

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Yahia FARES de MÉDÉA

Faculté des Sciences et de la Technologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Génie des Procédés

Option : Bioprocédés pharmaceutique

Thème

ETUDE DE LA SYNTHESE DE PENICILLINE ACYLASE PAR *ESCHERICHIA COLI* ATCC (21709 CIP 54.7)

Dirigé par :

- **Dr. Mahmoud ABOUSEOUD**

Présenté par :

- **Besma MELLATI**
- **Hadjer BARKI**

Année universitaire 2011– 2012

Remerciements

En premier lieu, nous remercions *ALLAH* le Tout Puissant de nous ’avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.

Nous remercions Monsieur Dr. ABOUSEOUD Mahmoud pour avoir assuré la direction de notre

thèse, pour ces conseils précieux le long de notre travail de thèse. Nous ne saurons trop le remercier pour l’intérêt qu’il a accordé à ce travail et pour les longues heures de discussion qu’il nous ’a réservée avec une patience inégale. Nous avons beaucoup apprécié ses qualités scientifiques et humaines.

Notre Co- promoteur Mr: BELKACEMI.ABED cadre chez SAIDAL qui nous avons facilité

la tache et nous avons permis de travailler dans des conditions très favorables.

Tout d’abord, nous adressons nos respectueux remerciements à tous les membres du jury qui nous 'ont fait l’honneur de participer à l’évaluation de notre travail. Nous somme certaine de pouvoir compter sur leurs vastes connaissances et leur esprit critique constructif pour nous ’aider, par leurs commentaires et leurs discussions, à mieux comprendre certains problèmes rencontrés au cours de ce travail de recherche.

Nous remercions également l'ensemble des membres du laboratoire de fermentation du complexe SAIDAL et plus particulièrement, Mr. DARGA khaled, Mr. GHRABA. Mohamed, Mm. AGOUNE Yemna et Mr. Rachid.

Un remerciement spécial aux membres de la sale d’internet M2 de la bibliothèque des sciences et techniques; Mr. BETTACHE Toufik et Mm. ZANATI Sabrina pour sa compétence, ses encouragements et ses précieux conseils durant le déroulement de ce travail.

Il est difficile, dans un ci petit espace, de remercier toutes les personnes qui ont eu une influence sur nos vies de tous les jours pendant la durée de notre thèse. Ces

personnes se reconnaitront facilement et sauront combien nos tendresse et nos amitié sont grandes pour eux.

Ce travail n'aurait jamais pu se réaliser sans le soutien continu de nos familles et sans leurs éducation basée sur des valeurs morales fondées sur le respect des autres et du travail.

Dédicace

À mes très chers et adorables parents,

qui m'ont toujours encouragé, aidé à surmonter touts les obstacles

que j'ai rencontré dans ma vie et être à mes cotés dans les moments les plus difficiles.

Merci pour votre amour, votre tendresse, vos prières, vossacrifices et vos précieux conseils.

Savez que vous êtes extraordinaires et que grâce à vous je suis ou j'en suis.

Enfin Merci tout simplement d'être…mes parents avec ma profonde affection.

À mes très chers et magnifiques frères :

Merci pour vos encouragements, vos conseils et l'amour dont vous m'avez entouré.

Je vous exprime ici, toute mon affection et mes souhaits de bonheur et de succès.

À mes très chers et magnifiques sœurs :

Hamida, Wahiba, Djamila, Fadila et Akila

A, mon mari MAHFOUD BARKI.

À tous les membres de la famille qbarki et HAMROUCHE.

À ma formidable amie BESMA,

C'est avec toi souvent que j'ai partagé mes joies et mes peines, tu m'as toujours soutenu grâce à ta présence, ton sourire, et ton amitié. Que notre amitié dure éternellement.

Je te souhaite une bonne continuation dans tes études de Doctora.

À tous mes amies et mes collègues, pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

À tous ceux qui me connaissent, et surtout qui m'aiment.

Je dédie ce modeste travail.

Hadjer

AMEL

Dédicace

Je dédie ce travail :

A mon père qui a souhaité vivre pour longtemps juste pour nous voir Qu'est-ce que nous allons devenir.

A celle qui m'a transmis la vie, l'amour, le courage, à toi chère maman toutes mes joies, mon amour et ma reconnaissance.

A ma sœur Meriem

A mes chers frères :

Oussama, Hicham, et Ishak

A mes belles sœurs Souria et Amina, je vous aime, avec vous j'ai partagé mes moments de joie et de bonheur

Je dédie ce travail aussi à Farida, Fetma-Zuhra, Amel et Soumia

A mes chères amies : Amina, Hayet, Soumia, Hadjer

A ma chère amie, ma binôme, Hadjer chez qui m'a supporter durant ces trois dernières années.et chez qui j'ai trouvé l'entente dont j'avais besoin.

Besma

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE…….....01

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES ANTIBIOTIQUES ……04

I.1Généralités …….....04

I.2 Définition…….....04

I.3 Mode d'action……05

I.4 Critères de Classification……...07

II. ANTIBIOTIQUES β LACTAMES PENICILLINE…….09

II.1. Définition……...09

II.2. Structure de la pénicilline…….....10

II.3.Définition des différentes molécules de pénicilline…….....10

II.4. Le noyaubêta-lactame…….11

II.5. Classification des pénicillines…….....13

II.5.1. Les pénicillines naturelles…….....14

II.5.1.1. Souches productrices……15

II.5.1.2 Stabilité des pénicillines naturelles…….....16

II.5.2. Pénicillines retard…….....17

II.5.3. pénicillines de semi synthèse…….....18

III. L'ACIDE 6-AMINO-PENICILLANIQUE…….19

III.1. Historique…….19

III.2. Propriétésphysico-chimiques du 6-APA ……19

III.3. Activitéantibactérienne du 6-APA ……..21

III.4. Procédés de production de l'acide 6-amino pénicillanique…….22

III.4.1. Procédéchimique, non enzymatique de la production du 6-APA……22

III.4.1.1. Procédé de SAIDAL (MEDEA) …….22

III.4.1.2. Procédé de CARRINGTON ……24

III.4.2. Procédé fermentaire de production de 6-APA……26

III.4.3. Procédé enzymatique de production de 6-APA……..29

III.5. Importance du 6-APA……...30

III.6. Acylation de l'acide 6-amino-pénicillanique ……..32

III.7. Synthèse de pénicillines nouvelles…….33

IV. LA PENICILLINE ACYLASE…….35

IV.1. Historique …….35

IV.2. Nomenclature de la pénicilline acylase……..36

IV.3. Structure ……...37

IV.4. Mécanisme de catalyse par la pénicilline G acylase…….40

IV.5. Caractéristiques technologiques du processus d'hydrolyse de la pénicilline G ……..41

V. PRODUCTION DE LA PENICILLINE G ACYLASE PAR FERMENTATION…….....43

V.1. La fermentation industrielle-Généralités……43

V.1.1. Choix de la souche……..**.....**43

V.1.2. Préparation de l'inoculum……...43

V.1.3. Conservation des souches ……..42

V.1.4. Propagation……43

V.2. Données sur la fermentation et sur la production……..45

V.2.1. Composition et préparation du milieu ……..45

V.2.2. Les facteurs influençant sur la production des enzymes ……..……45

V.3. Modes de conduite de la fermentation…….46

V.4. Optimisation de la fermentation…….47

V.5. Production d'enzyme par fermentation ……...48

V.6. Extraction et purification ……49

V.7. Optimisation des milieux de fermentation pour la

production de la pénicilline G acylase (PGA)……50

V.8. Extraction et purification de la pénicilline G acylase.....…….52

V.8.1. Séparation de la biomasse…….....52

V.8.2. Précipitation de l'enzyme pénicilline G acylase**.....**52

V.8.3. Purification de la pénicilline G acylase…….**.....**52

VI. PARTIE EXPERIMENTALE

VI.1. Matériels et produits utilisés……55

VI.1.1. Matériel biologique…….55

VI.1.2. Réactifs utilisés……56

VI.2. Méthodes…….57

VI.2.1. Revification de la souche *E. coli* ATCC

(21709 CIP 54.7……..57

VI.2.2. Mise en évidence de la production de l'enzyme

pénicilline acylase par la souche*E .coli* ATCC (21709 CIP 54.7)……59

VI.2.3. Essais de fermentation en Batch agités……59

A) Choix du milieu de production…….....59

B) Conditions de culture……..60

C) Choix de protocole de travail……..61

D) Détection de l'existence de l'enzyme pénicilline acylasedans le bouillon fermenté……63

i) Spectrophotométrie UV-vis……63

ii) Dosage par le bleu de Bromothymol…….....65

E) Suivi de la croissance de la souche de *E .coli*……...65

i) Détermination de la densité optique…….65

ii) Détermination de la biomasse sèche……...66

VI.2.4. Optimisation de la production de l'enzyme pénicilline acylase par la souche*E .coli* ATCC (21709 CIP 54.7)…..……74

A) Effet de concentration des compositions de milieu LB sur la production de l'enzyme pénicilline acylase…….....75

B) Effet des parameters physico-chimique sur la production de l'enzyme pénicilline acylase……..75

VI.2.5. Cinétiques de croissance bactérienne et de production de la pénicilline acylase sous les conditions optimales …….....86

VI.2.6. Précipitation de l'enzyme pénicilline acylase…….89

VI.2.7. Analyse par HPLC…….91

CONCLUSION GÉNÉRALE…….94

Liste des abréviations :

ATCC :

β : bêta

B: *Bacillus*

C : Classe

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CSL : Corn Steep Liquor

CIP : Collection Institut Pasteur

D : Débit

DCI :

E : Enzyme

***E.coli* :** *Escherichia coli*

EP :

Etc : etcetera

Ex : exemple

Fig : Figure

HPLC : Chromatographie A Haute Performance

IM : Intramusculaire

IV : Intraveineuse

LB : Luria Birtani

M : Molarité

PA : Pénicilline Acylase

PAA : Acide Phénilacétique

PAC : Pénicilline Acylase

pH : Point isoélectrique

PGA : Pénicilline G Acylase

PGL:

R : Radical

rpm : tour par minute

***Sp* :** *suptillus*

T : Température

Tr : tour

TSA : Trypto Caséine Soja Agar

UE : Unité Enzymatique

UV-vis : UV visible

6-APA : acide 6-amino-pénicillanique

Liste des figures

Figure I.1 : Structure bactérienne……05

Figure I.2 : Nombre de bactéries en fonction de temps d'incubation et de contact avec l'antibiotique……...06

Figure I.3 : Nombre de bactéries en fonction de temps de culture et de contact Avec l'antibiotique……..06

Figure I.4 *:* Mode d'action des antibiotiques……..07

Figure II.1: Structure de la pénicilline……10

Figure II.2: Formule de Lewis de la pénicilline……..10

Figure II.3 : Formule chimique de la pénicilline……11

Figure II.4: Structure de noyau bêta-lactame…….11

Figure II.5: Structure de l'acide 6-amino-pénicillanique…….12

Figure II.6: Schéma de la biosynthèse dirigée des pénicillines naturelles……..15

Figure II.7:*Penicillium notatum* cultivée sur milieu solide…….16

Figure II.8 : Réaction d'hydrolyse des pénicillines en présence des hydroxydes……17

Figure II.9 : Procaine-pénicilline G…….17

Figure II.10 : Benzatine-pénicilline G…….17

Figure III.1 : Structure de l'acide 6-amino-pénicillanique et ses sites actifs……...20

Figure III.2 : Synthèse du 6APA à partir de la pénicilline G potassique……23

Figure III.3 : production de 6APA par le procédé de CARRINGTON……..25

Figure III.4 : Procédé enzymatique de production de 6APA…….29

Figure III.5 : Importance de 6-PA……..32

Figure III.6 : Acylation de l'acide 6-amino-pénicillanique……33

Figure IV.1 : Escherichia coli Grossissement × 15 000……....35

Figure IV.2: Représentation chimique des réactions qui rendent la pénicilline une molécule biologiquement inactive, et des enzymes qui catalysent chaque réaction…...36

Figure IV.3 : Réaction de pénicilmline acylase…….37

Figure IV.4 : Le complexe pénicilline G acylase avec pénicilline G……....38

Figure IV.5 : Structure du pli NTN caractéristique avec la série de s'affiche dans la boule et le bâton……..……38

Figure IV.6 : a) La structure secondaire de PGA.La séquence signal est représentée en bleu, de vert séquence de liaison (bloquant le site actif), et les séquences d'acides aminés qui forment les chaînes A et B après transformation sont affichés (rouge et jaune, respectivement)…… ……39

Figure IV.6 : b) Structure de la maturité PGA montrant des unités secondaires structurales par la chaîne (rouge = la chaîne A, jaune = la chaîne B).Le résidu du site actif, Ser1 : B, est montré en magenta dans les deux structures……...39

Figure IV.7 : Structure de la PGA avec de la pénicilline G dans la poche hydrophobe de liaison (orange)…… ……...40

Figure IV.8:Mécanisme proposé de la pénicilline acylase catalysant l'hydrolyse de Pénicilline…….41

Figure V.1 : Les trois modes de fermentation……....47

Figure V.2: Les étapes du procédé de fermentation……...49

Figure VI.1 : La souche *E.coli* ATCC (21709 CIP 54.7) sous forme lyophilisée….54

Figure VI.2 : Développement de la souche *E.coli* sur la gélose incliné……57

Figure IV.3: Croissance microbiennes sur les différents milieux de production selon le protocole 1……..…66

Figure VI.4 : Résultat de dosage par bleu de Bromothymol pour les quatre milieux selon le protocole 1……..67

Figure VI.5 : croissance microbiennes sur les différents milieux de production selon le protocole 2……..68

Figure VI.6 : Résultat de dosage par le bleu de Bromothymol sur les quatre milieux selon le protocole 2……..69

Figure VI.7 : croissance microbiennes sur les différents milieux de production selon le protocole 3…….…….70

Figure VI.8 : La production de pénicilline acylasepour les différents milieux de production inoculés suivant le protocole 3…….….71

Figure VI.9 : Résultat de dosage par le bleu de Bromothymol pour les milieux (1,2) selon le protocole 3…….**.....**72

Figure VI.10 : Résultat de dosage par le bleu de Bromothymol pour les milieux (3,4) selon le protocole 3……...72

Figure VI.11 : Effet de la concentration de l'extrait de levure sur la croissance Microbienne (tryptone (10g/l), température30°C, pH7.5, agitation200 rpm)…….75

Figure VI.12 : Effet de la concentration de l'extrait de levure sur la production de la pénicilline acylase (Tryptone (10g/l), température 30°C, pH=7.5, agitation 200 rpm)..76

Figure VI.13 : Effet de la concentration de tryptone sur la croissance microbienne

(Extrait de levure (5g/l), température 30°C, pH=7.5, agitation 200 rpm)……...77

Figure VI.14 : Effet de la concentration de tryptone sur la production de la pénicilline acylase (Extrait de levure (5g/l), température 30°C, pH 7.5, agitation 200 rpm)……...78

Figure VI.15 : Effet de la concentration de glucose sur la croissance microbienne (extrait de levure (5g/l), tryptone (10g/l), température 30°C, pH 7.5, agitation 200 rpm).80……..79

Figure VI.16 : Effet de la concentration de glucose sur la production de la pénicilline acylase(extrait de levure (5g/l), tryptone (10g/l), température 30°C, pH 7.5 agitation 200 rpm)……...80

Figure VI.17 : Effet du pH sur la croissance microbienne (extrait de levure (5g/l), tryptone 10 (g/l), température 30°C, agitation 200 rpm)……..…81

Figure VI.18 : Effet du pH sur la production de la pénicilline acylase (extrait de levure (5g/l), tryptone (10g/l), température 30°C, agitation 200 rpm)……...81

Figure VI.19 : Effet de la température sur la croissance microbienne (extrait de levure (5g/l), tryptone (10g/l), pH7.5, agitation 200 rpm)……..82

FigureVI.20: Effet de la température sur la production de la pénicilline acylase (extrait de levure (5g/l), tryptone 10 (g/l), pH 7.5, agitation 200 rpm)**…**……83

Figure VI.21 : Effet de la vitesse d'agitation sur la croissance microbienne (extrait de levure (5g/l), tryptone (10g/l), température 30°C, pH 7.5)…….84

Figure VI.22 : Effet de la vitesse d'agitation sur la production de la pénicilline Acylase (extrait de levure (5g/l), tryptone (10g/l), température 30°C, pH 7.5)…….85

Figure VI.23: Variation de biomasse et de l'activité enzymatique sous les conditions optimales en fonction du temps(extrait de levure (5g/l), tryptone (10g/l),

température 30°C, pH 7.5, agitation 220 rpm)…….86

Figure VI.24 : Technique de purification de pénicilline acylase par précipitation à l'éthanol…….89

Figure VI.25: Chromatogramme du 6-APA standard……..91

Figure VI.26 : Chromatogramme du 6-APA produite à partir de l'hydrolyse de pénicilline G par la pénicilline acylase produite à l'aide d'*E.coli* ATCC (21709 CIP 54.7) dans les conditions optimales (extrait de levure (5g/l), tryptone (10g/l), température 30°C, pH 7.5, agitation 220 rpm)……..92

Liste des tableaux

Tableau II.1: Diversité des antibiotiques de type bêta-lactames: principaux cycles et antibiotiques représentatifs……...13

Tableau II.2 : les pénicillines naturelles…….14

Tableau II.3 : Classification taxonomique de *Penicillium notatum*……16

Tableau III.1 : concentrations minimales (mg/ml) nécessaire pour inhiber la croissance des bactéries. Dilution dans l'Agar. Incubation de 24 h à 37°C…….. 21

Tableau III.2 : Préparation du concentré de 6-APA**…**……27

Tableau V.2 : Optimisation des milieux de fermentation et de paramètres liés à la production modulée de la pénicilline G acylase……...51

Tableau VI.1: Variation de la production de biomasse et de la pénicilline acylase pour les différents milieux de culture par le protocole 1……..65

Tableau VI.2 : Variation de la production de biomasse et de la pénicilline acylase pour les différents milieux de culture par le protocole 2……..68

Tableau VI.3 : Variation de la production de biomasse et de la pénicilline acylase pour les différents milieux de culture par le protocole 3……..70

Tableau VI.4 : Variation de la production de biomasse et de la pénicilline acylase en fonction de la concentration de l'extrait de levure……...75

Tableau VI.5 : Variation de la production de biomasse et de la pénicilline acylase en fonction de la concentration de tryptone…….77

Tableau VI.6 : Variation de la production de biomasse et de la pénicilline acylase en fonction de la concentration de glucose……..79

Tableau VI.7 : Variation de la production de biomasse et de la pénicilline acylase en Fonction……..81

Tableau VI.8 : Variation de la production de biomasse et de la pénicilline acylase en Fonction de la température……..82

Tableau VI.9 : Variation de la production de biomasse et de la pénicilline acylase en fonction de la vitesse d'agitation…….84

Tableau VI.10 : variation de la production de la biomasse et de la pénicilline acylase sous les conditions optimales en fonction du temps……86

Tableau VI.11 : Activité de la pénicilline acylase avant et après la précipitation à l'éthanol……..89

Tableau VI.12 : Résultat d'analyse par HPLCdu 6-APA standard……91

Tableau VI.13 : Résultat d'analyse par HPLCdu 6-APA produite à partir de l'hydrolyse de pénicilline G par la pénicilline acylase produite à l'aide d'*E.coli* ATCC (21709 CIP 54.7)…….92

Références bibliographiques:

[1]: Claude, D. « Techniques de l'ingénieur », Bioprocédés (Revue), vol. BIO2, n°J6008, [Note(s): J6008.1-J6008.12], Paris, France, (2007).

[2]: Viel, C., Tréfouël, J., Lestel, L. « Itinéraires de chimistes », SFC/EDP Sciences, France, p 519-524, (2008).

[3]: Laverman. A. , Leste, L. « Antibiotiques, antibiorésistances et pathogènes», Université Pierre et Marie Curie-CNRS, Paris, France, (2009).

[4]: www.bacteriologie.net

[5]: Euzéby, JP. « Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse », Laboratoire de bactériologie, Toulouse, France, (2007).

[6]: Yala, D., Merad, A.S., Mohamedi, D., Ouar–Korichi, M.N. « Médecine du Maghreb », Revue médicale internationale maghrébine ,Tunisie, Algérie, Maroc, n°91, p 5-12, (2001).

[7]: Laurent, F. "Principales ß-lactamines : Pénicillines G, A, M, inhibiteurs de ßlactamases, Uréidopénicillines, Carboxypénicillines C1G, C2G, C3G, Monobactames Carbapénèmes", Laboratoire de Microbiologie Groupement Hospitalier, Lyon, P8-9, (2009).

[8]: Demain, A. L.., Solomon, N. A.. «Biology of industrial microorganisms», The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, California, p 408-414 (1985).

[9] : Brinkwirth, N., Müller, JK. «Enzymes for Penicillin Production Advanced», «Technical Biochemistry», Journal of Bioscience and Bioengineering**,** vol 42, Issue 2, , P 154-164, (2005).

[10]: http://www.scritube.com/limba/franceza/ANTIBIOTIQES ANTIBACTERIENNES23541257.php

[11]: Patrick, G.L. «Chimie pharmaceutique», De Boeck, France, P 398, (2003).

[12]: Landry, Y., Gies, J-P. «Pharmacologie moléculaire», Medsi/McGraw-Hill, Vol. 42, France, P 798, (1990).

[13]: Molina, J-M. « L'essentiel en pratique sur les bêta-lactamines », Hôpital Saint-Louis, Paris, France, P 210-212, (2011).

[14]: AMRI, K. « L'incidence de l'alimentation sur les voies métaboliques des anti-infectieux », thèse de docteur en pharmacie (Universite Henrin Poincare-Nancy 1), France, P 31-33, **(**2009).

http://fr.wikipedia.org/wiki/Penicillium_notatum**[15]**:

[16]: Gamdier, N., Gillet, P « Pharmacovigilance des Anti-infectieux », Faculté de médecine (Universite Henrin Poincare-Nancy 1), BIP31, France, P 35-37, (2011).

[17]: Nayler, J.H. «Semi-synthéticapproaches to novel penicillins», Official publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology , Vol 16, p 234-237, France, (1991).

[18]: Asselineau, J ., Zalta, J-P. « Les antibiotiques, structure et exemples de mode d'action », Ed Hermann, Paris, P 15-18, (1973).

[19]: Dorvault, F. « L'officine », XXll^{e} Edition, Ed: Vigot, Pari, France, P 43-45, (1867).

[20]: Betina, V. «The chemistry and biology of antibiotics», Editors: W. Th, Nauta and R.F Rekker, vol 5, P 116-119, France, (1983).

[21]:.Heftmann, E. «Chromatography», VI ème edition, «Journal of chromatography library», Vol 69B, Ed Elsvier, P 397-406, Paris, France, (2004).

[22]: Caillon, J. « Antibiotiques », MCU-PH, Nantes, P 210-213, Drugs, (2008-2009).

[23] : «Pénicillines semi-synthétiques », manuel opératoire, Vol 1, proj1557, p 3- 4, usine de production d'antibiotique de Médéa, S.N.I.C Algérie.

[24]: Nevena, D. «Manuel de formation vrac » Tom 1, élaboré par Chiminvest, Bulgarie, P 98-101, (1981).

[25] :http://www.takween.com/enzymologie/enzymes.html

[26] : Franssen, M. «Industrial Biocatalysis in Pharmacy and fine Chemistry», Mitsubishi Rayon (Co), Nîmes, P 115-116, (2005).

[27]: Veen, V., Gerard, J. « Procédé de préparation de l'acide 6-[D-α-amino-p-Hydroxyphényl- acétamido] Pénicillanique», Col laboratoi**re** Gist-Brocades N.V, (20 Janvier 1982).

[28]: Brogden, RN., Carmine, A., Heel, RC., Morley, PA., Speight, TM., Avery, GS. «Amoxycillin / clavulanic acid: areview of its antibacterial activity», « pharmacokinetics and therapeutic use », Drugs, (1981).

[29]: Ojha, M. « Cours de Microbiologie générale et appliqué ».

[30]: Haas, R**.** «Waste Treatment :Amberlite^{TM} XAD ^{TM} resins , Amberlyst^{TM} resins».

[31]:http://fr.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli

[32]: Done, S. H., Brannigan, J. A., Mood y, P. C., Hubbard, R.E. «Ligand-induced con f ormational change in penicillin acylase J.Mol.Biol», p 284, 463 -475, France, (1998).

[33] : Klein, J.; Wagner.« F.Immobilization of whole microbial cells for the production of G-amino penicillinic acid», Enzyme Eng. 5 , P 335-345, Drugs, (1980)

[34] : Coutouly, G. « Génie Enzymatique », Masson, p 45, Canada, (1993).

[35]: Arroyo, M., Mata, I., Acebal, C., Pilar Castillo, M. «Biotechnological applications of penicillin acylases», «Applied Microbiology and Biotechnology», p 60, 507-514, New York, (2003).

[36]: McVey, C. E., Walsh, M.A., Dodson, G.G., Wilson, K.S., Brannigan, J. A. «Crystal structures of penicillinacylase enzyme-substrate complexes: structural insights in to t he catalytic mechanism», J.Mol.Biol. p 313, 139-150, France, (2001).

[37]: Verhaert, R.M., Riemens, A.M., Van Der Laan, J.M., Van Duin, J., Quax,W.J. «Molecular Cloning and Analysis of the Gene Encoding the Thermostable Penicillin G Acylase from Alcaligenesfaecalis», Appl.Environ.Microbiol. p 63, 3412-3418, (1997).

[38] : Chandel, A., Rao, L., Narasu, M., Singh, O. «The realm of penicillin G acylase in β-lactam antibiotics», «Enzyme and Microbial Technology», p 42, 199-207, (2008).

[39]: Cole, M., Biochem, J. «Hydrolysis of penicillins and related compounds by the cell–bound penicillin acylase of Escherichia coli», p 115, 733–739, (1969).

[40]: Hewitt, L., Kasche, V., Lummer, K., Lewis, R. J., Murshudov, G. N., Verma, C. S., Dodson, G.G., Wilson, K. S. «Structure of a slow processin g precursor penicillin acylase from Escherichia coli reveals the linker peptide blocking the active-site cleft », J. Mol.Biol. p 302, 887-898, (2000).

[41]: Oinonen, C., Rouvinen, J. «Structural comparison of Ntn-hydrolases», «Protein Sci 9», 2329-2337, (2000).

[42]: Duggleby, H. J., Tolley, S. P., Hill, C. P., Dodson, E. J., Dodson, G., Moody, P.C. «Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic centre», p264-268, (1995).

[43]: PDB: 1ea3. Protein Data Bank, (29 November 2000) .http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?pid=15981068774566&page=0&pdbId=1E3A

[44]: PDB: 1gm7. Protein Data Bank,(28 November 2001).

http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?pid=145911067959654&page=0&pdbId=1GM7

[45]: Scriban, R. « Biotechnologie », (5ème Ed)Technologie et documentation, Lavoisier, Paris, p 1017, (1999).

[46]: Alkema, W. B., Dijkhuis, A. J., Vries, E., Janssen, D. B. «The role of hydrophobic active-site residues in substrate specificity and acyl transfer activity ofpenicillin acylase», Eur.J.Biochem, 269, p 2093-2100, (2002).

[47]: Alkema, W. B., Hensgens, C. M., Kroezinga, E. H., Vries, E., Floris, R., Van Der laan, J. M., Dijkstra, B. W., Jan Sen, D. B. «Characterization of the betalactame binding site of penicillin acylase of Escherichia coli by structural and site- directed mutagenesis st», (2000).

[48]: Datta, M., Baruat, R., Datta, N.N. «Amino penicillanic acid (6-APA) process». Plant description and chemical consumption, , Snamprogetti, Laaboratori Processi Microbiologici, Monterotondo, p 9, (1977).

[49] : Chillet, P. « biologie techniques», CRDP d'aquitaine, P 96-98, (2011).

[50] : Bourat, G. « Propriétés des micro-organismes », technique de l'ingénieur doc : j 6003, (2007).

[51] : Simon, R., Meunier, P. « Microbiologie industrielle et Génie biochimique», ,Ed). Masson et Cie, P 559, Paris, (1970).

[52] : Graham, L.P. « Chimie pharmaceutique », « Les substances antibactériennes », De Boeck Diffusion, De Boeck Université, Belgique, (2003).

[53] : Reviere, J. « Les applications industrielles de la microbiologie», (Ed). Masson p 129, (1975).

[54]: Gerarld, R. «Yes technology backer yeast», The AVI publishing company IMC, USA, (1973).

[55]: Scriban, R. «Biotechnologie». (5ème Ed), «Technologie et documentation», p 1017, Lavoisier, Paris, (1999).

[56]: Bauer, W., Raetz, E. « Fermentation et Technologie enzymatique», p 62, Lausanne, (1992).

[57]: Noui, Y. «L'optimisation de la production de la biomasse *Saccharomyces cerevisiae* cultivée sur un extrait de datte», Mémoire d`Ingénieur, Institut d`Agronomie, Université de Batna, p 62, (2001).

[58]: Cheng, S., Song, Q., Wei, D., Gao, B. « Enzyme Micro Techno », «High-level production penicillin G acylase from Alcaligenes faecalisin recombinant Escherichia coli with optimization of carbon sources», p 326-341,(2007).

[59]: Liu, YC., Liao, LC., Wu, WT. «Cultivation of recombinant Escherichia coli toachieve high cell density with a high level of Penicillin G Acylase activity», Proc Atl Sci Counc ROC (B), p 60-156, (2000).

[60]: Pinotti, LM., Silva, AFS., Silva, RG., Giordano, RLC. «Study of different media for production of Penicillin G Acylase from Bacillus megaterium ATCC14945», Appl Biochem Biotechnol, p 84-86,655-77, (2000).

[61]: Pinotti, LM., Silva, RG., Giordano, RC., Giordano, RLC. « Inoculum studies in production of Penicillin G AcylasebyBacillusmegateriumATCC 14945», Appl Biochem Biotechnol, p 98–100,679–686, (2002).

[62]: Rajendhran, J., Krishnakumar, V., Gunasekaran P. «Optimization of a fermentation medium for the production of Penicillin G acylase from Bacillus sp»,Lett App Microbiol 523-535, (2002).

[63]: Rajendhran, J., Krishnakumar, V., Gunasekaran, P. «Production of Penicillin GacylasefromBacillus sp, effect of medium components», World J Microb Biotechnol, 107-109, (2003).

[64]: Wen, Y., Feng, M., Yuan, Z., Zhou, P. «Expression and overproduction of recombinant penicillin G acylasefromKluyveracitrophila in Escherichia coli», Enzyme MicrobTechnol;37–38, (2005).

[65]: Yang, Y., Biedendieck, R., Wang, W., Gamer, M., Malten, M., Jahn, D., et al. «High yield recombinant penicillin G amidase production and export into thegrowth medium using Bacillus megaterium». Microb Cell Fact;5,p 1–14,(2006).

[66]: Silva, RG., Souza, VR., Nucci, ER., Pinotti, LM., Cruz, AJG., Giordano, RC., et al. «Using a medium of free amino acids to produce penicillin G acylase infed batch cultivations of Bacillus megaterium ATCC 14945», Braz J Chem Eng;23,p 37–43, (2006).

[67]: Zhang, M., Shi, M., Zhou, Z., Yang, S., Yuan, Z., Ye, Q. «Production of Alcaligenes faecalis penicillin G acylase in Bacillus subtilis WB600 (pMA5) fed with partially hydrolyzed starch», Enzyme MicrobTechnol,p 36–39, (2006).

[68] : Cours enzymologie, « Extraction et purification des enzymes microbiennes», Université Dr Yahia Farès, Médéa Algerie, (2010).

[69]: Liu, Y. C., ChangChien, C. C., Suen, S. Y. « Purification of penicillin G acylase using immobilized metal affinity membranes», J.Chromatogr, 794, p 67-76, (2003).

[70]: Collection de l'institute Pasteur 21709 CIP 54.7.

[71]: http://pedagogie.ac-toulouse.fr/svt/serveur/labo/recette/color2.html

[72] : **h**ttp://www.crbip.pasteur.fr/

[73]: Kornfeld, J.M. « A new colorimetric method for the determination of 6-aminopenicillanic acid», Anal. Biochem, 86: P 118-126, (1978).

[74]: ILLanes, A., Acevedeo, F., Gentina, J.C., Reyes, I., Torres, R., Cartagena, O., Ruiz, A., Vasquez, M. « Production of penicillin acylase from Bacillus megaterium in complex and defined media », Process Biochem, , 29, p 263-27, (1999).

[75]: Saba, M., R. Arshad and M.S. Ahmad. Screening of Escherichia coli from vertebrates for penicillin G acylase and betalactamase», The Nucleus, 35:P 97-103, (1998).

[76]: Ahmed, M.S., Saba, M and Arshad, R. « *Escherichia coli* producing penicillin G acylase from dung of horse, donkey and mule ». Pakistan J. Zool, 31:P 141-145, (1999)

[77] : http://fr.wikipedia.org/wiki/Bleu_de_bromothymol

[78]: Leclerc, H., Buttiaux, R., Guillaume, J., Wattre, P, «Microbiologie .appliquée », Ed. Doin, Paris, p 168-188, (1977).

[79]: Merino, E., Balbas, P., Recillas, F., Beccerril, B., Valle, F. and Bolivar, F. «Carbon regulation andthe role in nature of the Escherichia coli penicillin acylase (pac) gene », Mol. Microbiol 6, 2175–2182, (1992).

[80]: Liu, .Y.C., L.C. Liao and w.T. Wu. « Cultivation of recombinant Escherichia coli to achieve high cell dencity with a high level of penicillin G acylase activity », Proc. Natl. Sci. Counc. ROC(B)., 24: P 156-160.

[81] **http://www.arnobio2.com**

[82]: Parmar A, Kumar H, Marwaha S S, Kennedy J F. « Advance in enzymatic transformation of penicillins to 6-amino penicillanic acid (6-APA) », Biotech Advan 200; 18: P 298-301.

الملخص:

الهدف من هذه الدراسة هوإنتاج إنزيم البنسلين أسيلاز، الذي يحول البنسيلين G إلى الحمض السادس الأميني البنسيليني .تم دراسة قدرة السلالة التجارية (ATCC (21709CIP 54.7 *Escherichia coli* على إنتاج إنزيم البنسيلين أسيلاز على عدة أوساط للتعايش باستعمال بروتوكولات مختلفة.

من بين أوساط التعايش الأربعة المدروسة نوعا و كما عن طريق فحص النشاط الإنزيمي، تم تعيين أنسب شروط التخمر من أجل الوسط LB الذي يتكون من 10 غ/ل من التريبتون، 5 غ/ل من مستخلص الخميرة، و 10 غ/ل من كلورير الصوديوم.

حيث تم الحفاظ على التعايش في درجة الحموضة 7.5 ، عند درجة الحرارة 30°م، فترة الحضانة الأمثل كانت 24 ساعة مع تحريك ميكانيكي يقدر ب 220 دورة في الدقيقة، تم تلقيح الوسط بواسطة المعلق الذي يحتوي على الغليسيرين.

تحت هذه الشروط كان النشاط الإنزيمي الأقصى من أجل تحليل البنسيلين G إلى الحمض الأميني السادس البنسيليني هو 1.3 وحدة إنزيمية ، في درجة حموضة 8 ، و درجة حرارة تقدر ب 40 °م، مدة هذا التحليل هي 40 دقيقة.

تم فصل الإنزيم المنتج عن طريق الترسب بواسطة الإيثانول، المنتج المنقى لديه نشاط إنزيمي يقدر ب 6.8 وحدة إنزيمية.

الكلمات المفتاحية : Escherichia coli ، بينسيلين أسيلاز، دفعة، تفكك، البنسيلين G، الحمض السادس الأميني البنسليني.

Résumé:

La production de la pénicilline acylase, enzyme catalysant l'hydrolyse de la penicilline G en 6-APA, a été étudiée. La mise en évidence de la production de la pénicilline acylase par une souche commerciale de *Escherichia coli* ATCC(21709 CIP 54.7 a été réalisé sur différents milieux en utilisant trois protocoles d'ensemencement. Parmi les quatre milieux de cultures étudiés, suivis qualitativement et quantitativement par dosage de l'activité enzymatique, le meilleur rendement en enzyme a été obtenu avec le milieu LB qui contient de l'extrait de levure (5g/l), le tryptone (10g/l), et le NaCl (10g/l). La culture est maintenue à pH7.5 et sous une température 30°C. Le temps d'incubation optimal était de 24 h sous une agitation mécanique de 220 rpm ensemencé à partir d'une suspension de *E. Coli* contenant du glycérol. Sous ces conditions, l'activité maximale atteinte pour l'hydrolyse de la penicilline G en 6-APA était de 1.3 UE sous les conditions standards pH8 et une température de 40 °C, et pour un temps de réaction de 40 min. La pénicilline acylase obtenue a été séparée par précipitation à l'éthanol. Le produit purifié possède une activité totale de 6.8 unité enzymatique.

Mots clés: *Escherichia.coli*, pénicilline acylase, batch, hydrolyse, pénicilline G, acide 6-amino-pénicillanique.

Abstract:

The production of penicillin acylase, enzyme catalyzing the hydrolysis of penicillin G to 6-APA was investigated. Highlighting the production of penicillin acylase by a commercial strain of Escherichia coli (ATCC 21709 54.7 CIP was carried out using three different media protocols seeding.

From four culture media studied, followed by qualitative and quantitative determination of enzyme activity, the best fermentation conditions were determined for the LB medium containing yeast extract (5 g / l), tryptone (10 g / l), and NaCl (10g / l). The culture was maintained at pH 7.5 and at a temperature 30 ° C. The optimal incubation time was 24 h under mechanical agitation of 220 rpm seeded from a suspension of E. Coli containing glycerol. Under these conditions the maximum activity attained for the hydrolysis of penicillin G to 6-APA was 1.3 EU under standard conditions pH 8 and a temperature of 40C °, and reaction time 40 min. The penicillin acylase obtained was separated by ethanol precipitation. The purified product has a total activity of 6.8 unit enzyme.

Key words: Escherichia coli, batch, hydrolys, pénicilline acylase, pénicilline G, l'acide 6-amino-pénicillanique.

Introduction générale

L'hydrolyse de la pénicilline G ou V (antibiotiques de base) en acide 6 amino-pénicillanique (6APA) est une réaction conduisant à un produit d'intérêt primordial dans l'industrie pharmaceutique.

À partir de 1957, date à laquelle a été isolé l'acide 6-amino-pénicillanique, de nombreuses pénicillines de synthèse virent le jour, par substitution du noyau pénicillanique.

Le cycle b-lactame associé à un noyau thiazolidine forme l'**acide 6-amino-pénicillanique (6-APA)** qui représente la structure de base des pénicillines. Il peut être substitué par acylation sur sa fonction aminée pour donner naissance à des dérivés qui se distinguent par leur pharmacocinétique, leur stabilité, le spectre antibiotique et la résistance aux b-lactamases.

La synthèse de 6-APA est réalisée par deux voies principales : la voie chimique nécessitant l'utilisation de réactifs, de solvants, sous des conditions strictes, avec un rendement limité dû à des réactions secondaires. La voie enzymatique faisant intervenir l'enzyme pénicilline acylase et qui est actuellement la méthode privilégiée du fait des caractéristiques que possèdent la catalyse enzymatique grâce au pouvoir catalytique élevé « turn-over » des enzymes, leur spécificité, la biodégradabilité et la limitation de la formation de sous-produits. Ces avantages permettent ainsi de réduire l'utilisation des réactifs et des solvants nocifs.

Les micro-organismes constituent actuellement la source principale de synthèse de diverses enzymes utilisées dans l'industrie. La pénicilline acylase est une enzyme sécrétée par diverses bactéries telles que *Escherichia coli, Bacillus subtilis*,…etc . La pénicilline acylase est capable non seulement de catalyser la réaction d'hydrolyse de pénicilline, mais elle intervient également dans la synthèse des ampicillines. D'où l'intérêt de son obtention par fermentation et de sa séparation pour enfin conduire ces types de réactions sous des conditions modérées de température, de pH tout en contrôlant facilement les paramètres opératoires afin d'atteindre un rendement maximal en 6-APA ou de ses dérivés.

La présente étude a pour objectif la production de l'enzyme pénicilline acylase à partir d'une fermentation en batch agité utilisant la souche *Escherichia coli* ATCC (21709 CIP 54.7), en vue de catalyser la synthèse de 6-APA par hydrolyse de la pénicilline G.

A cet effet, l'étude sera concentrée sur la détermination des meilleures conditions permettant la production de la pénicilline acylase avec un rendement maximal.

Pour cela, le présent manuscrit décrivant les étapes de l'étude sera composé de deux parties :

1. Une partie bibliographique où sont présentées des notions sur :

- Les antibiotiques : généralités sur les antibiotiques, définition, mécanismes d'action, et classification.

- Les béta- lactames pénicillines : où est représenté en détail les différents types définition, souches productrices, stabilité des pénicillines naturelles, Pénicillines retard et les pénicillines de semi synthèse.

- L'acide 6-amino-pénicillanique : généralités, procédés de production (procédé de SAIDAL (MEDEA), procédé de CARRINGTON, procédé fermentaire et procédé enzymatique), importance, acylation et synthèse des pénicillines nouvelles.

- La pénicilline acylase : généralités sur la pénicilline acylase, mode d'action, mode d'action, et Caractéristiques technologiques du processus d'hydrolyse de la pénicilline G**.**

- La production de pénicilline acylase par fermentation : les conditions de fermentation, la fermentation industrielle-généralités, optimisation de la fermentation, production d'enzyme par fermentation, extraction et purification.

2. Une partie expérimentale, ayant pour objectif de produire la pénicilline acylase par une souche commerciale. La stratégie expérimentale est menée en quatre étapes essentielles :

- La première étape est consacrée essentiellement à revifier la souche *E.coli* ATCC (21709 CIP 54.7).
- Dans la deuxième étape, des essais en batch, où sera menée la fermentation de *E.coli* pour la mise en évidence de la production de pénicilline acylase par cette dernière dans des milieux présélectionnés et selon un protocole étudié sur la base de recherche bibliographique.

- On procèdera à l'étude des effets des différents paramètres de la fermentation dans le but d'obtenir les conditions optimales permettant d'atteindre le rendement de la production de pénicilline acylase.
- Enfin, un protocole sera élaboré pour la séparation et la purification de la pénicilline acylase produite sous les conditions optimales. L'enzyme séparée sera utilisée pour la réaction de synthèse de 6-APA.

I. LES ANTIBIOTIQUE:

I.1 Généralités :

Les antibiotiques sont des biomolécules produites par des champignons ou des bactéries, par synthèse ou hémi synthèse. Les antibiotiques sont capables d'inhiber ou de détruire certaines espèces bactériennes **[1]**.

Une substance antibiotique est donc un médicament qui a pour effet de tuer des bactéries de façon ciblée. Elle se distingue d'un antiseptique qui détruit tout germe et parfois même la cellule, de manière non ciblée. L'antibiotique, en général, va agir si la réponse immunitaire innée est déficiente **[2]**.

Ces antibiotiques peuvent avoir une action drastique, c'est-à-dire bactéricide, leur efficacité peut être également limitée à empêcher le développement des micro-organismes (action bactériostatique et d'inhibition) **[3]**. Ils ont connu un développement considérable durant le vingtième siècle, malgré qu'un ralentissement ait été constaté depuis quelques années, suite à la multiplication de mécanismes de résistance des bactéries. L'utilisation rationnelle des antibiotiques est donc essentielle et primordiale. Elle repose sur la connaissance des produits utilisés, l'analyse de l'infection à traiter, la prise en compte du terrain sur laquelle elle survient et enfin l'évolution des résistances **[1]**.

Il existe plusieurs familles d'antibiotiques classés selon leurs propriétés principales et leurs modes d'action, regroupés en plus de dix familles dont les principales sont les suivantes : aminosides, bêta-lactamines (pénicilline), macrolides, nitro-imidazolés, quinolones, et cyclines **[3]**.

I.2 : Définition :

On appelle « Antibiotique » toute substance naturelle d'origine biologique élaborée par un organisme vivant, substance chimique produite par synthèse ou substance semi synthétique obtenue par modification chimique d'une molécule de base naturelle ayant les propriétés suivantes :

- Activité antibactérienne (spectre d'activité),
- Toxicité sélective (mode d'action),
- Activité en milieu organique (pharmacocinétique),
- Bonne absorption et diffusion dans l'organisme **[4]**.

I.3 Mode d'action :

Les bactéries sont des organismes unicellulaires, possédant une paroi cellulaire glucidique, le peptidoglycane. Les bactéries présentent de nombreuses formes : sphériques (coques), allongées ou en bâtonnets (bacilles), des formes plus ou moins spiralées.

Les bactéries sont de l'ordre de deux types :

- Les bactéries pathogènes, qui sont responsables de maladies humaines et causent des infections en libérant des toxines qui constituent des poisons pour l'organisme.
- Les organismes infectieux qui peuvent être distingués en trois types : les pathogènes obligatoires, accidentels ou opportunistes.

Pour l'étude du mode d'action des antibiotiques nous proposons une représentation de la physionomie générale d'une bactérie **[5]**:

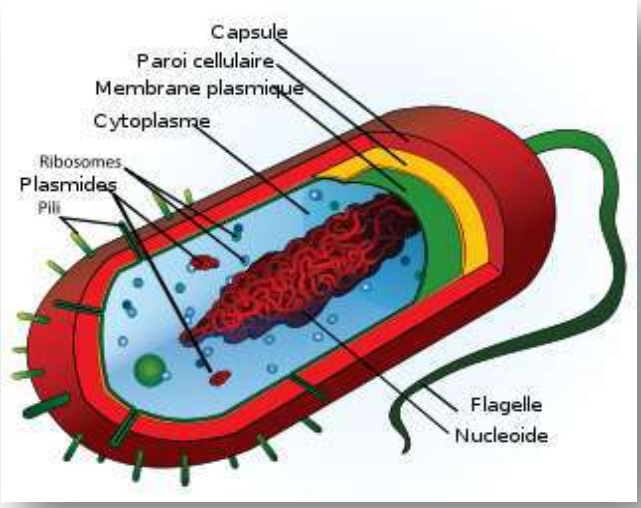


Figure I.1 : Structure bactérienne **[5]**.

Les antibiotiques agissent de manière très ciblée, ils peuvent avoir une action:

- **bactériostatique :** ils empêchent le développement des bactéries, ou;
- **bactéricide :** ils tuent les bactéries.

Afin de comprendre ces deux actions on peut examiner deux expériences réalisées par un campus de microbiologie médicale, en 2001 :

Bactériostate : Le nombre de bactéries viables après un temps d'incubation et de contact donné avec un antibiotique est inférieur à celui observé en l'absence d'antibiotique

(témoin) pour une culture incubée dans les mêmes conditions. Il y a donc un ralentissement ou un arrêt de la croissance, quantifiable en termes de CMI (concentration minimale inhibitrice en mg/l).

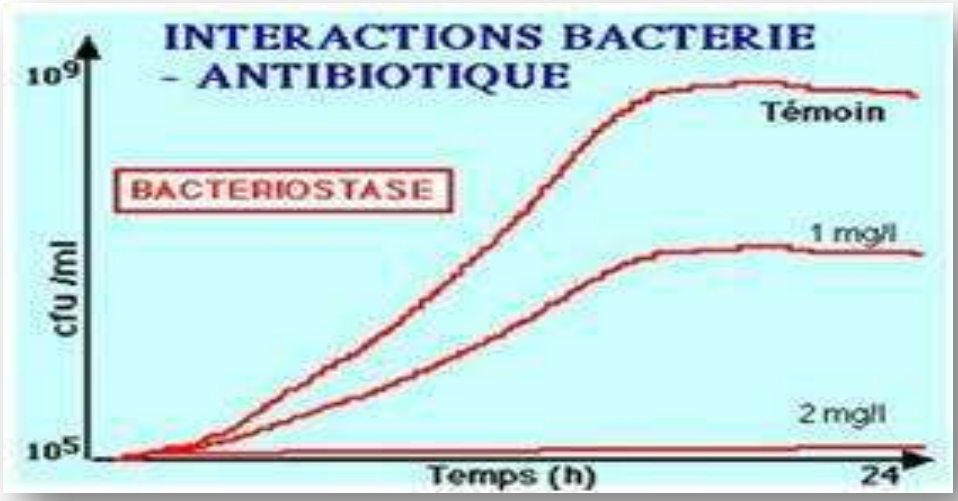


Figure I.2 : L'effet de l'antibiotique sur la cinétique de croissance bactérienne **[5]**.

Bactéricide : Le nombre de bactéries tuées après un temps de culture et de contact donné avec un antibiotique est inférieur à celui déterminé au temps 0. Il y a donc arrêt de la croissance et mortalité quantifiable en termes de CMI (concentration minimale inhibitrice en mg/l).

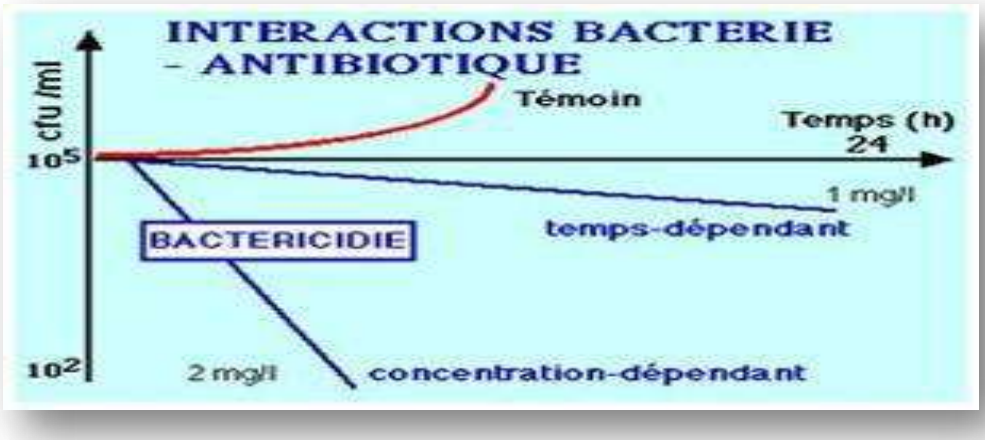


Figure I.3 : L'effet de l'antibiotique sur la cinétique de croissance bactérienne **[5]**.

Les antibiotiques agissent à l'échelon moléculaire au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie. Ils agissent par :

● **Toxicité sélective au niveau de :**

- ✓ Synthèse de la paroi bactérienne
- ✓ Membrane cytoplasmique
- ✓ Synthèse des protéines
- ✓ Acides nucléiques

● **Inhibition compétitive :** dans ce cas l'antibiotique est un analogue structural, il interfère avec une fonction essentielle à la bactérie.

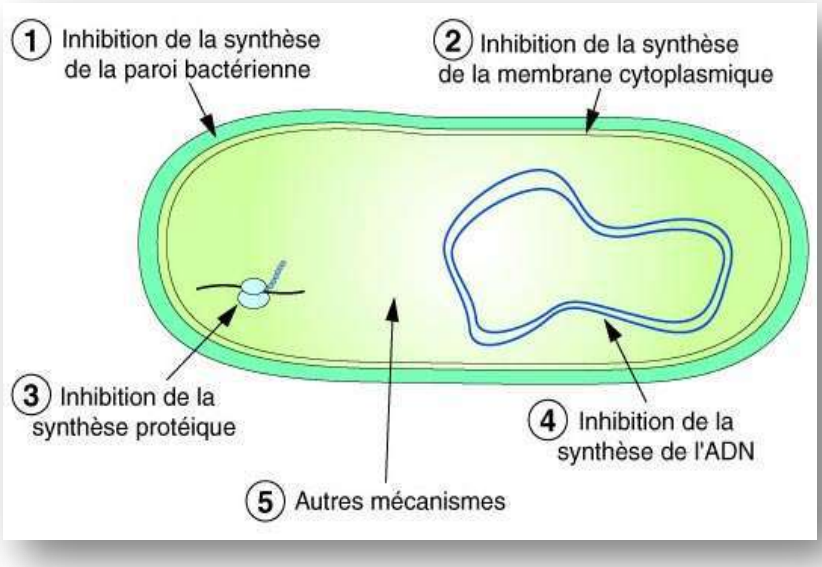


Figure I.4 *:* Mode d'action des antibiotiques **[4]**.

I.4 Critères de Classification :

La classification des antibiotiques peut se faire selon :

a. **Origine :** élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique)

b. **Mode d'action :** paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques

c. **Spectre d'activité :** liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large)

d. **Nature chimique :** très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle β lactame) sur laquelle il y a hémi synthèse.

La classification selon la nature chimique nous permet de classer les antibiotiques en familles (bêta- lactamines, aminosides, tétracyclines…..etc.).

Les antibiotiques sont classés tout d'abord, afin de faciliter le choix thérapeutique. En effet il y a un nombre très élevé de molécules. De plus les antibiotiques sont plus ou moins liés entre eux. On remarque que certains antibiotiques présentent une structure semblable, ils seront donc associés à un mode d'action équivalent et agiront sur le même type de bactéries **[6]**.

On a plusieurs familles :

- **Bêta -lactamines (Pénicilline, céphalosporines) :** traitent 80% des pathologies infectieuses.
- **Glycopeptides :** proches des β lactames.
- **Aminosides :** peu utilisés et souvent associés aux β Lactames dans les hôpitaux.
- **Cyclines :** efficaces mais avec de nombreuses formes de résistance.
- **Phénicolés :** en essais cliniques.
- **Rifamycines :** Antituberculeux majeurs.
- **Sulfamides [7].**

II. ANTIBIOTIQUES β LACTAME PENICILLINES :

La production de pénicilline est l'un des exemples les plus intéressants de fermentation à grande échelle. En raison de son ancienneté (plus de 50 ans) et de son importance industrielle, la littérature propose une masse considérable d'informations de toutes sortes sur tous les aspects concernés, dont on trouverait difficilement l'équivalent pour d'autres produits.

Elles recouvrent aussi bien la connaissance et les méthodes d'amélioration des souches productrices que les détails de la biosynthèse ; aussi bien les aspects biochimiques que les phénomènes physiques qui doivent être pris en compte dans l'extrapolation industrielle. Les fermentations de pénicilline G, de pénicilline V (de formule voisine), de céphalosporine C sont encore aujourd'hui la base de la fabrication de plus de 60 % des antibiotiques produits dans le monde **[8]**.

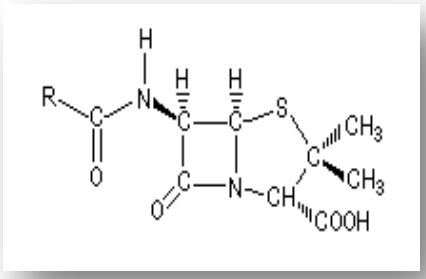
II.1.Définition :

Les pénicillines sont des produits du métabolisme de certaines moisissures du genre Penicillium et Aspergillus **[9]** et leur découverte fortuite résulte de l'observation par Fleming du pouvoir inhibiteur d'une colonie de ce champignon vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* lors d'une contamination accidentelle d'une plaque de pétri **[10]**. Elles ont des propriétés antibiotiques bactériostatiques : elles empêchent la synthèse de la paroi bactérienne et stoppent donc la prolifération des bactéries.

Ce sont les premiers antibiotiques obtenus à l'échelle industrielle et leur utilisation pour traiter les infections a entraîné une véritable révolution médicale au cours de la deuxième moitié du vingtième siècle **[11]**.

II.2.Structure de la pénicilline:

Cette molécule est devenue le premier antibiotique à connaître une très large diffusion alors même que sa structure n'était pas établie de façon certaine **[12]**. voir figures (II.1) et (II.2).



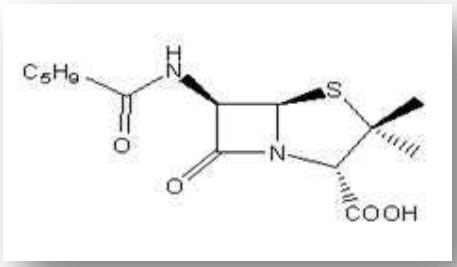


Figure II.1: Structure de la pénicilline **Figure II.2:** Formule de Lewis de la pénicilline**.**

II.3. Définition des différentes molécules de pénicilline:

La pénicilline, de formule **$C_{16}H_{17}N_2NaO_4S$- R**, est donc une molécule complexe. Cette formule chimique se divise en deux parties (voir figure II.3):

- Premièrement, $C_8H_{11}N_2O_3S$ est la formule de l'acide pénicilloïque que l'on nomme également pénicilline naturelle. Elle comprend la fonction amine (CONH), l'acide carboxylique (COOH), le noyau bêta-lactame, le noyau thiazolidine et le groupement méthyle. Tous ces éléments sont communs aux bêta-lactames.
- Ensuite le radical variable R, ce radical rattaché à la formule, représente les différentes protéines que l'on peut greffer synthétiquement à la pénicilline naturelle **[13]**.

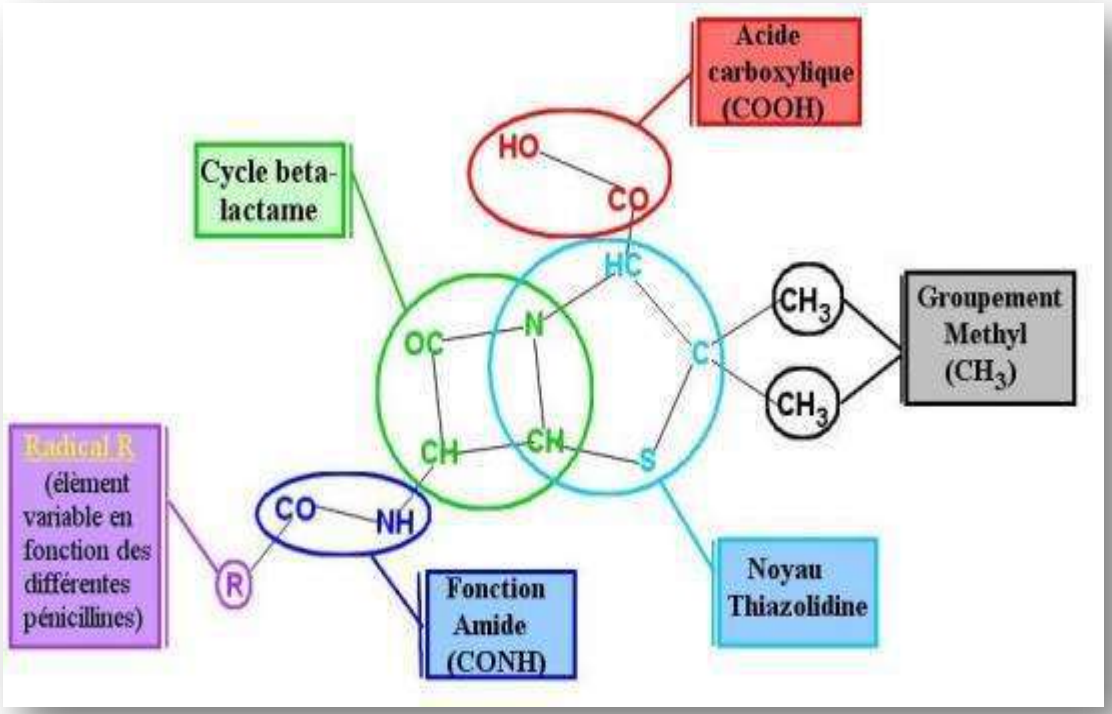


Figure II.3 : Formule chimique de la pénicilline **[13]**.

On accroche différentes protéines à la pénicilline naturelle afin de diversifier le champ d'action de celle-ci. Chaque pénicilline possède un nom différent selon la protéine qui lui est annexée.

II.4. Le noyau bêta-lactame (l'azétidin-2-one) (Figure II.4) :

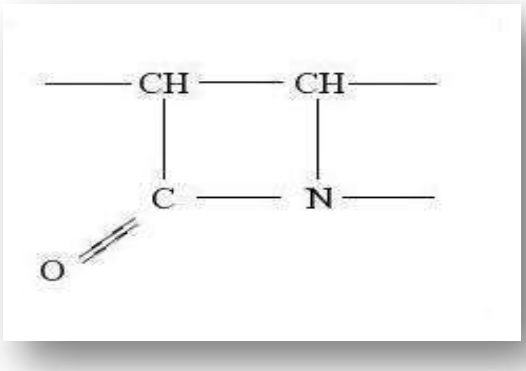


Figure II.4: Structure de noyau bêta-lactame **[12].**

Cet hétérocycle tétragonal est essentiel pour l'activité biologique et gouverne toute la chimie des antibiotiques de cette famille. Toute ouverture du cycle entraîne l'inactivation biologique de la molécule.

Le noyau thiazolidine (Figure II.5), associé au cycle bêta-lactame forme l'acide 6-amino-pénicillanique (6-APA) qui est le noyau de base des pénicillines **[12]**.

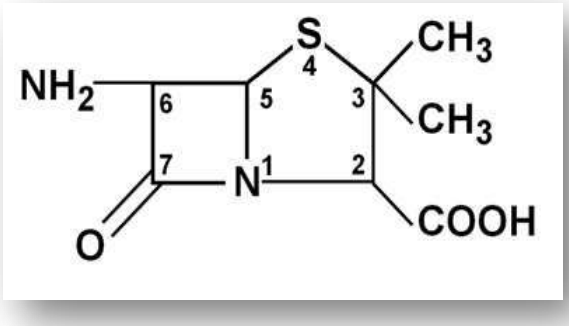


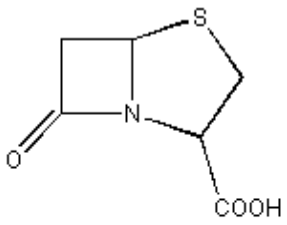
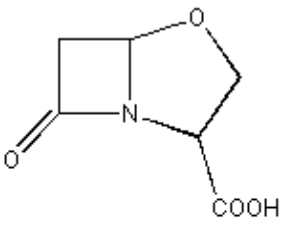
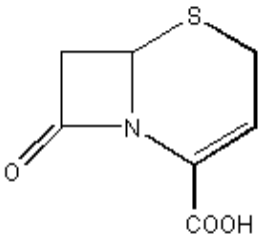
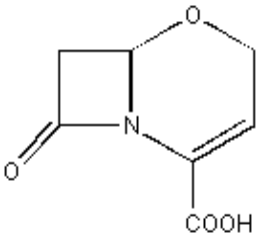
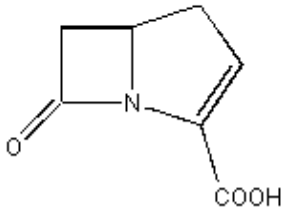
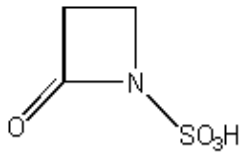
Figure II.5: Structure de l'acide 6-amino-pénicillanique **[14]**.

Le système bicyclique adopte dans l'espace une géométrie de livre ouvert avec les deux hydrogènes du cycle lactame et le carboxyle en arrière du plan, tandis que la chaîne acyle aminée se place en avant. La non-planéité des molécules s'oppose alors à la résonance du groupement CO-NH à l'origine de l'instabilité relative de ces molécules.

Selon qu'il est ou non intégré à une structure plus complexe seront distinguées:

- Les pénicillines (bicycles correspondant à la fusion de la thiazolidine) ;
- Les céphalosporines (fusion à la dihydro-l, 3-thiazine) ;
- Les mono bêta-lactames **[14]**.

Tableau II.1: Diversité des antibiotiques de type bêta-lactames: principaux cycles et antibiotiques représentatifs.

 Noyau pénane (Pénicillines)	 Noyau clavane (inhibiteurs de beta-lactamases)
 Noyau céphème (céphalosporines)	 Oxacéphème
 Carbapénème	 Monobactame

Sur base de la nature des substituants et de ses conséquences pour l'activité d'antibiotique, on peut distinguer plusieurs classes de produits, qui seront comparées systématiquement par la suite **[10]**.

II.5. Classification des pénicillines:

Selon le mode de leur obtention, on peut distinguer trois familles principales de pénicillines :

- Pénicillines naturelles;
- Pénicillines retard;
- Pénicillines de semi synthèse.

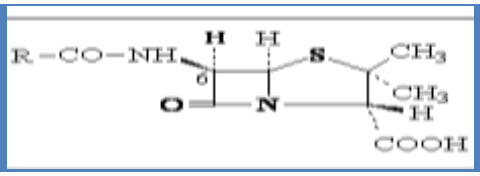
II.5.1. Les pénicillines naturelles :

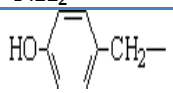
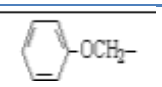
L'espèce Penicillium produit 6 pénicillines naturelles : G, F, K, N, X, V. Seules les pénicillines G et V sont d'usage thérapeutique **[10]** (tableau II.2).

Ces pénicillines sont distinguées uniquement par la nature du substituant R de la fonction acyle aminée en position 6 du bicycle.

- Benzyle pour la pénicilline G (benzylpénicilline) ;
- Phénoxyméthyle pour la pénicilline V (phénoxy-méthylpénicilline) **[14]**.

Tableau II.2 : les pénicillines naturelles **[10]**.



DCI	Pénicilline	R
Benzyl pénicilline	G	**C_6H_5-CH_2-**
penténYle pénicilline	F	**CH_3-CH_2-CH=CH-CH_2-**
Heptil pénicilline	K	**CH_3-$(CH_2)_5$-CH_2-**
α-amino-adipoil pénicilline	N	**HOOC-CH-CH_2-CH_2-CH_2-** | **NH_2**
p-hidroxi-benzyl pénicilline	X	
Fenoximetil pénicilline	V	

Les pénicillines G et V s'obtiennent par voie fermentaire (biosynthèse dirige). La souche productrice est *Penicillium chrysogenum* qui utilise deux acides aminés pour la biogenèse du noyau penam : cystéine et valine.

Dans la biosynthèse dirigée, s'utilise comme précurseurs de la chaine latérale l'acide phénylacétique pour la pénicilline G, ou acide fenoxiacétique pour la pénicilline V (Figure. II.6) **[10]**.

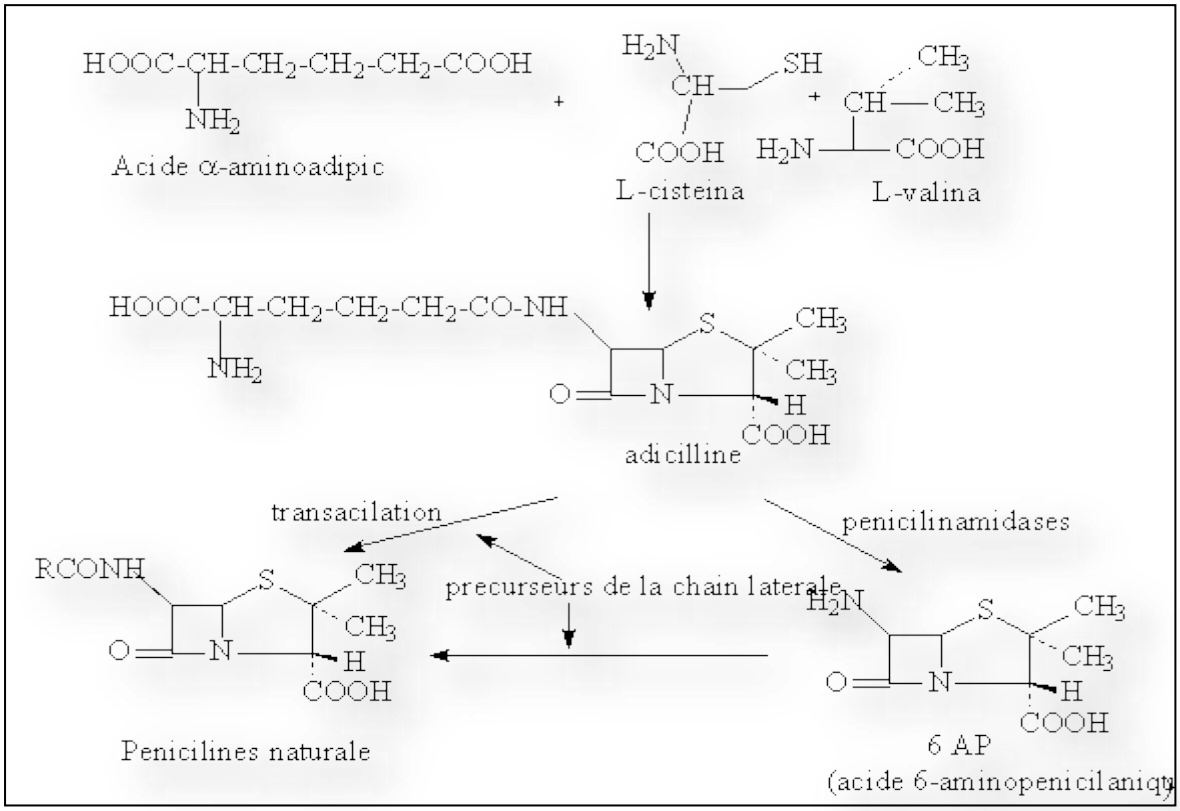


Figure II.6: Schéma de la biosynthèse dirigée des pénicillines naturelles **[10]**.

II.5.1.1. Souches productrices :

Penicillium notatum

Penicillium notatum, également connue sous le nom de *Penicillium chrysogenum* (Figure II.7), est une espèce de champignon filamenteux microscopique du genre Penicillium, célèbre pour être à l'origine de la découverte de la pénicilline par le docteur Alexander Fleming (1928). Penicillium est connu pour être la moisissure bleu verte que l'on retrouve sur le pain ou les fruits moisis ainsi que sur certains fromages.



Figure II.7: *Penicillium notatum* cultivée sur milieu solide

Tableau II.3 : Classification taxonomique de *Penicillium notatum* **[15].**

Classification	
Règne	*Fungi*
Division	*Ascomycota*
Sous-division	*Pezizomycotina*
Classe	*Eurotiomycetes*
Ordre	*Eurotiales*
Famille	*Trichocomaceae*
Genre	*Penicillium*
Nom binominal	
Penicillium notatum **Westling, 1911**	

II.5.1.2 Stabilité des pénicillines naturelles:

La pénicilline G est instable en milieu acide. Donc, elle s'utilise seulement par voie parentérale (IV ou IM). La pénicilline V est stable en milieu acide; elle s'utilise par voie orale.

Toutes les pénicillines naturelles sont instables en milieu basique et en présence de l'alcool. En présence des hydroxydes, les pénicillines soufrent d'une réaction d'hydrolyse au niveau du bêta-lactame (Fig. II.8), avec la formation d'acide peniciloique inactif:

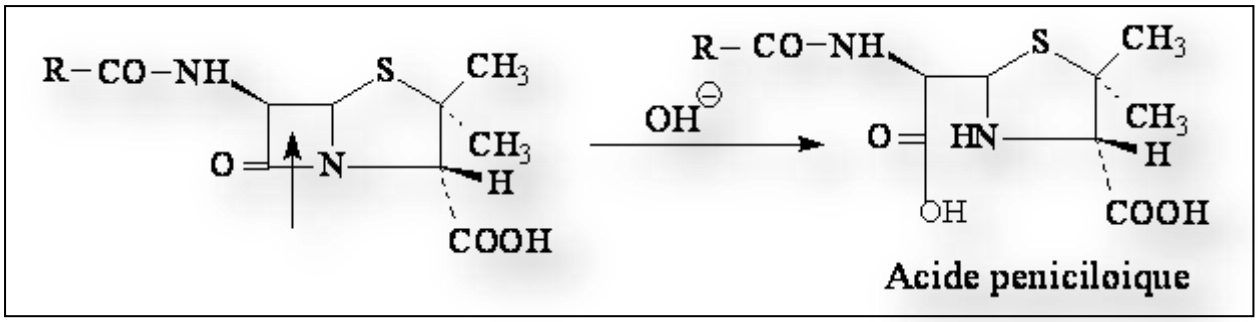


Figure II.8 : Réaction d'hydrolyse des pénicillines en présence des hydroxydes**.**

II.5.2. Pénicillines retard :

Pour assurer une durée d'action plus grande, ont été obtenu des pénicillines retard, qui sont des sels de la pénicilline G avec des amines organiques qui s'utilisent par voie intramusculaire. A ce groupe appartient la procaine-penicilline G et la benzatine-penicilline G Figures (II.9) et (II.10).

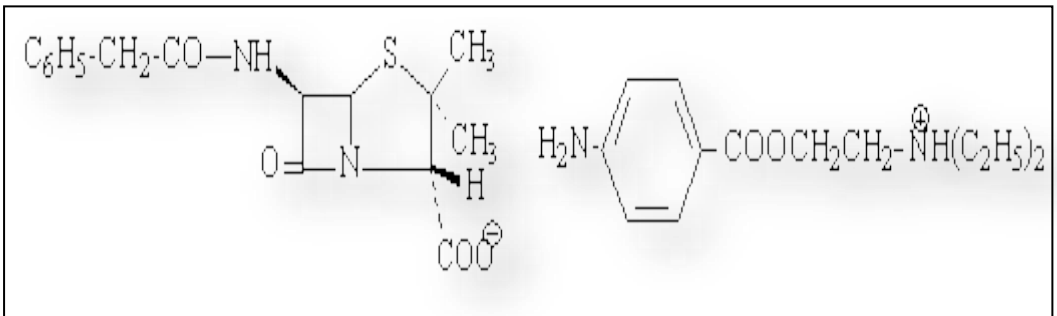


Figure II.9 : Procaine-pénicilline G.

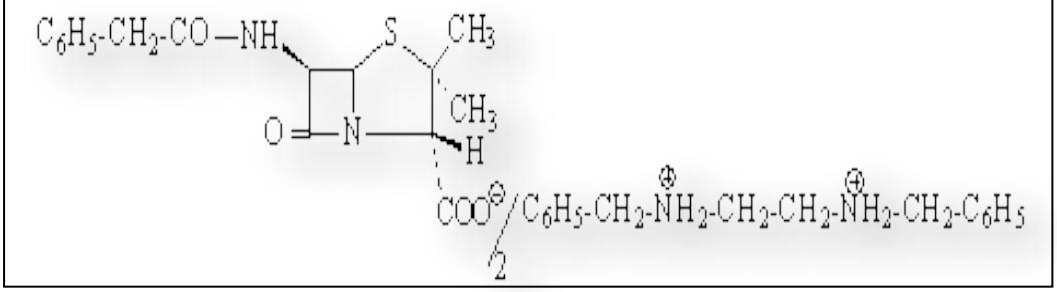


Figure II.10 : Benzatine-pénicilline G **[10].**

II.5.3 Pénicillines de semi synthèse :

Sont les plus nombreuses pénicillines: amoxilines, céphalosporines….

La semi synthèse des pénicillines comporte deux étapes:

a. Obtention de l'acide 6-amino-pénicilanique (6-APA);

b. Acylation de l'acide 6-amino-pénicilanique **[10]**.

III. L'acide 6-amino-pénicillanique:

III.1. Historique :

En **1950**, le japonais SAKAGUCHI et MURAO découvrent dans le bouillon de fermentation du *« pénicillium chrysogénum »* et *« Aspergillus arysae »* l'enzyme pénicilline acylase capable de réaliser une hydrolyse de la molécule de la pénicilline G pour donner l'acide phénylacétique et un composé aminé qui l'ont appelé *« pénicine »*.

En premier, ils ont supposé que la pénicine était la même substance que le produit de fermentation, mais on a commencé à se douter si les deux produits étaient vraiment identiques.

On a appris que plusieurs recherches n'ont abouti qu'a répéter les observations de SAKAGUCHI et MURAO **[17]**, jusqu'en 1953, quand KATAO découvre une substance possédant des propriétés anti bactériennes plus basses que la pénicilline, inactive biologiquement et sensible à la pénicillinase, et aussi la présence de l'acide phénylacétique dans le bouillon fermenté (fermentation sans précurseur).

Cette substance a été isolée à l'état pur et cristallin en **1959** par BATCHELOR, qui l'anommé : noyau pénicillanique 6-APA dont les propriétés physiques et chimiques sont identiques à celles qu'on a attribué à la pénicine **[18]**.

Dans la même année, DOYLE et ROBINSON ont réussi à mettre au point une méthode industrielle de fabrication de l'acide 6-amino pénicillanique **[19]**. Elle a été aussi obtenue par clivage enzymatique et par voie chimique en **1960** par KAUFFMAN et BAUER.

En **1971**, CARRINGTON a réalisé sa production à l'échelle industrielle par voies enzymatique et chimique **[20]**.

III.2. Propriétés physico-chimiques du 6-APA :

L'acide 6-amino-pénicillanique (cycle thiazolidine lié au cycle bêta-lactame) est le noyau de base des pénicillines. Il peut être substitué par acylation sur sa fonction aminée pour donner naissance à des dérivés qui se distinguent par la stabilité, la pharmacocinétique, le spectre et la résistance aux bêta-lactamases. Par ailleurs, la fonction carboxylique peut être transformée en carboxylate (plus soluble) ou permettre l'obtention d'esters (prodrogues).

Cette fonction acide est toutefois essentielle à l'activité antibactérienne (elle fait partie du pharmacophore).

Sur base de la nature des substituants et de ses conséquences pour l'activité antibiotique, on peut distinguer plusieurs classes de produits.

Les caractériqtiques suivantes peuvent être citées :

Formule brute : $C_8H_{12}O_3N_2S$

Structure chimique:

L'acide 6-amino-pénicillanique est un amino-acide, qui représente un système hétérocyclique constitué de deux cycles condensés l'un A : thiazolidine, à cinq membres et l'autre B : B-lactame à quatre membres (Fig. III.1) **[21]**.

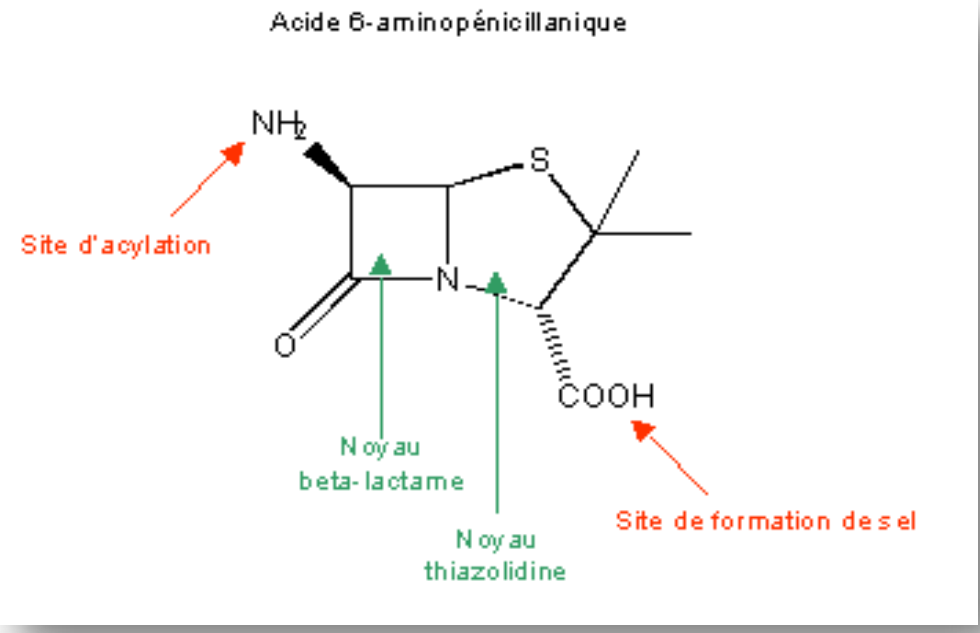


Figure III.1 : Structure de l'acide 6-amino-pénicillanique et ses sites actifs **[22]**.

- ✓ **Point de fusion :** 208÷210°C
- ✓ **Solubilité :** 4 $g \cdot l^{-1}$ (eau, 20 °C)
- ✓ **Dégradation enzymatique:** 6-APA se dégrade sous l'action de la pénicillinase moins rapidement par rapport à la pénicilline.

- ✓ **Dégradation chimique:** Comme toutes les pénicillines, il se décompose rapidement sous l'action des bases, mais il est relativement stable aux acides.
- ✓ **Le point isoélectrique**, où la substance possède la solubilité la plus basse dans l'eau est à pH=4.3 ou pH=3.7 d'après d'autres auteurs.
- ✓ **Le pouvoir rotatif** du 6-APA dépend du pH de la solution: On trouve $[\alpha]^{2}_{0D}$= 320 ÷ 337° à pH=8.9 et $[\alpha]^{20}_{D}$ = 284° à pH=2 **[21]**.

III.3. Activité antibactérienne du 6-APA :

Si on compare les valeurs de la concentration minimale inhibitrice du 6-APA et du benzylpénicilline (voir tableau III.1), on voit qu'en général le 6-APA est moins actif sur des bactéries gram positif que la pénicilline G, mais il n'y a pas de différences sur des bactéries gram négatif **[21]**.

Tableau III.1 : Concentrations minimales inhibitrices du 6-APA et de la pénilline G (mg/ml) **[21]**.

Bactéries	6-APA	Benzylpénicilline
Staphylococcus aureus	62.5	0.05
Sarcinalutea	50	0.001
Bacillus subtillus	50	5
Klebsiellapneumoniae	50	5
Alcalgènesfeacalis	125	5
Escherichia coli	50	50
Shigellasonnei	50	50
Aerobacteraerogènes	125	125
Proteusmorganii	> 250	> 250

III.4. Procédés de production de l'acide 6-amino pénicillanique :

Il existe trois procédés de production du 6-APA :

- Procédé chimique ;
- Procédé fermentaire ;
- Procédé enzymatique.

III.4.1. Procédé chimique:

III.4.1.1. Procédé de SAIDAL (MEDEA) :

Ce procédé consiste à une désacylation de la chaîne latérale de la pénicilline G (Fig.III.2).

Dans ce but, la pénicilline G potassique, mise en suspension dans du chlorure de méthylène, est solubilisé par la formation des esters silils (silildérivé) par l'addition de diméthyldichlorosilane, en présence de la N, Ndiméthyl aniline, qui sert d'accepter l'acidité.

Pendant la silylation, le milieu réactionnel doit être anhydre (l'humidité du chlorure de méthylène doit être de moins de 0.1%, l'humidité de la pénicilline moins de 1%).

Le dérivé silylé de la pénicilline G est transformé en iminochlorure par l'addition de penta chlorure de phosphate à une température très basse (-70°C). L'iminochlorure du silil dérivé de la pénicilline G est transformé en imino-ether par l'addition de l'alcool : n-Butanol, refroidit à 60°C, préalablement.

L'hydrolyse de l'imino-ether par l'addition de l'eau mène à la formation du chlorhydrate de l'acide de l'acide 6-amino pénicillanique et de l'ester butylique de l'acide phénylacétique.

La précipitation de l'acide 6-amino-pénicillanique est effectuée par l'addition de l'eau ammonicale jusqu'à son point isoélectrique à pH = 4.3 **[21]**.

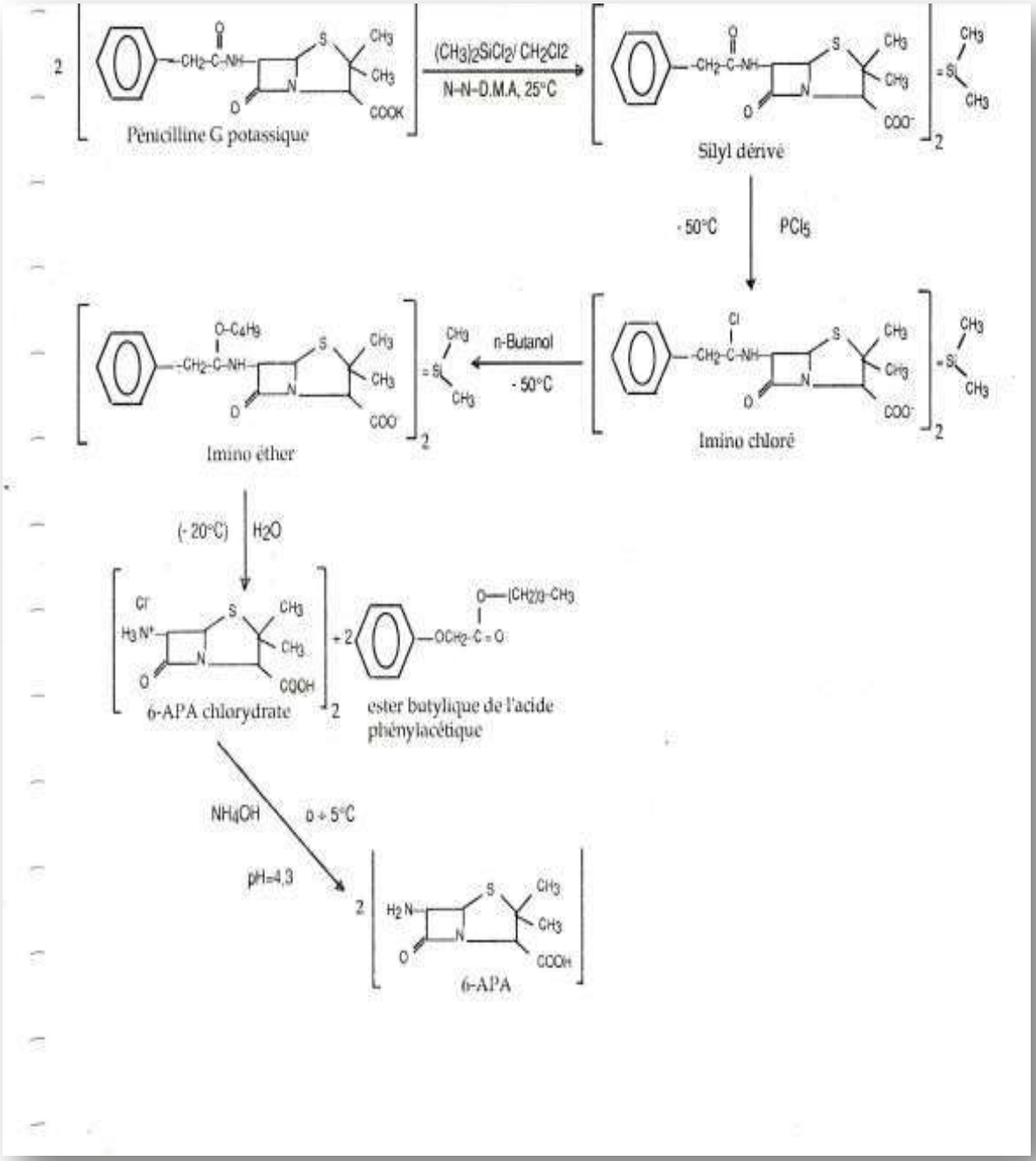


Figure III.2 : Synthèse du 6APA à partir de la pénicilline G potassique **[23].**

III.4.1.2. Procédé de CARRINGTON :

En **1971**, CARRINGTON a présenté une méthode permettant de convertir la pénicilline, par une hydrolyse sélective en 6-APA, sous des conditions très douces, qui laissent le cycle béta-lactame intact (Fig. III.3).

Par cette procédure, n'importe quelle pénicilline naturelle, exemple : benzylpénicilline (A) peut être produite par fermentation en premier, et converti par la suite en son ester méthylsilysé correspondant (B) afin de protéger le groupe carboxylique.

Son traitement avec du pentachlorure de phosphore en présence d'un catalyseur basique donne l'imino chlorure (C) correspondant. Le temps de la réaction optimal est assez critique et dépend de plusieurs facteurs tels que : La température, La quantité et la nature du solvant et le type de l'agent de chloration utilisé.

L'addition d'un alcool provoque la conversion de l'imino chlorure en son correspondant imino-ether (D) et fendre le groupe protecteur : l'ester silylé simultanément sans casser le cycle bêta-lactamique; le temps et la température de l'action sont aussi critiques à ce stade, et dépendent du type de l'alcool employé.

L'hydrolyse sélective de l'amino-ether d'une labilité élevée pour donner le 6-APA (E), où il est cristallisé au point iso-électrique **[20]**.

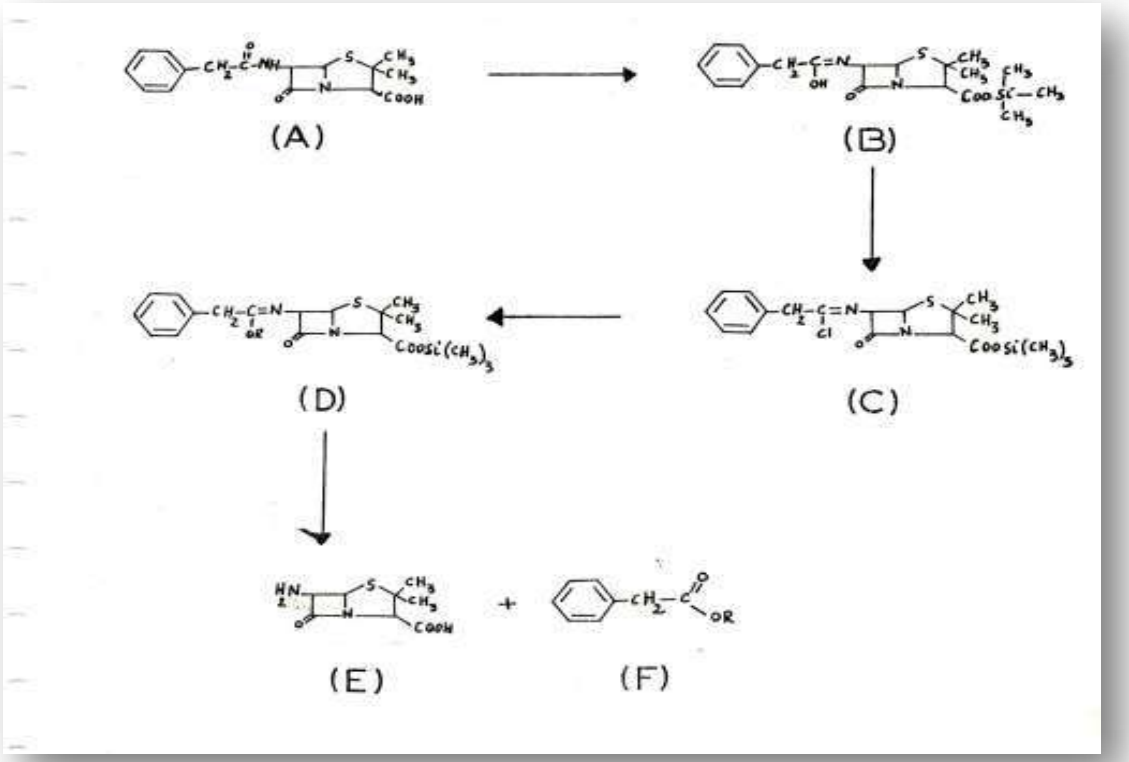


Figure III.3 : production de 6APA par le procédé de CARRINGTON**. [20]**

(A) Benzylpénicilline

(B) Ester silylé (forme énol)

(C) Dérivé imino chloré

(D) Dérivé imino éther

(E) 6 APA

(F) Alkylate de l'ester phenylacétique (résidu)

Inconvénients du procédé chimique :

- ✓ consommation de produits ;
- ✓ Utilisation de réactifs toxique ;
- ✓ Possibilité d'obtention de sous produits indésirables;
- ✓ Faible rendement de production.

III.4.2. Procédé fermentaire de production de 6-APA :

- **Organismes producteur de 6-APA :**

Le 6-APA est un produit naturellement élaboré par des souches productrices de la pénicilline *« pénicillium chrysogenum »* dont la fermentation a été réalisée sans précurseurs.

Elle peut être produite aussi par des souches productrices des céphalosporines *« céphalospoeiumsalmosynémnatum », « énéricellopsis minima »* et par certains dematophytes*« epidermophyton interdigitale »* et *« trichophyton gypseum »,* comme elle peut être produite aussi par *E. coli* à partir de l'enzyme pénicilline acylase **[21]**.

- **Séparation et purification du 6-APA :**

Le 6-APA ne peut être extrait avec des solvants organiques tels que le butanol et l'acétate du butyle, comme les pénicillines se trouvant dans le bouillon de fermentation cependant, sa séparation peut être réalisée par combinaison des opérations suivantes:

Préparation du concentré brut :

Le milieu de culture est corrigé à pH=7.5 et concentré jusqu'à 1/10 du volume initial sous vide à T=25°C ÷ 30°C. Le pH a été ensuite abaissé à pH=3.0 avec H_3PO_4 (50%) jusqu'à l'obtention du précipité inactif, ce précipité est séparé par centrifugation et le reste est extrait par ½ volume de l'acétate de butyle pour séparer les pénicillines. Le pH de la couche aqueuse est porté à 7.5 avec NaOH et on ajoute trois volumes d'acétone, cela provoque la formation d'une phase semi-solide.

La phase supérieur est clarifiée par centrifugation et concentrée jusqu'à 1/20 de volume initial. Les résultats de différentes étapes dans la préparation du concentré brut sont présentés dans le tableau (III.2). Cette préparation est accompagnée avec la perte de 30 à 60% de 6-APA **[21]**.

Tableau III.2 : Préparation du concentré de 6-APA **[21].**

Etape	volume	Unités	Unités /ml	%total Solides	% 6-APA
Filtrat de culture	40	345	13.0	100	100
Concentré du 1/10 de volume	4	3.300	12.5	100	95
Addition d'acide (pH = 3.0)	3.3	3.400	12.0	98	90
Extraction à l'acétate de Butyle	3.3	2.800	11.0	96	81
Précipitation à l'acétone (surnageant)	10.9	865	80.9	11.5	70
Concentré final (évaporation du solvant)	2	4600	72.0	11.5	68

Purification du concentré brut :

Une colonne (2×35 A°) contenant 700 g de la résine diacide est chargée avec 8.01 du concentré brut d'une vitesse de 400 ml /h. La colonne a été lavée avec 2.01 d'eau.

Ce lavage résulte dans la perte de 11.5% du 6-APA total appliquée sur la colonne .La colonne a été éluée avec de l'acide acétique (6%) d'une vitesse de 800 ml/h. Les fractions actives ont été collectées (3.01) et cela ne représente que 47% du 6-APA appliqué sur la colonne. Cette matière est pure à 10% seulement (252 unités/mg).

La purification suivante a été achevée par la chromatographie de colonne sur la cellulose. Les éluas actifs ont été évaporés a sec sous vide pour éliminer l'acide acétique, cette étape provoque la perte de 6-APA de 6 ÷ 30%, ce pourcentage dépend du volume utilisé et du temps mis en jeu.

Le résidu a été distillé dans le mélange de l'acétone-isopropanol-eau (2 :2 :1) un échantillon de 55 ml a été appliqué sur la colonne (2×10 A°) et élué avec le mélange de l'acétone-isopropanol-eau. Les premiers 12 ml ont été éliminés et on a collecté 25 ml contenant 90% de 6-APA total appliquée sur la colonne.

Cette matière (45% pure) possède l'activité de 1250 unités /mg. Les éluas de la colonne de cellulose ont été évaporés à sec et le résidu a été dissout dans l'eau dont la concentration est environ de 100mg/ml. Le pH a été corrigé à 4.3 avec HCl (20%), et le

mélange a été refroidi dans la glace. Les cristaux de 6-APA ont été séparés par la filtration, lavés avec de l'eau et de l'acétone et séchés **[21]**.

Purification de 6-APA par la résine DOWEX 1 :

Comme le 6-APA est un acide fort, on emploie la résine DOWEX 1 qui se montre comme milieu pour l'adsorption sélective du 6-APA. Après l'adsorption il a été élué avec HCl (0.1N).On réalise cette chromatographie à la température ambiante, on atteint le rendement de 70 ÷ 80%, si l'expérience est faite à la température T=10°C, le rendement atteint est de 90 à 95%.

On met 20kg de la résine DOWEX 1 dans une colonne remplie de particules de diamètre 20 A°. Il est recommandé de charger 10.81l. D'une solution concentrée de 6-APA, qui contient 32.5. 10^6 unités d'une pureté de 40.7 unités /ml. Les éluas sont collectés avec une vitesse de 40 ml/mn à la température ambiante. La colonne est lavée avec 2.0 l d'eau. Les éluas et l'eau de lavage contiennent 11.2 % de 6-APA.

La colonne est éluée avec HCl (01 N), les éluas sont collectés et les fractions actives sont combinées à pH ajusté à 7.0 avec NH_4OH (4.0 N). Cette matière neutre est concentrée sous vide jusqu'à un volume de 100 ml. Le 6-APA est cristallisé dans le concentrât par l'addition lente de HCl (20%) jusqu'à pH final de 4.3, les cristaux sont filtrés, lavés avec de l'eau et de l'acétone. Le rendement global est de 69.5%.

Actuellement, la voie fermentaire pour la production du 6-APA est rarement utilisée car elle représente certaines difficultés dans l'étape de séparation et purification et la consommation de réactifs, solvants et résine. Par ailleurs, les rendements obtenus sont limités, ce qui entraine un cout de production élevé **[21]**.

Inconvénients du procédé fermentaire :

- ✓ Difficulté de la séparation du produit ;
- ✓ Cout de purification élevé ;
- ✓ Risque de contamination.

III.4.3.Procédé enzymatique de production de 6-APA :

L'utilisation d'enzymes pour la synthèse de composés chimiques présente certains avantages par rapport à la synthèse chimique : procédé moins polluant **[24],** les taux réactionnels élevés, une fois comparés à ceux des réactions non catalysées (les enzymes sont 10^{10} fois plus rapides) **[25]**. Un exemple de l'utilisation des enzymes pour la synthèse de composés pharmaceutiques est celui de l'acide 6-amino-pénicillanique (6-APA), un intermédiaire dans la production de nombreux antibiotiques. La synthèse chimique nécessite trois étapes mettant en œuvre des réactifs toxiques et demandant des conditions réactionnelles assez drastiques. La bioconversion se fait en une seule étape, dans des conditions réactionnelles douces et sans autre réactif que des enzymes et leurs substrats **[26]**.

Aujourd'hui à partir d'un point de vue industriel, en raison de la résistance bactérienne aux antibiotiques naturels (pénicilline G, pénicilline V,…etc), l'hydrolyse de pénicilline G est très importante car ses produits (acide 6-amino-pénicillanique et l'acide phénylacétique) sont la base pour la production des antibiotiques semi-synthétiques. Le procédé de choix pour la conversion à 6-APA à l'échelle industrielle est l'utilisation de pénicilline acylase **[24]**.

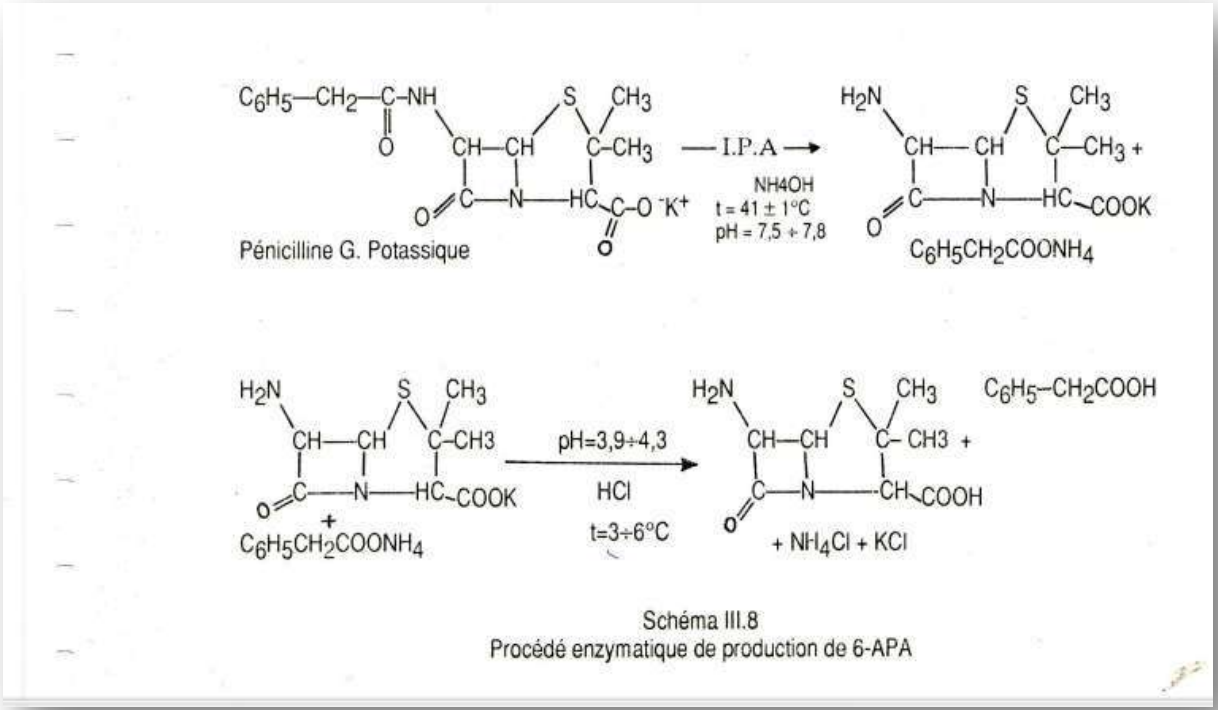


Schéma III.8
Procédé enzymatique de production de 6-APA

Figure III.4 : Procédé enzymatique de production de 6APA **[24].**

L'enzyme clé dans le procédé est la pénicilline acylase (PGA) qui peut être produite par voie fermentaire à l'aide de la souche *E. Coli*, par exemple, génétiquement modifiée. **[21]**

Avantages :

- ✓ Vitesse de réaction plus grande ;
- ✓ Spécificité ; chimio, régio, stéréospécificité élevées;
- ✓ Versatilité des substrats ;
- ✓ Procédé compatible avec l'environnement **[26]**;
- ✓ La synthèse chimique nécessite trois étapes mettant en œuvre des réactifs toxiques et demandant des conditions réactionnelles assez drastiques. La bioconversion se fait en une seule étape, dans des conditions réactionnelles douces (Pression atmosphérique, température, pH) et sans autre réactif que des enzymes et leurs substrats **[24]**.

Inconvénients :

- ✓ Instabilité de l'enzyme sous les conditions extrêmes;
- ✓ Inhibition par le produit de la réaction et par l'excès de substrat;
- ✓ Coût de purification de l'enzyme;

III.5. Importance du 6-APA :

Le squelette commun des bêta-lactamines est le cycle béta-lactame, en associant ce dernier à un cycle thiazolidine, on obtient l'acide 6-amino-pénicillanique, noyau commun des pénicillines.

Les possibilités de production des pénicillines biosynthétiques par une fermentation *« dirigée »* en introduisant différents précurseurs sont en réalité limitées par des souches productrices. Parfois, ces précurseurs se dégradent au cours de la fermentation sans pouvoir être introduit dans la molécule des pénicillines.

La découverte du noyau pénicillanique 6-APA et grâce aux recherches effectuées, un large groupe des pénicillines nommées *« semi-synthétique »* apparût et continu à grandir. En effet plus de 30% des nouveaux antibiotiques brevetés appartiennent à cette famille.

Sur ce noyau, il est possible par synthèse de fixer des molécules nouvelles et d'obtenir par suite des pénicillines synthétiques.

De très nombreux dérivés de l'acide 6-amino-pénicillanique furent fabriqués et expérimentés; on espérait ainsi éviter certains inconvénients d'utilisation de la pénicilline (voie parentérale d'introduction ; nécessité d'injection multiples), d'autres part, renforcer la spécificité de la pénicilline contre certains microbes et les staphylocoques en particulier et enfin diminuer les phénomènes de résistances.

L'espoir, ouvert par cette nouvelle série de recherches, de trouver l'antibiotique *« sur mesure »* réunissant à la fois toutes les propriétés désirées:

- D'avoir un spectre d'activité large;
- D'être résistant aux pénicillinases;
- D'être stable en solution;
- D'être stable en milieu acide et d'avoir un taux d'absorption digestive élevé;
- D'avoir une absorption rapide, mais excrétion lente;
- De ne pas provoquer l'hypersensibilité.

Enfin l'antibiotique réunissant le maximum d'activité et le minimum d'inconvénient. Cet antibiotique n'a pas été confirmé totalement, mais parmi les certaines de pénicillines de synthèse ainsi étudiées quelques-unes seulement ont été retenues après les criblages successives des essais bactériologiques, toxicologiques, cliniques, etc…, et se sont révélées très intéressantes. Les progrès réalisés se montrent surtout utiles dans deux directions :

- Meilleure résistance aux pénicillinases staphylococciques.
- Obtention de pénicillines orales plus valables que la pénicilline V **[21]**.

Un exemple de ces antibiotiques synthétisés à partir de 6-APA est celui de la forme obtenue par acylation de 6-APA.

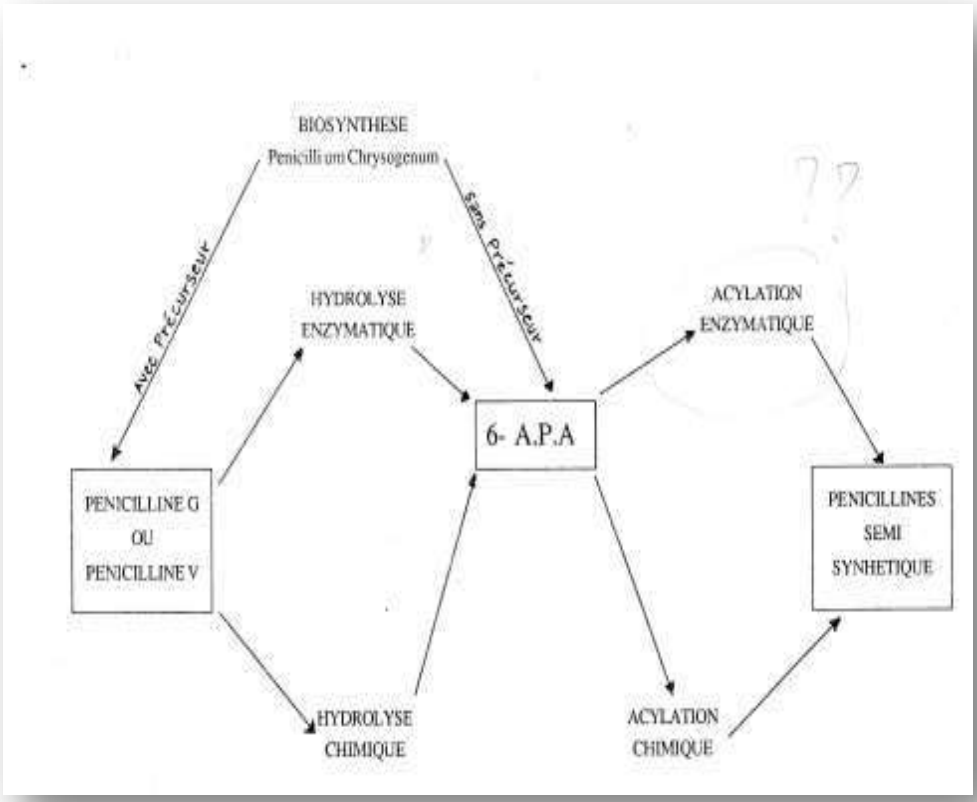


Figure III.5 : Importance de 6APA**. [21]**

III.6. Acylation de l'acide 6-amino-pénicillanique :

L'acylation se réalise avec des anhydrides mixtes, chlorures d'acides ou acides carboxyliques en présence de dicichlohexylcarbodiimide.

En effet l'acide 6-amino-pénicillanique (cycle thiazolidine lié au cycle beta-lactame) est le noyau de base des pénicillines. Il peut être substitué par acylation sur sa fonction aminée pour donner naissance à des dérivés qui se distinguent par la stabilité, la pharmacocinétique, le spectre et la résistance aux béta-lactamases. Par ailleurs, la fonction carboxylique peut être transformée en carboxylate (plus soluble) ou permettre l'obtention d'esters (pro drogues).

Cette fonction acide est toutefois essentielle à l'activité antibactérienne (elle fait partie du pharmacophore) **[27]**.

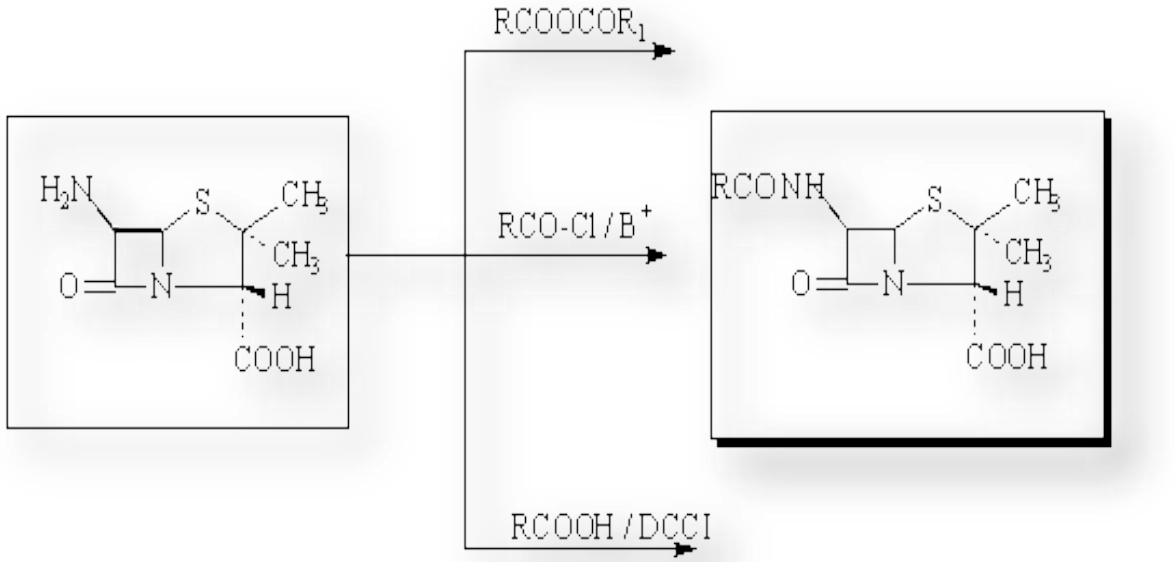


Figure III.6 : Acylation de l'acide 6-amino-pénicillanique **[28]**.

III.7. Synthèse de pénicillines nouvelles:

Le but de ces transformations est de rendre ces antibiotiques plus actifs, d'augmenter leur spectre d'activité et leur stabilité, de réduire leur toxicité ainsi que de diminuer leurs effets secondaires.

Un des problèmes majeur des traitements par les antibiotiques est le développement de la résistance des micro-organismes qui produisent des enzymes capables de dégrader le noyau actif de l'antibiotique. Par exemple, l'introduction de la pénicilline dans les années 40 a été rapidement suivie par l'augmentation de la proportion des *Staphylococcus* aureus résistants à cet antibiotique.

La production de la bêta-lactamase par ces bactéries est passée de 6% en 1946 à 50% en 1950 et à 80-90% à présent. Dans le cas des Pénicillines, deux enzymes sont capables de modifier : bêta-lactamase (pénicillinase) et pénicilline acylase (pénicilline acylase, PA).

Tandis que la bêta-lactamase fonctionne à l'avantage des micro-organismes, dans le développement de la résistance aux antibiotiques, la pénicilline acylase (PA), au contraire, permet le développement de nouveaux antibiotiques, justement pour contrecarrer l'action de la bêta-lactamase et l'acquisition de la résistance. La bêta-lactamase hydrolyse le noyau b-lactame en position 4-7, détruisant ainsi le noyau b-lactame, principe actif de ces antibiotiques. En revanche, la Pénicilline acylase hydrolyse la liaison amide de la chaîne latérale en position 6, laissant le noyau lactame intact.

Le produit de cette réaction, 6-APA (acide 6-amino-pénicillanique), peut être conjugué aux diverses chaînes acyl latérales. Ainsi la première pénicilline synthétique en 1958, la triphényl-méthylpénicilline, a montré une stabilité accrue contre la bêta-lactamase de *staphylococcus* **[29], [30]**.

IV. LA PENICILLINE ACYLASE :

IV.1.Historique :

La pénicilline acylase présente un grand intérêt historique dans le développement de l'enzymologie. Ce fut l'un des premiers enzymes caractérisés en 1950 par Sakaguchi et Murao, la plus part des premières recherches sur la cinétique d'action des enzymes sont effectuées avec la pénicilline acylase de *Escherichia coli*.

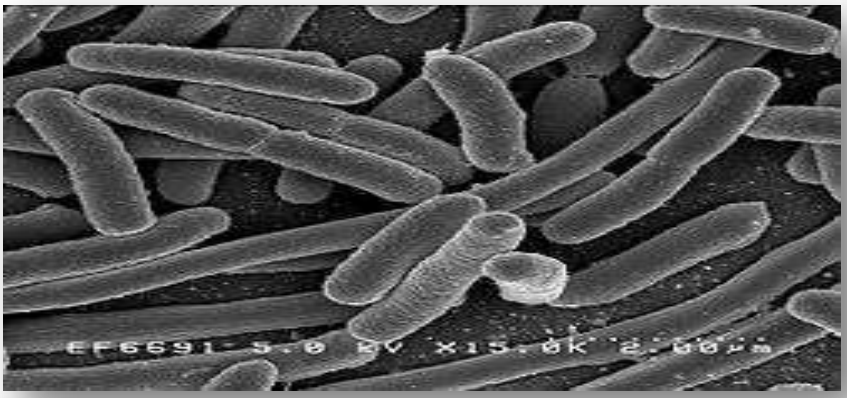


Figure IV.1 : Escherichia coli Grossissement × 15 000**[31].**

La pénicilline G acylase est une enzyme périplasmique produite par l'espèce *Escherichia coli*.Donc il n'est pas indispensable de l'extraire pour qu'elle agisse. Elle hydrolyse la pénicilline G en acide 6-amino-pénicillanique et l'acide phénylacétique **[32]**.

Parmi les grandes enzymes industrielles, la pénicilline G acylase n'occupe plus qu'un rang modeste cependant, son intérêt demeure très grand, à plus d'un titre :

Economiquement : sa présence dans des nombreuses bactéries permet de transformée chaque année environ 9000 tonnes d'acide 6-amino-pénicillanique **[33]**.

Scientifiquement : la pénicilline G acylase reste un modèle d'avenir à cause de sa morphologie et son patrimoine génétique.

IV.2.Nomenclature de la pénicilline acylase :

Cette enzyme a été donné 6 plusieurs noms différents, y compris pénicilline acylase, pénicillineamidase, pénicilline amidohydrolase, pénicilline déacylase, pénicilline acyltransférase et pénamidase.

L'appellation pénicilline acylase est la plus couramment utilisée, dans la nomenclature officielle des enzymes elle a comme (E.C.3.5.1.1.1.) **[34]**.

Les pénicilline acylases (PAC) sont des enzymes microbiennes et se trouvent dans une gamme éventail de bactéries, les actinomycètes, les levures et les champignons **[35]**. Sur la base de leurs spécificités de substrat (préférences des chaînes latérales), ils ont été classés en trois groupes: pénicilline G acylases, la pénicilline V acylases et acylases ampicilline **[35], [36], [37]**.

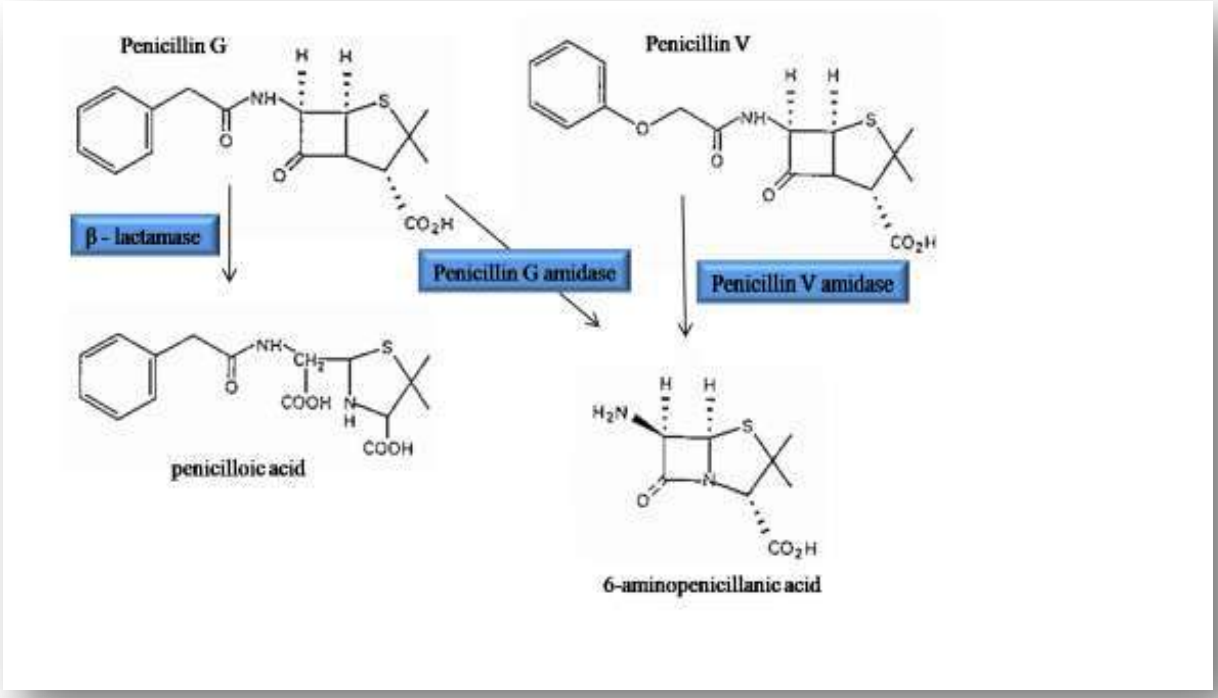


Figure IV.2: Représentation chimique des réactions qui rendent la pénicilline une molécule biologiquement inactive, et des enzymes qui catalysent chaque réaction **[38]**.

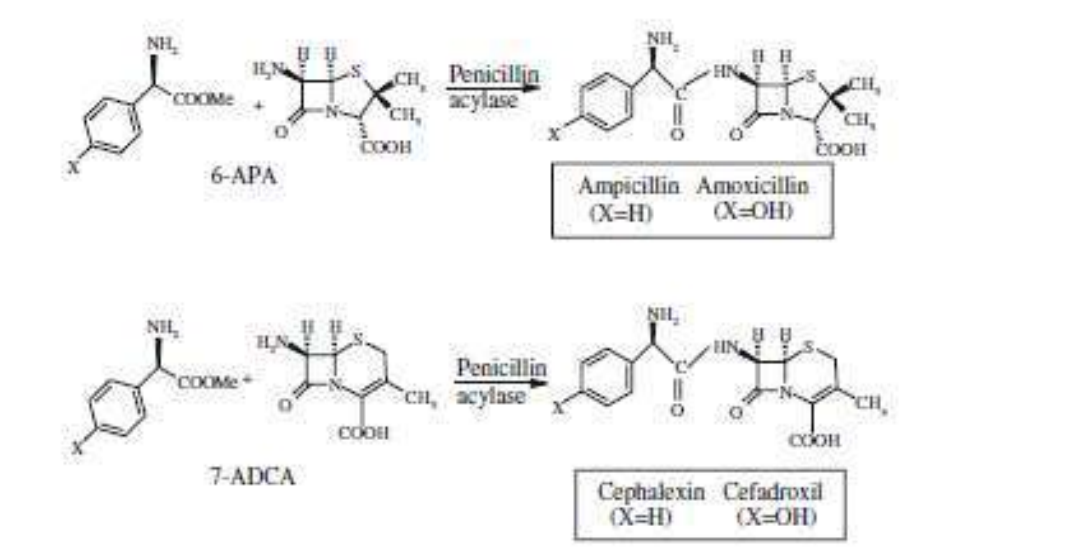


Figure IV.3 : réactions de pénicilline acylase **[39]**.

Les pénicillines G acylases se trouvent plus partiellement dans les bactéries, et les pénicillines V acylases se trouvent dans les champignons, mais cette classification selon le type de microorganismes comporte de nombreuses exceptions.

L'enzyme la plus étudiée du groupe est la pénicilline G acylase. Les deux microorganismes les plus utilisés pour produire la pénicilline G acylase sont des souches de *Bacillus megaterium*et d*'Escherichia coli***[34]**.

IV.3. Structure :

Pénicillines acylase s'appartiennent à une superfamille des enzymes, des hydrolases nucléophiles N-terminaux(NTN-hydrolases), qui sont généralement synthétisés sous forme de protéines précurseur et soumis à un processus post-traductionnelle auto catalytique pour générer la protéine mature avec un centre actif catalytique à l'extrémité N-terminale nouvelle**[32], [40], [41]**.

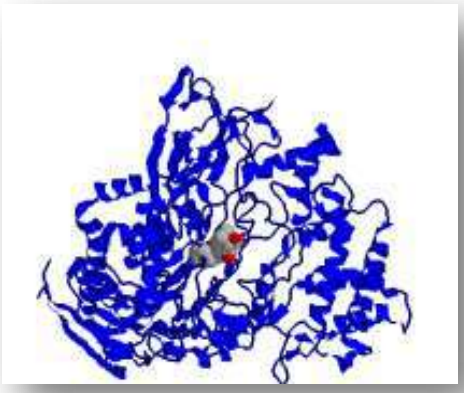


Figure IV.4 : Le complexe pénicilline G acylase avec pénicilline G **[36].**

Cette superfamille des actions des enzymes non seulement un processus de génération semblable, mais aussi une structure similaire tertiaire. Le pli caractéristique de NTN-hydrolases est constitué d'un quatre couches catalytiquement active αββα-noyau qui est constitué de deux antiparallèles ß-feuilles emballées une contre l'autre et recouvert espar une couche de antiparallèle hélices d'un côté (figure IV.9) **[40]**.



Figure IV.5 : Structure du pli NTN caractéristique avec la sérine du site actif s'affiche dans la boule et le bâton.**[36]**

Comme il est décrit pour NTN-hydrolases, spécifiquement, la PGA est synthétisé dans le cytoplasme d'*E. coli* comme un précurseur de chaîne unique. Le précurseur contient une séquence signal de 26 acides aminés et un peptide espaceur composé de 54acidesaminés (figure IV.10.a).

La séquence signal est utilisé pour diriger la translocation de la proenzyme dans le périplasme, tandis que la séquence d'espacement, entre les chaînes A et B, bloque le site actif et est également estimé pour influencer le pliage final de la protéine **[40], [42].**

La séquence signal et le peptide de liaison sont enlevés par l'intermédiaire d'un processus autocatalytique, résultant en la forme mature de l'enzyme dans le périplasme d'*E. coli* **[32], [40]**.

L'enzyme PGA mature actif d'*E. Coli* est un hétéro dimère de 86 kDa, avec des chaînes A (209 acides aminés) et B (557 acides aminés) étroitement liées, et maintenus ensemble par des forces non covalentes (Figure IV.10.b).

La structure cristalline de PGA isolé à partir d'*E. Coli* et cultivées en présence d'éthylène glycol a été déterminé à une résolution de 1,3A°. L'enzyme formant une structure pyramidale avec une dépression centrale située au fond, au fond duquel est le site de connexion. La poche de liaison est bordée par des résidus hydrophobes des sous-unités A et B, définissant sa spécificité pour le groupe phénylacétyle de la pénicilline G.

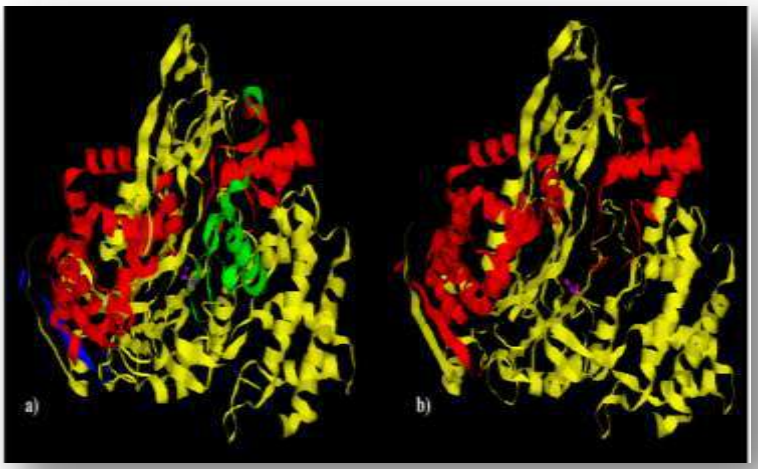


Figure IV.6 : a) La structure secondaire de PGA **[40], [43]**. La séquence signal est représentée en bleu, de vert séquence de liaison (bloquant le site actif), et les séquences d'acides aminés qui forment les chaînes A et B après transformation sont affichés (rouge et jaune, respectivement). **b)** Structure de la maturité PGA montrant des unités secondaires structurales par la chaîne (rouge = la chaîne A, jaune = la chaîne B) **[36], [44]**. Le résidu du site actif, Ser1 : B, est montré en magenta dans les deux structures.

IV.4. Mécanisme de catalyse par la pénicilline G acylase:

La bioconversion est réalisée par l'enzyme. L'intérêt de la bioconversion réside dans le fait que les transformations catalysées s'effectuent dans des conditions expérimentales (pH et températures) et que les molécules sont modifiée de façon spécifique et sa réaction secondaire.**[45]**

La liaison amide de la pénicilline G (substrat préféré de la PGA) qui située entre la bague péname et la chaîne latérale est le site de clivage parla PGA **[36]**, le site actif de la PGA est une poche profonde lie principalement de résidus d'acides aminés aromatiques et des chaînes latérales hydrophobes impliquées dans la liaison au substrat (Figure 4) **[32], (46]**.

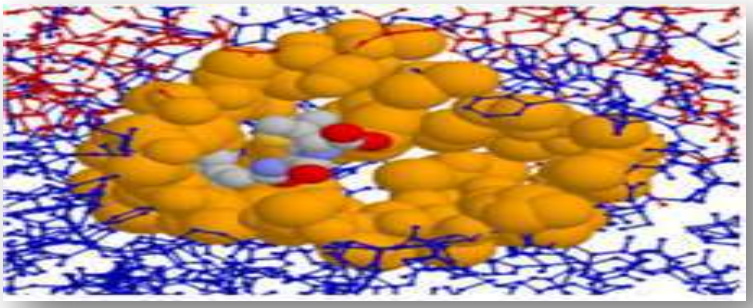


Figure IV.7 : Structure de la PGA avec de la pénicilline G dans la poche hydrophobe de liaison (orange) **[36]**.

Les résidus hydrophobes qui forment le site du groupe acyle obligatoire dans la PGA sont les principaux contributeurs à la reconnaissance du substrat et contraignant, ce qui entraîne dans sa spécificité pour la pénicilline G **[36], [47]**.

L'hydrolyse enzymatique de la pénicilline G nous donne l'acide phénylacétique et l'acide 6-amino-pénicillanique dont le dernier est un intermédiaire pour la production des bêta-lactamines semi-synthétique, la réaction d'hydrolyse est exprimer dans la figure (IV.12) **[32]**.

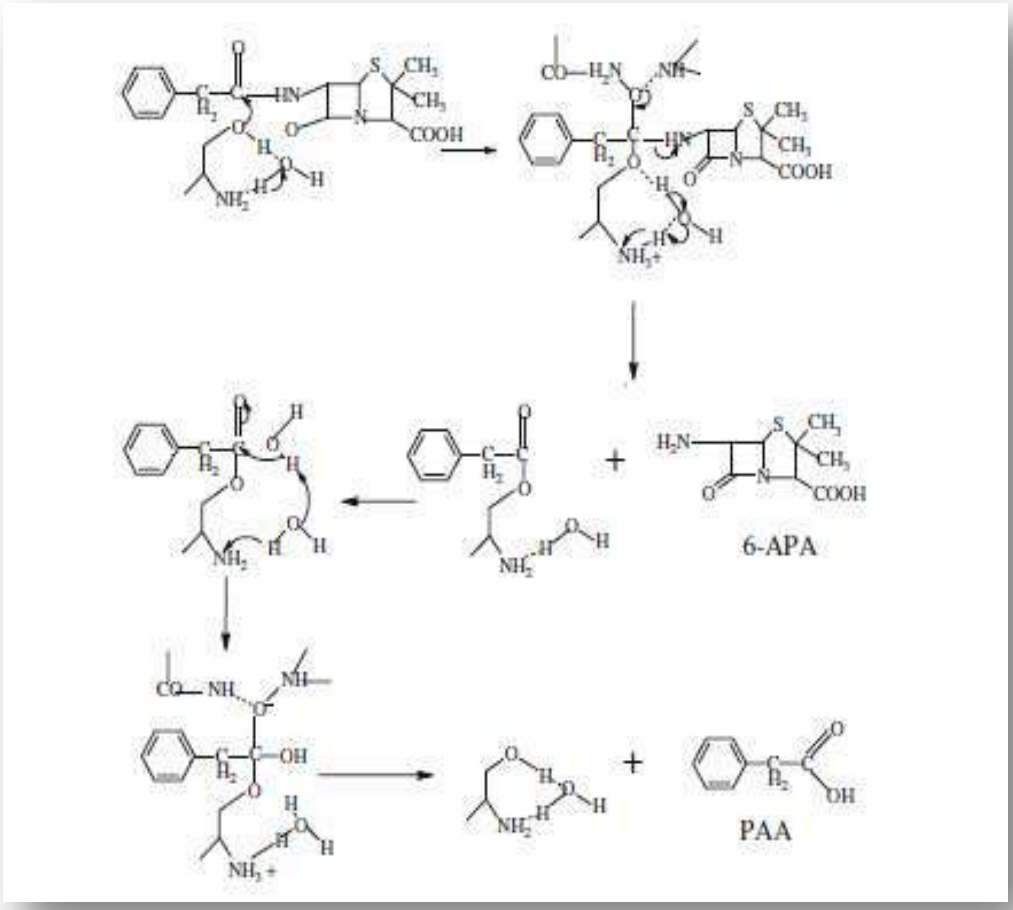


Figure IV.8:Mécanisme proposé de la pénicilline acylase catalysant l'hydrolyse de pénicilline G **[42]**.

IV.5. Caractéristiques technologiques du processus d'hydrolyse de la pénicilline G :

L'hydrolyse de Pénicilline G au 6-APA produit à un pH légèrement alcalin (pH= 8 ÷ 7.8), à la température 40 C° sous l'action de l'enzyme pénicilline G acylase, tandis que le produit de réaction inverse à pH acide. Il s'ensuit donc que la réaction globale est déterminée par le pH et les concentrations relatives de substrat et de produit.

Kheirolomoom et al. (2001) ont démontré que l'enzyme est inhibée par excès de substrat et la présence de deux produits, 6-APA et de PAA.

Inhibition non compétitive par 6-APA et l'inhibition compétitive par PAA ont été observés pour la réaction ordonné dans le sens direct. Dans le sens inverse, Pen G agit comme un inhibiteur de type mixte à l'égard de 6-APA à des concentrations insaturées de PAA.

Cette inhibition peut être surmontée avec des quantités saturantes de PAA. En outre, Pen G est un inhibiteur compétitif par rapport à la PAA à toutes les concentrations de 6-APA.

Une fois l'hydrolyse est atteint, Le produit est précipité on ajustant le pH du mélange de la réaction sur le point isoelectrique (pH = 4.2) en présence d'un dissolvant organique miscible avec de l'eau; le précipité est rassemblé par filtration, lavé, et finalement séché sous vide.

La pureté du 6-APA résultant est habituellement plus haute que 96-98%, et le rendement global est entre 85 et 90% **[48]**.

V. PRODUCTION DE LA PENICILMLINE G ACYLASE PAR FERMENTATION :

V.1. La fermentation industrielle-Généralités :

La fermentation désigne l'opération unitaire qui permet de produire de la biomasse ou des produits de bioconversion par la culture de micro-organismes **[49]**.

Les performances d'une culture en vue de la production industrielle d'enzyme tiennent dans la capacité d'atteindre les 3 objectifs majeurs (capacité technologique) :

- Obtenir une croissance efficace aboutit à une quantité importante de biomasse dans un état physiologique compatible avec la production.
- Maintenir pendant une période « la plus longue possible » la biomasse dans des conditions de production optimales.
- Faire en sorte que ces phases de croissance, de production, ainsi que les étapes d'extraction et de purification soient les moins coûteuses possibles **[50]**.

V.1.1. Choix de la souche :

Les impératifs qui guideront le choix de la souche sont les suivants :

- La croissance rapide ;
- La résistance aux contaminants ;
- La culture facile ;
- Un pouvoir fermentaire élevé ;
- Fourniture facile de l'enzyme nécessaire à la transformation recherchée ;
- la conservation des caractères biochimiques, sans risque de variation génétique **[51]**.

V.1.2. Préparation de l'inoculum :

L'inoculum est l'ensemble de la biomasse nécessaire pour ensemencer un fermenteur de production de grande capacité. Sa préparation est basée sur la mise en culture de souches génétiquement modifiées, il convient donc de bien conserver les souches et de bien les propager.

V.1. 3. Conservation des souches :

De nombreux organismes producteurs d'enzymes sont généralement très instables par exemple Les techniques utilisées doivent permettre des conservations stables à longue terme, sans multiplication cellulaire **[52]**.

➢ *Conservation des cellules végétatives :*

Les procédés de lyophilisation à -70°c à -196°C permettent de conserver des échantillons dont la durée de vie peut excéder plusieurs années. Les techniques impliquant d'importants refroidissements ou un vide poussé induisent une forte mortalité. Pour limiter ces effets, l'utilisation de cryoprotecteurs tel que le lait écrémé, le glycérol ou le diméthylsulfoxy d'est recommandée.

Pratiquement, il faut partir d'une culture en milieu liquide en phase exponentielle de croissance, y ajouter une solution stérile du cryoprotecteurs (10 à 20% en volume). La suspension homogénéisée est répartie dans des récipients identiques utilisés pour la congélation ou la lyophilisation **[52]**.

➢ *Conservation sous forme de spores :*

La plupart des souches utilisées peuvent sporulées sur milieu solide adéquat. Les spores et le mycélium peuvent être décrochés de la gélose par une solution stérile d'eau physiologique. La suspension est filtrée sur coton cardé pour éliminer le mycélium, additionnées de cryoprotecteurs, puis répartie dans plusieurs flacons et traitée de la même façon que les cellules végétatives**[52]**.

V.1.4. Propagation :

La propagation consiste en une série de cultures appelée « pré culture » dans des milieux de volume croissant. Outre, l'objectif de croissance rapide et la production de biomasse importante, un des buts de la propagation est d'amener les cellules dans un état physiologique propice à une bonne production d'enzyme pendant ces phases. Pour ce placement physiologique, on effectue une succession de pré cultures ayant lieu dans des milieux différents, convergeant progressivement vers la composition de milieu de production **[52]**.

V.2. Données sur la fermentation et la production:

V.2.1. Composition et préparation du milieu :

Le milieu de production doit d'abord permettre d'assurer une importante croissance pour conduire à une concentration élevée en cellule au moment de la production.

Il doit assurer ensuite la maintenance de la vitalité des cellules et la production optimisée de l'enzyme. Il doit de ce fait fournir des sources d'énergie et assurer les conditions physico-chimiques désirées (pH, T°, oxygénation).

Les milieux doivent permettre de fournir sans limitation les précurseurs nécessaires à la production des enzymes tout en évitant ces phénomènes de répression et/ou d'inhibition.

Les oses, les polyholosides, les acides gras, les triglycérides et les protides fournissent les sources de carbone et d'énergie.

En mode semi-continu, généralement l'azote pour la production sera apporté sous forme de sources complexes ;

La formulation d'un milieu de culture optimal pour la production n'est pas simple, en s'appuyant sur des critères physiologiques et économiques la formulation d'un milieu de production fera appel à une procédure d'optimisation mettant en œuvre une planification expérimentale. La stérilité des milieux de pré culture et de production est un impératif absolu dans ce type de fermentation **[52]**.

V.2.2. Les facteurs influençant sur la production des enzymes :

Les milieux doivent permettre de fournir sans limitation les précurseurs nécessaires à la production des enzymes tout en évitant ces phénomènes de répression et/ou d'inhibition.

- **Régulation catabolique par la source carbonée :**

  Pour la plupart des microorganismes producteurs d'enzymes, une source de carbone rapidement assimilable tel que le glucose exerce une action négative sur la biosynthèse de ceux-ci. Par contre des sources d'énergie lentement catabolisable tels que l'amidon, les dextrines…..etc.

- **Régulation par la source azotée :**

Les fortes concentrations des milieux en ammonium ou en composées azotées rapidement métabolisées suppriment la production de nombreux enzymes. Les ions ammonium imposent un taux de croissance élevé réprimant les gènes de production de

nombreuses enzymes impliquées dans la dégradation des acides aminés, inhibent certaines de leurs activités. Lors des phases de production, les ions ammonium doivent être à concentration limitant ou remplacés par des sources d'azote lentement métabolisées comme le tryptone.

- **Les oligoéléments :**

Toutes une série d'éléments traces, cofacteurs de la croissance des organismes sont nécessaires à des concentrations très faibles (environ 10-7) (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo). Certains jouent un rôle important, quantitativement et qualitativement, dans la production des enzymes **[53]**.

V.3. Modes de conduite de la fermentation:

La fermentation peut être assurée selon trois modes:

- **Fermentation en discontinu:**

Est appelée aussi **«batch»** consiste à cultiver les microorganismes dans une cuve «milieu fermé non renouvelé» pour les récolter ou extraire les produits formés après une «période de temps déterminée».

- **Fermentation «Fed-batch»:**

C'est un processus où le fermenteur est alimenté par des ajouts successifs de milieu ou de substrat ceci permet d'éviter les problèmes d'inhibition liées par exemple à la toxicité d'un substrat.

La culture en « Fed-Batch » est utilisée dans l'industrie lorsque l'on veut optimiser l'apport d'un nutriment susceptible d'avoir un effet rédacteur sur la croissance.

- **Fermentation en continu :**

Elle est caractérisée par un apport continu du milieu nutritif et un soutirage d'une quantité égale du milieu réactionnel, c'est-à-dire le milieu nutritif est introduit avec un débit D dans le fermenteur de volume V, tandis que le fluide soutiré est évacué avec le mémé débit D.

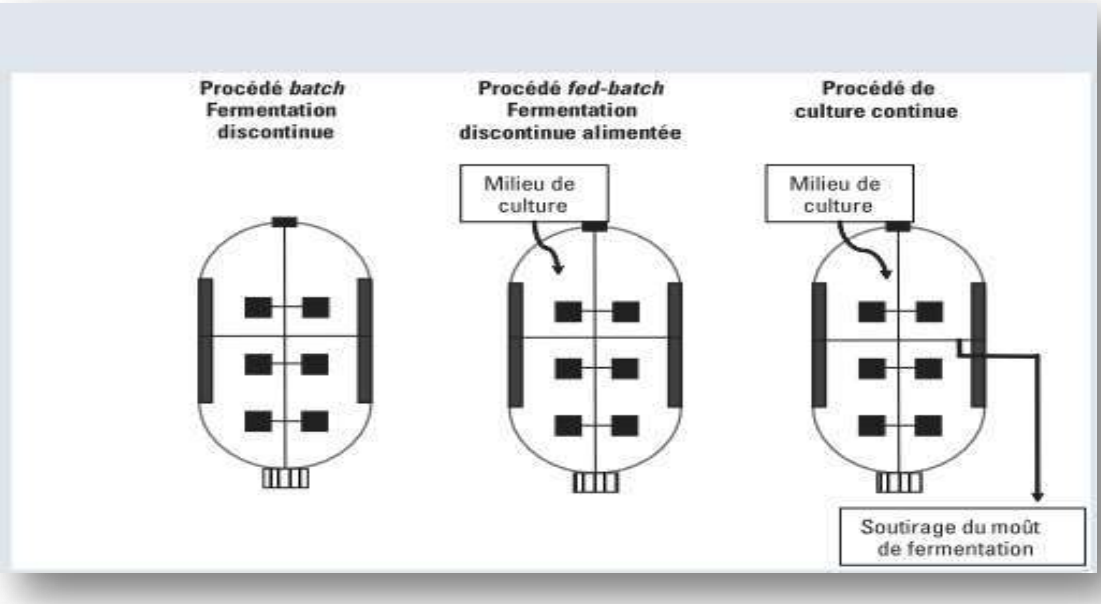


Figure V.1 : Les trois modes de fermentation **[49].**

V.4. Optimisation de la fermentation :

Traditionnellement, les fermentations industrielles sont conduites en maintenant les variables d'action constantes.

Leurs valeurs sont souvent déterminées à partir de critères biologiques en visant la meilleure productivité (concentration la plus élevée possible en fin de fermentation obtenue la plus rapidement possible) au moindre risque de contamination par exemple.

Il est évidemment envisageable de les faire varier dans le temps, dans le but d'améliorer les résultats. C'est ce que permet la mise en œuvre des techniques d'optimisation **[53]**.

Une fermentation comme toute opération industrielle, est soumise à la notion d'indice de performance dans lequel entrent en particulier le temps d'opération, la production, la consommation d'énergie, de matière première, le rendement **[54]**.

D'où la notion de critères selon lesquels l'optimisation doit être faite et qui sont de trois sortes:

- Maximisation des concentrations des produits de fermentation que l'on cherche à obtenir (biomasse microbienne, métabolites);
- Minimisation du temps de fermentation;
- Minimisation des coûts d'opération.

Les deux premières critères impliquent la définition des conditions conduisant aux meilleurs profils des courbes de croissance et de production **[55]**.

Il est possible d'agir sur les différents paramètres opératoires biochimiques et physiques pour optimiser la mise en œuvre de la fermentation et atteindre les meilleures rendement de conversion tels que:

- Les concentrations des nutriments : surtout le carbone et l'azote;
- Les profils d'alimentation ;
- La température ;
- Le pH ;
- L'agitation et l'aération ;
- Les temps de réaction **[54]**.

V.5.Production d'enzyme par fermentation :

Traditionnellement, les enzymes microbiennes étaient produites par culture en surface, en couche mince sur milieu liquide ou milieu semi –solide, cette technique est encore utilisée pour certaines productions (enzyme d'origine fongique).

Mais cette technique présente des difficultés au niveau de contrôle de température d'aération et d'humidité. C'est pourquoi les cultures submergées sont maintenant préférées aux cultures de surface.

Les cultures en milieu liquide agité sont mieux adaptées au différent contrôle par des méthodes modernes et réduisent les risques de contamination. De plus elles se prêtent mieux aux opérations d'extrapolation et d'optimisation pour ce passage de fermenteur pilote de laboratoire au fermenteur industriel **[56]**.

V.6. Extraction et purification :

Après la fermentation les enzymes doivent être séparées des cultures et de milieu par les opérations simples telle que ; Centrifugation, filtration, précipitation.

En cas des enzymes intracellulaire l'extraction consiste en la libération des enzymes des cellules ou constituants cellulaires nécessitent un éclatement de la paroi ou de la membrane cellulaire par des procédés mécaniques, physiques ou chimiques, puis ces enzymes sont purifiées comme les enzymes exocellulaire **[56].**

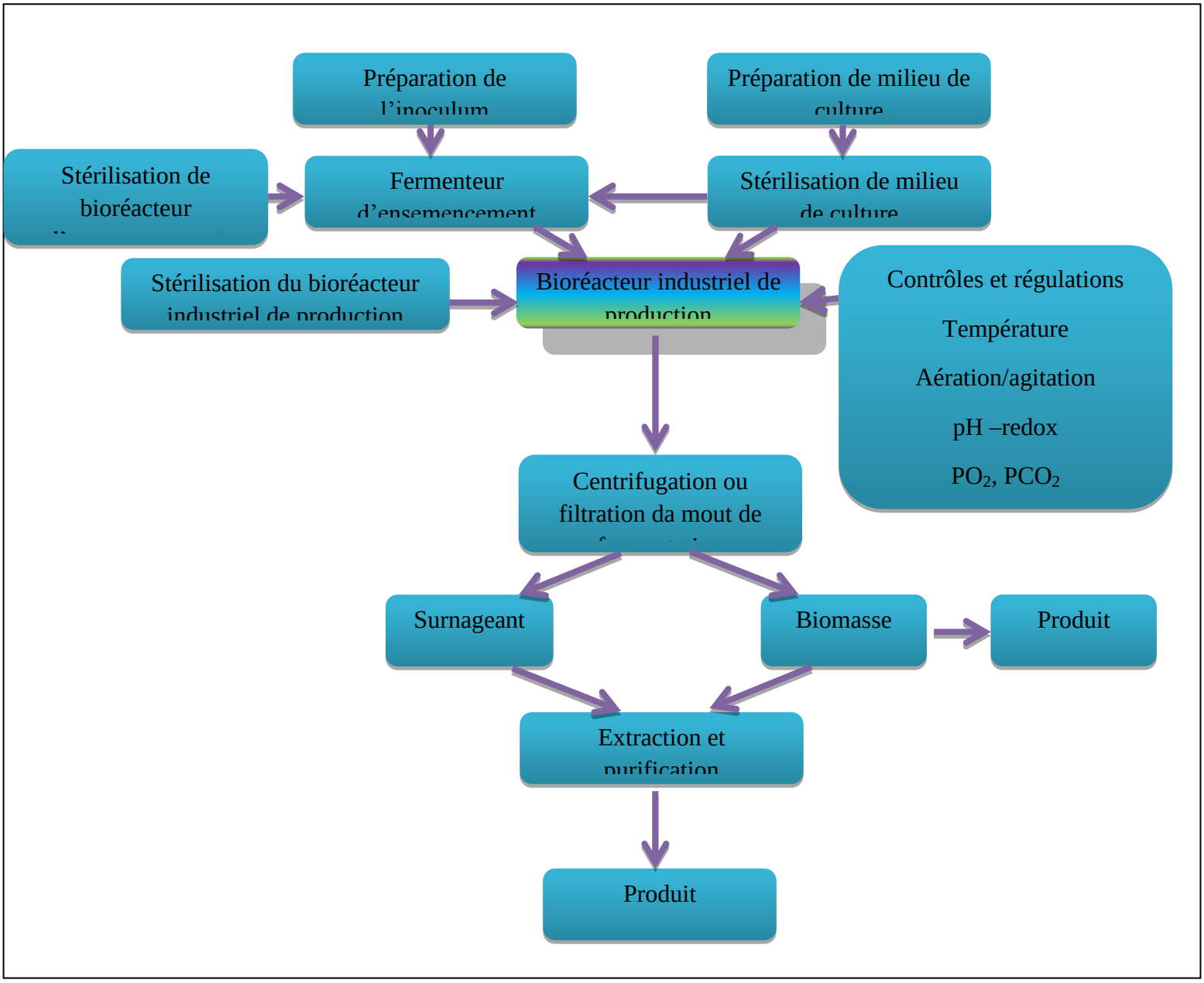


Figure V.2: Les étapes du procédé de fermentation **[49].**

V.7.Optimisation des milieux de fermentation pour la production de la pénicilline G acylase (PGA):

Souvent, les microorganismes peuvent s'adapter à une variété de milieux de fermentation. Cependant, plusieurs nutriments essentiels ainsi de carbone approprié et des sources d'azote sont nécessaires pour une réaction de fermentation **[57]**.

Une variété de constituants a été optimisée pour les médias de production PGA avec différents micro-organismes. Une analyse complète de l'optimisation des médias de fermentation a été résumée dans le tableau (IV.2), et ceux optimisé spécifiquement pour la production de la PGA sont indiqués **[58]**.

La pénicilline G acylase produite par *Escherichia coli* (21709 CIP 54.7) est une enzyme extracellulaire.

La pénicilline acylase est produite dans un milieu de culture constitué d'un mélange de :

- Source de carbone (glycérol) ;
- L'azote apporté sous forme de tryptone ;
- Les sels minéraux essentiels (potassium, magnésium, Chlorure de sodium);

Les conditions de fermentations sont choisies pour éviter la fermentation alcoolique :

- Bonne aération ;
- Le pH est réglé de 7.2 à 7.5 par l'hydroxyde de sodium.
- La température se situe entre 30°C et 37°C.

Tableau V.2 : Optimisation des milieux de fermentation et de paramètres liés à la production modulée de la pénicilline G acylase:

Organismes	Optimisation / optimale des paramètres	Activité de PGA	Références
Souche mutante de la bactérie *E. coli* EP1 (PGL-5)	Sources de carbones : glucose, glycérol et PAA	Cellule concentration de 162 g de poids humide / L (2,4 fois plus élevé que celui de l'opération initiale), et une activité spécifique de 37 PGA (UI / g de poids humide).	**[59]**
***B. megaterium* ATCC 14945**	Les sources de carbone et d'azote	Maximum PGA activité-138 UI / L en utilisant l'hydrolysat de caséine complété avec 0,6 de alcalase et le fromage de lactosérum.	**[60]**
B. megaterium ATCC 14945	Phase de germination de l'inoculum et taille de l'inoculum	Concentration-1.5 Spore × 10^7spores/mL et la germination pendant 24 h et 72 h ont montré PGA maximum d'activité.	**[61]**
***Bacillus sp*. Isoler**	Niveau 2-conception fractionnaire avec sept composants	L'optimisation à moyen 2-étape a entraîné en 2 fois augmentation de l'activité de la PGA.	**[62]**
***Bacillus sp*.**	Le saccharose, le PAA et tryptone	L'activité de PGA était de 2 fois supérieure à la production en milieu de base.	**[63]**
***K. citrophila* pénicilline G acyalse expression dans E. coli**	Milieu TB (tryptone, extrait de levure et de glycérol), complété avec de l'IPTG (isopropylthio-bêta-D-galactoside)	2,4 Fois augmentation de l'activité de la PGA.	**[64]**
***B. megaterium* ATCC 14945**	Solution de vitamine	7 fois amélioration de l'activité de la PGA. $Ca2^+$ (2,5 mM) ont augmenté de 2,6 fois l'activité spécifique de la PGA, échange de peptide signal naturel a augmenté de 1,7 fois l'activité à la place de A. Lip lipase extracellulaire	**[65]**
***B. megaterium* ATCC 14945**	Fed-batch utilisant la culture des acides aminés libres et des médias de lactosérum de fromage complétées	L'activité maximale de PGA 220 UI / mL, la concentration de la biomasse, 5,5 g / L en utilisant, lors de la culture fed-batch. Dans la culture du lot, l'activité PGA 160 UI / ml avec une concentration de la biomasse (4,5 g / L).	**[66]**
***B. subtillus* WB 600 (pMA5)**	La production PGA sous lot et culture fed-batch utilisant de l'amidon comme source de carbone	De 5 fois l'augmentation de l'activité PGA (1960 UI / mL) a été trouvé sur l'alimentation de l'amidon hydrolysé et tryptone dans les médias avec un taux de productivité - 19,6 U / L / h.	**[67]**

V.8. Extraction et purification de la pénicilline G acylase:

V.8.1. Séparation de la biomasse :

Le moût de fermentation est traité pour séparer les cellules, le plus généralement par centrifugation.

V.8.2. Précipitation de l'enzyme pénicilline G acylase :

- ✓ **Par les sels (Sulfate d'ammonium):**

Il existe plusieurs manières différentes d'employer le sulfate d'ammonium. Nous pouvons citer :

- ❖ L'utilisation des concentrations croissante en sel : addition fractionnées de cristaux de sel séparées par des périodes d'équilibrage ;
- ❖ L'emploie d'une solution saturée de sel. Son inconvénient réside dans la dilution importante de la préparation.
- ❖ Par dialyse : l'enzyme est dans le sac et le sel placé à l'extérieur. Cette méthode est lente.

- ✓ **Par les solvants organiques :**

Les alcools sont utilisés pour précipiter les acides nucléiques, les polysaccharides et les protéines. Les solvants organiques dans une large mesure précipitent les macromolécules en modifiant leur hydratation. Ils diminuent aussi l'activité de l'eau ce qui provoque une baisse de la solvatation des macromolécules chargées.

L'acétone, l'éthanol, le méthanol, le butanol sont miscibles à l'eau, mais occasionnent une élévation de la température de milieu. Ils ont tous tendance à dénaturer les protéines, particulièrement lorsqu'ils sont utilisés au-dessus de 0°C **[68]**.

V.8.3.Purification de la pénicilline G acylase :

Afin de développer un processus de production efficace et économique de semi-synthétiques bêta-lactamines, purification de grandes quantités de PGA à faible coût est souhaitée.

La purification s'effectuée par une adsorption sélective à l'aide d'une chromatographie d'affinité, cette dernière exploite les propriétés des interactions afin de séparer et purifier les biomolécules. Elle permet la séparation d'une biomolécule à partir d'un milieu complexe. Dans ce cas cette dernière doit se lier réversiblement à un ligand spécifique

attaché sur une matrice insoluble. Seul l'analyte doit se lier au ligand. Les autres molécules contaminantes sont éliminées **[69]**.

Introduction :

La pénicilline acylase (EC 3.5.1.11) est une enzyme produite par la souche *Escherichia coli* ATCC (21709 CIP 54.7).L'enzyme pénicilline acylase produite par cette dernière est une enzyme extracellulaire. Bien que son rôle métabolique ne soit pas complètement élucidé, elle est largement utilisée pour la production de l'acide 6-amino-pénicillanique (6-APA) en raison de sa capacité à catalyser l'hydrolyse de la pénicilline G.

On s'intéresse à la production de pénicilline acylase par fermentation en batch agité en utilisant la souche *E.coli* ATCC (21709 CIP 54.7), La partie expérimentale est réalisée en trois grandes parties **:**

Partie 1: Revification de la souche *E .coli* ATCC (21709 CIP 54.7) à partir de sa forme lyophilisée commerciale;

Partie 2: La production de l'enzyme pénicilline acylase par fermentation en batch agités. L'étude est menée en deux étapes:

- La mise en évidence de la production de l'enzyme pénicilline acylase ;
- L'optimisation de la production de l'enzyme pénicilline acylase.

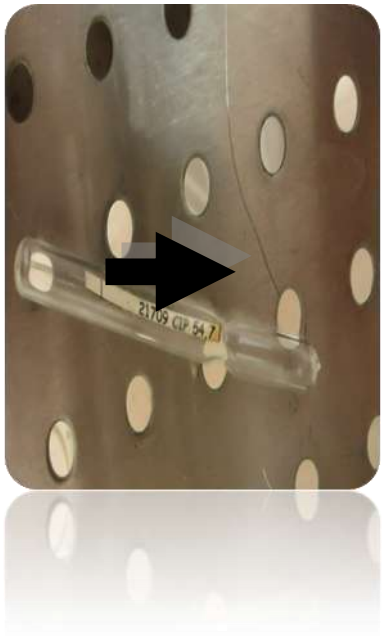
Partie 3 : La séparation et la purification de l'enzyme avec un test d'application pour la production de 6-APA par hydrolyse de la pénicilline G.

Il est à noter que toutes les analyses ont été réalisées au niveau du Département de fermentation- Filiale Antibiotical Saidal Medea.

VI.1.MATERIELS ET PRODUITS UTILISES :

VI.1.1.Matériel biologique :

La souche utilisée est *Escherichia coli* ATCC (21709 CIP 54.7) obtenue de l'institut Pasteur de Paris.



Souche *E.coli* dans l'ampoule

Figure VI.1 : La souche *E.coli* ATCC (21709 CIP 54.7) sous forme lyophilisée **[70]**.

VI.1.2. Réactifs utilisés:

Substrat: pénicilline G potassique.

Les solvants :

Ethanol ;

Acétone ;

Solution de tampon phosphate (0.2M) de pH 8:

Préparée par l'acide KH_2PO_4 et sa base conjuguée K_2HPO_4 pour pH 8;

Préparation [71]:

- Dissoudre 13.6g de phosphate monobasique (KH_2PO4) dans une fiole gaugé de 500 ml et compléter avec de l'eau distillé jusqu'au trait de jauge ;
- Laisser sous agitation jusqu'à la dissolution complète du solide ;
- Transférer de cette dernier 25 ml dans une fiole jaugé de 1 l ;
- Ajouter 145.5 ml de NaOH (0.2N) ;
- Ajouter 500 ml d'eau distillé ;
- Corriger le pH à 8 avec NaOH (0.1N) ;
- Compléter le volume avec de l'eau distillé jusqu'à le trait.

Solution de soude (NaOH) (0.2 M):

Préparation [71] :

- Dissoudre 4 g de NaOH dans 250ml d'eau distillé ;
- Complété le volume jusqu'à 500 ml dans un ballon volumétrique

Rouge de phénol :

Préparation [71]:

- Dissoudre 0,1 g de Rouge de Phénol dans 100 ml d'eau distillée

- Blue de Bromothymol ;

- HCl (0.2 M) ;

VI.2. METHODES:

VI.2.1. Revification de la souche *E. coli* ATCC (21709 CIP 54.7):

La souche *E .coli* ATCC (21709 CIP 54.7) utilisée dans ce travail est une souche de référence de l'institut Pasteur de Paris, modifiée génétiquement pour produire l'enzyme pénicilline acylase. La revification de cette dernière est effectuée sur le milieu gélosé Trypto Caséine Soja Agar (TSA).

Le milieu TSA se compose de :

Trypto Caséine soja Agar ……40 mg

Eau distillé …….. 1000 ml

pH= 7.3

Le milieu préparé est conditionné dans des tubes à essais à raison de 9 ml par tube, ensuite autoclavé à 121°C pendant 15 min. On laisse après les tubes refroidis à l'état incliné **[72].**

Le bouillon utilisé pour dissoudre la souche lyophilisée, est le bouillon de soja.

Le bouillon de soja se compose de:

Soja…….30 mg

Eau distillée ……1000 ml

pH= 7.3

Le bouillon préparé est conditionné dans des tubes à essais, ensuite autoclavé à 121 °C pendant 15 min. Le bouillon soja devient utilisable juste après le refroidissement pour éviter de détruire les micro-organismes par la température **[72].**

Mode opératoire [72]:

L'ouverture de l'ampoule est effectuée selon le protocole mentionné sur la notice de traitement de la souche, la manipulation est réalisée dans un locale stérile sous une hotte à flux laminaire horizontale avec un taux d'air renouvelable stérile :

- Dissoudre la souche lyophilisée par 0.2 ml de bouillon de soja ;
- Après refroidissement et, à partir d'un tube à essai des stries sont effectuées à la surface du milieu gélose à l'aide d'une pipette pasteur stérile trempée dans l'ampoule contient la souche dissoute ;
- Le tube ensemencé, est porté à l'incubation à 30 °C pendant 24h ;
- Après, incubation, on observe une couche brillanté, bien développée à la surface du milieu solide, ensuite conservation. La souche *Escherichia coli*, est conservée dans un réfrigérateur à 4°C sur milieu gélosé.



Figure VI.2 : Développement de la souche *E.coli* sur la gélose inclinée.

VI.2.2.Mise en évidence de la production de l'enzyme pénicilline acylase par la souche *E .coli* ATCC (21709 CIP 54.7):

A partir de cette souche pure, une série de repiquages sur milieu enrichi ou sur gélose inclinée est effectuée chaque 15 jour, pour le rajeunissement des cellules de *E .coli*. Ce qui permet d'utiliser la souche pour une longue durée.

La souche *E.coli* ATCC (21709 CIP 54.7) est une souche inconnue concernant les conditions de la production de pénicilline acylase, donc elle nécessite de réaliser plusieurs fermentation à partir de différents milieux de culture pour choisir les conditions favorables pour la production de pénicilline acylase par cette dernière.

VI.2.3. Essais de fermentation en Batch agités:

A) Choix du milieu de production:

Plusieurs milieux qui sont sélectionnés pour produire la pénicilline acylase par la souche *E.coli* dans des conditions appropriées. Parmi lesquels on a choisit les milieux suivants:

Composition des milieux de production en g/l de l'eau distillée:

Milieu 1 (LB) [73] :

Extrait de levure……05

Tryptone……10

NaCl……...10

Milieu 2[74] :

Peptone ……. 20

Extrait de levure …….05

$MgSO_4$……0.2

KH_2PO_4……. .03

K_2HPO_4……...07

Acide phénylacétique……..….01

Milieu 3[75] :

Corn Steep Liquor ……12.5

Sulfate d'ammonium ……..10

Glucose ……03

Milieu 4:

Corn Steep Liquor……1.5

Tryptone ……..10

Extrait de levure ……..….07

NaCl…….10

Acide phénylacétique……...0.5

B) Conditions de culture:

***Quantité de milieu de culture utilisé* :** Pour éviter des pertes éventuelles du milieu de culture par formation de mousse dans l'erlenmeyer, les essais de fermentation ont été menés sur un volume utile de 250 ml.

***Choix de la température d'incubation*:** La température de culture est fixée à 30°C.

***Choix du pH* :** Pour nos études de production, nous avons fixé la valeur de pH à 7.5.

***Aération* :** L'oxygène est nécessaire au développement de *E .coli* ATCC (21709 CIP 54.7). Pour éviter les risques de contaminations par l'air, celle-ci est filtrée à travers du coton avant de pénétrer dans l'erlenmeyer.

***Agitation*:** le but de l'agitation est de favoriser l'oxygénation du milieu en dispersant l'air en très fines bulles et en augmentant aussi la surface d'échange entre les cellules et le milieu nutritif, l'agitation est fixée à 200 rpm **[73], [74], [75]**.

C) Choix de protocole de travail:

Les essais qui sont effectuées durant notre travail pour atteindre la production de la pénicilline acylase sont les suivantes:

Protocole 1:

Le protocole 1 nécessite de passer par les étapes suivantes:

1. Préparation de l'inoculum :

Les souches entretenues sur la gélose inclinée doivent subir la veille de la fermentation, une réactivation sur milieu Luria Birtani (LB).

Mode opératoire:

- Dans un erlenmeyer de 250 ml , on met 50 ml du milieu LB, ensuite autoclavage à 121°C pendant 15 mn;
- Après refroidissement, le milieu stérilisé est ensemencé à l'aide d'une anse stérile à partir de la souche entretenue;
- Le contenu de l'erlenmeyer est homogénéisé, puis incubé à 30°C pendant 24 h sous agitation rotative 200 rpm.

2. Ensemencement du milieu de fermentation:

- Ensemencement par 2.5 ml d'inoculum dans 50 ml de milieu de culture dans un erlenmeyer de 250 ml;
- Le contenu de l'erlenmeyer est homogénéisé, puis incubé à 30°C pendant 24 h sous agitation rotative 200 rpm.

Protocole 2:

Le protocole 2 passe par les étapes suivantes:

1. **Préparation d'une solution 50% (w/v) de glycérol:**

- Peser 50 g de glycérol ;
- Mettre la quantité de glycérol pesée dans une fiole jaugé de 100 ml puis compléter le remplissage de la fiole par l'eau distillée jusqu'à la jauge ;
- Dans un erlenmeyer de 500 ml , on met la solution de glycérol préparée , suivi de l'autoclavage à 121°C pendant 15 mn.
- Après refroidissement, le milieu stérilisé est ensemencé à l'aide d'une anse stérile à partir de la souche entretenue. Le contenu de l'erlenmeyer est homogénéisé par agitation rotative 200 rpm pendant 1 h, puis conservé à 4°C pour l'utilisation ultérieure

2. **Préparation de l'inoculum :**

- Dans un erlenmeyer de 250 ml , on met 50 ml du milieu LB, suivi de l'autoclavage à 121°C pendant 15 mn.
- Après refroidissement, le milieu stérilisé est ensemencé à l'aide d'une micropipette stérile de 0.2 ml à partir de culture de glycérol. Le contenu de l'erlenmeyer est homogénéisé, puis incubé à 30°C pendant 24 h sous agitation rotative 200 rpm.

3. Ensemencement de la culture:

- Ensemencement par 2.5 ml de l'inoculum dans 50 ml de milieu de production dans un erlenmeyer de 250 ml;
- Le contenu de l'erlenmeyer est homogénéisé, puis incubé à 30°C pendant 24 h sous agitation rotative 200 rpm **[73]**.

Protocole 3:

Dans ce protocole l'ensemencement se fait directement à partir d'une solution 50% (w/v) de glycérol sans passer par le milieu d'enrichissement.

Mode opératoire:

- Ensemencement par 2.5 ml de solution de glycérol dans 50 ml de milieu de production dans un erlenmeyer de 250 ml;
- Le contenu de l'erlenmeyer est homogénéisé, puis incubé à 30°C pendant 24 h sous agitation rotative 200 rpm.

D) Détection de l'existence de l'enzyme pénicilline acylase dans le bouillon de fermentation:

La détection de l'enzyme pénicilline acylase dans le bouillon fermenté se fait par spectrophotométrie dans le domaine du visible et sera confirmée par une réaction colorimétrique mettant en jeu une complexation du 6-APA à l'aide du bleu de Bromothymol.

i) Spectrophotométrie UV-vis:

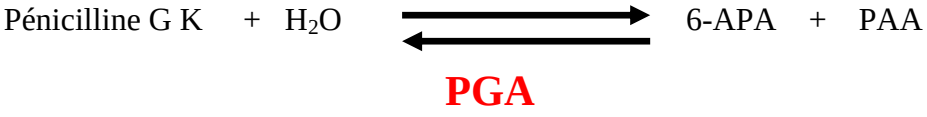
Méthode:

- Après 24 heures de culture, la biomasse est séparée par centrifugation à 4000 tours/min pendant 15 min ;
- La réaction d'hydrolyse par la pénicilline acylase est effectuée sur le surnageant comme suit :

- Mettre 25 ml de tampon phosphate de potassium (pH=8) dans un erlenmeyer de 250 ml ;
- Dissoudre 250 mg de pénicilline G K (substrat) dans le tampon ;
- Ajouter 5 ml de surnageant ;
- Mettre l'erlenmeyer sous agitation de 50 rpm à une température de 40 °C ;

- vérifier le pH (pH entre 7.5 et 08), l'ajustement se fait à l'aide de la solution de NaOH.
- Mesurer la densité optique (DO)à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde de 415 nm, chaque 10 min pendant 1 heure **[76]**.

La réaction enzymatique: peut être schématisé comme suit :



L'activité enzymatique a été calculée comme suit :

$$UE = \frac{[6\text{-APA}] \times 1000}{M \times t}$$

UE : Activité enzymatique (µmol/min/ml) ;

[6-APA]: Concentration de l'acide 6-amino-pénicillanique (g/l) ;

M : Masse molaire de l'acide 6-amino-pénicillanique (g/mol) ;

t : temps de réaction d'hydrolyse (min).

ii) Dosage par le bleu de Bromothymol:

- ✓ Réaliser la réaction d'hydrolyse de même façon que de la réaction précédente ;
- ✓ Après la durée de la réaction d'hydrolyse, le dosage par bleu de Bromothymol se fait comme suit :
  - Mettre dans une fiole jaugé de 25 ml 0.1 à 5 ml de solution contenant éventuellement le 6-APA ;
  - Ajouter 2.5 ml de bleu de Bromothymol ($2.5.\ 10^{-3}$ M) ;
  - Ajouter 5 ml d'acétone ;
  - Ajouter 12.5 ml de tampon phosphate (pH=7) ;
  - Compléter par l'eau distillée jusqu'à la jauge ;
  - Incuber le mélange de 20 à 30 min.

Dans le cas de présence de 6-APA et d'acide phénylacétique la couleur de la solution vire du bleu vers la couleur verte **[77]**.

E) Suivi de la croissance de la souche de *E .coli* :

Le contrôle de la croissance d'*E .coli* a été réalisé par la mesure des paramètres suivants:

- ➢ La densité optique ;
- ➢ La biomasse sèche.

i) Détermination de la densité optique :

On mesure l'absorption lumineuse de la suspension cellulaire à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde égale à 600 nm.

Comme la densité optique évolue très vite, nous avons préféré de diluer nos échantillons au 1/8 de façon à rester dans la marge de l'absorbance. La densité optique est proportionnelle à la masse cellulaire en suspension **[78]**.

ii) Détermination de la biomasse sèche:

On met un volume déterminé de surnageant dans un carré en papier d'aluminium pesé préalablement noté (P1), ce dernier est séché dans une étuve à 110 °C pendant 1 h, puis on pèse le carré la deuxième fois et on note la masse (P2).

La masse de la biomasse sèche est (P2-P1), la détermination de la concentration de biomasse se fait par la relation suivante:

$$C = (P2-P1)/V$$

P1: masse de carré d'aluminium avant le séchage en (mg);

P2: masse de carré d'aluminium après le séchage en (mg);

V: volume de suspension séchée en (ml).

Résultats et discussion :

La croissance cellulaire et la production de PAC sont étudiées sur quatre milieux de culture qui sont détaillés précédemment. Les résultats sont illustrés comme suit :

Protocole 1:

Inoculation à partir de milieu d'enrichissement LB. Les résultats d'étude obtenus dans cette fermentation sont exprimés dans le tableau suivant:

Tableau VI.1: Variation de la production de biomasse et de la pénicilline acylase pour les différents milieux de culture par le protocole 1.

Milieux	Concentration de biomasse (g/l)	pH	L'activité enzymatique (UE)
1	**6.45**	**8.45**	**0.005**
2	**7.5**	**8.7**	**0.011**
3	**3.5**	**8.62**	**0.002**
4	**09.75**	**8.5**	**0.007**

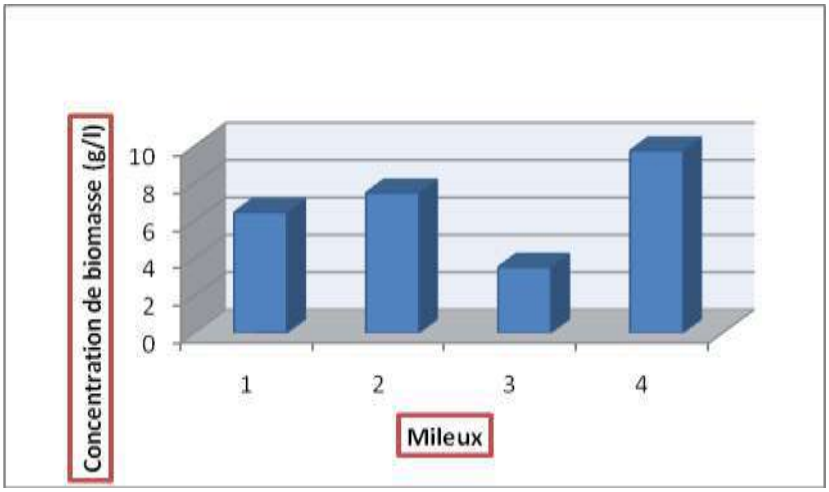


Figure IV.3: Croissance microbienne sur les différents milieux de production selon le protocole 1.

D'après les résultats du tableau **(VI.1)**, le pH du surnageant augmente légèrement pour les quatre milieux mais reste dans la zone de neutralité. La croissance bactérienne a eu lieu dans les différents milieux. Le milieu 4 étant le plus riche en éléments nutritifs, il permet d'obtenir la concentration la plus élevée en biomasse (9 g/l).

Les valeurs de l'activité enzymatique dans les quatre milieux sont négligeables. Le suivi de la concentration de 6-APA dans la réaction d'hydrolyse en fonction du temps ne nous

donne aucune variation significative pour les surnageant des quatre milieux, ce qui implique qu'il n'ya pas eu de formation de 6-APA à partir de l'hydrolyse de pénicilline G par la pénicilline acylase.

Le dosage de 6-APA par le test au bleu de Bromothymol est représenté dans la figure **(VI.5).**



Figure VI.4 : Résultat de dosage par bleu de Bromothymol pour les quatre milieux selon le protocole 1.

Le résultat de dosage s'est avéré donc négatif sur les quatre milieux avec le protocole 1 car la couleur de mélange reste bleu, ce qui implique qu'il n' ya pas eu de production de pénicilline acylase.

Alors, on conclue que le résultat de production de pénicilline acylase par le protocole 1 à partir de fermentation d'*E. coli* ATCC (21709 CIP 54.7) sur les quatre milieux est négatif.

Protocole 2:

Ce protocole consiste à inoculé à partir d'une préculture LB qui est ensemencé par une suspension de glycérol. Les résultats de fermentation tirés d'après cette étude sont mentionnés dans le tableau **(VI.2)**:

Tableau VI.2 : Variation de la production de biomasse et de la pénicilline acylase pour les différents milieux de culture suivant le protocole 2.

Milieu	Concentration de biomasse (g/l)	pH	L'activité enzymatique (UE)
1	**7.1**	**8.72**	**0.004**
2	**8.21**	**8.6**	**0.01**
3	**5.23**	**8.49**	**0.007**
4	**10.13**	**8.56**	**0.005**

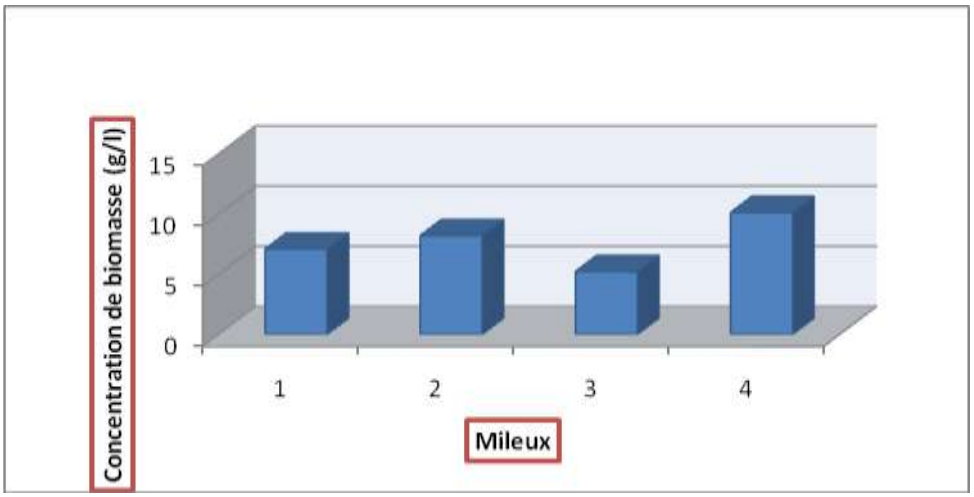


Figure VI.5 : croissance microbienne sur les différents milieux de production selon le protocole 2.

D'après la figure **(VI.5)**, la croissance de biomasse est signalée pour les quatre milieux de production. La meilleure valeur de concentration est obtenue dans le milieu 4, puisqu'il contient plusieurs sources nutritives (CSL, extrait de levure, tryptone,…). Les autres

valeurs sont comparables. Pour cet essai, la croissance bactérienne est favorisée aux dépens de la production de l'enzyme.

La valeur du pH, reste avoisinante à 8.5 pour les essais. L'activité enzymatique testée sur le surnageant à travers l'hydrolyse en 6APA, st très faible, sinon nulle, de façon à considérer les valeurs détectées du même ordre que le bruit de fond de l'appareil.

Le dosage de 6-APA par le test au bleu de Bromothymol est représenté dans la figure **(VI.6)**.

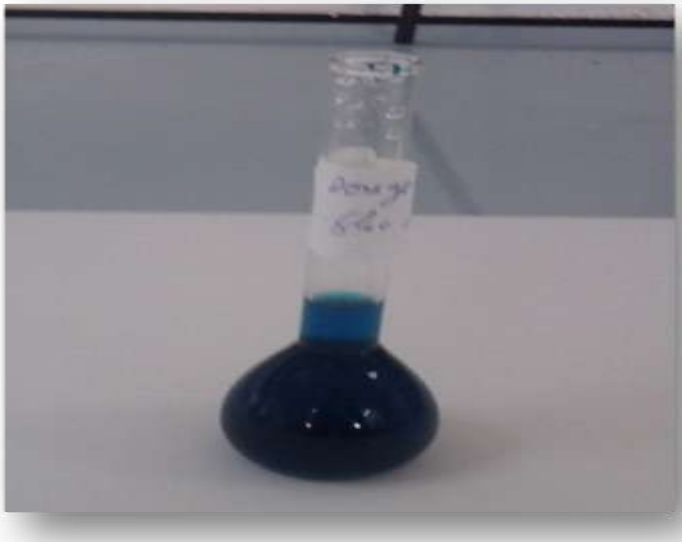


Figure VI.6 : Résultat de dosage par le bleu de Bromothymol sur les quatre milieux selon le protocole 2.

Le résultat de dosage s'est avéré donc négatif sur les quatre milieux avec le protocole 2 car la couleur de mélange reste bleu, ce qui implique qu'il n' ya pas eu de production de pénicilline acylase.

Alors, on conclue que le résultat de production de pénicilline acylase par le protocole 2 à partir de fermentation d'*E. coli* ATCC (21709 CIP 54.7) sur les quatre milieux est négatif.

Protocole 3:

Pour ce protocole l'inoculation se fait directement à partir de la suspension de glycérol. Les résultats de cette fermentation sont écrient dans le tableau suivant:

Tableau VI.3 : Variation de la production de biomasse et de la pénicilline acylase pour les différents milieux de culture par le protocole 3.

Milieux	Concentration de biomasse (g/l)	pH	Activité enzymatique (UE)
1	**6.13**	**4.6**	**0.524**
2	**6.85**	**4.91**	**0.25**
3	**4.65**	**8.59**	**0.013**
4	**8.91**	**8.71**	**0.003**

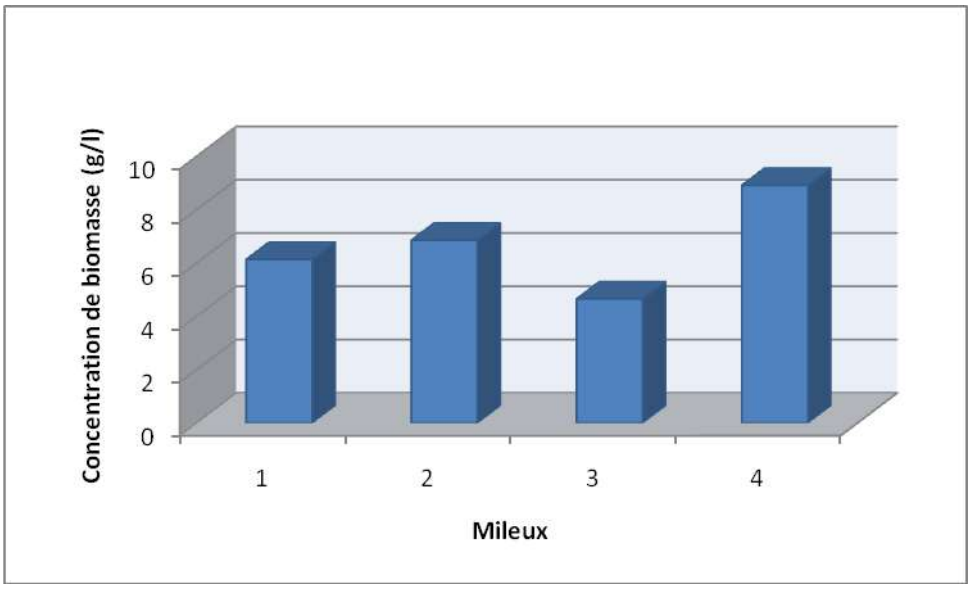


Figure VI.7 : croissance microbienne sur les différents milieux de production selon le protocole 3.

D'après la figure **(VI.7)**, on remarque une croissance importante de biomasse dans le milieu 4, puis le milieu 2, 1 et à la fin le milieu 3.La concentration de biomasse varie selon les sources nutritives dans chaque milieu.

Les résultats de l'activité enzymatique sont représentés en fonction des différents milieux de production dans la figure **(IV.8)** :

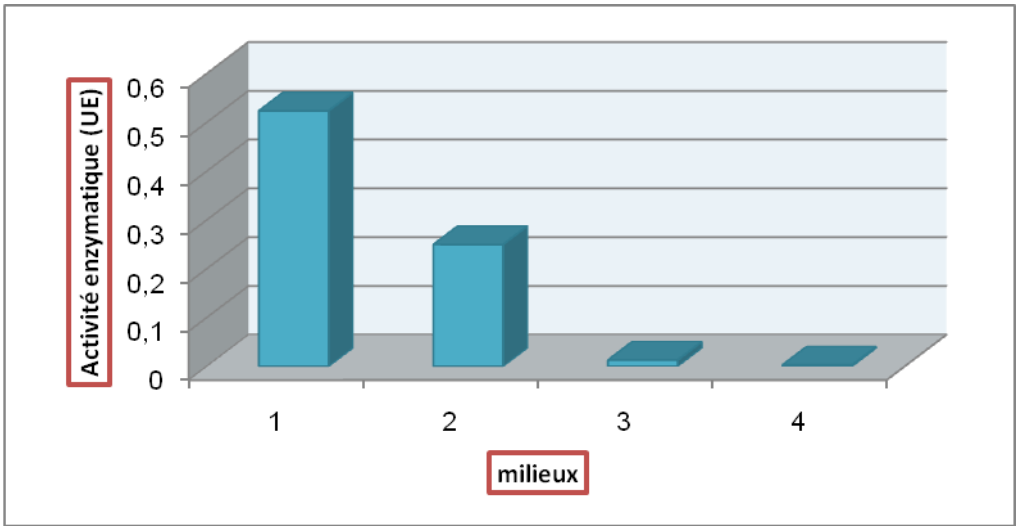


Figure VI.8 : La production de pénicilline acylase pour les différents milieux de production inoculés suivant le protocole 3.

L'activité enzymatique est maximale pour le milieu 1, où l'on obtient la meilleure valeur de 0.524 UE. Dans le milieu 1 et suivant le protocole 3, la souche *E. coli* a pu assurer sa croissance et la production de la pénicilline acylase, car le milieu est équilibré par les sources nutritives et contient aussi le glycérol comme inducteur de la production **[59]**.

Pour le milieu 2, on a une activité enzymatique de 0.25 UE. Elle est inférieure à celle obtenue dans le milieu 1, du fait que le milieu contient plus d'éléments nutritifs par rapport au premier, donc la production de biomasse était plus favorisée que la production de pénicilline acylase. D'un autre coté, l'acide phénylacétique, joue le rôle d'un précurseur pour la production de l'enzyme [**79]**.

La diminution de pH signalé dans les milieux 1 et 2 est due à la production d'acide phénylacétique.

Pour le milieu 3, aucune production de pénicilline acylase n'a été enregistrée. Le milieu contient une concentration de 3 g/l de glucose, et le glucose est un inhibiteur de la production de pénicilline acylase **[79]**.

Dans le dernier milieu la souche ne suit que le chemin de la production de biomasse, et elle ne produise pas la pénicilline acylase parce que ce dernier milieu est trop riche en azote malgré l'existence du précurseur, l'acide phénylacétique.

Le dosage de 6-APA par le test au bleu de Bromothymol est représenté dans la figure **(VI.10)**.



Figure VI.9 : Résultat de dosage par le bleu de Bromothymol pour les milieux (1,2) selon le protocole 3.

D'après la figure **(VI.9)**, on remarque l'apparition d'un complexe vert pour les milieux (1,2) qui nous confirme l'existence du 6-APA dans le mélange donc il ya une de production de pénicilline acylase. Alors, le résultat de dosage était positif pour les milieux (1,2) selon le protocole 1.



Figure VI.10 : Résultat de dosage par le bleu de Bromothymol pour les milieux (3,4) selon le protocole 3.

D'après la figure **(VI.10)**, la couleur reste bleu pour les milieux (3,4) ce qui implique qu'il n' ya pas eu de production de pénicilline acylase. Le résultat de dosage s'est avéré négatif pour les milieux (3,4).

Conclusion : le milieu LB ensemencé à partir de suspension de glycérol est la méthode de choix pour la production de la pénicilline acylase par *E. coli* ATCC (21709 CIP 54.7).

VI.2.4.Optimisation de la production de l'enzyme pénicilline acylase par la souche *E .coli* ATCC (21709 CIP 54.7) :

Pour obtenir un rendement élevé de l'enzyme pénicilline acylase sur le milieu sélectionné 1 en utilisant le protocole 3, il est possible d'optimiser en premier lieu le milieu de culture en faisant varier les concentrations de ses composants sous des conditions constantes. Par la suite, il sera possible de choisir les meilleures conditions de culture (pH, température, et la vitesse d'agitation) dans le milieu optimisé.

a) Effet de concentration des compositions de milieu LB sur la production de l'enzyme pénicilline acylase :

En maintenant la température à 30°C, le pH à 7.5 et sous agitation magnétique constance 200 rpm, on fait varier la concentration de l'un des constituants du milieu et on maintient celles des autres à une valeur constante. Une fois la concentration optimale déterminée, elle sera fixée pour la suite de l'étude. Pour cela, les valeurs de concentrations pour chacun des constituants seront comme suit:

- **Concentration de l'extrait de levure** en (g/l) **:3, 5, 7.5, 9, et 10**. (autres composés maintenus comme milieu 1)
- **Concentration de tryptone** en **:5, 7.5, 10, 12.5, et 15**.
- **Concentration du glucose** (g/l) **:0.1, 0.2, 0.3.**

b) Effet des paramètres physico-chimique sur la production de l'enzyme pénicilline acylase:

Pour optimiser la production de l'enzyme pénicilline acylase, on a procédé à l'étude des effets des conditions de culture sur la production de la pénicilline acylase dans le milieu optimisé. La stratégie de variation d'un seul paramètre à la fois sera adoptée:

- **pH de milieu : 5, 6, 7.5, 8, 9.2**. (extrait de levure (5g/l), tryptone (10g/l), Température 30°C ; agitation 200 rpm,).
- **La température d'incubation :** La température d'incubation a été variée à différents niveaux: **4, 20, 26, 30, 37 °C** pour la valeur du pH optimal fixé.
- **La vitesse d'agitation :** Les valeurs de vitesse d'agitation en rpm sont les suivantes: **100**, **150**, **200**, et **220** rpm pour les valeurs de pH et de température qui sont optimisées.

Résultats et discussion:

A. Optimisation des concentrations de compositions de milieu LB:

A.1 Effet de la concentration de l'extrait de levure :

Tableau VI.4 : Variation de la production de biomasse et de la pénicilline acylase en fonction de la concentration de l'extrait de levure.

Concentration de l'extrait de levure (g/l)	Concentration de biomasse (g/l)	pH	Activité enzymatique (UE)
3	**5.63**	**4.41**	**0.34**
5	**7.02**	**4.45**	**0.523**
7.5	**8.13**	**4.53**	**0.38**
9	**9.45**	**4.64**	**0.31**
10	**10.12**	**4.51**	**0.32**

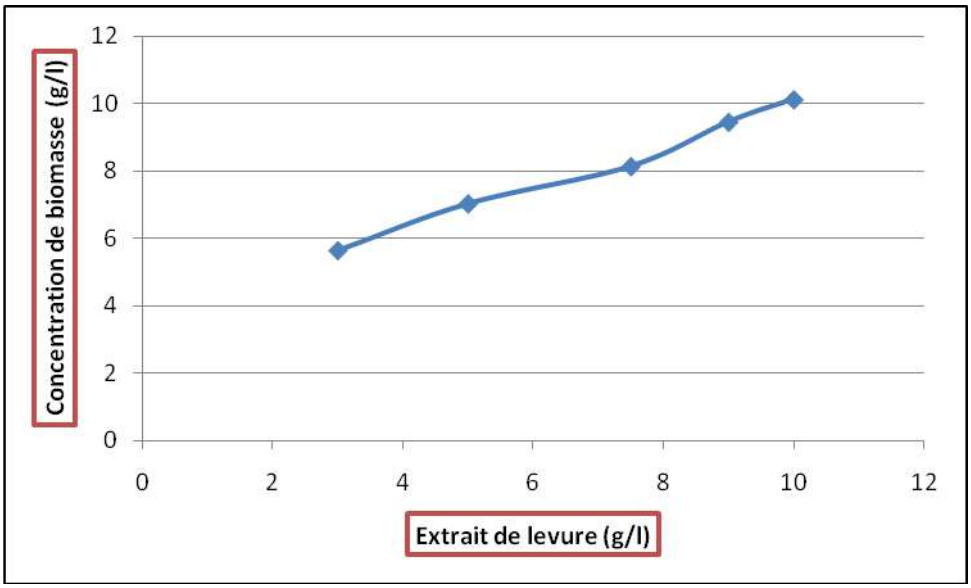


Figure VI.11 : Effet de la concentration de l'extrait de levure sur la croissance microbienne (tryptone (10g/l), température30°C, pH=7.5, agitation200 rpm).

A partir de ces résultats obtenus on observe que l'augmentation de la concentration de l'extrait de levure provoque une augmentation de la concentration de biomasse. Donc, le taux de croissance varie proportionnellement avec la concentration de l'extrait de levure.

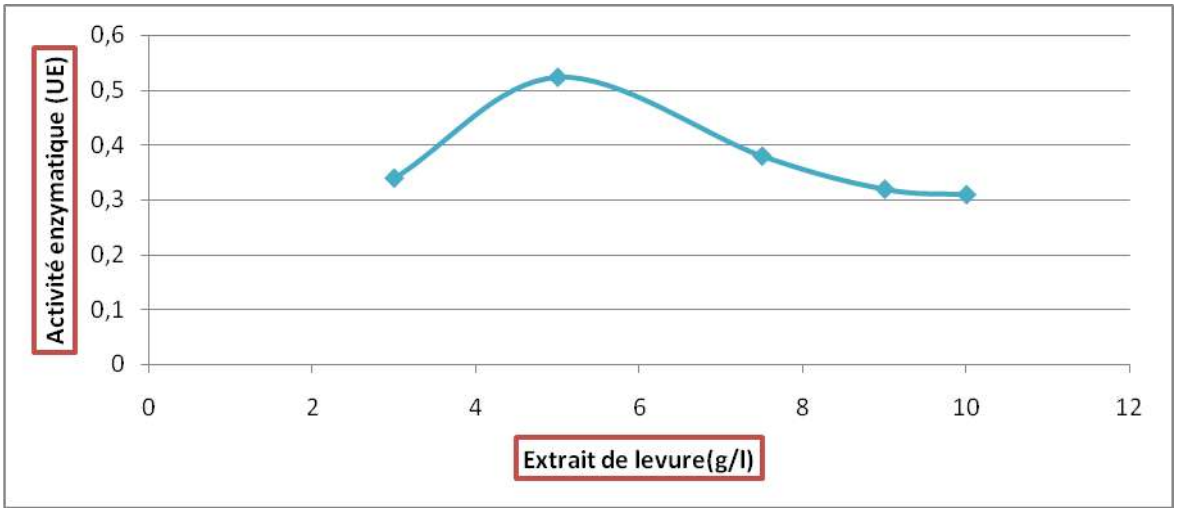


Figure VI.12 : Effet de la concentration de l'extrait de levure sur la production de la pénicilline acylase, (tryptone (10g/l), température 30°C, pH=7.5, agitation 200 rpm).

D'après la figure **(VI.12)**, l'activité enzymatique augmente aussi avec l'augmentation de la concentration de l'extrait de levure dans le milieu. Ce résultat est confirmé puisque l'enzyme est un métabolite primaire. Cette augmentation atteint son maximum (0.55UE) pour une concentration égale à 5g/l en extrait de levure. Au-delà de cette valeur, on observe une diminution progressive de l'activité enzymatique en fonction de l'augmentation de concentration de l'extrait de levure.

En présence d'un excès de l'extrait de levure, le métabolisme est déplacé vers la voie de production de biomasse alors que celle de la production de l'enzyme est partiellement inhibée.

Alors, on conclue que la valeur optimale de la concentration de l'extrait de levure qui donne une meilleure production de l'enzyme pénicilline acylase et qui sera prise pour la suite de l'étude est égale à 5g/l.

A.2 Effet de la concentration du tryptone :

Les résultats sont illustrés sur le tableau **(VI.5)** et la figure **(VI.13)**:

Tableau VI.5 : Variation de la production de biomasse et de la pénicilline acylase en fonction de la concentration de tryptone

Concentration de tryptone (g/l)	Concentration de la biomasse (g/l)	pH	Activité enzymatique (UE)
5	**5.39**	**4.48**	**0.23**
7.5	**7.32**	**4.49**	**0.4**
10	**8.45**	**4.78**	**0.531**
12.5	**9.13**	**4.62**	**0.48**
15	**10.9**	**4.63**	**0.47**

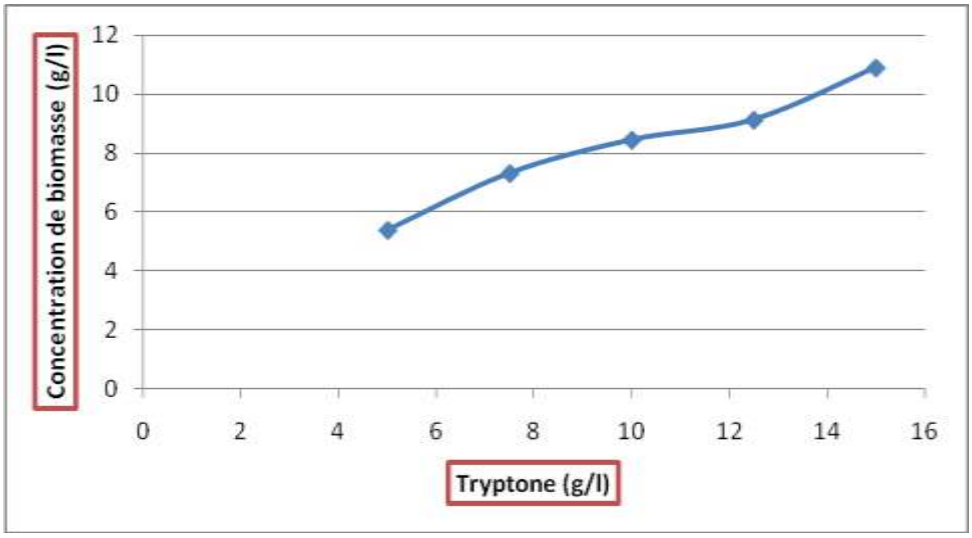


Figure VI.13 : Effet de la concentration de tryptone sur la croissance microbienne (extrait de levure (5g/l), température 30°C, pH=7.5, agitation 200 rpm).

Les résultats obtenus indiquent que la concentration de biomasse varie proportionnellement avec l'augmentation de la concentration de tryptone jusqu'à une valeur qu'est égal à 10 g/l. Néanmoins, l'augmentation n'est pas significative pour une concentration

de tryptone au-delà de 10g/l. Le même constat est signalé pour la production de la pénicilline acylase Figure **(VI.14)** il est inutile, donc, d'utiliser dans le milieu une concentration au-delà de cette valeur.

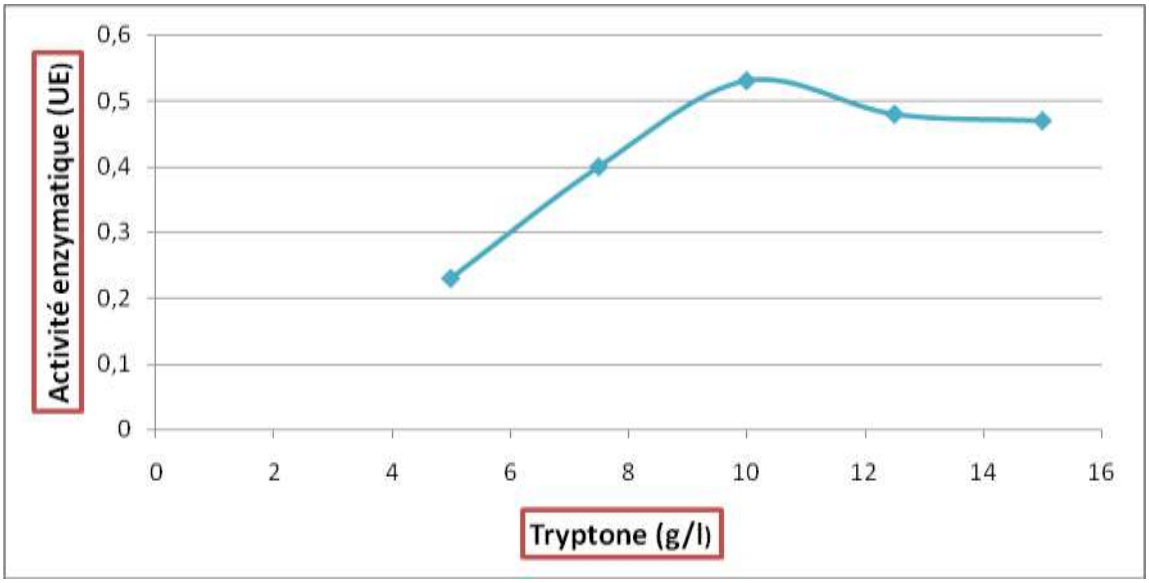


Figure VI.14 : Effet de la concentration de tryptone sur la production de la pénicilline acylase (extrait de levure (5g/l), température 30°C, pH 7.5, agitation 200 rpm)

En conclusion, la valeur optimale de tryptone qui donne une meilleure croissance et une meilleure production de l'enzyme pénicilline G acylase (0.5UE) est égale à 10g/l.

A.3 Effet de la concentration du glucose :

Les résultats sont illustrés sur le tableau **(VI.6)**:

Tableau VI.6 : Variation de la production de biomasse et de la pénicilline acylase en fonction de la concentration de glucose.

Concentration de glucose (g/l)	Concentration de la biomasse (g/l)	pH	Activité enzymatique (UE)
0	**8.84**	**4.48**	**0.622**
0.1	**10.22**	**4.52**	**0.4**
0.2	**12.4**	**4.53**	**0.254**
0.3	**15.23**	**4.49**	**0.078**

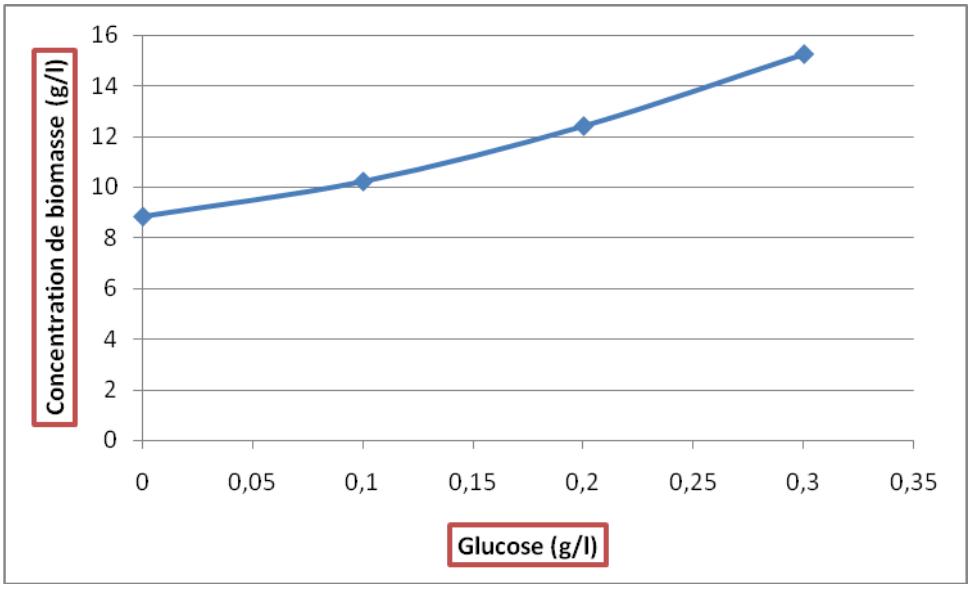


Figure VI.15 : Effet de la concentration de glucose sur la croissance microbienne (Extrait de levure (5g/l), Tryptone (10g/l), température 30°C, pH 7.5, agitation 200 rpm).

Le glucose est une source de carbone et d'énergie facilement utilisable pour les microorganismes**. [79]** Les tests qui sont effectués pour définir l'effet de glucose sur la croissance microbienne indiquent que le rendement en biomasse augmente avec la concentration en glucose. Cette augmentation pour une concentration en glucose au delà de 0.2 g/l.

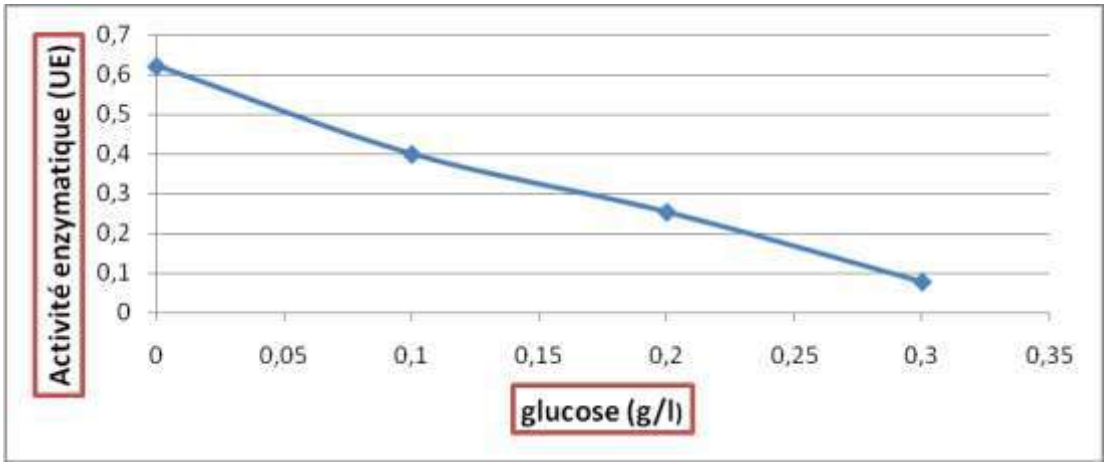


Figure VI.16: Effet de la concentration de glucose sur la production de la pénicilline acylase (extrait de levure (5g/l), Tryptone (10g/l), température 30°C, pH 7.5, agitation 200 rpm).

D'un autre coté, d'après la figure **(VI.16)**, l'activité enzymatique diminue avec l'augmentation de la concentration en glucose. Le glucose dans ce cas est un inhibiteur de la production de la pénicilline acylase par *E. coli*. Le même résultat a été mentionné dans d'autres travaux. **[80]**

Par la suite, le glucose sera éliminé de la formulation du milieu de production.

B. Optimisation des paramètres physico-chimique :

B.1 Effet du pH:

Les résultats de fermentation à différentes valeurs de pH sont illustrés dans le tableau suivant:

Tableau VI.7 : Variation de la production de biomasse et de la pénicilline acylase en fonction de pH.

pH	Concentration de biomasse en (g/l)	pH	Activité enzymatique (UE)
5	**3.2**	**4.52**	**0.131**
6	**8.4**	**4.56**	**0.193**
7.5	**10.2**	**4.56**	**0.4**
8	**9.7**	**4.62**	**0.27**
9.2	**2.8**	**7.32**	**0.15**

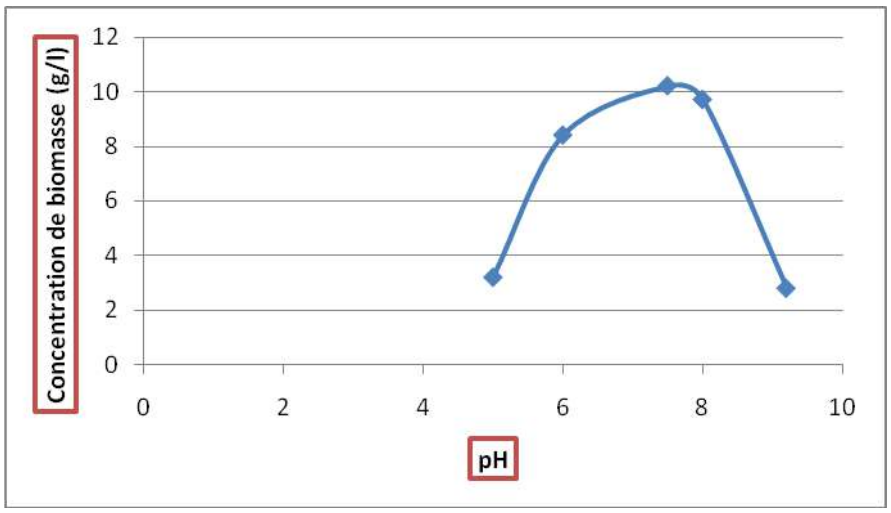


Figure VI.17 : Effet du pH sur la croissance microbienne (Extrait de levure (5g/l), Tryptone 10 (g/l), température 30°C, agitation 200 rpm).

Le pH est un paramètre qui a une grande influence sur la croissance microbienne. D'après la figure **VI.17**, le pH optimal de croissance d'*E. coli* se situe dans la zone de 6 à 8 où l'on atteint une concentration moyenne de 9 g/l. Hors de cette zone, la croissance est partiellement inhibée et le rendement en biomasse diminue.

Les valeurs de l'activité enzymatique sont représentées dans le graphe suivant:

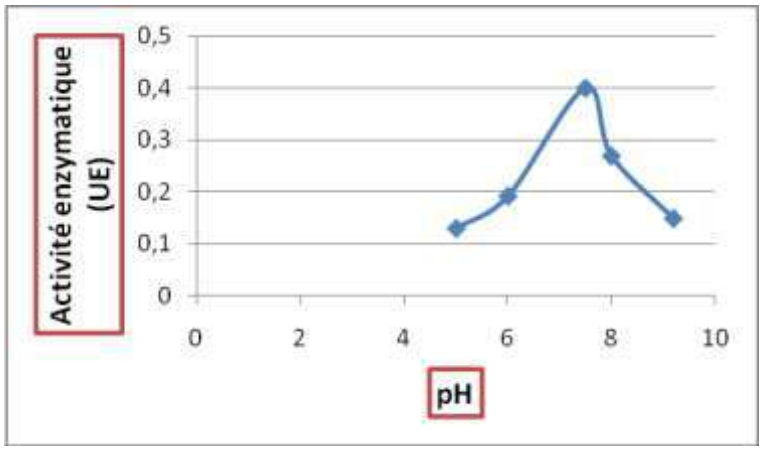


Figure VI.18 : Effet du pH sur la production de la pénicilline acylase (extrait de levure (5g/l), tryptone (10g/l), température 30°C, agitation 200 rpm).

Pour la production de la pénicilline acylase, on remarque que le pH neutre est l'optimum pour l'obtention de (0.4 UE) d'activité. Hors de cette zone, le pH agit négativement sur la production de l'enzyme suite à l'inhibition de la croissance d'*E. coli*.

Donc, la valeur de pH optimale qui sera fixée pour la suite de l'étude pour la production de l'enzyme pénicilline acylase est de 7.5.

B.2 Effet de la température :

Tableau VI.8 : Variation de la production de biomasse et de la pénicilline acylase en fonction de la température.

Température (°C)	concentration de la biomasse (g/l)	pH	Activité enzymatique (UE)
4	**0.017**	**7.3**	**0**
20	**3.12**	**6.76**	**0.023**
26	**5.3**	**4.7**	**0.155**
30	**10.4**	**4.55**	**0.476**
37	**8.5**	**4.43**	**0.411**

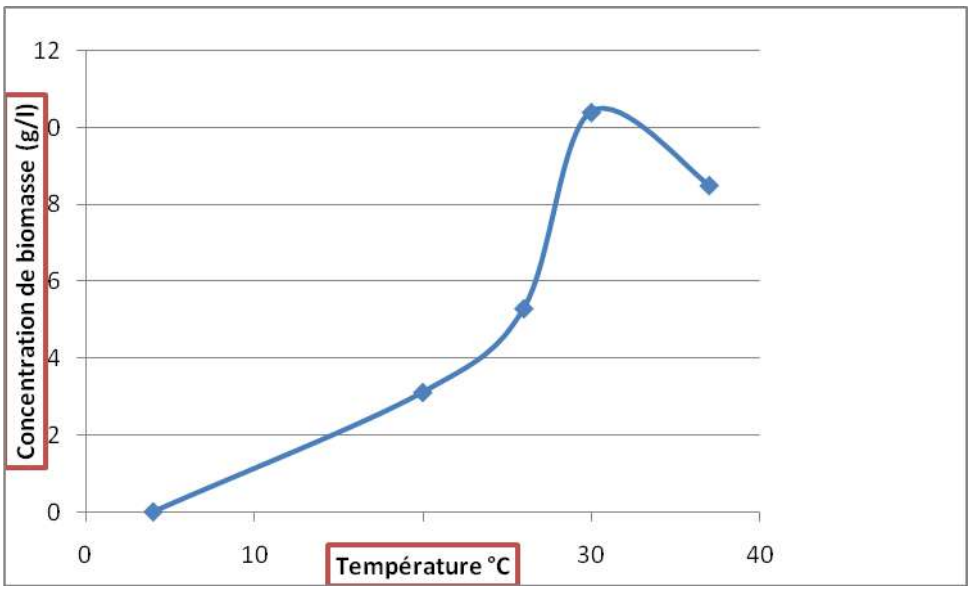


Figure VI.19 : Effet de la température sur la croissance microbienne (extrait de levure (5g/l), tryptone (10g/l), pH7.5, agitation 200 rpm).

D'après les résultats illustrés sur le tableau **(VI.19)** et la figure **(VI.19)** on observe que, le rendement en biomasse augmente avec la température (facteur favorisant l'activité enzymatique) jusqu'à 30 °C où l'on atteint une biomasse maximale d'environ de 10 g/l. Au dessus de cette valeur, on remarque une diminution légère de la croissance bactérienne.

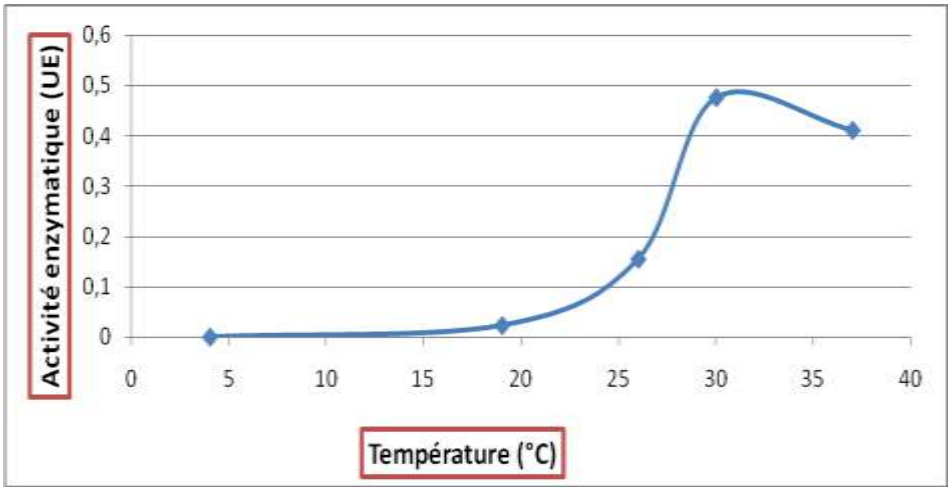


Figure VI.20: Effet de la température sur la production de la pénicilline acylase (extrait de levure (5g/l), tryptone 10 (g/l), pH 7.5, agitation 200 rpm)**.**

De même pour l'activité enzymatique **(VI.20)**, elle est quasiment faible jusqu'à 20°C. Au dessus de cette valeur, on observe une augmentation de l'activité enzymatique avec la température. Le maximum d'activité (0.48 UE) est atteint pour une valeur optimale de température 30°C. Au-delà de 30°C, une légère diminution de la production de la pénicilline acylase est observée. Pour la suite de l'étude, la valeur de la température optimale de 30°C est fixée.

Les valeurs de pH signalés confirment ces résultats, les pH acides inférieures à 5 dues à la production d'acide phénylacétique sont détectés qu'à des températures supérieures à 20°C.

B.3 Effet de la vitesse d'agitation :

L'effet de l'agitation sur la production de biomasse et de pénicilline acylase sont illustrés sur le tableau **(VI.9)** et les figures **(VI.21)** et **(VI.22)**.

Tableau VI.9 : Variation de la production de biomasse et de la pénicilline acylase en fonction de la vitesse d'agitation.

Vitesse d'agitation (rpm)	Concentration de biomasse (g/l)	pH	Activité enzymatique (UE)
100	**2.5**	**4.7**	**0.256**
150	**5.6**	**4.54**	**0.4**
200	**7.6**	**4.49**	**0.49**
220	**9.42**	**4.42**	**0.562**

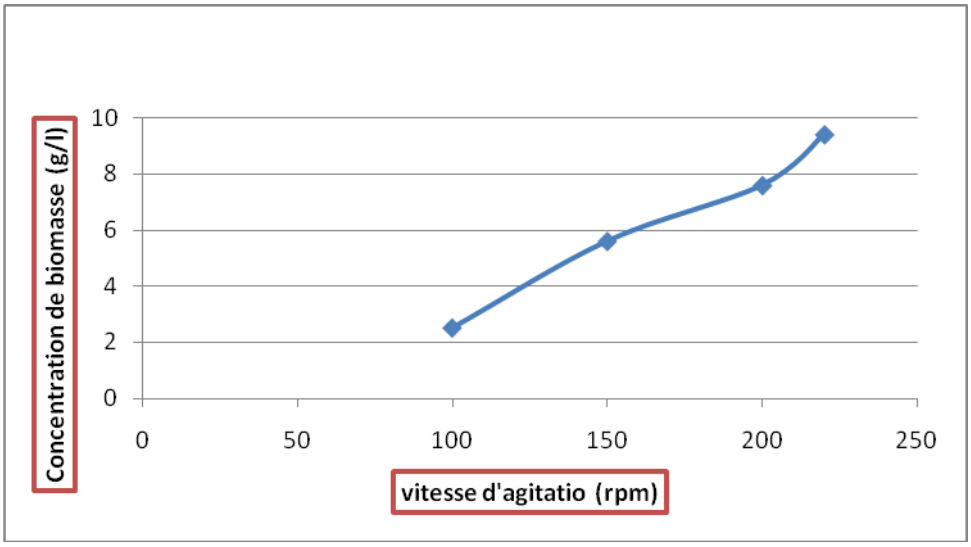


Figure VI.21 : Effet de la vitesse d'agitation sur la croissance microbienne (extrait de levure (5g/l), tryptone (10g/l), température 30°C, pH 7.5).

D'après les figures **(VI.21)** et **(VI.22)**, on remarque une augmentation de la biomasse et de la production de la pénicilline acylase en fonction de l'augmentation de la vitesse d'agitation. La souche étant aérobie, **[72]** l'apport de l'oxygène augmenté par l'agitation

favorise la croissance bactérienne et par la suite la production des métabolites primaires comme l'enzyme acylase.

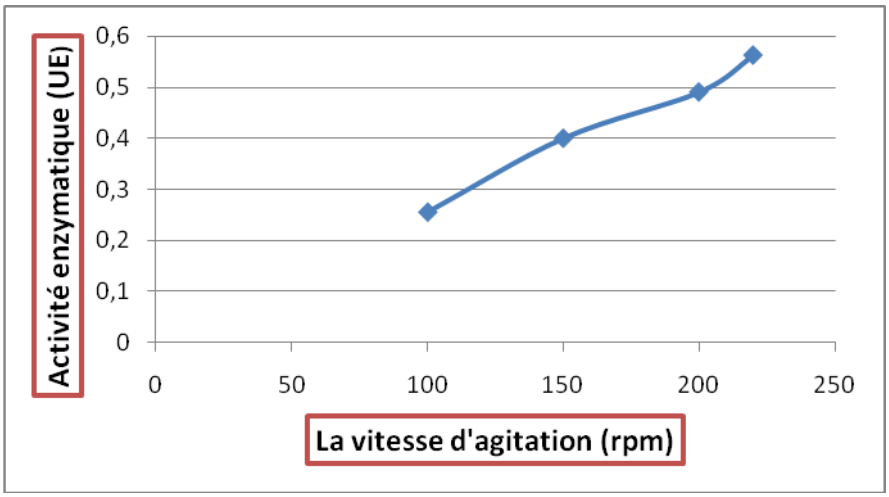


Figure VI.22 : Effet de la vitesse d'agitation sur la production de la pénicilline acylase (extrait de levure (5g/l), tryptone (10g/l), température 30°C, pH 7.5).

L'agitation est donc un facteur important dans la production de l'enzyme qui provoque une augmentation de 50 % lorsque sa valeur est doublée. Par ailleurs, l'agitation favorise l'homogénéisation du milieu **[45]**.

VI.2.5. Cinétiques de croissance bactérienne et de production de la pénicilline acylase sous les conditions optimales :

Afin d'établir les cinétiques de croissance d'*E. coli* et de la production de la pénicilline acylase, une culture est mené dans le milieu1 suivant le protocole 3 et sous les conditions optimales déterminées pendant une durée de 30 heures. Des prélèvements sont effectués à partir de la culture à des intervalles de temps réguliers afin de mesurer la concentration en biomasse et l'activité enzymatique de la pénicilline acylase.

Les résultats du suivi de la concentration en biomasse et de l'enzyme produite sous les conditions optimales obtenus sont illustrés sur le tableau **(VI.10)** et la figure **(VI.23).**

On peut donc signaler ce qui suit :

Tableau VI.10 : variation de la production de la biomasse et de la pénicilline acylase sous les conditions optimales en fonction du temps.

Temps (h)	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
Biomasse (g/l)	**0.232**	**0.231**	**0.232**	**0.232**	**0.34**	**0.43**	**0.62**	**0.83**	**1.5**
Activité enzymatique (UE)	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0.045**	**0.061**	**0.083**	**0.094**
Temps	**10**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**	**24**	**25**
Biomasse (g/l)	**2.42**	**11.35**	**11.5**	**11.85**	**12.21**	**12.35**	**12.45**	**12.2**	**11.8**
Activité enzymatique (UE)	**0.125**	**0.369**	**0.42**	**0.481**	**0.53**	**0.61**	**0.62**	**0.622**	**0.621**

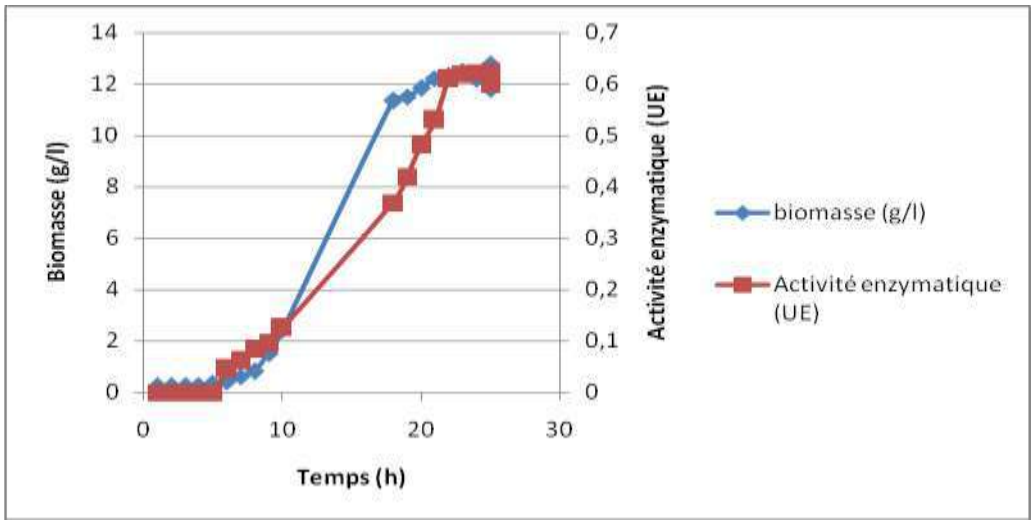


Figure VI.23 : Cinétique de croissance bactérienne et de produit de pénicilline acylase sous les conditions optimales (extrait de levure (5g/l), tryptone (10g/l), température 30°C, pH 7.5, agitation 220 rpm)**.**

Les phases classiques d'une croissance bactérienne ont été rencontrées à travers l'essai mené :

- Une phase de latence d'une durée de 4 à 5 heures durant laquelle les cellules synthétisent les enzymes qui vont leur être nécessaires pour utiliser les substrats (éléments nutritifs) du milieu. Il n'ya pas de division cellulaire (X = 0) et (μ = 0). **[81]**.
- Une phase de croissance (phase logarithmique) à partir de 6 heures jusqu'à 20 heures. Le rendement en biomasse maximal (12 g/l) est atteint au bout de 24 heures.
- Une phase stationnaire est remarquée de 22 heures jusqu'à 24 heures durant laquelle la concentration en biomasse reste constante à sa valeur maximale.
- Une phase de déclin due à la mort des bactéries.

La production de l'enzyme suit quasiment le même profil, du fait que c'est un métabolite primaire et qui est donc associé à la croissance. L'activité augmente avec la biomasse au cours du temps pour atteindre une valeur maximale d'environ 0.6 UE après 24 h d'incubation. Ce résultat peut être comparé à celui obtenu par d'autres auteurs. **[80]**

Le rendement de production $Y_{E/X}$ pourra être calculé d'après la formule suivante :

$$\mathbf{Y_{E/X} = (UE - UEo) / (X - Xo)}$$

Où : UE : Activité enzymatique à l'instant t;

UEo : Activité enzymatique à t=0;

X : biomasse à l'instant t;

Xo : biomasse à t=0.

La valeur obtenue est $Y_{E/X}$ = **0.033** UE/g biomasse

Par ailleurs, on pourra calculer la productivité spécifique moyenne $q_{p/x}$ comme étant :

$$q_{p/x} = \frac{(UE - UE_0)}{(X - X_0)\, t}$$

UE : unités enzymatique à l'instant t ;

UE_0 : unités enzymatique à t=0 ;

X : biomasse à l'instant t ;

X_0 : biomasse à t=0 ;Séparati

t : temps de lan UE/g biomasse phase exponentielle (heurs).

La valeur obtenue est $q_{p/s}$ = **0.000174** UE/g biomasse/h

VI.2.6. Séparation de l'enzyme pénicilline acylase:

Pour augmenter l'activité enzymatique, on a fait la précipitation de pénicilline acylase par l'éthanol.

Mode opératoire :

Les pénicillines acylase sont extraites d'après une méthode classique **[69]**. Toutes les opérations de l'isolement de l'enzyme ont été réalisées à 4°C. Après avoir séparé la biomasse par centrifugation à 4000 tr/min pendant 20 minutes à 4°C, l'opération s'effectue en versant de trois volumes d'éthanol glacial goutte à goutte dans un volume de surnageant disposé sous agitation dans la glace pilée. Une fois l'éthanol est totalement versé, le mélange (surnageant-éthanol) est laissé dans le frigo pendant 2heures, il se forme alors un précipité blanc. Sa récupération se fait par filtration sous vide. Le filtrat récupéré a été séché à température ambiante, la poudre obtenue est l'extrait enzymatique de la pénicilline acylase partiellement purifiée.

La pénicilline acylase purifiée est souvent stable et doit être généralement conservée sous des conditions la protégeant de la dégradation chimique et biologique. L'isolement se fait à 4°C, donc cette température est suffisante pour sa conservation en solution tampon (pH 8). Les étapes de purification sont récapitulées sur la figure **(VI.24)** :

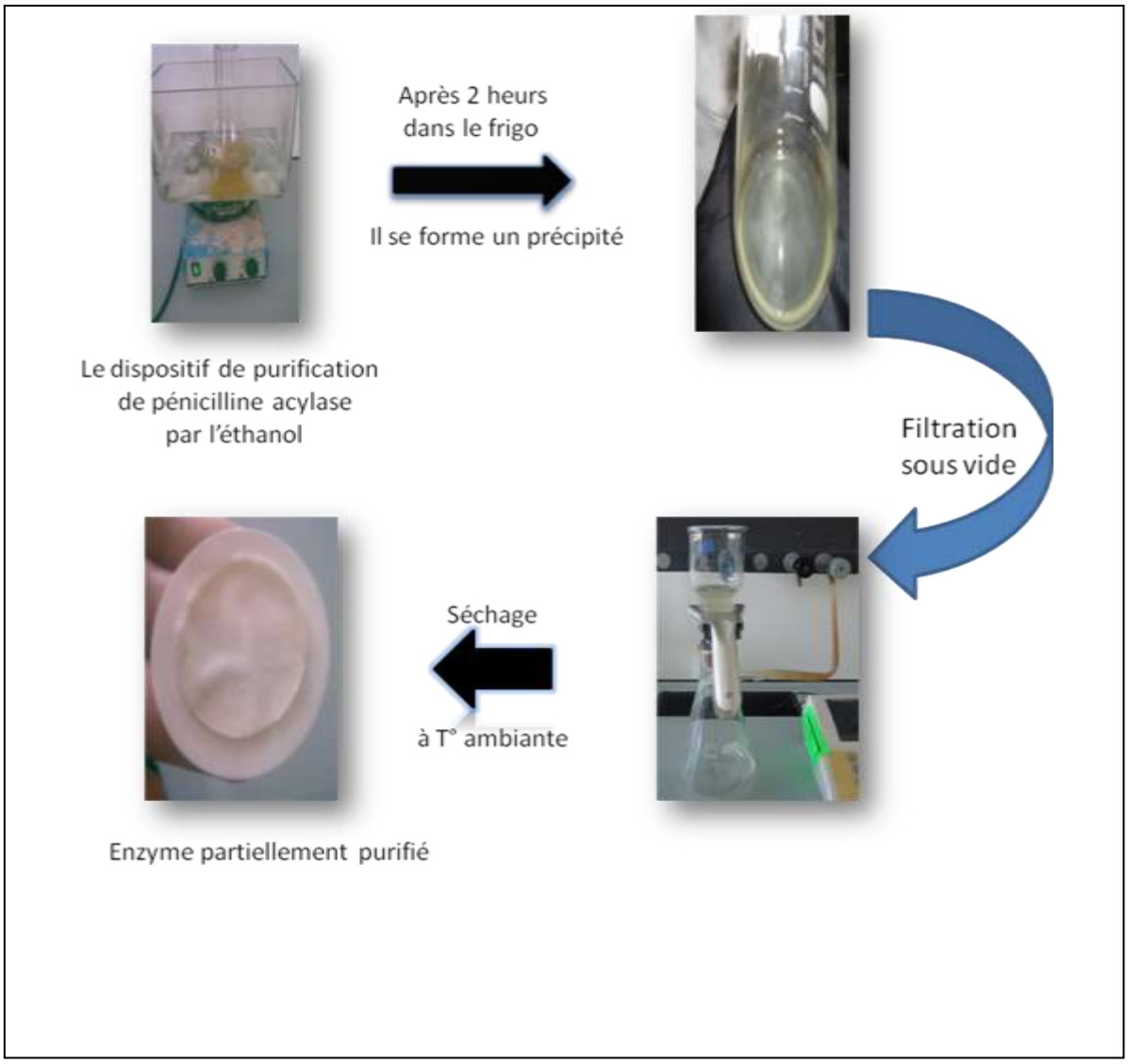


Figure VI.24 : Technique de purification de pénicilline acylase par précipitation à l'éthanol.

Résultats et discussion :

La méthode de précipitation à l'éthanol est une méthode simple à mettre en œuvre permettant de séparer l'enzyme et d'éliminer la majorité des impuretés provenant de la fermentation. Suite à cette opération, on obtient une enzyme plus pure ayant une activité de 1.34 UE. Ce résultat peut être comparé à celui obtenu par d'autres auteurs (..)**[79].**

Les résultats de mesure de l'activité totale mesurée avant et après purification sont illustrés sur le tableau **(VI.11)**.

Tableau VI.11 : Activité de la pénicilline acylase avant et après la précipitation à l'éthanol.

	Volume totale (ml)	**Activité spécifique (UE)**	**Activité enzymatique (UE/ml)**	**Rendement**
surnageant	10	0.78	7.8	-
Précipité	5	1.34	6.7	85.89%

VI.2.7. Analyse par HPLC :

Afin de confirmer que l'enzyme partiellement purifié catalyse la réaction d'hydrolyse de la pénicilline G en 6-APA, on procède à l'analyse par HPLC du produit de la réaction mené sous les conditions standards et le comparer avec un échantillon du 6-APA pur.

Une solution (2 g/l) d'échantillon standard de 6-APA a été préparé dans un tampon 8, par la suite, la solution a été filtré sur membrane d'acétate de cellulose et ensuite injecté dans l'appareil HPLC de type Varian prostar système HPLC 210.

Les conditions de l'analyse sont les suivantes :

- Phase mobile: 0,05 M de dihydrogéno phosphate de potassium (pH 5,0): acétonitrile = 97: 3;
- Colonne: 250 x 4,6 mm avec matériel d'emballage Microsorb 300-5, C-18,
- Détecteur UV-visible (Hitachi, U-2001) à la longueur d'onde 220 nm,
- Volume d'injection 20 µl;
- Température de la colonne 25 ± 2 ° C; débit 1,0 ml / min].
- Longueur d'onde de détection a été fixée à 220 nm sur la base du spectrophotomètre rapport d'analyse de la 6-APA par HPLC phase mobile en tant que blanc.

La solution contenant les produits de la réaction de l'hydrolyse de Peni G K par la pénicilline acylase partiellement purifiée a été traitée de la même manière **[82]**.

Les chromatogrammes ont été enregistrés et sont présentés sur les figures **(VI.25)** et **(VI.26).**

Résultats et discussion :

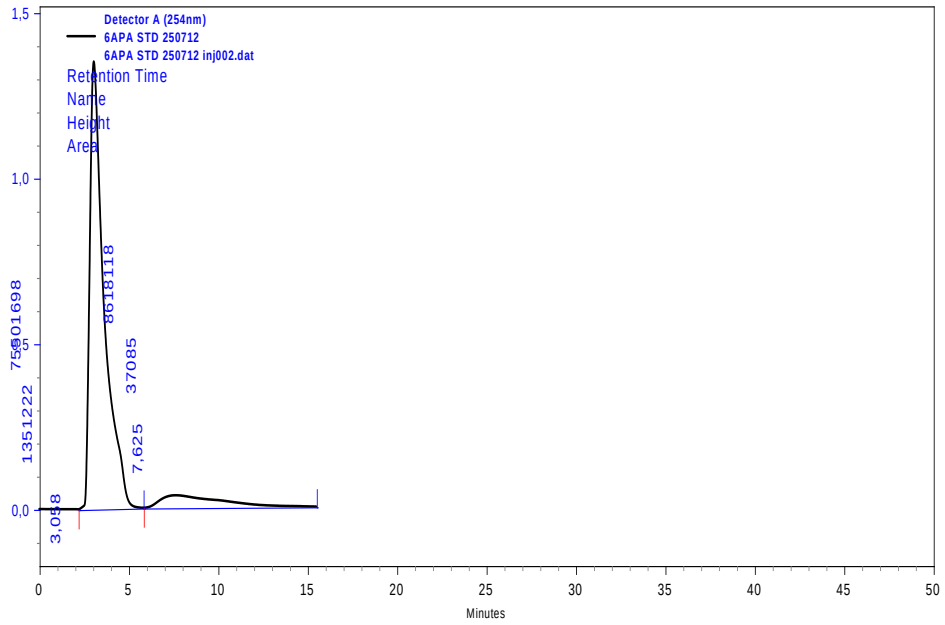


Figure VI.25: Chromatogramme du 6-APA standard

Tableau VI.12 : Résultat d'analyse par HPLC du 6-APA standard.

Picks	Temps de Retention	**Air**	Air %	**Hauteur**
1	3,058	**75501698**	89,75	**1351222**
2	7,625	**8618118**	10,25	**37085**
Totales		**84119816**	100,00	**1388307**

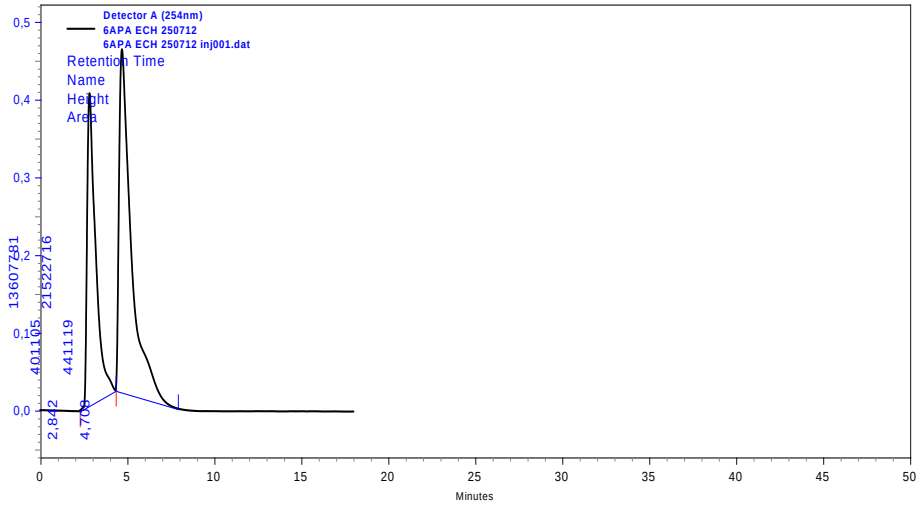


Figure VI.26 : Chromatogramme du 6-APA produite à partir de l'hydrolyse de pénicilline G par la pénicilline acylase produite à l'aide d'*E.coli* ATCC (21709 CIP 54.7) dans les conditions optimales (extrait de levure (5g/l), tryptone (10g/l), température 30°C, pH 7.5, agitation 220 rpm).

Tableau VI.13 : Résultat d'analyse par HPLC du 6-APA produite à partir de l'hydrolyse de pénicilline G par la pénicilline acylase produite à l'aide d'*E.coli* ATCC (21709 CIP 54.7).

Picks	Temps de retention	Air	Air (%)	Hauteur
1	2,842	13607781	38,73	401105
2	4,708	21522716	61,27	441119
Totales		35130497	100,00	842224

En analysant la figure **(VI.25)**, On remarque l'apparition d'un pic qui a un temps de rétention égal à 3.058, c'est le pic de 6-APA **[82]**, par ailleurs sur la figure **(VI.26)** apparaissent deux pics, le premier a presque le même temps de rétention (2.842) que celui du pic de 6-APA standard. Le deuxième a un temps de rétention de 4.708 correspond à celui de pénicilline G ou à l'acide phénylacétique.

Donc d'après les résultats d'analyse par HPLC confirme donc que le produit de la réaction d'hydrolyse de pénicilline G K par la pénicilline acylase est le 6-APA.

CONCLUSION GENERALE :

L'objectif principal de notre travail était, à l'origine, de produire l'enzyme pénicilline acylase à partir d'une fermentation en batch agité réalisée par la souche *E.coli* ATCC (21709 CIP 54.7), dans le but de l'utiliser pour l'hydrolyse de la pénicilline G en acide 6-amino-pénicillanique.

L'intérêt a été porté en premier lieu à la revification de la souche *E.coli* ATCC (21709 CIP 54.7) sur milieu gélosé « Trypto Caséine Soja Agar ».

Dans la seconde partie, une stratégie expérimentale a permis de choisir à priori le milieu et la méthode d'ensemencement adéquats permettant la mise en évidence de la production de l'enzyme pénicilline acylase par *E. coli* sur différents milieux de production. Le dosage de l'activité enzymatique de la pénicilline acylase est fait par des méthodes simples dans le but d'assurer la présence d'enzyme dans le bouillon de fermentation.

La production est réussite sur le milieu de culture qui contient de l'extrait de levure, tryptone, chlorure de sodium, et en présence de glycérol comme source de carbone.

Par la suite, l'étude est menée sur les effets de différents paramètres sur le rendement de produit obtenu nous a permis de faire des essais préliminaires pour déterminer les valeurs des facteurs optimums tels que : les concentrations de différents compositions de milieu, la concentration de glucose, la température, le pH, et la vitesse d'agitation.

Les résultats ont montré que la souche *E.coli* donne son point de production maximale dans le milieu LB lui-même avec (1.25 g) de glycérol, à un pH neutre (7.5), température de 30°C, sous agitation de 220 rpm pour une durée de 24 heures.

Enfin, la séparation et la purification de l'enzyme qui a été produite dans les conditions optimales ont été effectuées en quelques étapes :

Notre travail n'est qu'une étape préliminaire qui a permis de déterminer la faisabilité et les conditions optimale de la production, à l'échelle de laboratoire, de l'une des enzymes industrielles les plus importantes.

Conclusion générale

Les résultats pourront être complétés par la suite sur divers axes, notamment :

- L'étude de l'effet de l'acide phénylacétique sur la production de pénicilline acylase.
- Production de l'acide 6-amino-pénicillanique par pénicilline acylase immobilisée.
- La production de la pénicilline acylase en continu ou avec des cellules immobilisées.
- La séparation et la purification de la pénicilline acylase avec des techniques plus performantes afin d'avoir un extrait enzymatique totalement purifié qui permet d'augmenter l'activité spécifique de la pénicilline acylase.