**LES ANTIBIOTIQUES**

**ACTINOBACTERIES (exActinomycetes) MICROORGANISMES D’INTERET INDUSTRIEL**

**GENERALITES**

* Les Actinomycètes sont des bactéries
* Leur structure subcellulaire est procaryote
* Gram+, hétérotrophes, aérobies, mésophiles.
* Certains présentent des morphologies semblables à celle des moisissures.
* ils présentent des filaments mycéliens
* Ils forment des spores de dissémination.
* Pas d’endospores
* Ils sont sensibles aux antibactériens et aux bactériophages
* Résistants aux antifongiques
* Pas de stérols dans leurs membranes

**Importance industrielle**

* 70% des antibiotiques d’origine naturelle sont produits par les microorganismes.
* Les Microorganismes procaryotes 50 %,
* les champignons 20 %
* Le reste par les végétaux principalement et les animaux (végétaux supérieurs 15%, algues 2%, lichens, 1% et les animaux 7%)
* Un même microorganisme peut produire plusieurs antibiotiques de la même famille ou de familles différentes. Inversement, un même antibiotique peut être synthétisé par divers genres et espèces comme c’est le cas de l’acide fusidique isolé à partir de 18 espèces appartenant aux genres Fusidium, Cephalosporium, Microsporum, Mucor
* **Les Bactéries non mycéliennes** produisent environ 10% du total des antibiotiques
* Parmi les bactéries productrices nous citerons les Bacillaceae :*Bacillus subtilis* et les pseudomonadaceae : pseudomonas
* Les antibiotiques produits par ce groupe sont généralement de nature peptidique, (Bacitracine , polymyxine)
* **Les champignons** produisent environ 20% du total des antibiotiques
* Parmi les champignons producteurs, nous citerons les genres Aspergillus, Fusarium, Penicillium et Trichoderma et aussi certains Basidiomycetes et Zygomycetes
* Les antibiotiques les plus connus secrétés par les champignons sont la pénicilline, la céphalosporine, la griséofulvine , l’acide fusidique etc. ;
* **Les actinomycètes**
* 70% des antibiotiques sont synthétisés par ce vaste groupe ; les espèces du genre Streptomyces sont à l’origine de plus de 50% du total des antibiotiques et près de 80% des antibiotiques produits par les actinomycètes. Les autres considérés comme actinomycetes rares :tel que Micromonospora, Nocardia, Actinomadura

Apres les antibiotiques : **Les ENZYMES**

* l’industrie alimentaire (isomérase du glucose), détergents (protéases).
 Médicales :(Neuraminidases, estérases et oxydases des stérols)
* Biologie moléculaire: (endonucléases de restriction).

Les glycosidases des Actinomycètes jouent un rôle important dans la dégradation des biomasses végétales (amylases, xylanases) et animales (chitinases

**Leur importance touche en réalités plusieurs domaines**

****

CRITERES D IDENTIFICATION

Certains actinomycètes peuvent être identifiés uniquement par leur morphologie particulière, la micromorphologie pour d’autres ,la composition en acides aminés, sucres ,lipides est obligatoire

1)**critères morphologiques :**

Présence ou absence de mycelium aérien ( sa couleur, sporulation, fragmentation, ..

Le mycelium du substrat (fragmentation, stérile ou sporulé, présence de sporanges

Les pigments solubles

1. **Critères chimiques**

Les chimiotypes sont définis selon les acides aminés pariétaux ,les sucres pariétaux et les lipides cellulaires et les acides nucléiques

1. **Acides aminés**

La paroi des actinomycètes est composée de dipéptides qui peuvent contenir les acides aminés suivants

Acide diaminopimélique forme LL, DL ou meso

Lysine, ornithine, glycine ,acide diaminobutyrique(Dab)

1. **Sucres cellulaires :**

La composition en glucide d’un hydrolysât cellulaire et de la paroi est un critère taxonomique chez les actinomycètes après hydrolyse l’analyse des sucres peut être effectué par CCM

Les couples arabinose xylose sont caractéristiques des actinoplanes

La présence de madurose caractérise les maduromycetes

L’arabinose et galactose les nocardioformes …..

La combinaison du type d’acide aminé pariétal et du spectre des glucides permet un classement en types principaux 1,2,3,4 (voir tableau)

1. **Les lipides :**

 La présence d ‘acides mycoliques est caractéristique de quelques actinomycètes seulement .Ce sont des molécules en forme de chaînes droites ou ramifiée ,saturées ou insaturées avec présence éventuellement de groupes

Il existe des acides mycoliques à 80 C (Mycobacterium) 50C (Nocardia) 30 C (Corynebacterium)

La composition en phospholipides est également un critère de différenciation de quelques groupes et sous groupes

1. **Les acide nucléiques**

Les actinomycètes sont caractérisés par un coefficient de Chargaff (C+ G %) élevé (60 à 80 %), Mycobacterium(60 à 70 %), Actinomyces (63 à 73), Nocardia (67 à 69), Streptomyces(69 à 76) Micromonospora (71 à 73) Actinoplanes ( 70 à 76)

Le % de cytosine guanine a permis de reconsidérer la définition des actinomycètes dont l’ADN contient un % de G+C supérieur à 55%

Ainsi l’ordre des actinomycetales est défini comme regroupant les bactéries à Gram+ ayant un taux élevé de Guanine + cytosine (C+G > 55%)

Forment un groupe homogène sur la base du séquençage de l’ADN ribosomal 16S et l’hybridation ADN/ ADN

**Ceci a permis de reconsidérer**

la lignée des actinomycètes de celle des Bacillaceae , des Lactobacillaceae et d’autres bactéries à Gram+

De même que d’autres bactéries non mycéliennes tel que Corynebacterim, Mycobacterium, Cellulomonas, Arthrobacter et même Micrococcus sont considérées comme faisant partie de la lignée phylogénétique des actinomycètes

**ECOLOGIE des ACTNOBACTERIES**

* 10 et 20 % du total de la microflore tellurique
* Divers sols, le fumier, composts, foin, débris végétaux, litières, les graines de céréales, pollen de plantes
* Lacs, rivières , mers et océans
* Sols glaciaires de l’arctique, déserts chauds de divers continents, sols pollués par le pétrole ou les métaux lourds,
* les lacs salés et alcalins :actinomycètes halophiles.

**SOURCE  et MILIEUX ISOLEMENT SELECTIFS :**

Milieux naturels ,sol, eaux riches pour les actinomycètes courants (Streptomyces) et milieux extrêmes pour les actinomycètes plus rares (autres que streptomyces)

* Actinomycètes sont à croissance relativement lente.
* Défavorisées devant les bactéries non mycéliennes à croissance plus rapide et plus nombreuses et les champignons envahissants
* D’où la nécessité de recourir à des milieux sélectifs
* la sélectivité des milieux a été améliorée par l’addition d’agents chimiques ou d’antibiotiques inhibiteurs des bactéries, ou encore de genre indésirables d’actinomycètes

 Les champignons invasifs sont facilement éliminés par l’utilisation d’antifongiques (actidione ou nystatine)

* Certains auteurs ont mis à profit le pouvoir chitinolytique et ont conçu un milieu minéral avec de la chitine comme seule source de carbone et d’azote. ce milieu permet d’éliminer les bactéries non mycéliennes
* Le milieu chitine fut amélioré en ajoutant des vitamines du groupe B (CHV)
* D’autres milieux utilisent l’acide humique à la place de la chitine

 Les tétracyclines permettent de sélectionner les nocardia , la novobiocine les micromonospora et les actinoplanes

* Les antibiotiques utilisés : cycloserine, erythromycine, gentamicine, novobiocine, streptomycine à 10µg /ml
* kanamycine,le chloramphénicol, oxytetracycline , pénicilline et polymyxine à 25 µg/ml

**MILIEUX ISP (International Streptomyces Project)**

* ISP1 : Tryptone ,Extrait de levure, Agar
* ISP2 : Extrait de levure, extrait de malt, glucose, Agar
ISP3 :Farine d’avoine agar , Infusion d’avoine, solution saline ,
ISP4: amidon et sels minéraux
* GYEA :extrait de levure,glucose, agar
* **Etude physiologique**
* ISP7 : Glycerol 15 g, L tyrosine 0,5g, l ,Asparagine 1g , KH2PO4 0,5g, MGSO4 0,5g, NACL 0,5g, FESO4 0,01g ,Agar , pH 7,2

**STREPTOMYCES et autres**

Streptomyces est celui qui prédomine dans les sols représentent 80 à 95% de actinomycètes

Après Streptomyces les genres les plus fréquents sont Nocardia et Micromonospora

Les autres genres représentent une fraction infime, peu fréquente ou rares

Les genres Saccharothrix et Nocardiopsis représentent moins de 0,5% des actinomycètes dans le monde et se trouvent dans des écosystèmes particuliers tels que les gisements de minéraux, les eaux usées, les sols salins et alcalins.

Dans les sols sahariens ils peuvent atteindre jusqu'à 15% de la flore actinomycète

 **PRODUCTION et EXTRACTION des ANTIBIOTIQUES**

Après croissance des souches en milieu liquide, on filtre sur papier pour séparer le mycelium du milieu de culture , on peut extraire l’activité soit à partir du filtrat soit à partir du mycelium

**Extraction à partir du mycelium** : le mycelium est lavé à l’eau , il est remis en suspension dans du methanol puis agiter durant 2 heures

**Extraction à partir du filtrat** : On utilise une armada de solvants usuels + ou – polaires après avoir ramené le Ph du filtrat à 7 ;Les solvants utilisés : methanol, butanol, ethanol, benzène, acétate d’éthyle, hexane. On utilise des ampoules à décanter et des rotavapors pour la concentration des phases

L’activité antimicrobienne des différentes phases et des résidus après extraction est testée par antibiographie.50 µl d’extrait sont déposés sur un disque en papier stérilisé sous UV. Les disques sont déposés aseptiquement sur un milieu ensemencée au préalable avec la souche cible

**Spectre UV vis des extraits butanoliques** : Les extraits obtenus sont redissous dans du méthanol, à l’aide d’un spectrophotomètre, on détermine leur spectre d’absorption entre 200 et 450 nm Ce test nous informe sur la nature polyénique ou non polyénique dans le cas des antifongiques

 **PURIFICATION DES ANTIBIOTIQUES**

**- ETUDE DE LA SOLUBILITE DANS DIFFERENTS SOLVANTS** : pour le choix des systèmes éludants des différentes chromatographies et elle donne des indication sur la polarité des substance présentes

-**SEPARATION PAR CCM** :

Pour de multiples usages :analytique , préparative, révélation microbiologique, révélations physique (fluorescence en UV) et chimiques

Choix des révélateurs chimiques en fonction des types de substances : macrolides, glucides, phénols, amines ..

Les révélations microbiologiques sont effectuées comme suit :

 Les chromatographes sont séchés à l’étuve. Un volume de 100 ml de gélose molle en surfusion (45 – 50°) ensemencée en masse avec la souche cible .

Ce milieu est réparti avec une pipette sur toute la surface du chromatogramme afin d’obtenir une couche unifiée. Les zones d’inhibitions sont notées après inoculation

Dans le cas de la chromatographie préparative les plaque ont une epaisseur de 0,5 mm Les zones de gel correspondant aux antibiotiques sont grattées et reprises dans du méthanol

La purification de ces substances peut être confirmée et effectuée par HPLC

Sur les fractions purifiées on peut entamer d’autres types d’investigation tel que

**IDENTIFICATION CHIMIQUE DE LA MOLECULE**

Qui nécessite la mise en œuvre de techniques spectroscopiques ( IR, masse, RMN …)

**SPECTRE D’ACTIVITE ET MESURE DES CMI**

**ETUDE DU MODE D’ACTION ET DE LA TOXICITE**