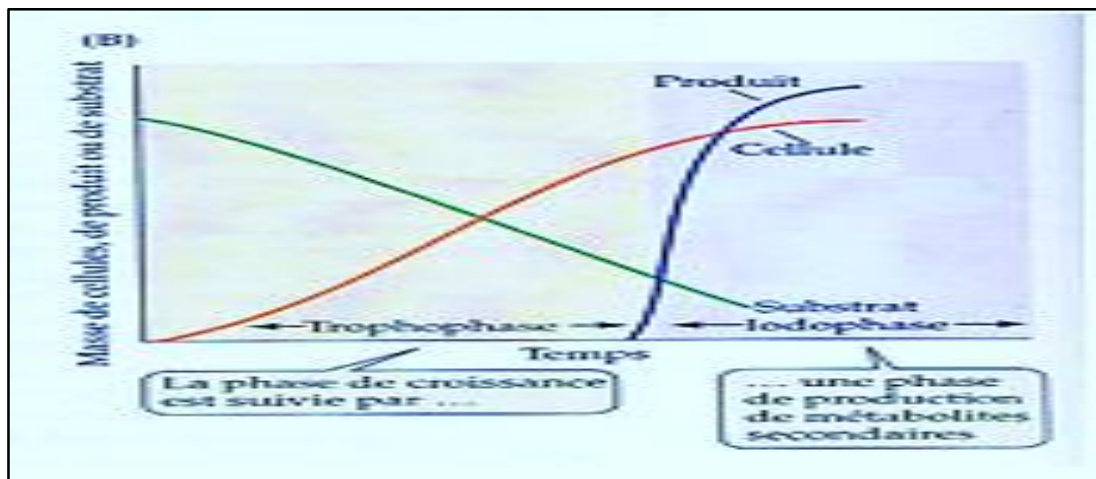


## Chapitre 4 : Production de métabolites fongiques

### I- Les produits de la fermentation

On étudie ici la production de la biomasse et certaines substances désignées par le terme métabolites primaires et secondaires, substances dont la production par les microorganismes peut présenter un grand intérêt industriel et économique.

Au cours du cycle de croissance, le microorganisme va consommer les substrats disponibles (source de carbone, source d'azote, sels minéraux...) pour une prolifération et augmentation du nombre de cellules ce qui conduit à l'obtention de la biomasse et à la libération des produits de la fermentation appelés métabolites, qui peuvent être endocellulaires ou exocellulaires. Ces métabolites doivent être séparés des cellules et du milieu de fermentation par traitement de façon à obtenir une préparation commerciale répondant aux critères de pureté et de stabilité souhaités. Ces traitements sont des opérations simples : centrifugation, filtration, évaporation, précipitation, séchage... Dans le cas de métabolites endocellulaires, la récupération du produit est plus difficile et suppose une étape supplémentaire de broyage ou de lyse des cellules microbiennes. Les produits de la fermentation ou métabolites sont divisés en : métabolites primaires et métabolites secondaires, selon la phase de leurs production durant le cycle de croissance microbien (figure 15).



**Figure 15** Les produits de la fermentation au cours du cycle de croissance microbien.

- **Métabolites primaires** : Ce sont des produits associés ou liés à la synthèse des cellules microbiennes, donc de type associé à la croissance. Ils sont synthétisés pendant **la phase exponentielle (trophopphase)**. Les voies de biosynthèse sont, en général, simples. Parmi

ces métabolites on trouve : les acides aminés, les acides organiques, les enzymes, l'alcool, les vitamines, les polysaccharides, les solvants, les carburants, les lipides...

- **Métabolites secondaires** : Ils sont synthétisés dans des conditions particulières, et s'accumulent pendant la phase suivant la phase exponentielle de croissance ou en **idiophase (phase de ralentissement ou en phase stationnaire)**. Ces produits n'ont pas de relation directe avec la synthèse des matières cellulaires et la croissance normale, ils sont donc, de type non associé à la croissance. On trouve dans ce groupe : les antibiotiques, les toxines, les vaccins, les insecticides, les arômes, les colorants...

**I-1-La biomasse** : La biomasse microbienne brute « Protéines d'organismes unicellulaires » ou SCP (Single Cell Protein), peut être utilisée comme source d'alimentation humaine et animale. Le terme de biomasse désigne le matériel organique cellulaire des organismes mis en culture. Elle peut être une source de protéines, de vitamines, d'antibiotiques, de vaccins... Les sources de SCP sont la biomasse de levures et de bactéries (les levures et les champignons filamenteux sont plus promoteurs comme source de nutrition humaine que les bactéries).

**I-1-1-Biomasse de levures** : Les premières tentatives pour fabriquer des levures datent des années 1930. Depuis la fin de la seconde guerre mondiale, la motivation dans ce domaine est d'un côté la volonté de combler le manque chronique en protéines dans les pays en voie de développement et de l'autre, le recyclage des substances polluantes pour l'eau.

Les cellules de levures sont riches en vitamines B essentielles, leurs protéines contiennent peu d'acides aminés soufrés, et ne sont pas suffisamment équilibrées pour les besoins alimentaires humains ou animaux. Cependant, elles peuvent être additionnées à la farine de blé ou de maïs pour fournir des vitamines B, certains acides aminés, et constituer ainsi un aliment plus équilibré.

**Matière première pour la fermentation** : La mélasse, issue de la canne à sucre (liquide visqueux et homogène de couleur marron foncé à noir) ou de betteraves à sucre (liquide visqueux et homogène de couleur marron), est la matière première de choix, elle a un prix compétitif et une teneur favorable en sucres autre que le carbone, à savoir l'azote, des vitamines et des oligo-éléments. Les mélasses sont obtenues par macération, puis par extraction chaude de la canne ou de betteraves, elles contiennent 40 à 50% de saccharose qui sera clivé par une enzyme (l'invertase) de *Saccharomyces cerevisiae* pour former des sucres fermentescibles (le glucose et le fructose). La transformation de la mélasse en masse cellulaire doit être réalisée sous contrôle de l'aération (elle doit être suffisante pour empêcher la formation de l'éthanol) et

l'ajout en continu du sucre (qui doit rester inférieur à 100mg/l de glucose), car une concentration plus élevée en glucose exerce une répression catabolique conduisant à la production de l'éthanol.

**I-1-2-Biomasse de champignons filamenteux (moisissures) :** La production de biomasse par les champignons a commencée vers les années 1950, par l'utilisation de mycélium séché et débarrassé de son contenu en pénicilline de *Penicillium chrysogenum*, pour la nutrition animale. En effet, en 6 à 10 jours de développement, un champignon peut transformer 1000 g de glucides en 135 g de protéines (le porc ne produit que 41 g de protéines et le poulet 49 g pour 1000 g de glucides). Cette biomasse a un contenu total en azote qui peut dépasser 50% de la masse totale (à peine moins que la viande). Sa composition en acides aminés est bien équilibrée, le taux en lipides est inférieur à 15% (deux fois moins que la viande), les phospholipides représentent 10 à 12% et le cholestérol est absent. Les hyphes rendent le produit fibreux, facteur important pour les nutritionnistes.

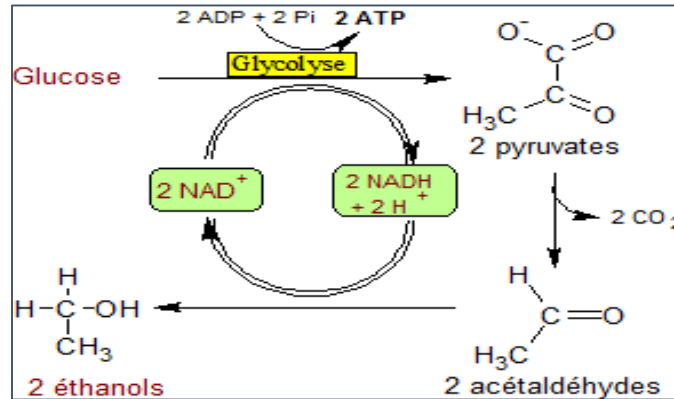
**Matière première pour la fermentation :** L'objectif initial est de produire des protéines pour la nutrition animale, à partir de substrats bon marché, ou de récupération (cellulose, eau de traitement des céréales, effluents d'usine à papier). La culture doit être bien aérée. Après quelques jours de développement à 30°C, à un pH optimal, la masse mycélienne est récoltée par filtration ou centrifugation. Cette masse est traitée à la chaleur pour tuer le champignon et pour extraire la plus grande partie des acides nucléiques (résidus < à 1%). Ce mycélium pourra être mélangé à d'autres composés pour donner une série de produits finis.

## **I-2-Les métabolites primaires**

**I-2-1-Production d'alcool :** L'alcool industriel est un solvant important ( $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{OH}$ ,  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$  : éthanol), et représente la matière première de nombreuses synthèses chimiques et aussi un carburant (carburant vert ou biologique). En 1997, la production était environ 23 milliards de litres d'éthanol (18.5 millions de tonnes), dont 10% par addition catalytique de l' $\text{H}_2\text{O}$  à l'éthylène. La fabrication par voie biotechnologique est la plus importante, environ 2/3 de la production mondiale sont issues de la fermentation de glucose par des levures et des bactéries qui prolifèrent en anaérobiose. Depuis 1975, l'éthanol est utilisé comme carburant dans des pays comme le Brésil et les Etats-Unis).

**Organisme et biosynthèse :** L'organisme classique pour la fermentation destinée à la fabrication de boissons alcooliques est la levure boulangère *Saccharomyces cerevisiae*. Elle

fournit à partir de 1 mole de D-glucose, par une glycolyse, 2 moles d'éthanol (figure 16). La bactérie *Zymomonas mobilis* donne le même rendement, mais elle utilise la voie du céto-désoxyphosphogluconate (CDPG).



**Figure 16** La fermentation alcoolique.

**Fermentation, extraction et purification :** La fabrication de l'éthanol est réalisée à l'aide d'un procédé discontinu dans des bioréacteurs à grands volumes (500m<sup>3</sup>). Le microorganisme de choix est *Saccharomyces cerevisiae*. La fermentation démarre par une préculture sur un milieu de sucre enrichie par différents éléments nutritifs. Après une période de 14 à 20 heures, le pic de la formation d'alcool est atteint (90%). L'inhibition de la levure par une concentration croissante en alcool est maîtrisée par le prélèvement périodique de l'alcool. Le produit obtenu montre une pureté d'environ 95%, ce qui est suffisant pour une utilisation comme carburant. Pour obtenir de l'éthanol absolu, il faut passer par une distillation on utilisant un tamis moléculaire.

**Aspects économiques :** Les matières premières en source carbonée les plus importantes sont la mélasse de canne à sucre (Brésil) et l'amidon de maïs (Etats-Unis). A travers le monde, il existe environ 700 installations industrielles pour la fabrication de l'éthanol par fermentation. Au Brésil, depuis la création du programme « Proalcool » crée en 1975, l'alcool est fabriqué à environ 15 milliards de litres par an, pour réduire les importations du pétrole, du biocarburant. Aux Etats-Unis, ils commercialisent depuis 1975 de l'essence, contenant 10% d'éthanol, sous le nom de « Gasohol ».

**I-2-2-Production d'acide citrique :** Les acides organiques les plus courants sont les acides carboxyliques qui sont principalement employés dans l'industrie alimentaire comme additifs alimentaires et sont utilisés comme agent de conservation, acidulant ou antioxydant. La

production industrielle des acides organiques a débuté avec la production d'acide citrique à partir de citrons ainsi que la production d'acide malique à partir de pommes.

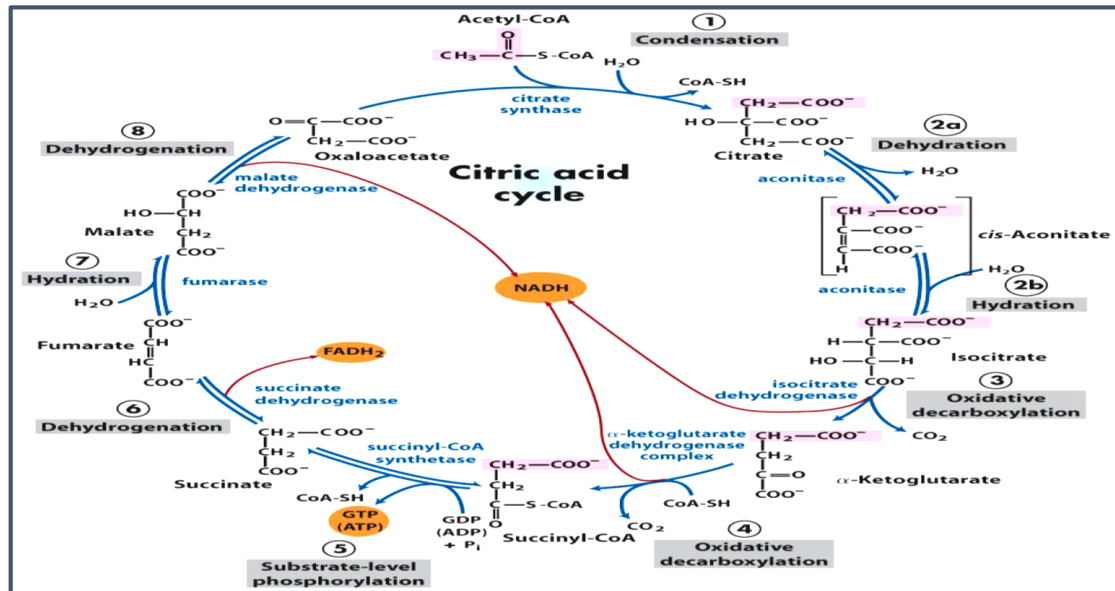
Les principaux acides organiques produits par fermentation liquide et les micro-organismes producteurs sont présentés dans le tableau 4.

**Tableau 4** Principaux acides organiques produits par des procédés microbiens.

Acide organique	Microorganisme utilisé	Usage
<b>Acide acétique</b>	<i>Acetobacter</i> , dans des solutions d'éthanol	Alimentaire
<b>Acide citrique</b>	<i>Aspergillus niger</i> , dans un milieu à base de mélasse	Produits pharmaceutiques, additifs alimentaire
<b>Acide fumarique</b>	<i>Rhizopusnigricans</i> , dans un milieu à base de sucre	Fabrication de résines, tannage et calibrage
<b>Acide gluconique</b>	<i>Aspergillus niger</i> , dans un milieu avec glucose et sels minéraux	Transporteur de Ca et Na
<b>Acide itaconique</b>	<i>Aspergillus terreus</i> , dans un milieu à base de mélasse et de sels	Polymérisation des ester pour la fabrication de plastique
<b>Acide kojique</b>	<i>Aspergillus flavus</i> et <i>Aspergillus oryzae</i> , dans un milieu à base de glucides	Fabrication de fongicides et insecticides
<b>Acide lactique</b>	<i>Lactobacillus delbruecki</i>	Transporteur de Ca et acidifiant

L'acide citrique (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) est le principal acide organique produit et utilisé. C'est un intermédiaire du cycle de KREBS (figure 17). L'acide citrique est formé par la condensation de l'acide oxaloacétique avec l'acétyle coenzyme A (les deux dérivés du pyruvate). Les souches productrices ont une activité citrate synthétase élevée et les activités de l'aconitase et de l'isocitrate déshydrogénase sont réduites. Il est largement utilisé dans l'alimentation, comme additif alimentaire, mais aussi dans la composition des détergents et des cosmétiques. 60% de la production est utilisée par l'industrie alimentaire (jus de fruits, confiserie...), comme acidifiant, neutralisant ou émulsifiant. Cet acide est un antioxydant. Pour la pharmacie, sous

forme de citrate de fer ou de calcium, qui est utilisé comme agent conservateur. 30% de la production est utilisée par la métallurgie (obtention de métaux purs grâce au pouvoir chélatant de l'acide citrique), par l'industrie chimique (détergent, traitement des tissus, fabrication de plastique...).



**Figure 17** Synthèse de l'acide citrique (cycle de KREBS).

La production d'acide citrique par fermentation liquide à l'échelle industrielle date de la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle. Depuis quelques années, les recherches s'orientent vers une production d'acide citrique par FMS. Un grand nombre de champignons filamenteux (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*), de levures (*Candida*, *Saccharomycopsis*) et quelques bactéries (*Arthrobacter*, *Corynebacterium*) sont capables d'excréter l'acide citrique, mais *Aspergillus niger* reste le meilleur champignon producteur d'acide citrique à échelle industriel. L'acide citrique peut être produit à partir de canne à sucre, son de blé ou de riz ou encore de grains de café, etc. En effet, sa production est fortement influencée par le type et la concentration de la source de carbone. Cette source de carbone, principalement le saccharose, doit être comprise entre 140 et 220 g/L. La source d'azote ne doit pas excéder 0,4 g/L. L'utilisation de sels d'ammonium, comme le sulfate d'ammonium, est préférée pour la production d'acide citrique. En effet, l'utilisation de ces sels comme source d'azote permet une diminution du pH du milieu de fermentation qui est essentielle pour la production d'acide citrique. Celle-ci est améliorée lorsque le pH est aux environs de 2. La température de fermentation est généralement de 28 à 30°C et le meilleur taux d'humidité initiale est de 70%. Les métaux tels que le cuivre, le zinc, le manganèse et le fer doivent être présents en faible quantité. Il est important de noter qu'une

forte aération augmente la sporulation du champignon entraînant une diminution de production d'acide citrique. Ainsi, il est nécessaire de maintenir le champignon à l'état de mycélium. Avec la souche sauvage d'*Aspergillus niger*, la production d'acide citrique peut varier de 88 à 264 mg/g de matière sèche. L'utilisation d'une souche d'*Aspergillus niger* mutée permet d'obtenir 616,5 mg/g de matière totale.

**I-2-3-Production des enzymes :** Les enzymes sont des catalyseurs biologiques. Ce sont des macromolécules de haut poids moléculaire (10 à 100 kDa) présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires.

Les enzymes sont privilégiées en industrie car elles permettent de contourner les inconvénients des produits chimiques et améliorent les relations coûts-efficacité des procédés. Le marché global des enzymes industrielles et de spécialité conserve une forte croissance. Estimé à plus de 1,5 milliards US\$ en l'an 2000. Il a atteint 6 milliards de dollars en 2011, dont 40% sont représentés par les enzymes d'origine fongique. Parmi les enzymes industrielles, les protéases occupent la part majeure des ventes des enzymes, soit environ 60%. Les enzymes industrielles proviennent de source végétale, animale ou microbienne. L'extraction à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par des paramètres difficiles à contrôler. Dès que le développement de la microbiologie a permis de comprendre les systèmes de la synthèse des enzymes chez les microorganismes, la production industrielle des enzymes s'est orientée vers les processus fermentaires. En effet, les principaux avantages des enzymes de fermentation par rapport aux enzymes d'extraction sont une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques, une possibilité d'utilisation de matières premières bon marché, des rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes et l'optimisation des conditions de production. Ces avantages l'ont emporté sur les inconvénients liés aux industries de fermentations (lourd investissement, consommation d'énergie, risques de contamination...). Les enzymes d'origine fongique sont des enzymes extracellulaires, ce qui permet une séparation du mycélium du milieu de fermentation par une simple filtration. La biosynthèse des enzymes est influencée par diverses formes d'azote. Un nombre considérable d'enzymes requiert un cation métallique pour leur activité : les métalloenzymes. Ces cations sont fortement liés à la protéine, ils participent à la reconnaissance du substrat et à la catalyse enzymatique, tout en stabilisant le site actif dans une conformation spatiale active.

La production des enzymes se fait soit sur substrat solide (méthode qui joue un rôle important tout particulièrement au Japon), soit en culture submergée dans des fermenteurs de 100 à 200 m<sup>3</sup> équipés de système d'agitation puissant et bien aérés car la production des enzymes présente une forte demande en oxygène. Les enzymes doivent être séparées des cellules et du milieu, traitées de façon à obtenir une préparation commerciale répondant aux critères de pureté et de stabilité souhaités. Ces traitements sont des opérations simples telles que : filtration, centrifugation, évaporation, précipitation, séchage... Les préparations enzymatiques peuvent être commercialisées sous différentes formes : liquide, concentré, granulées, poudre, immobilisées... Les formes liquides sont faciles à mettre en œuvre que les formes déshydratées, mais ces dernières présentent une meilleure stabilité à la conservation. Les enzymes utilisées dans les industries agroalimentaires ou pharmaceutiques exigent une solide réglementation concernant leur production, leur pureté chimique, biochimique et microbiologique. Leur présentation commerciale soit diluée, soit fixées sur des supports inertes (forme adaptées aux différentes utilisations industrielles).

**Protéases :** Les enzymes protéolytiques (protéases ou protéinases) font partie de la classe des hydrolases. En effet, ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique et peuvent être endocellulaires ou exocellulaires. Les protéases d'origine végétale sont par ordre décroissante en technologie. La papaïne, la bromélaïne, la kératinases et la ficine représentent quelques-unes des protéases bien connues d'origine végétale. La plupart des protéases d'origine animales sont pancréatiques (la trypsine, la chymotrypsine, la pepsine, la rénine). Cependant, elles sont produites par une grande variété de moisissures, de levures et de bactéries dont, les actinomycètes (tableau 5).

**Tableau 5** Exemples de microorganismes producteurs de protéases.

Sources	Espèces
Moisissures	<i>Aspergillus oryzae</i>
	<i>Mucor circinelloides</i>
	<i>Penicillium</i> sp.
	<i>Aspergillus terreus</i>
	<i>Aspergillus clavatus</i> ESI
Levures	<i>Candida lipolytica</i>



<b>Bactéries</b>	<i>Bacillus licheniformis</i>
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
<b>Actinomycètes</b>	<i>Streptomyces</i> sp.
	<i>Nocardiosisalkaliphilasp.</i>

Lors de la production, une fois la phase de croissance et de formation de la masse cellulaire achevée, la synthèse des protéases est déclenchée par l'ajout d'un inducteur. A la fin, l'enzyme extracellulaire est récupérée par une étape de séparation de la masse cellulaire à l'aide d'une filtration, suivie par une précipitation et une ultracentrifugation. Les protéases occupent une grande part du marché des enzymes industrielles. Dont les ventes sont estimées à plus de 350 millions US\$ annuellement. Les principaux secteurs industriels employant les protéases sont résumés dans le tableau 6.

**Tableau 6** Applications industrielles des protéases.

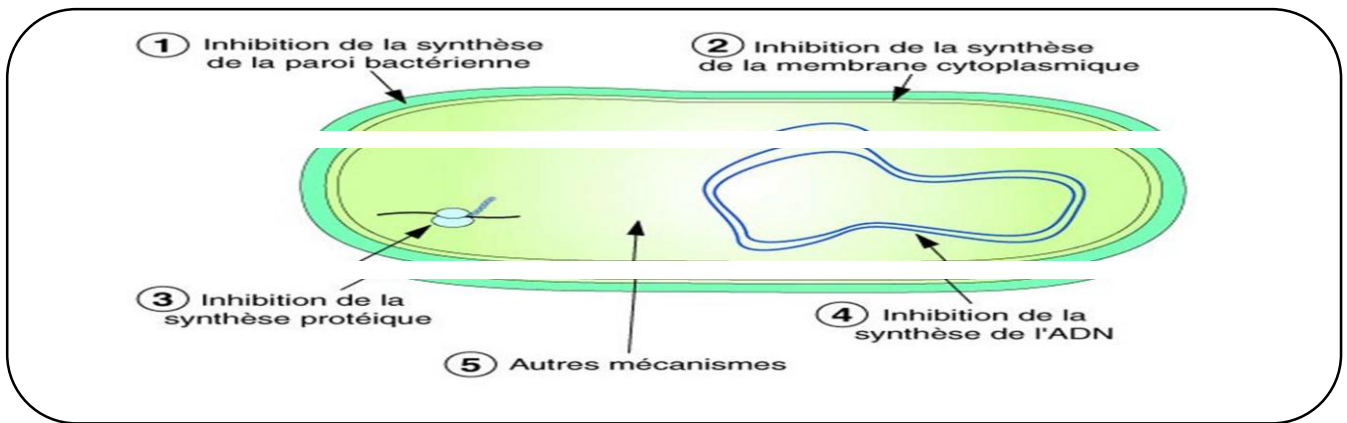
<b>Industries</b>	<b>Applications</b>
<b>Pharmaceutique et médicale</b>	La grande diversité et spécificité des protéases est un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans le développement des agents thérapeutiques efficaces. Par exemple, des protéases d' <i>A. oryzae</i> sont utilisées comme aide à la digestion ; des collagénases provenant de <i>Clostridium sp.</i> sont utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement des brûlés, des plaies et des ulcères dermiques.
<b>Alimentaire</b>	La fabrication des fromages, dans l'étape de l'affinage.  Additifs pour augmenter la digestibilité des aliments et l'attendrissage des viandes.
<b>Chimique</b>	Dans les détergents, on se sert de protéases relativement spécifiques pour les taches de nature protéique (les taches organiques qui disparaissent le plus difficilement au lavage souvent due à une protéine dénaturée) .en effet 25% des protéases commercialisées sont des enzymes puissantes.

**I-3-Production de métabolites secondaires** Dans ce groupe, on trouve les antibiotiques, les insecticides biologiques, les hormones végétales (gibbérellines) et les alcaloïdes de fermentation.

**I-3-1-Biosynthèse des antibiotiques :** 8000 molécules à effet antibiotique sont isolées à partir de microorganismes, et 4000 autres à partir d'organismes supérieures comme des lichens, des plantes et des animaux. La famille des actinomycètes représente actuellement les organismes producteurs d'antibiotiques les plus polyvalents.

**Définition :** Les antibiotiques sont des substances chimiques produites par des microorganismes et douées d'une : activité antibactérienne (ayant le pouvoir d'inhiber ou de détruire d'autres microorganismes, sans affecter l'hôte (cellules eucaryotes), activité en milieu organique et une bonne absorption et diffusion dans l'organisme. Les antibiotiques ont la propriété d'interférer directement avec la prolifération des micro-organismes à des concentrations tolérées par l'hôte. Leur intérêt économique provient de l'utilisation médicale (chimiothérapie) pour leur pouvoir antimicrobien dans la lutte contre les maladies infectieuses. La pénicilline, premier antibiotique à usage clinique, est produite par *Penicillium notatum* et sa découverte fortuite résulte de l'observation par Fleming (en 1928) du pouvoir inhibiteur d'une colonie de ce champignon vis-à-vis de l'espèce bactérienne *Staphylococcus aureus* lors d'une contamination accidentelle d'une boîte de Pétri. On distingue : les antibiotiques à spectre large, agissant contre tout un spectre de germes pathologiques (ex : les Céphalosporines et les Tétracyclines), et les antibiotiques sélectifs qui se montre actifs contre des pathogènes bien précis (ex : la rifampicine en cas de tuberculose, l'amphotéricine B en cas de mycoses). Les antibiotiques peuvent être classés en fonction de leur spectre antimicrobien, leur mode d'action, la souche productrice, la voie de biosynthèse ou la structure chimique.

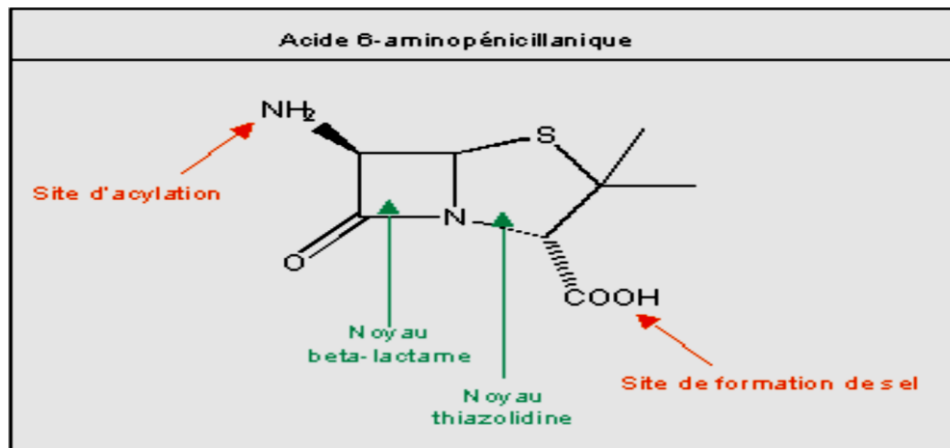
**Mode d'action :** Un antibiotique doit se caractériser par une action spécifique sur les germes visés sans perturber le fonctionnement des cellules eucaryotes (hôte). Il devra affecter une voie métabolique absente ou peu active chez les eucaryotes mais essentielle aux procaryotes, ou atteindre une cible spécifique aux procaryotes. Les antibiotiques agissent à l'échelon moléculaire au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie (figure 18).



**Figure 18** Cibles d'attaque des antibiotiques au niveau de la cellule bactérienne.

**I-3-1-1-La famille des  $\beta$ -lactamines** : les antibiotiques du type  $\beta$ -lactame sont les plus utilisés au monde. La production mondiale se situe aux alentours de 30000 tonnes. Il s'agit d'une famille qui comprend 4 groupes majeurs : les pénames (pénicillines), les pénèmes, les céphèmes (céphalosporines, céphamycines et oxalcéphèmes) et les monobactames ( $\beta$  lactamines monocycliques). Elles représentent une vaste famille d'antibiotiques bactéricides qui possèdent comme structure de base le cycle bêta-lactame. Les  $\beta$ -lactamines sont des inhibiteurs de la synthèse de paroi bactérienne (synthèse du peptidoglycane) par une inactivation des principaux enzymes impliqués dans cette construction et regroupés sous le terme de PLP (Protéines Liant les Pénicillines). Ce sont des analogues structuraux de substrats des enzymes synthétisant le peptidoglycane (transpeptidase, carboxypeptidase), localisés dans l'espace périplasmique. Les bêta-lactamines se comportent comme des inhibiteurs de la transpeptidase, enzyme essentielle à la synthèse de la paroi bactérienne. Elles forment un lien covalent avec l'enzyme et empêchent donc toute activité de celui-ci. Les  $\beta$ -lactamines sont actives sur des bactéries en phase de croissance bactérienne car les protéines cibles sont impliquées dans le renouvellement constant de la paroi bactérienne.

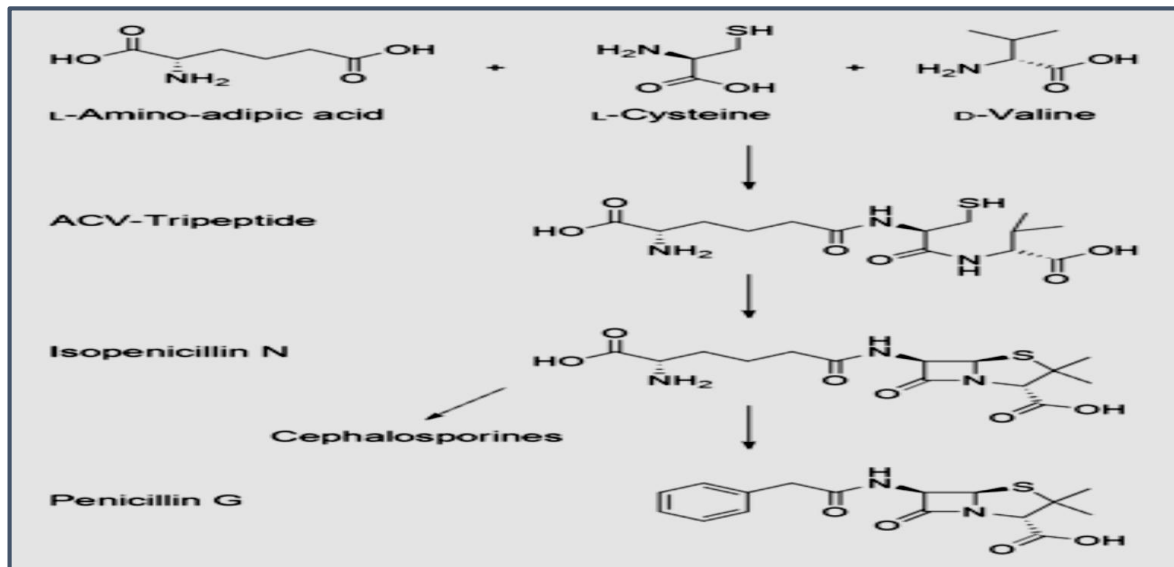
**Pénicillines** : Molécules à noyau péname, à effet bactéricide. La structure de base des pénicillines est l'acide 6-aminopénicillanique (6-APA), composé d'un cycle thiazolidine associé à un cycle  $\beta$ -lactame sur lequel est greffée une chaîne latérale variable en position 6 (figure 19).



**Figure 19** La structure de base des pénicillines.

Les pénicillines naturelles sont produites sans addition de ces chaînes, les pénicillines de biosynthèse le sont en ajoutant au milieu de culture le précurseur de la chaîne latérale variable. Les composés de ce groupe, malgré leur relative ancienneté, se situent encore actuellement, en tête des antibiotiques utilisés dans le monde. La pénicilline découverte en 1929 par Fleming, ne fut fabriquée industriellement qu'à partir de 1941. Les pénicillines naturelles (G et V) sont produites par *Penicillium chrysogenum* (ou *Penicillium notatum*). Elles sont synthétisées à partir d'un tripeptide, l' $\alpha$ -aminoadipyl-cystéinyl-valine qui, après cyclisation et oxydation, donne l'isopénicilline N, précurseur des pénicillines (figure 20). La pénicilline est excrétée en début de la phase stationnaire de croissance. La culture soit aérée et agitée et son pH soit contrôlé et proche de 7. Les milieux de culture complexes contiennent du lactose pour l'apport en carbone et comme source d'azote de la trempe de maïs. La formation des antibiotiques ne démarre qu'après 40 heures (après la croissance du microorganisme). Dans la phase de production (qui dure environ 100 heures), on ajoute de l'acide phényl acétique à la culture. La pénicilline G est sécrétée dans le milieu de culture au fur et à mesure de sa formation. Après séparation du mycélium par filtration ou centrifugation, le surnageant est extrait à l'aide d'acétate d'amyle ou de butyle, dans des conditions bien définies (pH ajusté entre 2.5 et 3.0 et température de 0°C à 3°C). Les rendements actuels sont supérieurs à 40g/l. Des pénicillines semi-synthétiques sont préparées par voie chimique ou enzymatique à partir des pénicillines naturelles, il y a formation d'acide 6-aminopénicillanique (6-APA) qui est recyclé chimiquement pour donner des composés actifs nouveaux. Les pénicillines sont capables d'inhiber la synthèse de la paroi bactérienne. Elles agissent sur les bactéries Gram positif (*Staphylococcus*, *Streptococcus*...), quelques bactéries Gram négatives. La plupart des pénicillines peuvent être décomposées par des germes dotés d'une pénicillinase (*Escherichia coli*, *Bacillus*...). Ainsi, la pénicilline G et

son dérivé, l'acide Amino-6-Pénicillanique (6-APA) sont les intermédiaires les plus importants de la synthèse des pénicillines et des céphalosporines hémi-synthétiques.

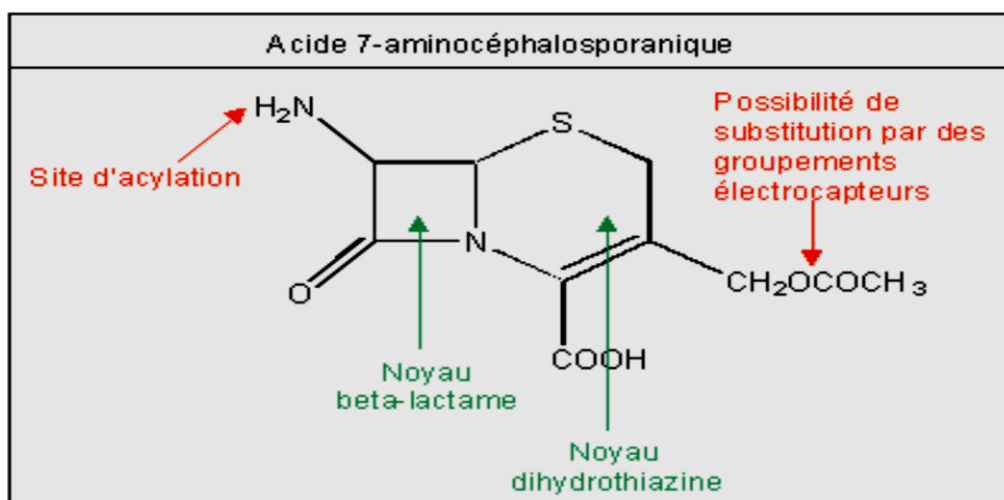


**Figure 20** Synthèse de la pénicilline G.

**Céphalosporines** : elles sont synthétisées par *Acremonium chrysogenum* au paravent *Cephalosporium acremonium*, et la céphalosporine C a été identifiée en 1953 comme premier représentant de ce groupe basé sur la structure  $\beta$ -lactamique. Les céphalosporines produites par hémisynthèse à partir de la céphalosporine C. Dans ce groupe, on distingue :

- Les céphalosporines proprement dit : C1G, C2G, C3G et C4G
- Les céphamycines : sont caractérisés par la présence d'un radical méthoxy sur le noyau céphem, assurant une résistance aux pénicillinases
- Les oxacéphemes : présentent une grande résistance à la dégradation enzymatique.

Les céphalosporines ont un effet bactéricide, et sont moins sensibles à l'hydrolyse enzymatique que les pénicillines. Leur structure de base est le noyau céphème ou : acide 7-amino céphalosporanique (7-ACA) composé d'un cycle dihydrothiazine associé à un cycle  $\beta$ -lactame (figure 21).



**Figure 21** Structure de base des céphalosporines.

Les Céphalosporines semi synthétiques sont obtenues à partir de cet intermédiaire (7-ACA).

La fabrication de la céphalosporine C par voie de fermentation (*A.chrysogenum*) est de point de vue du procédé proche de ce qui se pratique pour la fabrication des pénicillines, mais les rendements sont plus faibles. L'ajout d'acides gras améliore le rendement.

### I-3-1-2-Autres antibiotiques

**Griséofulvine** : Elle est active sur tout contre les dermatophytes. Elle est produite par *Penicilium griseofulvum* et résulte de la condensation d'une unité acétate et de 6 unités malonate. La chaîne polycétonique à 14 carbones ainsi formée est convertie en griséofulvine après une série de réactions de cyclisation, de méthylation et de chloration.

**Acide fusidique** : Il est actif contre diverses bactéries Gram positif. Il inhibe l'allongement des chaînes de protéines. L'organisme producteur est *Fusidium coccineum*. L'acide fusidique appartient à la famille des terpenoïdes, formés à partir d'unités isoprènes.

**Acide aspergillique** : Cet antibiotique, actif contre les bactéries Gram positif et Gram négatif, est synthétisé par *Aspergillus flavus*.

**Variotine** : C'est un dérivé d'acides gras. Cet antifongique est produit par *Paecilomyces variotii*.

**I-3-1-3-La résistance aux antibiotiques** : Depuis l'introduction des antibiotiques en thérapeutique, on assiste à l'émergence très rapide de nombreuses souches bactériennes devenues insensibles à un ou plusieurs antibiotiques. Au départ de molécules naturelles, cependant, des modifications chimiques sont souvent apportées pour améliorer l'activité et/ou modifier des paramètres pharmacocinétiques essentiels. Aujourd'hui, la plupart des antibiotiques en usage clinique sont donc obtenus par semi-synthèse.

La résistance naturelle : elle existe d'emblée si le germe n'appartient pas au spectre de l'antibiotique.

La résistance acquise : elle est due à l'emploi abusif d'antibiotiques (ceux-ci n'exercent plus d'effet sur des germes antérieurement sensibles). Cette résistance est due à l'apparition de germes mutants dus au traitement antibiotique lui-même. Elle est notamment le résultat d'une prise de trop courte durée de l'antibiotique ou d'une auto médication répétitive. La résistance est croisée dans une même famille (ex: résistance à toutes les pénicillines).

Les mécanismes de résistance les plus importants sont :

a/L'empêchement de l'absorption et/ou l'excrétion accrue des antibiotiques (ex : modulation de la perméabilité membranaire).

b/La modification des structure cibles des antibiotiques (ex : variation du site de liaison sur le ribosome ou l'ADN).

c/L'altération de l'antibiotique à l'aide d'une enzyme (certaines bactéries libèrent les  $\beta$ -lactamases ou pénicillinases qui hydrolysent les pénicillines naturelles, elles sont plus ou moins active vis-à-vis des pénicillines synthétiques).

**I-3-2-Biosynthèse des alcaloïdes** : Les métabolites secondaires synthétisés par les champignons microscopiques, ne se limite pas aux antibiotiques. Ces microorganismes sont capables de produire des substances à activités pharmacologiques (des hormones, des récepteurs de substances animales et des substances comparables à des peptides médiateurs chez les vertébrés (insuline)). Les premiers produits d'origine fongique en médecine sont les alcaloïdes de l'ergot du seigle (fait partie des céréales à paille), utilisés en gynécologie et pour diverses autres indications.

Les alcaloïdes de l'ergot du seigle : l'ergot est un champignon parasite des graminées qui produit, à la place des grains, des sclérotés riches en alcaloïdes. Il appartient au genre *Claviceps*, classe des ascomycètes. Les alcaloïdes de l'ergot sont toxiques à fortes doses en provoquant des gangrènes (c'est le terrible feu de Saint-Antoine, provoqué au moyen âge par l'ingestion de farine contaminée par ce champignon). A des concentrations limitées, ces alcaloïdes se révèlent de précieux médicaments. Leurs propriétés obstétricales furent citées pour la première fois en 1565. L'entrée officielle de l'ergot dans la pharmacopée date de 1807. Les principales

utilisations thérapeutiques sont : atonie, migraines, troubles circulatoires, insuffisance cérébrale, hypertension, maladie de Parkinson.

Les alcaloïdes de l'ergot forment une famille dérivée d'un noyau tetracyclique dénommé : ergoline. Le noyau ergoline est dérivé du tryptophane et de l'acide mévalonique. Les alcaloïdes naturels sont soit des clavines, des dérivés du type acide lysergique à courtes chaînes latérales ou des dérivés tripeptidiques complexes des groupes ergotamines et ergotoxines. Plus de 99% des sclérotés contiennent des alcaloïdes à la concentration de 0.05 à 2%. Les milieux de production sont caractérisés par de fortes concentrations en sucres (jusqu'à 30%), par la présence de sels ammoniacaux d'acides carboxyliques et par des quantités sub optimales de phosphate. Actuellement, les divers alcaloïdes de l'ergot peuvent être produits par culture saprophytique de *Claviceps purpurea* et *Claviceps paspali*, en bioréacteur, à raison de plusieurs grammes par litre. La synthèse d'alcaloïdes ne s'effectue que dans des cellules globuleuses, à paroi épaisse, riche en lipides, comparables aux cellules du sclérote parasite. La fermentation dure une dizaine de jours, et les divers alcaloïdes sont extraits du mycélium par le chloroforme en milieu alcalin (pH 8 à 10). La synthèse chimique au niveau du laboratoire est trop complexe, elle est impossible au stade industriel. De nombreux dérivés sont obtenus par hémisynthèse, après production par fermentation de la molécule de base, l'acide lysergique.