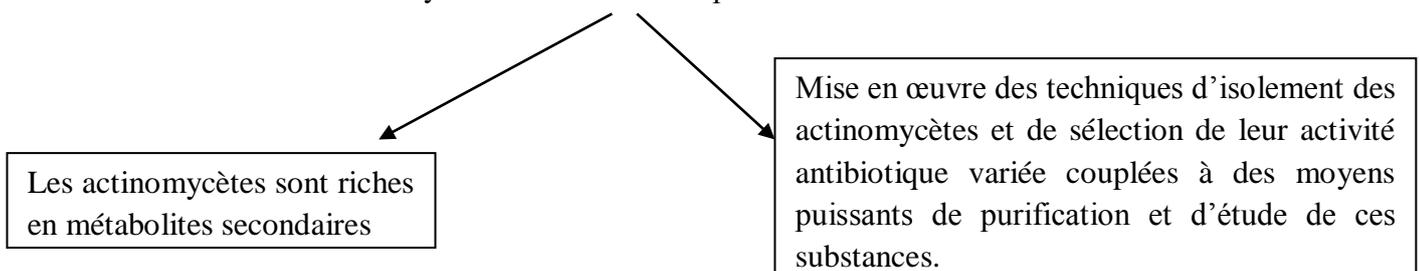


Définition

- ❖ Antibiotique : substance naturelle ou synthétique, cliniquement définie ayant la propriété d'inhiber la croissance ou même détruire les micro-organismes (animaux, végétaux, microbes).
- ❖ Elle manifeste **à faible concentration** des activités biologiques de nature :
 - antibactérienne
 - antifongique
 - antivirale
 - antiparasitaire
 - anticancéreuse

Micro-organismes producteurs	→ Actinomycètes 69,7% du total des ATB décrits
	→ Champignons 19,5%
	→ Bactéries 10%
	→ Algues 0,8%

Les ATB issus des actinomycètes constituent des produits d'intérêt industriel car :



Isolement sélectif

- Un échantillon du sol comprend un ensemble d'une flore microbienne dont multiples représentants gênent l'isolement des actinomycètes.
- La présence de champignons ou de bactéries à développement rapide ainsi que l'abondance du genre *Streptomyces* (un actinomycète) masquent souvent les germes plus rares.



Les méthodes qui visent l'élimination des champignons et autres bactéries et qui permettent de réduire la proportion des *Streptomyces*, combinent à la fois :

- a. Un traitement préalable des échantillons.
- b. Choix des milieux appropriés.
- c. Addition d'inhibiteurs.

**Cours Microbiologie industrielle/ MI TAA /
Isolement des souches productrices d'antibiotiques**

A/ Séchage de l'échantillon du sol à la température du laboratoire pendant environ 8 jours (ceci permet de réduire la flore bactérienne).

- Broyage, exposition à température maximal tolérée du germe recherché (30 à 60 min).
- Mise en suspension de l'échantillon et préparation des dilutions ; de $d=10^{-1}$ à $d=10^{-8}$ qui seront mélangées au milieu gélosé en fusion 45°C .
- T $^{\circ}\text{C}$ d'incubation est fonction des germes que l'on veut isoler :
 - 25 - 28°C → majorité des actinomycètes mésophiles
 - 28 - 30°C → *Micromonospora* (un genre d'actinomycètes)
 - 45 - 65°C → thermophiles (atmosphère saturée d'eau).

B/ Plusieurs milieux de culture ont été proposé. Cependant bien qu'ils favorisent la croissance des actinomycètes, n'empêchent pas la croissance des champignons et bactéries ayant résisté aux prétraitements.

- Milieu pour la sporulation et la propagation (milieu gélosé).
- Milieu pour la production de ménaquinones (lipides membranaires présents chez les actinomycètes).
- Milieu pour l'observation des caractères cultureux.
- Milieu pour la production d'ATB.

C/ Addition d'inhibiteurs (antifongiques et d'antibactériens) peu actifs sur les actinomycètes.

- ❖ Association nystatine + cycloheximide (50 à 100 $\mu\text{g/ml}$).
→ Inhibition de tout développement fongique.
- ❖ Association polymyxine B (5 $\mu\text{g/ml}$) et pénicilline (1 $\mu\text{g/ml}$).
→ Croissance bactérienne limitée.

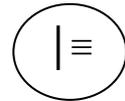
Technique de sélection : on utilise les techniques d'antagonismes

Germes cibles	→ G^{+} : <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> .
	→ G^{-} : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella sp.</i>
	→ Levures : <i>Candida albicans</i> .
	→ Moisissures : <i>Aspergillus niger</i> , <i>Mucor sp.</i>

A. Milieu solide

1) Test des stries croisées

- La souche à tester est ensemencée en trait.
- Incubation. A la T°C optimale de croissance.
- Ensemencement des souches-cibles en stries parallèles et perpendiculaires à la souche -test.
- Incubation à la température optimale des germes cibles.
- Recherche des zones d'inhibition.



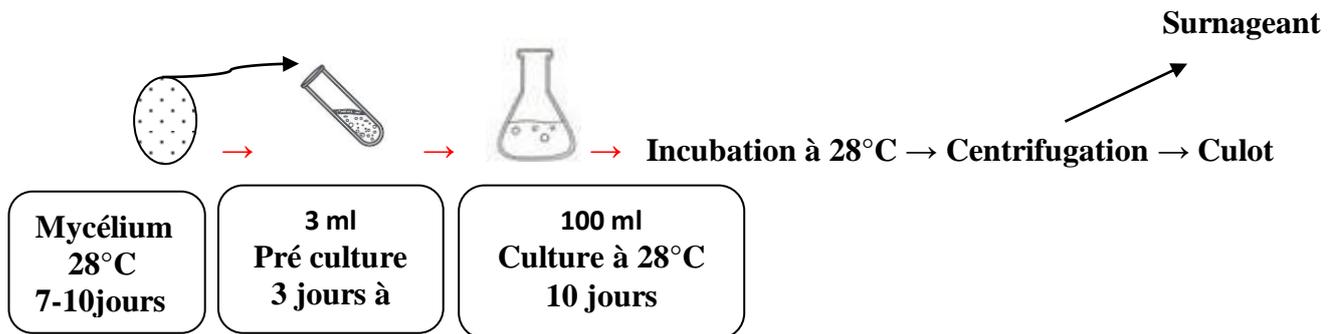
2) Test des cylindres d'agar

- Ensemencement par spot des souches – tests
- Incubation à 28°C pendant 10 jours (temps de génération des actinomycètes très long et l'ATB est produit durant la phase stationnaire).
- Découpage des cylindres gélosés à l'endroit des colonies (6 mm de diamètre).
- Dépôt de ces cylindres (en les retournant) sur le milieu préalablement ensemencé par le germe cible (*E. coli*).
- Incubation 24h à la température du germe cible.
- Mesure des zones d'inhibition.
- La souche présentant une zone d'inhibition élevée : production d'une quantité élevée en ATB, **MAIS** :
- En cas d'absence de zone d'inhibition cela veut dire que la souche-test ne produit pas d'ATB **anti** *E. coli*; la tester avec d'autres germes- cibles.

N.B La 1^{ère} méthode : on utilise plusieurs germes cibles (dans la même boîte).

La 2^{ème} méthode : on utilise un seul germe cible (dans la même boîte).

B. Milieu liquide



La souche-test est cultivée dans un Erlen, agitée, incubée à température appropriée (bain-Marie).

On peut :

- effectuer la cinétique de croissance du germe (prélèvements à temps réguliers / tp : $DO=f(t)$, $MS=f(t)$).
- effectuer la cinétique de production des ATB ($ATB=f(tps)$) et déterminer la phase durant laquelle l'ATB est synthétisé.
- optimiser le milieu de culture (changement de source C, N,...ainsi que leur concentration).
- doser les ATB et donc connaître leur concentration.
- savoir si l'ATB est Endo / Exo cellulaire.

1. Méthode des puits

- C'est une méthode de diffusion sur une boîte de Pétri préalablementensemencée avec le germe cible et à la surface de laquelle on creuse des puits.
- Les puits sont ensuite remplis par 10µl du surnageant et les boîtes sont incubées 24h à 4°C.

→ Incuber les boîtes à la température du germe cible.

→ Zone inhibition

→ En cas d'absence de zones d'inhibition, on doit :

- **Spectre d'activité** : tester d'autres souches cibles.
- [ATB] → **concentrer** l'extrait par évaporation sous vide.
- Ou alors, procéder à une **extraction de l'ATB**.

2. Méthode des disques

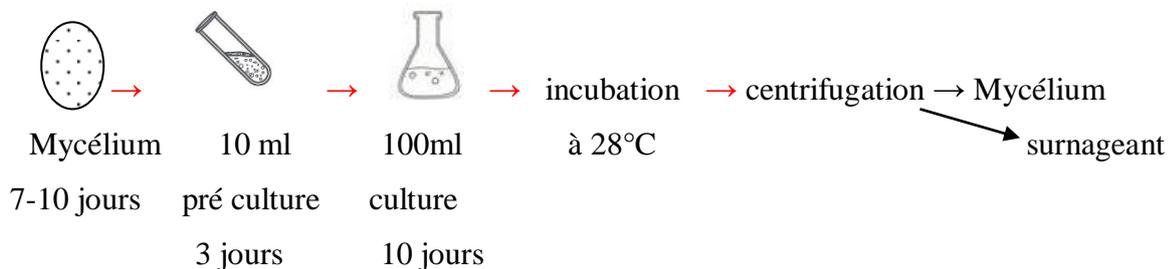
C'est une méthode qui permet de chercher l'activité dans les extraits. Des disques en papiers (wattman n°4) de 6 mm de diamètre, sont imbibés avec l'extrait puis séchés avec un séchoir (sécher le solvant).

N.B : on doit charger le disque de telle manière que l'ATB se trouve à la concentration voulue.

1. Les disques sont stérilisés aux U.V
2. Disposer les disques chargés, aseptiquement, à la surface de la gélose préalablement ensemencée avec le germe-cible.
3. les boites sont mises à plus 4°C environ 2h afin d'amorcer la diffusion de l'ATB.
4. incuber à 28°C selon le germe cible.
5. mesurer les zones d'inhibition autour des disques.

Production, Extraction, purification et caractérisation des ATB

1) production en milieu liquide



2) Extraction et purification

a) Extraction par solvants

❖ mycélium

- Lavage du mycélium (trois fois par centrifugation) → égouttage → ajouter méthanol (50 mg mycélium + 1 ml du méthanol) → agitation pendant deux heures.

➤ L'extrait méthanolique subit une filtration sous vide puis une concentration (au RotaVapor).

➤ Le résidu est dissout dans du méthanol, l'extrait est stérilisé par filtration stérilisante (filtre millipore).

❖ Filtrat

- L'extraction des antibiotiques (ATB) à partir du filtrat de culture nécessite **le choix d'un solvant non miscible à l'eau**.
- Exp. solvants de polarité croissante ; hexane, benzène, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le n-butanol.

Volume (filtrat) + Volume (solvant) → ampoule à décanter → séparation des phases (organiques et aqueuses).

b) Antibiographie et choix du solvant d'extraction

Méthode des puits : Selon la lecture du résultat, choisir le meilleur solvant d'extraction.

c) Séparation par chromatographie sur couche mince

- Une fois le meilleur solvant d'extraction est mis en évidence, on doit chercher un meilleur système de séparation par migration en réalisant une CCM.

Préparation des plaques CCM

- 50 g de gel de silice +100 ml d'eau distillée → agitation mécanique.
- Étaler uniformément la pâte obtenue en une fine couche sur des plaques en verre (20x 20cm).
- Sécher les plaques 37°C pendant 1 nuit.
- Activer les plaques à 100°C, une heure avant utilisation.

Sélection d'un système d'élution

- Dépôt de l'extrait en spots à 2 cm de la bordure inférieure de la plaque
- La plaque est mise dans une cuve chromatographique dont l'atmosphère a été préalablement saturée avec l'un des systèmes suivants :
 - BAE : n-butanol, acide acétique, eau (3/1/1 : v/v).
 - EAE : éthanol, ammoniac, eau (8/1 /1 : v/v).
 - AM: acétate d'éthyl, méthanol (100 /15: v /v).

- Après développement de la CCM, les plaques sont séchées afin d'éliminer toute trace de solvant pouvant empêcher toute croissance microbienne.

**Cours Microbiologie industrielle/ MI TAA /
Isolement des souches productrices d'antibiotiques**

- Après migration, observer sous U.V (pour choisir le meilleur solvant de migration qui a permis une bonne séparation des ATB entre eux et des autres molécules non actives).

❖ A 254 nm : fond vert ; tâches de couleur bleue marine, Foncée, violette

❖ A 366 nm : fond bleu marin ; tâches fluorescentes.

- Bio autographie (Betina, 1973)

- Cette méthode permet de déterminer les tâches actives, leur nombre et leur R_f (révélation microbiologique des ATB).
- La plaque développée est incubée une nuit à 37°C (pour éliminer le solvant pouvant gêner la croissance du germe-cible).
- Les plaques sont placées sur un support en verre dans boîte de polyéthylène (22 x 24cm), à la base de la boîte une feuille de papier filtre imbibé d'eau stérile (atmosphère humide et éviter la dessiccation gélose)
- Le dispositif est stérilisé environ une heure sous U.V à 254 nm.
- 10^7 UFC/ml du germe-cible sont inoculés dans 50 ml d'une gélose molle (Muller Hinton) (7g/l).
- Répartir le milieuensemencé, à l'aide d'une pipette stérile, sur la surface de la plaque sous forme d'un film fin et uniforme.
- Après solidification, la plaque est mise à plus de 4°C environ 2h.
- Incuber la plaque à 28°C pendant 24 – 48h
- Mesurer les zones inhibition et les R_f .

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par la tâche active}}{\text{Distance parcourue par le solvant}}$$

2) Révélation chimique des ATB

Révélateur chimique	composé	Coloration
Chlorure de fer ferrique (FeCl 3)	Phénols	bleu vert
Diphényl alamine	Glucides	chauffage : rose, violet, bleu
Ninhydrine	amines, Acide aminés, osamines	Chauffage : violet, rose
Vasiniline H₂SO₄	alcools, stéroïdes	Chauffage : violet, rose, gris
Formaléhyde H₂SO₄	composés aromatiques poly cycliques	brun, blanc
Réactif de tollens, Zaffaroui	Substances réductrices	Chauffage : couleur foncée

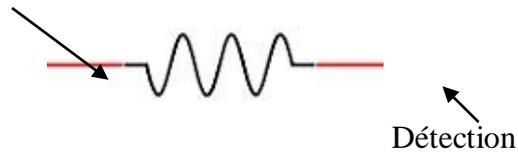
*Cours Microbiologie industrielle/ MI TAA /
Isolement des souches productrices d'antibiotiques*

Après sélection d'un meilleur solvant de migration et détermination des R_f des différentes tâches de l'extrait brut ; on prépare d'autres plaques dans les mêmes conditions. Pulvériser les surface avec les différents révélateurs chimiques ; les tâches apparaissent soit à froid, soit à chaud (5-10 min /100°C).

3) Purification

La purification des ATB fait par HPLC : Chromatographie liquide à haute performance.

Éch. Injecté sous pression



3) Détermination des structures chimiques

La caractérisation de la structure chimique des ATB est le résultat de la combinaison de plusieurs données obtenues par analyses chimiques et chromatographiques.

Les CCM combinées avec les radicaux chromogéniques peuvent donner une première estimation des molécules.

❖ Spectroscopie UV –visible

Technique pouvant nous fournir une idée générale sur les produits insaturés et conjugués, les produits aromatiques, les peptides, protéines, les composés polyéniques (caractérisés par des spectres à plusieurs pics entre 200 – 405nm).

❖ Spectroscopie Infra- rouge

Permet de découvrir certains groupes fonctionnels CH, NH₂ qui présentent une absorption dans l'I.R.

❖ Spectroscopie de masse

Combinée avec la RMN (résonance magnétique nucléaire), cette technique permet d'établir avec certitude la structure chimique et le poids moléculaire des ATB. C'est une méthode fondée sur les transmissions induites entre les niveaux d'énergies magnétiques d'un atome, d'un ion, d'une molécule.