

## RODUITS PHARMACEUTIQUES

### Isolement et caractérisation des antibiotiques

Les antibiotiques sont produits par les micro-organismes pour tuer ou inhiber la croissance d'autres micro-organismes. Ce sont des métabolites secondaires typiques. Ils sont produits principalement par des champignons filamenteux et des bactéries du groupe des Actinomycètes. Le tableau liste les plus importants des antibiotiques produits à grande échelle.

Antibiotique	Micro-organisme producteur
Bacitracine	<i>Bacillus licheniformis</i> (BS)
Céphalosporine	<i>Cephalosporium</i> spp.
Chloramphénicol	Synthèse chimique (auparavant par <i>Streptomyces venezuelae</i> )
Cycloheximide	<i>Streptomyces griseus</i>
Cyclosérine	<i>Streptomyces orchidaceus</i>
Érythromycine	<i>Streptomyces erythreus</i>
Griséofulvine	<i>Penicillium griseofulvium</i>
Kanamycine	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>
Lyncomycine	<i>Streptomyces lincolnensis</i>
Néomycine	<i>Streptomyces fradiae</i>
Nystatine	<i>Streptomyces noursei</i>
Pénicilline	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Polymyxine B	<i>Bacillus polymyxa</i> (BS)
Streptomycine	<i>Streptomyces griseus</i>
Tétracycline	<i>Streptomyces rimosus</i>

### Recherche de nouveaux antibiotiques

Bien que les sociétés pharmaceutiques découvrent aujourd'hui leurs nouveaux produits par modélisation informatique, les antibiotiques ont été découverts traditionnellement par criblage ou *screening*. Dans cette approche, un grand nombre de souches produisant potentiellement des antibiotiques de façon naturelle sont isolées en culture pure. Elles sont ensuite testées pour leur production de composés inhibiteurs de bactéries témoins choisies pour être représentatives ou très proches de bactéries pathogènes, par la *méthode des stries croisées*.

### ANTIBIOTIQUES PRODUITS INDUSTRIELLEMENT

Les isolats qui montrent une activité antibiotique sont ensuite testés afin de savoir si cet antibiotique est nouveau, ce qui réclame beaucoup de temps et de ressources, car la plupart des antibiotiques ainsi découverts sont déjà connus. S'il est nouveau, l'antibiotique est produit en quantité suffisante pour des études de structure, de toxicité et d'activité clinique sur des animaux infectés. Quelques-uns de ces nouveaux antibiotiques connaissent effectivement une activité *in vivo* sur l'animal et sont susceptibles d'une production commerciale. Cependant, la recherche continue car on estime par exemple à plus de cent mille le nombre d'antibiotiques différents produits par le seul genre *Streptomyces*.

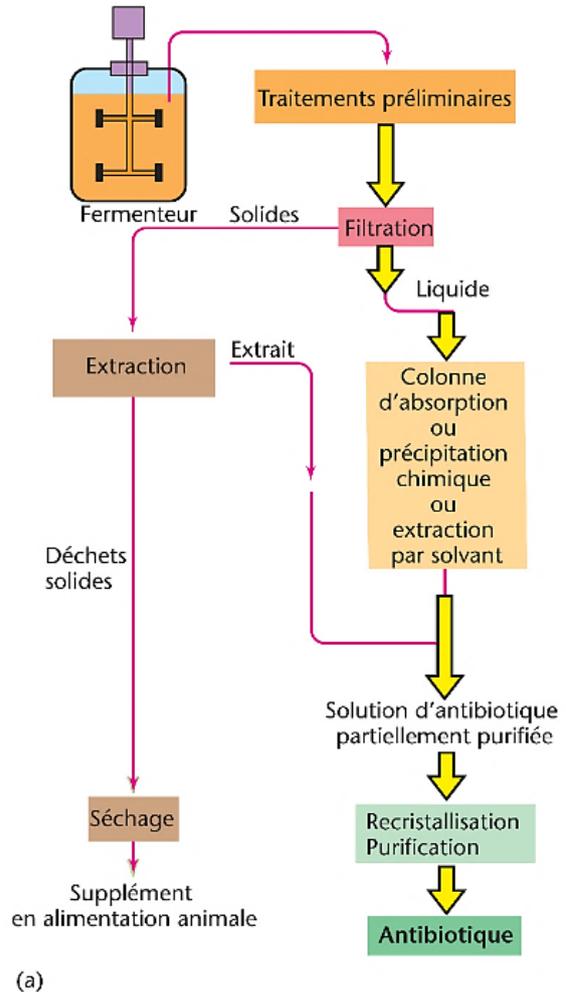
## Purification

Pour produire un antibiotique commercial, il faut d'abord le développer à grande échelle et ensuite le *purifier* de façon efficace. Comme l'antibiotique est présent à faible concentration dans le bouillon de fermentation, des méthodes d'extraction et de purification élaborées sont nécessaires. Si l'antibiotique est soluble dans un solvant organique, il sera relativement simple à purifier dans un volume de solvant qui sera réduit par évaporation. S'il n'est pas soluble, il faudra faire appel à des techniques de chromatographie d'adsorption, d'échange d'ions ou de précipitation chimique. Dans tous les cas, le but est d'obtenir un produit cristallisé de haute pureté.

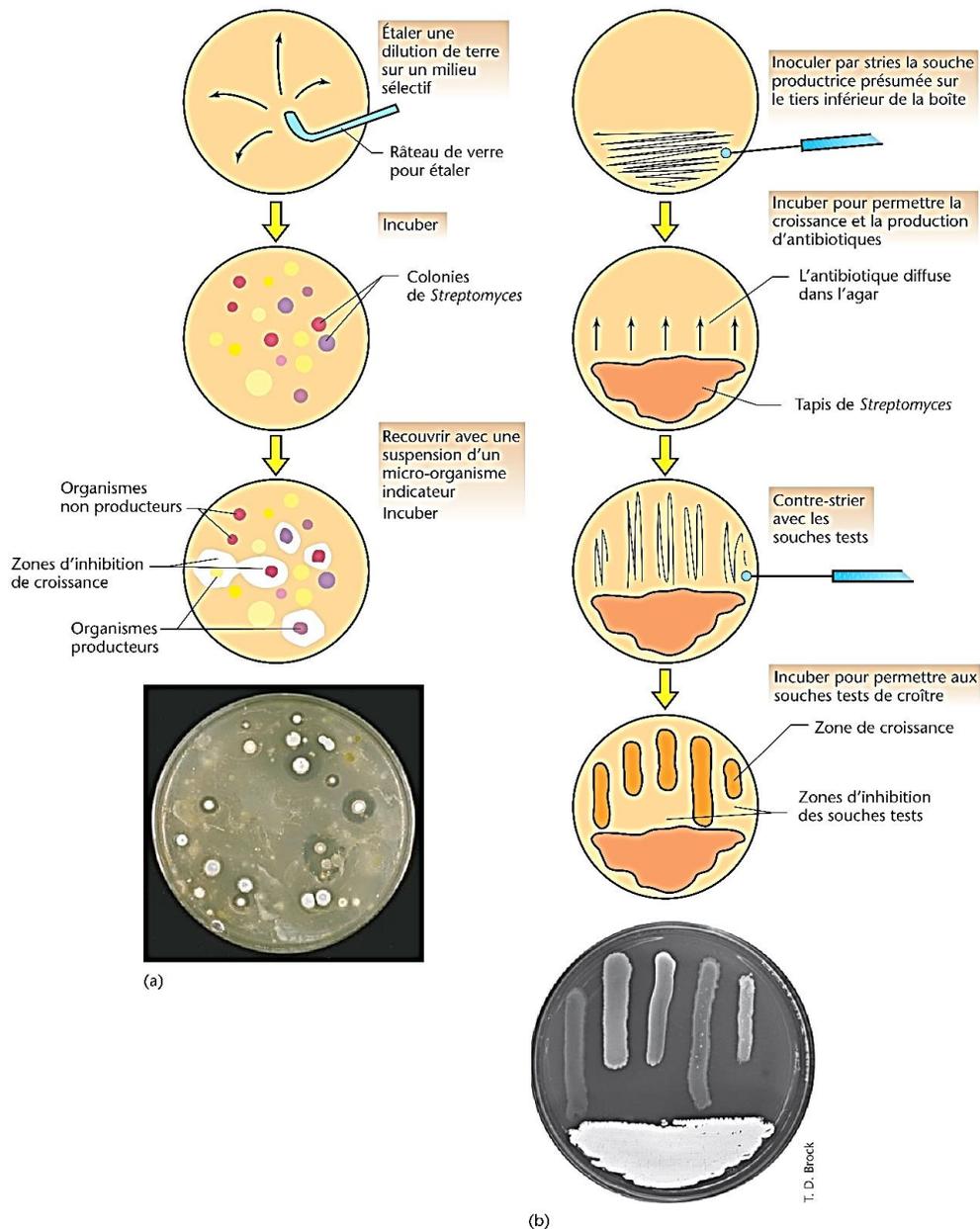
## Augmentation du rendement

Les rendements en antibiotique des souches naturelles sont souvent faibles et il faut donc sélectionner des *souches à haut rendement*. Pour obtenir de telles souches, il faut procéder à une mutagénèse de la culture initiale, cultiver les mutants sur boîte de Petri et les tester pour leur activité antibiotique. Le génie génétique a permis de gagner beaucoup de temps sur ce processus très long. Par exemple, l'*amplification des gènes* rend possible l'insertion de copies additionnelles du gène

intéressant dans la cellule au moyen d'un vecteur du type plasmide. Les altérations des processus de régulation permettent aussi d'augmenter les rendements. Une des difficultés de l'utilisation du génie génétique pour la production d'antibiotiques réside dans la multiplicité des étapes de biosynthèse impliquant de nombreux gènes. Il n'est pas évident de savoir à l'avance si la modification ou l'amplification de gènes va augmenter le rendement. Il est donc important d'identifier au préalable en recherche fondamentale les *étapes clés limitantes* du rendement ou régulatrices de la voie biochimique donnée. Ce processus de recherche pouvant être très long, des études empiriques sont menées simultanément. Le rendement final est une donnée commerciale critique de tous les produits pharmaceutiques. Même après démarrage de la production commerciale d'un antibiotique, la recherche continue souvent pour identifier ou produire des souches à haut rendement ou pour modifier le processus de façon à l'augmenter. Bien que les produits pharmaceutiques soient produits à petite échelle, en comparaison des produits chimiques de base et des produits agricoles, leur valeur économique pousse à obtenir les rendements les plus hauts dans les délais les plus courts. La durée de vie d'un antibiotique avant qu'il tombe dans le domaine public est de dix ans, au bout desquels la molécule pourra être produite par un concurrent ou par une filiale de la même société comme médicament générique.



**FIGURE Purification d'un antibiotique.** (a) Procédé d'extraction et de purification. (b) Installation d'extraction par un solvant d'un antibiotique du jus de fermentation. Les procédés de purification sont aussi importants que les facteurs microbiologiques pour obtenir un bon rendement en antibiotique.



**FIGURE Isolement et criblage de souches productrices d'antibiotiques.** (a) Isolement de souches utilisant un milieu sélectif pour *Streptomyces* et identification des souches productrices d'antibiotiques à l'aide d'un micro-organisme indicateur. La plupart des colonies sont de l'espèce *Streptomyces*, certaines produisant des antibiotiques, comme le montre la zone d'inhibition du microorganisme indicateur (*Staphylococcus aureus*) autour de ces colonies. (b) Test du spectre d'activité antibiotique d'un micro-organisme : le tiers de la boîte de Petri a été strié avec une culture d'un producteur (ici un *Streptomyces*) et la boîte a subi une incubation. Après croissance, cinq bactéries tests ont été inoculées perpendiculairement aux stries de *Streptomyces* et la boîte a été de nouveau incubée. Le défaut de croissance de certaines de ces souches près du *Streptomyces* démontre une activité antibiotique à l'encontre de plusieurs de ces souches tests. Souches testées (de gauche à droite) : *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium smegmatis*.

## Production industrielle de pénicillines

Une fois que la structure d'un nouvel antibiotique a été caractérisée, que son efficacité et sa non-toxicité ont été prouvées en expérimentation animale, ce qui peut prendre plusieurs années, il reste à effectuer les essais cliniques humains. Si ces derniers sont concluants, l'antibiotique est prêt pour la production commerciale. Ces obstacles ont été levés depuis longtemps pour les pénicillines et les tétracyclines, qui ont été produites par *tonnes* pour des usages médicaux et vétérinaires.

### Antibiotiques à cycle $\beta$ -lactame : pénicilline et dérivés

Les pénicillines sont une classe d'antibiotiques caractérisés par leur *cycle  $\beta$ -lactame* et sont produites par un grand nombre de moisissures des genres *Penicillium* et *Aspergillus*, ainsi que par certains procaryotes. Les pénicillines utilisables en médecine sont de plusieurs types et beaucoup sont issues de réactions catalytiques avec modification chimique ultérieure. Ceci a permis la synthèse d'une série de pénicillines, chacune ayant ses propres propriétés cliniques. La structure de base des pénicillines est l'acide *6-aminopénicillanique*, composé d'un anneau thiazolidine associé à un cycle  $\beta$ -lactame sur lequel est greffée une chaîne latérale variable en position 6.

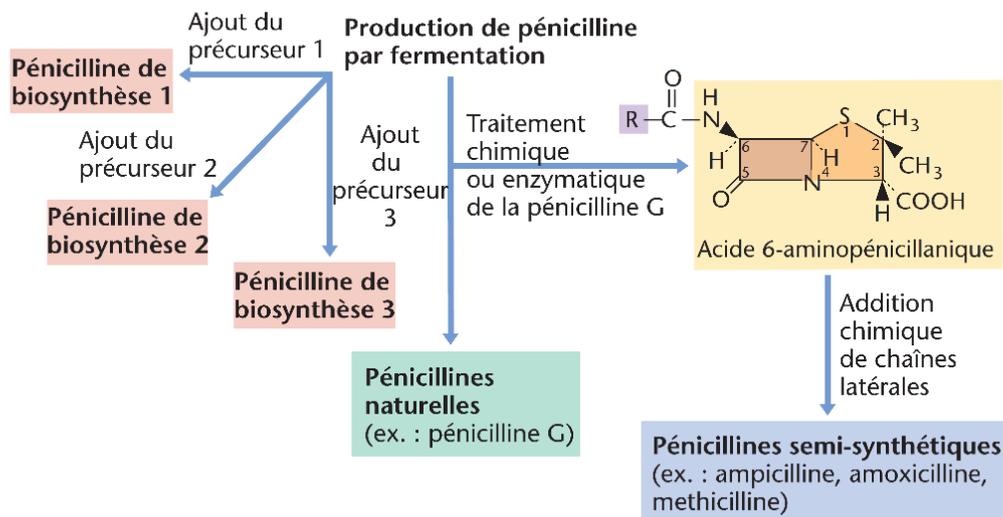
Les **pénicillines naturelles** sont produites sans addition de ces chaînes ; les **pénicillines de biosynthèse** le sont en ajoutant au milieu de culture le *précurseur de la chaîne latérale variable*. Pour produire les pénicillines les plus utiles, actives contre les *bactéries Gram négatif*, on utilise une approche combinée de fermentation et de chimie. Dans ce cas, une pénicilline naturelle issue de fermentation est coupée par voie enzymatique ou chimique pour donner du 6-APA ; ce dernier est ensuite modifié chimiquement par addition d'une chaîne latérale. Ces **pénicillines semi-synthétiques** ont beaucoup d'avantages cliniques : elles ont typiquement un large spectre d'activité, peuvent être administrées de façon orale, et donc ne nécessitent pas d'injection ; l'*ampicilline* en est un bon exemple. La variation des chaînes latérales permet également de contrecarrer les phénomènes d'apparition de résistance à un antibiotique donné. C'est pourquoi les pénicillines semisynthétiques représentent la majorité des pénicillines produites.

### Production d'antibiotiques à cycle $\beta$ -lactame

La pénicilline G est produite par *Penicillium chrysogenum* dans des fermenteurs de 40 000 à 200 000 litres. C'est un métabolite secondaire qui n'apparaît qu'une fois la source de carbone presque épuisée. En ajoutant du carbone et de l'azote au niveau adéquat, la production peut être poursuivie pendant plusieurs jours. L'un des ingrédients majeurs des milieux de culture pour produire de la pénicilline est la liqueur de trempage de maïs, qui contient de l'azote et des facteurs de croissance. La source de carbone est le *lactose*, obtenu généralement à partir des sérums de fromagerie. Hormis la question de coût, des concentrations élevées en glucose réprimeraient la production de pénicilline. Le glucose n'est donc ajouté que quand le lactose devient limitant et que la biomasse est devenue importante afin d'obtenir un rendement maximal en pénicilline. La pénicilline est excrétée dans le milieu ; après élimination des cellules par filtration, on abaisse le pH pour faciliter son extraction dans un solvant organique. Après concentration dans le solvant, l'antibiotique est réextrait dans une phase aqueuse basique, à nouveau concentré puis cristallisé.

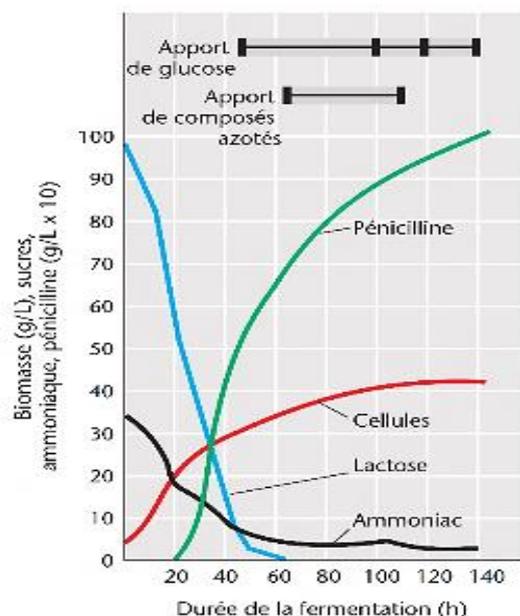
### Autres antibiotiques à cycle $\beta$ -lactame

On trouve parmi ceux-ci les *céphalosporines*, qui contiennent un noyau dihydrothiazine au lieu d'un noyau thiazolidine. L'origine des céphalosporines est le champignon *Cephalosporium acremonium*, mais un certain nombre d'autres champignons ainsi que des procaryotes produisent des antibiotiques avec ce type de cycle. Un grand nombre de céphalosporines synthétiques sont produites de la même façon que les pénicillines semi-synthétiques. Elles sont intéressantes d'un point de vue clinique car peu toxiques et pourvues d'un **large spectre d'activité**.



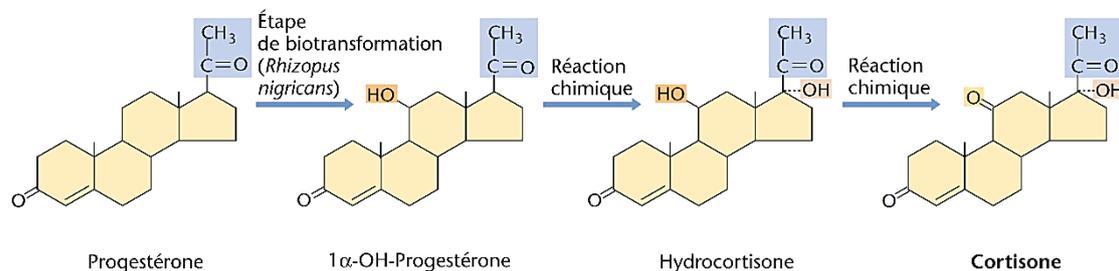
**FIGURE Production industrielle de pénicillines.** Le cycle  $\beta$  lactame figure en marron foncé. La fermentation classique par des souches à haut rendement en pénicilline de *Penicillium chrysogenum* conduit aux pénicillines *naturelles*. Si on ajoute des précurseurs spécifiques pendant la fermentation, on peut obtenir diverses pénicillines *biosynthétiques*. Les pénicillines *semi-synthétiques* sont produites par addition d'une chaîne latérale au noyau de l'acide 6-aminopénicillanique (groupement R en violet). Ce sont celles qui ont la plus grande activité clinique, car elles sont typiquement actives contre des *bactéries* Gram négatif.

**FIGURE Cinétique de production de pénicilline par *Penicillium chrysogenum*.** Notez comment la production de pénicilline démarre quand les cellules entrent en phase stationnaire de croissance et lorsque carbone et azote sont épuisés. L'alimentation en nutriments permet de maintenir la production de pénicilline à un niveau élevé.



## Procédés de biotransformation des stéroïdes

Les stérols ont un rôle important dans les membranes des eucaryotes . Les **stéroïdes** sont des dérivés des stérols et sont des hormones animales régulant de nombreux processus métaboliques. Certains stéroïdes sont utilisés comme médicaments en médecine humaine : c'est le cas du groupe des *corticoïdes* qui réduisent l'inflammation et sont efficaces pour contrôler les symptômes de l'arthrite et des allergies. Un autre groupe, composé des *oestrogènes* et des *stéroïdes androgènes*, est utilisé pour contrôler la fertilité humaine ou pour stimuler la construction musculaire. Les stéroïdes peuvent être obtenus par synthèse chimique complète, mais ceci est compliqué et coûteux. Certaines étapes clés peuvent être effectuées bien plus efficacement par des microorganismes ; la production de stéroïdes inclut typiquement une étape microbienne. La plupart des stéroïdes sont produits par **biotransformation** en ajoutant à la culture un précurseur du stérol au moment approprié. Ce dernier est obtenu à partir d'une source bon marché, en général le stigmasterol, un sous-produit de l'industrie du soja . **Cortisone et hydrocortisone** Ces corticoïdes servent à réduire les inflammations et les démangeaisons mineures de la peau et à lutter contre les allergies. Le champignon *Rhizopus nigricans* effectue une étape clé de biotransformation : l'hydroxylation stéréospécifique d'un précurseur de la cortisone . On trouve dans la plupart des biotransformations des stéroïdes des hydroxylations stéréospécifiques de ce type en un site caractéristique. Un certain nombre de champignons sont utilisés à cet effet car ils effectuent cette réaction bien plus spécifiquement et plus économiquement qu'une étape de synthèse chimique ne le ferait. La production de stéroïdes est un très gros marché mondial, estimée à 800 t/an, et centrée sur quatre stéroïdes : l'*hydrocortisone*, la *cortisone*, la *prednisone* et la *prednisolone*.



**FIGURE Exemple de biotransformation : la production de cortisone par le champignon *Rhizopus nigricans*.** La première étape de la production de cortisone, la formation de la 11 $\alpha$ -hydroxylation de la progestérone est une biotransformation typique. Cette réaction très spécifique, et de plus stéréospécifique, est réalisée par le champignon et permet d'éviter une étape de synthèse chimique difficile. Les étapes suivantes sont réalisées par voie chimique classique.