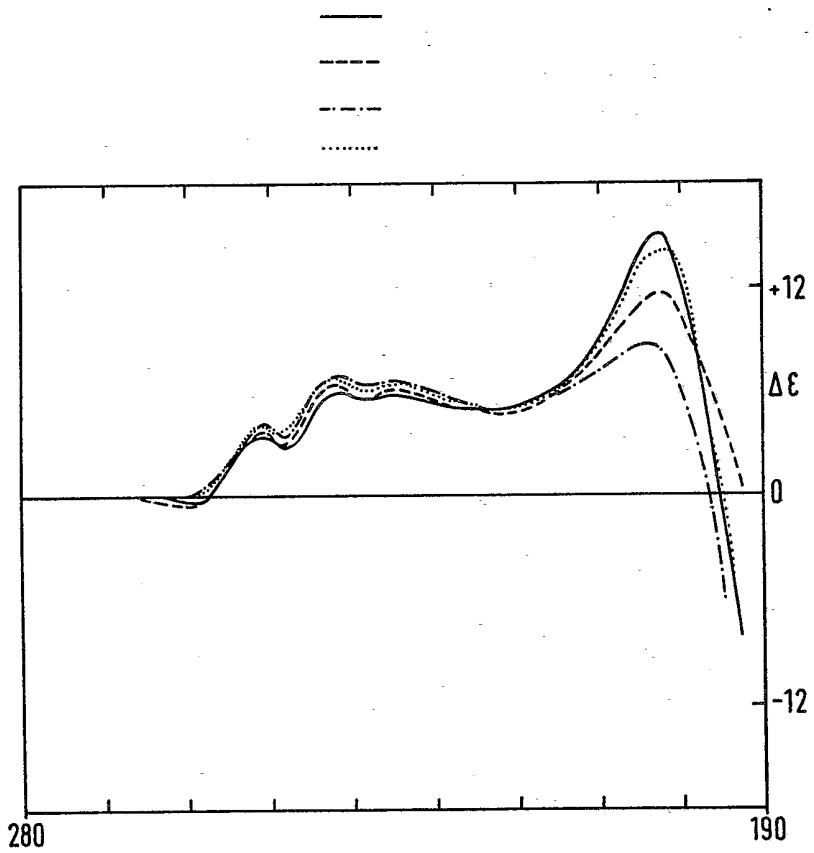


FIG. 8