



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique



Université Abderrahmane Mira de Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

Mémoire de fin cycle

En vue de l'obtention du diplôme
D'ingénieur d'Etat en Génie Biologique
Thème

**Influence de trois sources de carbone sur la
production de la pénicilline V synthétisée par
*Penicillium chrysogenum***

Membres de Jury :

Présenté par :

Présidente : M^{me} BOUCHERBA N. UAMB

M^{lle} : Tahraoui Ismahene.

Promoteur : M^r KECHA M. UAMB

Co promoteur : M^r BELCACEMI A (Saida).

Examinatrice : M^{me} BOUKTIT N. UMB

Promotion 2012/ 2013

Dédicaces

- ✚ *Je dédie ce modeste travail à mon père qui, derrière son fort caractère cache tant de tendresse et d'émotions ;*
- ✚ *A ma mère, avec son amour et sa foi de me voir réussir ;*
- ✚ *A ma grand mère que j'estime énormément et qui m'a soutenu jusqu'à la fin de mon stage pratique, je n'oublierai jamais son amour, sa gentillesse et sa générosité ;*
- ✚ *A ma tante Samia qui m'a encouragée et beaucoup aidée pour réaliser le stage au niveau de Saïdal ;*
- ✚ *A mes tantes Mahdia, Amel, Fatima ainsi a leurs adorables enfants que j'estime tant ;*
- ✚ *A ma tante Sabiha, exceptionnellement ;*
- ✚ *A mes deux sœurs Louiza et la petite et adorable Anaïs que j'aime, ainsi que mon frère Abd el Razek que j'adore je leurs souhaite du bonheur et de la réussite dans leurs études ;*
- ✚ *A tous les autres membres de la famille sans exception ;*
- ✚ *A ceux que j'aime tant et sont ma joie de vivre , j'espère qu'ils se reconnaîtront ;*
- ✚ *A tous mes amis qui m'ont beaucoup encouragé durant les moments difficiles*
- ✚ *A tous ceux qui me connaissent et surtout qui m'aiment*

Ismahene

Remerciements

Je remercie le Dieu, le seul et le miséricordieux, qui m'a pleinement accordé de l'énergie, de la santé et surtout de la volonté et du courage pour pouvoir accomplir ce modeste travail.

Je tiens à remercier très particulièrement Mr Kecha d'avoir accepté de m'encadrer et pour toute l'aide qu'il ma fournie.

Un grand Merci pour Mrs Belkacemi Abed et Messis A. Aziz, qui ont assuré le suivi de mon stage au niveau du complexe ANTIBIOTICAL SAIDAL ; grâce à eux, j'ai pu réaliser ce modeste travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes vifs remerciements.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux membres de jury qui ont accepté d'évaluer mon travail.

Mes remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire : Mr Benouda Smail, Dergua Khaled pour leurs précieuses aides, sans leurs efforts, ce travail n'aura pas eu lieu.

Sans oublier khalti Elyamna, qui m'a beaucoup soutenue durant toute la période de stage.

Enfin je remercie ma famille de m'avoir soutenue tout au long de mes études.

Dédicaces	
Remerciements	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	

SOMMAIRE

Introduction.....	01
--------------------------	-----------

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Présentation du lieu de stage

I.1. Présentation groupe SAIDAL.....	02
I.2. Unités principales du complexe ANTIBIOTICAL.....	02

II. Les antibiotiques

II.1. Définition	03
II.2. Généralités sur Les beta-lactamines.....	03
II.3. Généralités sur la pénicilline V.....	06
II.3.1. Historique.....	06
II.3.2. Biosynthèse de la pénicilline V	07
II.3.3. Mode d'action de la pénicilline V.....	09

III. Le germe producteur

III.1. Généralités sur <i>Penicillium chrysogenum</i>	09
III.2. Classification.....	09
III.3. Paramètres influençant la croissance	10

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériels et méthodes

I. Matériels

I.1. Matériels biologiques.....	12
I.1.1. Microorganisme producteur « <i>Penicillium chrysogenum</i> ».....	12
I.1.2. Microorganisme cible	12
I.2. Matériels analytiques.....	12
I.3. Sucres utilisé et leurs concentrations	12
I.4. Milieux de culture	13

II. Méthodes

II.1.Revivification de la souche.....	13
II.1.1. Réactivation sur milieu solide.....	13
II.1.2. Propagation des spores.....	14
II.2. Culture en batch dans des fioles agitées.....	14
II.2.1. Pré-culture	14
II.2.1.1. Inoculation du milieu germinatif.....	15
II.2.1.2. Estimation de la biomasse.....	15
II.2.2. Culture	15
II.2.3. Dosage de la pénicilline V.....	16
II.2.3.1. Dosage par spectrophotométrie UV-Visible.....	16
II.2.3.2. Dosage par chromatographie liquide a haute performance.....	17
II.3.Test d'activité biologique.....	18
II.3.1. Méthode de diffusion sur agar (test des disques).....	18

RESULTATS ET DISSCUSSION

I. Résultats et discussions

I.1. Revivification des souches	20
I.2. Culture en batch dans des fioles agitées	21
I.2.1. Pré-culture.....	21
I.2.2. Culture	22
I.2.2.1. Mesure du pH.....	22
I.2.2.2. Mesure de la biomasse	24
I.2.2.3. Mesure du titre de la pénicilline V par spectrophotométrie	26
I.2.2.4. Dosage par HPLC.....	29
I.3. Test d'activité biologique	33
Conclusion	35

Références bibliographiques

Annexes

LISTE DES TABLAUX

Tableau I : Classification des β -lactamines.....	5
Tableau II : Classification de <i>Penicillium Chrysogenum</i>	10
Tableau III : Sucres utilisés et leurs concentrations.....	13
Tableau IV : Concentrations de la pénicilline V utilisées dans l'antibiogramme.....	19
Tableau V : Résultats du pH et de la sédimentation après 40 heures de germination des spores dans le milieu « VMP »V pour les souches S ₁ et S ₂	21
Tableau VI : Résultats de la productivité de la pénicilline V déterminé par HPLC au cours de la deuxième fermentation.....	29
Tableau VII : Résultats du test d'activité de la pénicilline V vis-vis de <i>Bacillus subtilis</i>	34
Tableau VIII : Résultats des absorbances des différentes concentrations du standard de la Pénicilline V.....	annexe IX

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Le noyau β -lactame.....	04
Figure 02 : Représentation moléculaire des pénicillines	06
Figure 03 : Les étapes de la biosynthèse de la pénicilline G.....	08
Figure 04 : Apparition des colonies typiques sur milieu « CMP »V après 14 jours d'incubation a 25°C.	20
Figure 05 : Propagation des spores sur la surface de la gélose inclinée contenant le milieu « CMP »V après 14 jours d'incubation.....	20
Figure 06 : Evolution du pH en fonction du temps dans les milieux fermentatifs contenant différentes sources de carbone pour la souche S1.....	22
Figure 07 : Evolution du pH en fonction du temps dans les milieux fermentatifs contenant différentes sources de carbone pour la souche S2	23
Figure 08 : Evolution de la biomasse en fonction du temps dans les milieux fermentatifs contenant différentes sources de carbone pour la souche S1.....	24
Figure 09 : Evolution de la biomasse en fonction du temps dans les milieux fermentatifs contenant différentes sources de carbone pour la souche S2.....	24
Figure 10 : Evolution du titre de la penicilline V en fonction du temps dans les milieux fermentatifs contenant différentes sources de carbone.....	26
Figure 11 : Evolution du titre de la penicilline V en fonction du temps dans les milieux fermentatifs contenant différentes sources de carbone.....	26
Figure 12 : Chromatogramme des standards de la pénicilline V et du précurseur POAA.....	30
Figure 13 : Evolution du titre de la pénicilline V et du précurseur POAA déterminé par HPLC au cours du test de fermentation dans le milieu contenant le lactose comme source de carbone.....	31

Figure 14 : Evolution du titre de la pénicilline V et du précurseur POAA déterminé par HPLC au cours du test de fermentation dans le milieu contenant l'amidon comme source de carbone.....	31
Figure 15 : Evolution du précurseur POAA déterminé par HPLC au cours du test de fermentation dans le milieu contenant le glucose comme source de carbone.....	32
Figure 16 : Evolution du précurseur POAA déterminé par HPLC au cours du test de fermentation dans le milieu contenant le saccharose comme source de carbone.....	33
Figure 17 : Effet antimicrobien de la pénicilline V sur <i>Bacillus subtilis</i>	34
Figure 18 : Courbe d'étalonnage du standard de la pénicilline V.....	annexes IX

Liste des abréviations

6 APA :	Acide 6 Aminopénicillinique
ACV :	δ - (L- aminoadipyl -L- cysteinyl -D- valine)
CMP :	Culture Medium Penicillium
EPS :	Eau peptonée stérile
FMP :	Fermentative Medium Penicillium
IAT :	Isopénicilline N acyl transférase
IPN :	Isopénicilline N
L-α- AAA :	Acide L- α aminoadipique
P :	<i>Penicillium</i>
PLP :	Protéine liant pénicilline
POAA:	Phenoxy acide acétique
Slant :	tube à essai grand format
VMP :	Végétative Medium Penicillium

Introduction

L'antibiothérapie est le moyen de défense majeur contre les infections microbiennes **(Delaunay et al., 2013)**.

Parmi les fermentations industrielles, la production d'antibiotiques est l'un des secteurs les plus importants. Le criblage de souches productrices d'antibiotiques naturels a conduit à la production des antibiotiques dits de première génération **(Delaunay et al., 2013)**.

Ces antibiotiques sont des métabolites secondaires qui sont des molécules généralement produites par des organismes lors de la phase appelée idiophase par opposition à la phase de croissance active appelée trophophase. **(Delaunay et al., 2013)**.

Les champignons sont des producteurs prolifiques de métabolites secondaires. Les antibiotiques comme les pénicillines et les céphalosporines sont largement prescrites comme médicaments et sont classées parmi les ventes les plus importantes des produits pharmaceutiques **(Hawksworth, 1991 ; Whalley, 1994)**.

La production des métabolites secondaires peut être réalisée sous trois conditions : il est nécessaire d'avoir de la biomasse, des précurseurs, ainsi que des enzymes capables de transformer ces précurseurs. **(Voelker et Altaba, 2001)**.

Dans cette optique que notre travail s'inscrit, tous en étant le souci de l'entreprise ANTIBIOTICAL. Celle-ci ne cesse de vérifier la productivité des souches de *Penicillium Chrysogenum*, en effet le laboratoire de microbiologie industrielle de l'entreprise se trouve confronté au problème de la baisse de productivité des souches dans le milieu de fermentation standard.

Notre travail a consisté d'étudier, lors de la production de la pénicilline V par voie fermentative l'effet de la source de carbone sur sa productivité.

Deux souches appartenant à la collection du laboratoire, ont été testées sur un milieu technologique qui contient du lactose comme source de carbone et aussi sur trois autres milieux de fermentation, préparés avec des sources de carbone différentes : glucose saccharose et amidon.

I. Présentation du lieu de stage

I.1. Présentation groupe SAIDAL

Le groupe SAIDAL est une société par actions. Sa mission principale est de développer, de produire et de commercialiser des produits pharmaceutiques à usage humain et vétérinaire (**Aouni et Bitouri, 2006**). En 1997, l'entreprise SAIDAL a mis en œuvre un plan de restructuration qui s'est traduit par sa transformation le 02 février 1998 en groupe industriel SAIDAL, ainsi le complexe d'antibiotiques est devenu ANTIBIOTICAL filiale du groupe SAIDAL. Cette filiale située à MEDEA (80 Km au sud d'Alger), s'étend sur une superficie de 25 hectares dont plus de 19 hectares couverts, d'une capacité de production de 60 millions d'unités de vente spécialisée dans la production des médicaments antibiotiques et autres, dotée de toutes les installations nécessaires à leur fabrication. (**Aouni et Bitouri, 2006**).

I.1. Unités principales du complexe ANTIBIOTICAL

- Une unité à la pointe de la biotechnologie pour la production des principes actifs.
- Une unité des spécialités pharmaceutiques.
- Une imprimerie.
- Unité des services généraux et récupération des solvants.
- Station de traitement des effluents.
- Une centrale de maintenance.

II. Les antibiotiques

II.1.Définition

Les antibiotiques sont des composés chimiques élaborés par des microorganismes (bactéries ou champignons) ou par synthèse chimique qui agissent par inhibition de certain processus vitaux a l'égard des autres microorganismes **(Euzéby, 2004)**.

L'activité des antibiotiques se manifeste a de faibles doses sur les microorganismes, et n'ont pas de toxicité sur l'hôte. **(Mc Dermott et al., 2003)**.

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 la synthèse de la paroi bactérienne, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, acides nucléiques ou par inhibition compétitive dans ce cas l'antibiotique est un analogue structural, il interfère avec une fonction essentielle à la bactérie. **(Yala et al., 2001)**.

II.2.Généralités sur les β -lactamines

Les β -lactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus importante, aussi bien par le nombre et la diversité des molécules utilisables que par leurs indications en thérapeutique et en prophylaxie des infections bactériennes. La grande variété des β -lactamines bactéricides, une bonne diffusion tissulaire, une bonne tolérance et un faible nombre d'interactions médicamenteuses expliquent leur popularité et l'importance de leur utilisation, seules ou en associations, depuis plus de 60 ans. **(Cavallo et al., 2004)**.

La famille des β -lactamines comprend un grand nombre de molécules, toutes caractérisées par la présence d'un cycle β -lactame (figure 01), indispensable à l'activité antibiotique **(Cavallo et al., 2004)**.

Elles représentent une analogie structurale avec la terminaison D-ala-D-ala du précurseur du peptidoglycane. **(Tipper et Rominger, 1965 ; Neuhaus et Georgopapadakou, 1992)**.

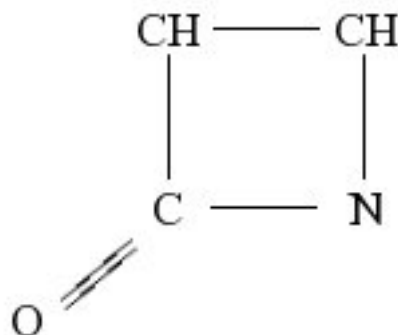
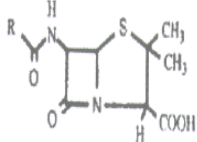
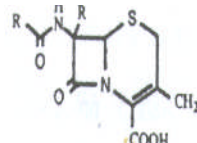
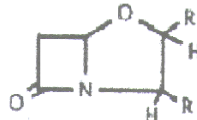
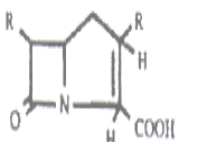
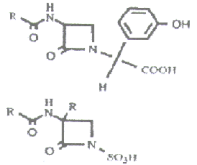


Figure 01 : Le noyau β -lactame (Cavallo et *al.*, 2004).

Les β -lactamines se composent de quatre groupes en fonction de leur structure chimique et leurs activités antibactériennes : les pénames, les cephèmes, les pénèmes et les monobactames (**voir tableau I**). On peut aussi ajouter les inhibiteurs des β -lactamases tel que l'acide clavulanique, qui ont une activité antibactérienne très faible mais qui peuvent être utilisés en association avec d'autres antibiotiques de la famille des β -lactamines : Ticarcilline-acide clavulanique et amoxicilline-acide clavulanique. (Cavallo et *al.*, 2004).

Tableau I : Classification des β -lactamines. (Brakhage, 1998).

Classe des betalactames naturels	Structures	Antibiotiques	Microorganismes producteurs	Bactéries	
Pénames		Penicillines	Penicillium chrysogenum p.notatum Aspergillus nidulans	Gram ⁺	Gram ⁻
Céphèmes ou (Ceph-3-em)		Cephalosporines Cephamycines Cephacines Chitinivorines	Acremonium chrysogenum (syn cephalosporin acrimonies) Paecilomyces persinicus	Streptomyces clavuligerus Nocardia lactamdurans	Flavobacterium sp. Lysobacter lactamgenus
Clavames ou Oxapénames		Acide Clavulanique	Streptomyces clavuligerus		
Carbapénèmes		Thienamycines Acides olivaniques Epithienamycines		Streptomyces clavuligerus S.olivaceus	Erwinia carotovora Seratia sp.
Monolactames		Nocardicines	Nocardia uniformis Subsp.tsuyamanensis		
		Monobactames			Agrobacterium radiobacter Pseudomonas acidophila

II.3. Généralités sur la pénicilline

II.3.1. Historique

En 1928, Fleming (1881-1955), professeur de bactériologie à Londres, observa sur une boîte de Pétri, qui contenait une culture de staphylocoques et qui avait été contaminée accidentellement par une moisissure, que les colonies de staphylocoques situées à proximité de la moisissure avaient été lysées. Il identifia cette moisissure comme étant un *Penicillium* et réussit à préparer un « jus de moisissure » qu'il appela pénicilline.

Ce n'est qu'en 1940 qu'une équipe de chercheurs d'Oxford, Florey, Chain et Heatley, réussit à obtenir une pénicilline concentrée, partiellement purifiée et stable. Le premier cas de septicémie à staphylocoque fut traité en 1941 à Oxford et, en 1943, les armées alliées commencèrent à recevoir des quantités importantes de pénicilline. (Cavallo et al., 2004).

La pénicilline V phénoxyméthylpénicilline est un antibiotique bactéricide de la famille des bêta-lactamines, du groupe des pénicillines naturelles, du type des phénoxypénicillines. La phénoxypénicilline est l'acide (2S,5R,6R)-3,3-diméthyl-7-oxo-[(phénoxycétyl)amino]-4thia-1-azabicycloheptane-2carboxylique, substance élaborée par certaines souches de *Penicillium notatum* ou par d'autres organismes apparentés, dans un milieu de culture additionné d'un précurseur de chaîne latérale (acide phénoxycétylique), ou obtenu par autre moyen (acylation de l'acide 6-aminopénicillanique). (Emily et al., 1996).

La pénicilline V ou phénoxyméthylpénicilline est administrable par voie orale. (Fauchère et Avril, 2002).

La structure de base des pénicillines consiste en un noyau thiazolidine fusionné à un noyau β -lactame. (Bejaoui, 1996).

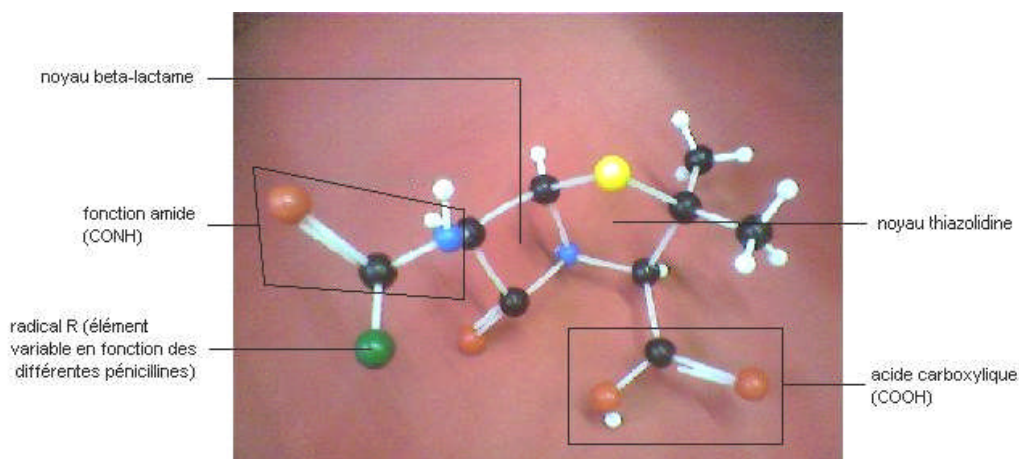


Figure 02 : Représentation moléculaire des pénicillines

Spectre d'activité des pénicillines naturelles (V et G)

Hormis la voie d'administration qui est différente (parentéral pour la pénicilline G et oral pour la pénicilline V), le spectre lui, est identique.

La pénicilline G et la Pénicilline V sont actives sur : les streptocoques (y compris le pneumocoque), entérocoques, méningocoques, gonocoques, *Corynebacterium diphtheriae*, *Listeria*, leptospires, *Treponema pallidum*, clostridies, fusobactéries.

Elles sont inactives sur: les staphylocoques producteurs de pénicillinases (bêtalactamases), les bacilles à Gram négatif. **(Zitouni, 2010).**

II.3.2. Biosynthèse des pénicillines et céphalosporines

La biosynthèse des pénicillines et des céphalosporines ont les deux premières étapes en commun **(Brakhage, 1998).**

Les pénicillines et les céphalosporines naturelles produites par les microorganismes eucaryotes ou procaryotes sont synthétisées par les mêmes trois acides aminées, l'acide L- α -aminoadipique, L-cystéine et L-valine. Chez les champignons, le L- α -AAA est dérivé de la voie spécifique des aminoadipates qui mène à la formation de la lysine. Il peut être aussi obtenu par le catabolisme de la lysine bien que la contribution de cette voie à la synthèse de la pénicilline n'est pas encore clarifiée **(Brakhage, 1998).**

Dans la première réaction de la voie de biosynthèse des pénicillines et des céphalosporines, il ya condensation des acides aminés précurseurs pour la formation du tri-peptide δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine(ACV).cette réaction est catalysée par une seule enzyme la ACV synthétase **(Brakhage, 1998).**

Dans la deuxième étape, il ya la transformation oxydative du tri peptide en une structure bi cyclique formée d'un noyau B-lactame et d'un noyau thiazolidinique qui est caractéristique aux pénicillines. Le composé résultant, l'Iso pénicilline N (IPN) possède une faible activité antibiotique, cette réaction est catalysée par l'Iso pénicilline N synthétase. L'Iso pénicilline N est le composé en commun entre les pénicillines et les céphalosporines **(Brakhage, 1998).**

Dans la troisièmes et la dernière étape de la biosynthèse de la pénicilline, la chaine latérale hydrophile du L- α -AAA de l'IPN est échangée par un groupement acyle hydrophobe

catalysée par l'acyle Coenzyme A : iso pénicilline N acyle transférase (IAT) (**Brakhage, 1998**).

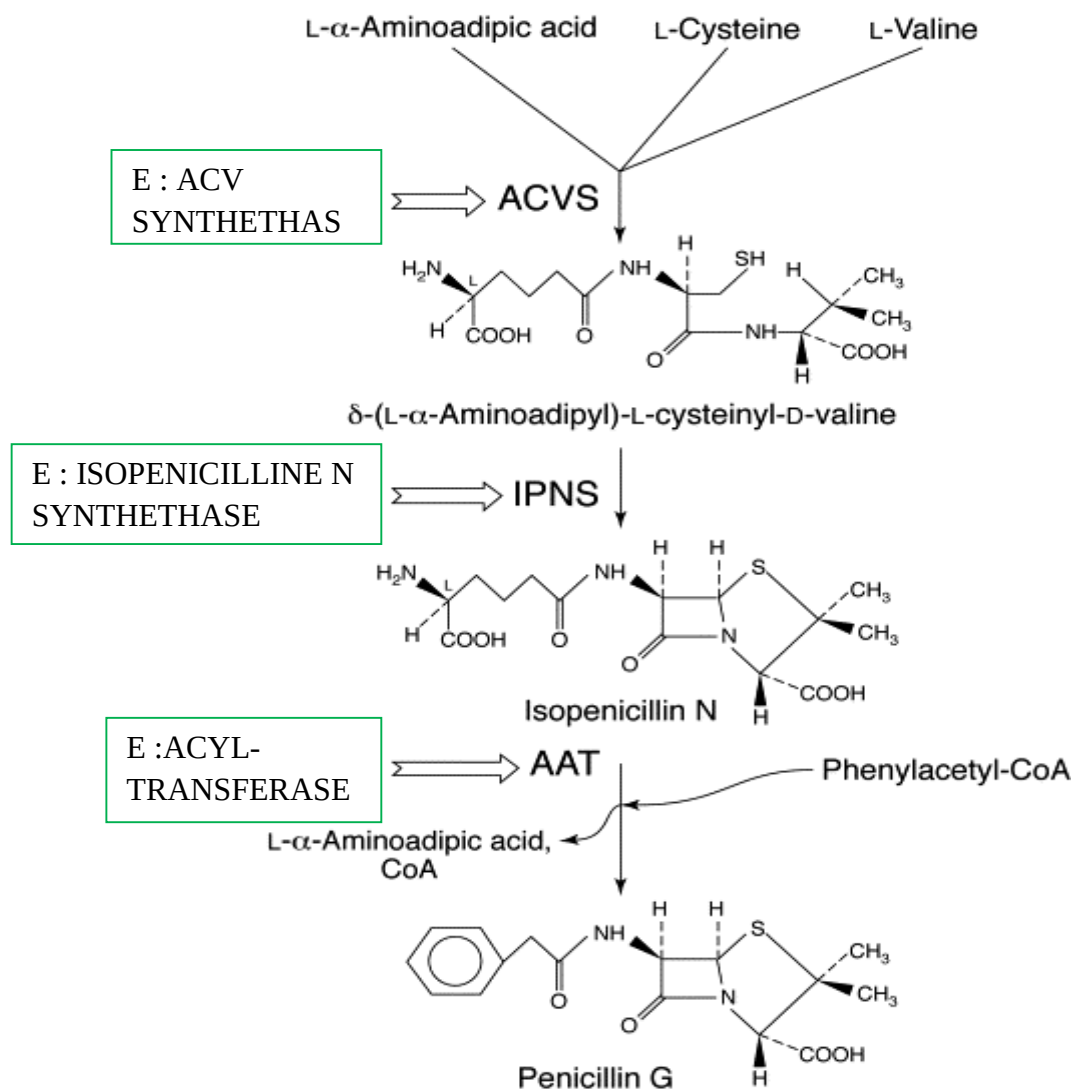


Figure 03 : Les étapes de la biosynthèse de la pénicilline G (**Penalva et al ., 1998**).

Pour la pénicilline V le radical et le phenoxy acide acétique. (**Emily et al., 1996**).

II.3.3. Mode d'action de la pénicilline V

Le mode d'action de la pénicilline ou les bêta-lactamines est la liaison de manière covalente aux protéines de liaison des pénicillines (PLP) qui sont impliquées dans la synthèse du peptidoglycane, rendant ainsi inactives ces enzymes, ce qui aboutit à l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi bactérienne. Les PLP qui sont insérés au niveau de la face externe de la membrane cytoplasmique vont reconnaître le cycle bêta lactame du fait de son analogie structurale avec leur substrat naturel et vont s'y lier, ceci entraînera la destruction progressive de la paroi cellulaire et aboutira à la mort de la bactérie. La résistance naturelle aux bêta lactamines des bactéries Gram (-) est liée à la capacité de diffusion de ces molécules au niveau des porines de la membrane externe. L'affinité des bêta lactamines pour les différentes PLP conditionnera leur activité sur chaque espèce bactérienne. (Zitouni, 2010).

III. Le germe producteur

III.1. Généralités sur *Penicillium chrysogenum*

Penicillium chrysogenum a une grande importance économique, écologique et médicale. En effet, il peut causer la dégradation de produits entreposés. De plus, il est utilisé dans l'industrie et la fermentation alimentaire, et il existe dans différents types de sols, d'air ambiant, d'aliments et d'eau (Domsch *et al.*, 1980; Klich, 1993; Asan, 2000; Fischer et Dott, 2003; Eltem, 2004).

Penicillium chrysogenum est caractérisé par un thalle à croissance rapide, vert bleu ou vert jaune, devenant gris ou brun, souvent surélevé au centre, sillonné radialement, velouté ou un peu floconneux. Revers jaune vif à brun jaune, parfois brun rouge. Exsudat jaune plus ou moins foncé à brun jaune et pigment jaune diffusible, généralement il présente une odeur aromatique, pénicilles asymétriques et souvent complexes, à ramifications divergentes. Leurs extrémités sont porteuses de plusieurs phialides, porteuses de conidies, sub globuleuses, disposées en longues colonnes irrégulières (Botton *et al.* , 1990).

III.2. Classification de *Penicillium Chrysogénum*

Penicillium chrysogenum est un champignon filamenteux appartenant à la classe des Deutéromycètes ou «champignons imparfaits» en raison de leur mode de reproduction asexuée, sa forte présence dans l'environnement et son importante sporulation. Ce sont des

ascomycètes qui ont perdu la partie sexuée de leur cycle biologique. **(Bouchet Ph et al ., 1999)** .

Le tableau suivant nous renseigne sur la nouvelle classification basé sur la morphologie du *P.chrysogenum* **(Hoog et al., 2000)**.

Tableau II : Classification de *Penicillium Chrysogenum* (Hoog et al., 2000).

Subdivision	Pezizomycotina
Classe	Eurotiomycetes
Ordre	Eurotiales
Famille	Trichocomaceae
Genre	<i>Penicillium</i>
Espèce	<i>Penicillium Chrysogenum</i>

III.3. Facteurs influençant la croissance du *P.chrysogenum*

Penicillium chrysogenum est un microorganisme hétérotrophe: il peut se développer seulement si le milieu lui apporte les éléments nutritifs nécessaires. Sa croissance est aussi dépendante d'un certain nombre de paramètres intrinsèques et extrinsèques du milieu. **(Cahagnier, 1998)**.

Activité en eau (Aw)

Penicillium chrysogenum est un microorganisme xérotolérant. Il se développe à des Aw voisines de 20 MPa (mega pascal) à 25°C ; il peut donc croître dans les aliments pauvres en eau comme les céréales au cours de stockage, les fruits secs, les produits dont l'activité hydrique a été réduite (produits de salaison sèche, confitures). **(Castegnaro et Pfohl-Leskowicz,2002)**.

pH

Penicillium chrysogenum peut se développer dans une large gamme de pH ; il se développe normalement pour des pH compris entre 3 et 8, sa croissance étant normalement optimale entre 5 et 6. **(Cahagnier, 1998)**.

Présence d'oxygène

Penicillium chrysogenum est un microorganisme aérobie ; il a besoin d'oxygène pour une croissance normale. Toutefois, son développement est peu affecté par des teneurs de 10 fois plus faibles (2,1%) que celle de l'atmosphère. En conséquence il pourra se développer

sur les denrées alimentaires conservées dans une atmosphère pauvre en oxygène. (**Bourgeois, 1989**).

Température

Penicillium chrysogenum est mésophile : la croissance de ses hyphes est optimale entre 20 et 25°C. En dehors de cet intervalle de température, les hyphes se développent plus lentement. Les spores de moisissures mésophiles ne peuvent pas germer à une température inférieure à 5°C, mais elles peuvent résister longtemps aux basses températures allant jusqu'à -20°C (**Bourgeois, 1989 ; Julien, 2002 ; Pitt et Hocking , 1999**).

Lumière

La lumière favorise la maturation des conidies et la germination des spores. Les moisissures sont, généralement, indifférentes à l'action de lumière. (**Pfohl-Leszkowicz, 2001**).

Présence d'insectes

Les insectes représentent les principaux vecteurs de spores de moisissures au champ et dans les lieux de stockage (**Pfohl-Leszkowicz, 2001**). Les insectes, en dégradant la paroi des grains, favorisent la contamination par les moisissures et la production des mycotoxines.

I. Matériels

I.1. Matériels biologiques

I.1.1. Champignon « *Penicillium chrysogenum* »

Les souches nous ont été fournies par le laboratoire de microbiologie industrielle du complexe ANTIBIOTICAL SAIDAL de Médéa .Elles étaient conservées dans une culture en milieu gélosé incliné dans un tube a essai grand format (slant) a 4°C.

P .Chrysogenum NPSQV1 LORDO 11 ,5 est fournie par un partenaire italien (ALCHIM TECH) en 2002.Cette souche a été importée sous forme lyophilisée. Cette dernière, réactivée le 03 mars 2003, est conservée sur Quartz le 19 mars 2003 avec une productivité de 41 538UI/ml.

I.1.2. Microorganisme cible

Un seul germe sensible à la pénicilline V est utilisé pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne.

Bactérie à Gram positif

 *Bacillus subtilis* ; ATCC 6633

I.2. Matériels analytiques

La liste des appareillages, petits matériels et réactifs figure en annexe I

I.3. Sucres utilisés et leurs concentrations

Le choix des sources de carbone a porté sur tous les composés glucidiques que la souche *P.chrysogenum* est capable de métabolisés.

Le choix des concentrations est basé sur la nature des sucres ; monosaccharide (glucose) disaccharide (saccharose) et polysaccharide (amidon) comparant a la concentration du disaccharide (lactose 120g/l) utilisée dans le milieu technologique avec une optimisation basé sur le pH technologique (6,1-6,5) lors de la préparation des milieux fermentatifs.

Tableau III : Sucres utilisés et leurs concentrations

Sucres	Concentrations
Lactose (standard)	130 g/l
glucose	200g/l
saccharose	150g/l
amidon	80g/l

I.4. Milieux de culture

La composition et la préparation des milieux de culture figurent en annexes :

Annexe II : milieu de réactivation de la souche (CMP) V

Annexe III: milieu de germination de la souche (VMP) V

Annexe IV: milieu de fermentation technologique contenant le lactose comme source de carbone (M1) V

Annexe V: milieu de fermentation contenant le glucose comme source de carbone (M 2) V

Annexe VI: milieu de fermentation contenant le saccharose comme source de carbone (M3) V

Annexe VII: milieu de fermentation contenant l'amidon comme source de carbone (M4) V

II. Méthodes

II.1. Revivification de la souche

II.1.1. Réactivation sur milieu solide

La souche à réactiver est PV 04/07/11, inoculée le 07 juillet 2011 et conservée le 21 juillet 2011 ; sa souche mère est PV 03/03/03

La suspension de spores est décongelée à une température 37°C dans une chambre d'incubation.

Les spores sont récupérées à partir de la gélose ensemencée puis resuspendues dans 06 ml d'EPS à 0,1 %. A partir des tubes à essai contenant 10 ml d'EPS à 0,1% une série de dilutions allant jusqu'à 10^{-10} est préparée contenant 1ml de la solution mère. Les boîtes de pétri contenant 25 ml du milieu « CMP » V sécher au paravent a 37°C pendant 2-3 jours sont ensemencées avec 0,2 ml de chaque solution diluée et étaler avec un râteau stérile sur toute la surface des boîtes. Les boîtes sont incubées dans la chambre thermostatique (25°C/55% d'humidité) pendant 14 jours.

II.1.2. Propagation des spores sur une gélose inclinée

Après maturité (14^{ème} jour), des colonies sont choisies répandant à la morphologie des colonies typiques et qui présentent les caractéristiques suivants :

-  diamètre : 8-10 mm
-  couleur : vert avec petit cercle autour clair au milieu
-  pigmentations sur l'agar : absente
-  sporification : centre élevé avec les sept radiaux irréguliers. **(AFAQ ISO 9002).**

Deux colonies sont prises de la boîte de dilution 10^{-7} , réactivée sur milieu gélosé avec la souche PV 04/07/11.

La colonie (1) a donné naissance a une souche PV 05/01/13

La colonie (2) a donné naissance a une souche PV 05/02/13

Ces colonies sont prélevées a l'aide d'une spatule stérile et écrasées séparément dans des tubes Potter contenant 2ml d'eau peptonée stérile 0,1%.Cinq tubes a essai grand format contenant 50 ml de la gélose (CMP) V inclinée sont inoculés avec 0,2 ml de la suspension de spores obtenues, puis étaler sur toute la surface de la gélose. Les tubes a essai grand format sont incubés pendant 14 jours, dans la chambre thermostatique (25°C/55% d'humidité).

II.2. Culture en batch dans des fioles agitées

La fermentation s'effectue en deux étapes :

II.2.2. Pré-cultures

La germination est une étape permettant de faire germer les spores .De ce fait, les tubes a essai (Slant) contenant les spores qui présente un tapis verdâtre de ces souches sont choisies puis un raclage (scraping) est effectué a l'aide d'une pipette stérile et 6 ml d'EPS 0,1% sont rajoutés pour obtenir une suspension sporale.

II.2.2.1. Inoculation du milieu germinatif

La suspension de spores ainsi obtenue sert à inoculer les fioles d'Erlenmeyer de 500 ml, contenant 35ml du milieu « VMP»V a raison de 0,5ml par fiole.

Les fioles sont Incubées dans une chambre thermostatique à 25°C et 55% d'humidité sous agitation rotative, continue de 220 rpm pendant 40 h.

Après 40 h de germination, des mesures de la sédimentation (estimation de la biomasse), du pH sont effectuées ainsi qu'une observation microscopique est réalisé pour confirmer l'absence de contamination.

Le pH du milieu doit être compris entre 5,3 et 5,7. **(AFAQ ISO 9002).**

II.2.2.2. Estimation de la biomasse

L'évolution de la biomasse durant la fermentation est estimée selon le mode opératoire de SAIDAL **.(AFAQ ISO 9002).**

Pour cela 10 ml de culture sont prélevés chaque 24h dans un tube conique gradué a 10 puis centrifugés a une vitesse de 3000tr/min pendant 10 min.

Pour déterminer le pourcentage de sédimentation une lecture est effectuée à partir du tube conique.

Calcul :

$\text{Sédimentation (\%)} = \text{lecture} \cdot 10$

NB : le pourcentage de la sédimentation doit être compris entre 15% et 20% **(AFAQ ISO 9002).**

II.2.3. Culture

Les fioles d'Erlenmeyer de 500ml, contenant chacune 35ml du milieu fermentatif, a différents sources de carbones ; « M1 » V, « M2»V, « M3»V, « M4»V, sont respectivement inoculées avec 04 ml du milieu de germination.

NB : pour chaque souche, quatre fioles ont été préparées

Les fioles sont incubées dans la chambre thermostatique (25°C/55% d'humidité) sous agitation de 220 rpm pendant 09 jours.

Des le 4^{ème} jour de fermentation une observation microscopique est effectuée pour confirmer l'absence de contamination, des mesures de la sédimentation, de pH, sont réalisées ainsi qu'une détermination de la productivité de chaque colonie par mesure du titre de la pénicilline V par spectrophotométrie et par HPLC.

NB : Une deuxième fermentation dans les mêmes conditions est réalisée afin de confirmer les résultats.

II.2.4. Dosage de la pénicilline V

Le dosage de l'antibiotique a commencé du 4^{ème} jour jusqu'au 7^{ème} jour de la fermentation, ceci afin d'évaluer la productivité des souches. La recherche du titre de la pénicilline V se fait par deux méthodes :

II.2.4.1. Dosage par spectrophotométrie UV-Visible

La méthode se base sur le fait que la pénicilline V réagit rapidement avec l'hydroxylamine pour donner un acide hydroxylamine qui forme une couleur pourpre avec l'ion ferrique dont la quantité peut être déterminé par colorimétrie

L'inversion des réactifs est utilisée pour obtenir des valeurs « blanches » car la réaction de pénicilline avec l'hydroxylamine ne se vérifie pas dans le cas ou la solution de pénicilline serait mélangée précédemment avec la solution ferrique.

Protocole opératoire

-  Peser avec exactitude en mg (pénicilline V standard) : 88,5 ; 59 ; 50,1 ; 38,3 ; 29,5 ; 11,8
-  Dans des fioles (A) de 10 ml, faire la dissolution des différentes pesées du standard de la pénicilline V en ajoutant quelques gouttes de tampon phosphate (pH 6,43), puis compléter le volume a 10 ml avec de l'eau distillée.
-  Prendre 7 tubes a essai (6 pour les échantillons et 1 pour le blanc)
-  Mettre 2,5 ml d'ED dans chaque tube des échantillons et 3.1 ml d'ED dans le tube du blanc
-  retirer 0,6 ml de chaque fiole (A) et verser dans chaque tube des échantillons
-  Ajouter 2 ml de la solution alcoolique dans chacun des 6 tubes des échantillons
-  Ajouter 2ml de l'alun de fer dans le tube du blanc
-  Agiter tous les tubes et laisser reposer pendant 5 minutes

- ✚ Inverser la réaction en ajoutant 2 ml de l'alun de fer dans chacun des 6 tubes des échantillons et 2 ml de la solution alcoolique dans le tube du blanc
- ✚ Agiter tous les tubes et laisser reposer pendant 5 minutes
- ✚ Faire l'étalonnage du spectrophotomètre avec l'échantillon du blanc afin d'avoir le zéro optique
- ✚ Faire la lecture de la densité optique à 480 nm
- ✚ Tracer la courbe des concentrations en UI/ml des standards en fonction des variations des absorbances (DO) de chacune des 6 solutions.
- ✚ On devrait obtenir une droite passant par l'origine

NB : $1,6 = 10^{-3}\text{mg}$

$Tg \alpha = Km$

Titre (UI/ml) = DO. Km

Les résultats des densités optiques (DO) et le graphique de la courbe d'étalonnage figurent en annexe IX.

L'absorbance des échantillons de fermentation, est mesurée en remplaçant le standard par des filtrats des bouillons.

II.2.4.2. Dosage par chromatographie liquide a haute performance(HPLC).

Conditions expérimentales

La colonne utilisée est en phase inverse (5 μm sphérique), colonne interchrom semi-preparative C18, (250 $\times$ 4,6mm). Le débit est fixé a 1ml/min .L'éluant est fixé a 33% d'acetonitrile dans l'eau durant 20 min en isocratique. La lecture se fait à une longueur d'onde 215nm dans UV-Visible déterminer après un balayage du standard de pénicilline V a une température 28°C .Le volume d'injection est 20 μl .

La préparation des solutions tampons et phase mobile ainsi que la préparation des standards de pénicilline et du précurseur (POAA) figurent en **annexe X**.

Préparation des échantillons

La production de la pénicilline V a été quantifiée quotidiennement par HPLC pour ce la 2,5 ml du bouillon de fermentation, préalablement filtré a travers un papier filtre, est introduit dans une fiole jaugée de 50 ml, puis diluer avec la solution tampon I et compléter le volume jusqu'au trait de jauge, ensuite 2,5 ml de cette solution sont diluées avec la solution tampon II dans une fiole jaugée de 50 ml. Après filtration de cette solution a travers un micro filtre de 0,45 μ m, 20 μ l sont injectés a l'aide d'une micro seringue dans l'appareil (HPLC).

Les titres de la pénicilline V et du précurseur POAA sont calculés comme suit :

$$\text{Titre pénicilline V} = \frac{\text{Aire Pic Ech} \times \text{Pesé Std} \times \text{Act Std}}{\text{Aire Pic Std} \times 5}$$

$$\text{Titre POAA} = \frac{\text{Aire Pic Ech} \times \text{Pesé Std} \times 100}{\text{Aire Pic Std}}$$

II.3. Test d'activité de la pénicilline V

La méthode employée nous permet de mesurer le spectre d'activité antibactérienne de la pénicilline V.

II.2.3. Méthode de diffusion sur agar

Cette méthode consiste à faire diffuser un antibiotique sur un milieu gélosé (PCA), préalablementensemencé avec une souche bactérienne (*Bacillus subtilis*) vu que c'est un germe sensible à cette molécule.

La méthode des disques consiste à imprégner des disques dans les filtrats des bouillons de fermentation. Ces disques sont mis au contact d'une surface gélosée contenant des cellules du germe cible.

Les boîtes sont incubées dans une étuve a la température optimale de croissance du microorganisme « germe cible » qui est 37°C.

Pendant l'incubation, l'antibiotique diffuse dans la gélose de façon radiaire a partir de son point d'application. Après 24 heures les diamètres d'inhibition qui apparaissent sous l'aspect de zones claires sont mesurés.

Protocole de réactivation

Un écouvillon est introduit dans la boîte qui contient la souche (*Bacillus subtilis* conservée à 4°C) pour prendre quelques colonies et les ensemercer en stries dans la surface d'une autre boîte qui contient une gélose nutritive (PCA).

La boîte est incubée dans une étuve à la température de croissance (37°C) du germe pendant 24h.

Une solution qui contient 5 colonies de la boîte réactivée et 5ml d'eau physiologique est préparée pour avoir une charge microbienne approximative de 10^6 UFC/ml.

Les filtrats du 7^{ème} jour du dosage sont utilisés puisque ils contiennent des quantités de pénicilline V importantes par rapport aux autres jours du dosage.

Les concentrations de pénicilline V utilisées sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau IV: Concentrations de la pénicilline V utilisées dans l'antibiogramme

	Concentration en UI/ml				Concentration en mg/ml			
	(M1) V	(M 2)V	(M 3)V	(M3)V	(M1)V	(M2)V	(M3)V	(M3) V
PV 05/01/13 S1	37828	21783	11496	20865	23,64	13,61	7,18	13,04
PV 05/01/13 S2	37306	19578	10411	24474	23,31	12,19	6,50	15,29

Sachant que $1,6\text{UI} = 10^{-3} \text{ mg}$

I. Résultats et discussions

I.1. Revivification des souches

I.1.1. Réactivation sur milieu gélosé

La souche PV 04/07/11 réactivée en milieu solide « CMP »V a donné un résultat positif vu que toutes les boîtes ensemencées ont donné des colonies typiques.

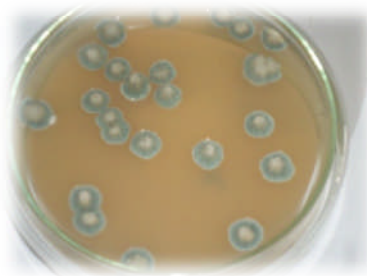


Figure 04 : Apparition des colonies typiques sur milieu « CMP »V après 14 jours d'incubation.

I.1.2. Propagation des spores sur une gélose inclinée

Après 14 jours d'incubation, les tubes à essai (slant) ensemencés par les deux souches présentaient des tapis verts uniformes représentant les spores de ces souches.



Figure 05 : Propagation des spores sur la surface d'une gélose inclinée contenant le milieu « CMP »V après 14 jours d'incubation.

Interprétations

La réactivation de la souche PV 04/07/11 conservée depuis 2011 a donné des colonies typiques après 15 jours d'incubation, un bon résultat est assuré par une durée de conservation

de 8 à 10 mois (**Botton et al., 1990**). Nous observons que nos résultats contredisent ces recommandations. En effet, la conservation des souches sur milieu gélosé pour une longue durée est exposée à des problèmes de contamination et de variabilités génétiques. Les bonnes conditions de conservation ; telle que la température, l'ont mis à l'abri d'une quelconque contamination.

I.1. Culture en batch dans des fioles agitées

I.1.1. Pré-culture

I.1.1.1. Mesure du pH et estimation de la biomasse

Après 40 heures de germination, des valeurs très rapprochées du pH et de sédimentation sont mesurées pour les deux souches durant les deux tests de fermentation. Les résultats sont regroupés dans le tableau ci-après :

✚ Les valeurs représentées dans le tableau ci-après résultent de la moyenne entre les deux tests de fermentations effectuées.

Tableau V : Résultats du pH et de la sédimentation après 40 heures de germination des spores dans le milieu « VMP »V pour les souches S₁ et S₂

Souches	test de fermentation dans le milieu « VMP »V	
	pH	Sédimentation %
PV 05/01/13 (S1)	5,34	17,5%
PV 05/02/13 (S2)	5,36	18,25%

Interprétations

Les valeurs du pH et des sédimentations des souches ; PV 05/01/13, PV 05/02/13 correspondent à la norme du process technologique de Saidal sachant que le pH doit varier entre 5,3 et 5,5 et la sédimentation entre 15 et 20% pour assurer un bon déroulement de l'étape fermentatif. (**AFAQ ISO 9002**).

La levée de dormance des spores ou du mycélium est surtout favorisée par une humidité élevée et aussi par la température, la présence d'acides aminés et des glucides et aussi par le pH. (Larpen et Sanglier, 1990).

L'inoculum est jugé adéquat l'ors qu'il permet le maximum de production, une très faible inoculation du milieu de production ne permettrait qu'une croissance lente et souvent a une faible production. (Larpen et Sanglier, 1990).

Dans des conditions expérimentales définies, la production de pénicilline décroît de 85% lorsque l'inoculum contient $2 \cdot 10^2$ spores/ml au lieu de 10^4 /ml (Calam, 1986 ; Larpen et Sanglier, 1990).

I.1.2. Culture

Dans le test de fermentation des mesures du pH, de la sédimentation ainsi que le titre de la pénicilline V sont effectuées afin d'en déduire l'influence de la source de carbone sur les variations de ces paramètres au cours de la fermentation par *P.chrysogenum*.

L'étude des variations de ces paramètres au cours de la fermentation sont représentés dans les graphes ci-après et ce pour les souches S₁ et S₂ à partir du quatrième jour de la fermentation dans les quatre milieux étudiés.

Les valeurs représentées dans les graphes résultent de la moyenne entre les deux tests de fermentations effectuées.

I.1.2.1. Mesure du pH

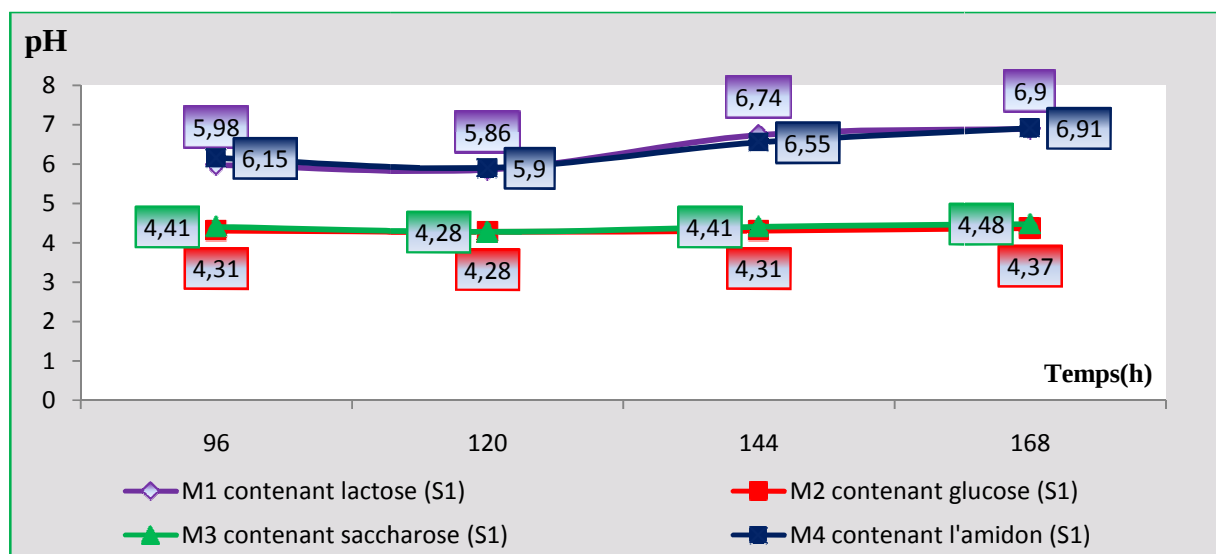


Figure 06 : Evolution du pH en fonction du temps dans les milieux fermentatifs contenant différentes sources de carbone pour la souche S1.

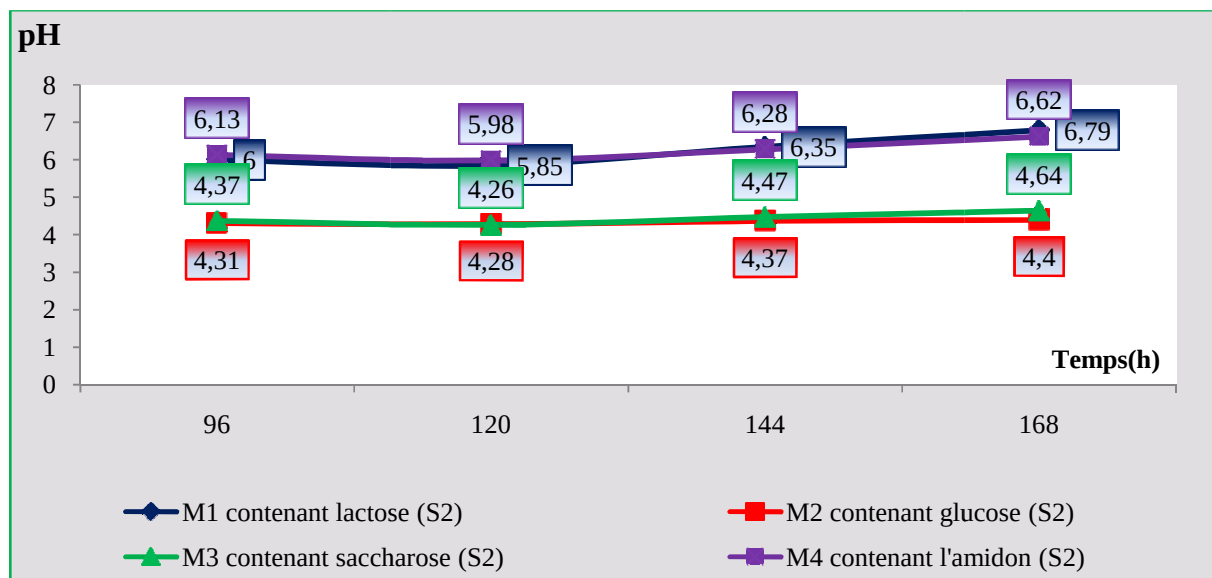


Figure 07 : Evolution du pH en fonction du temps dans les milieux fermentatifs contenant différentes sources de carbone pour la souche S2 .

Interpretations

Cette étude ayant pour objectif l'amélioration du rendement de la production de la pénicilline V en variant la composition du milieu fermentatif au niveau de la source de carbone .Des variations du pH, biomasse et titre de pénicilline V sont observés, au cours du test de fermentation mené.

Au cours du test de fermentation, une baisse du pH par rapport au pH initial technologique (6,3) est observée (figure 06, figure 07) au cours du 4^{ème} et 5^{ème} jours pour les milieux contenant le lactose (M1), l'amidon (M4) et ce pour les deux souches ; ce décroissement est due, a la consommation des composés du milieu lors de la croissance des souches de *P.chrysogenum*. (**Martain et Demain, 1980**)

Une diminution assez importante a été observée (figure 06, figure 07) pour le milieu contenant le glucose (M2), saccharose (M3). Selon **Solé et collaborateurs (2000)** l'effet inhibiteur du glucose sur la production des métabolites secondaires est pH dépendant, il est dû à l'acidification par suite de l'accumulation des acides organiques.

L'accroissement du pH dans les différents milieux (M1 : lactose, M2 : glucose, M3 : saccharose, M4 : amidon) et ce pour les deux souches (figure 06, figure 07) a partir du 5^{ème} est du selon **Jérôme et collaborateurs (2004)** a l'accumulation de l'ammoniac gaz (NH_3) résultant de la décomposition des composés azotés du milieu (protéines ou acides aminés).

I.1.2.2. Mesure de la biomasse

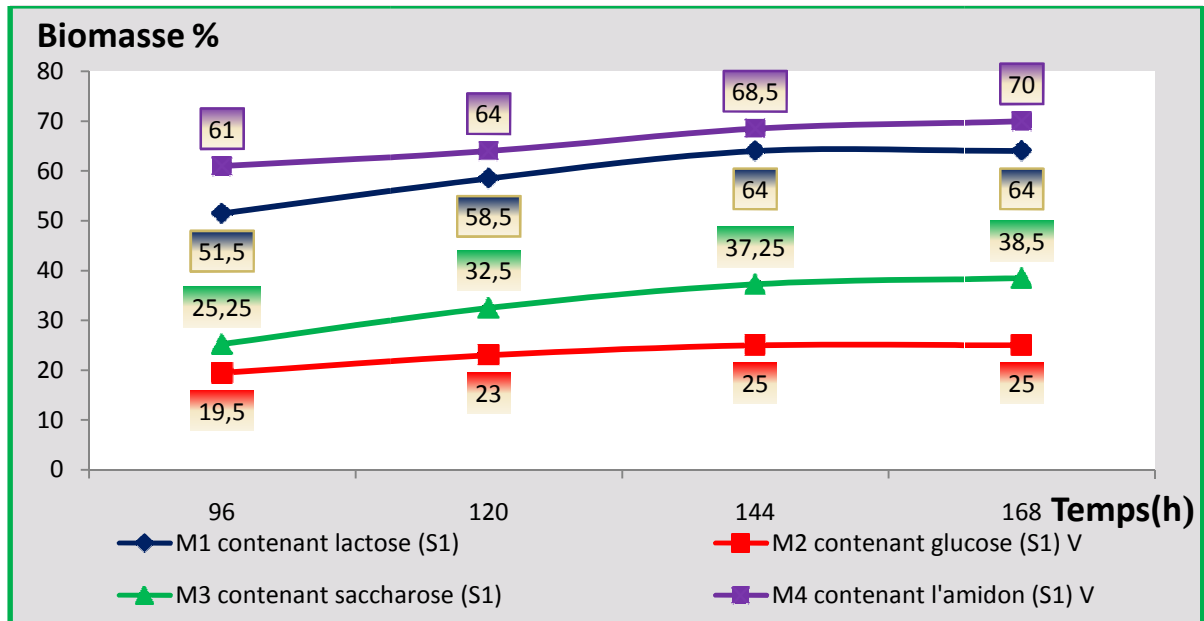


Figure 08 : Evolution de la biomasse en fonction du temps dans les milieux fermentatifs contenant différentes sources de carbone pour la souche S1.

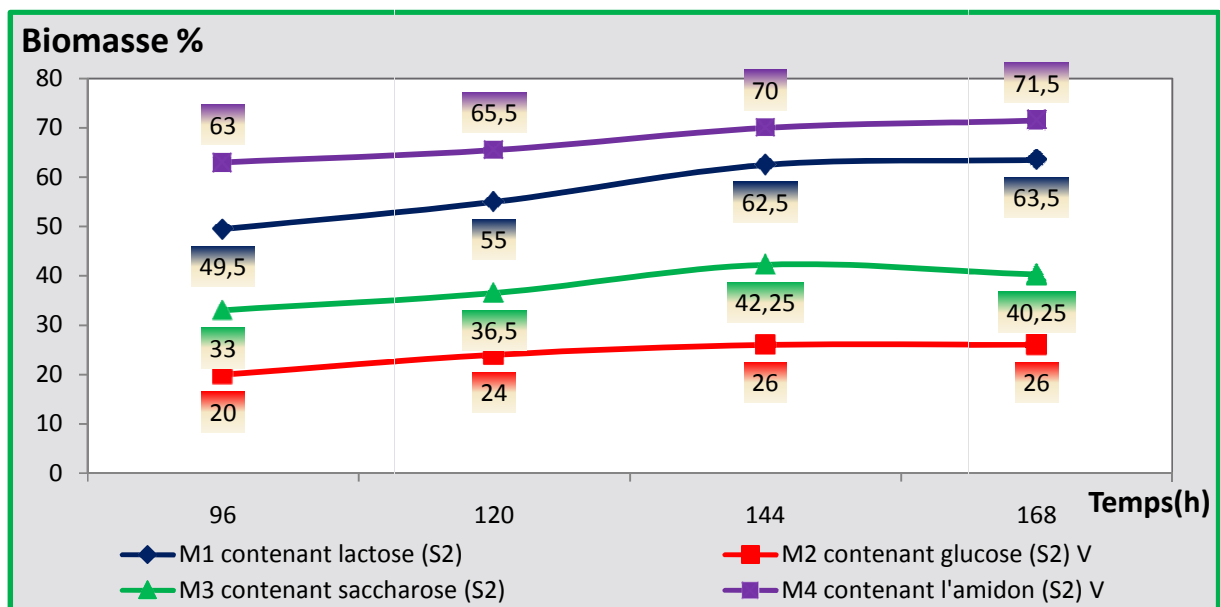


Figure 09 : Evolution de la biomasse en fonction du temps dans les milieux fermentatifs contenant différentes sources de carbone pour la souche S2.

Interpretations

L'augmentation rapide de la biomasse (figures 08, figure 09) au cours du 4^{ème} et 5^{ème} jours pour les milieux contenant le lactose (M1), l'amidon (M4) et ce pour les deux souches ; est due à la croissance des souches de *P.chrysogenum*. **(Martain et Demain, 1980).**

Cette phase est favorisée par la disponibilité de toutes les conditions optimales pour la croissance du mycélium, elle correspond à la phase active de la production de la biomasse. On l'appelle trophophase dans le cas de fermentation en batch. **(Thonart, 2007).**

Dans le milieu contenant l'amidon (M4) le taux de la biomasse est élevé par rapport au milieu contenant le lactose.

L'hydrolyse de l'amidon est plus en moins lent chez les champignons par conséquent l'effet inhibiteur du glucose est supprimé c'est pour cette raison qu'on a obtenu des valeurs élevées en biomasse. **(Larpen et Sanglier, 1990).**

L'emploi des sucres partiellement métabolisés comme le lactose influe positivement sur la croissance, vu que ce dernier est hydrolysé en glucose et galactose, lui-même converti en permanence pour suivre la même voie que le glucose, la concentration en glucose reste faible, **(Demain AL, 1986; Larpen et Sanglier, 1990)**, et n'influe pas sur la croissance.

Une baisse du taux de biomasse (figure 08, figure 09) est observée pour les milieux contenant le glucose (M2), saccharose (M3) comparativement aux deux autres milieux à base de lactose et amidon, et ce pour les deux souches.

Les substrats rapidement métabolisés tels que le glucose peuvent souvent réaliser des taux de croissance cellulaire maximale, **Gallo et Katz (1972),**

Les sucres simples tels que le glucose, le fructose, le saccharose, et le sorbitol comme uniques sources du carbone révèlent une grande croissance fongique, une bonne sporulation et une meilleure production de l'aflatoxine **(Abdollahi et Buchanan, 1981; Kacholz et Demain, 1983; Buchanan et Stahl, 1984; Larpen et Sanglier, 1990; Luchese et Harrigan, 1993).**

Selon **(Demain AL, 1986)** des concentrations très élevées en substrat inhibent la croissance du microorganisme, comparativement à nos résultats on constate que les

concentrations utilisées dans notre cas soit 200 g/l de glucose et 150g/l de saccharose sont trop élevées et ne sont pas adéquates a la croissance du champignon.

Des valeurs très rapprochées de biomasse sont observées au cours du 6^{ème} et 7^{ème} jours dans les quatre milieux fermentatifs contenant différentes sources de carbones c'est la phase stationnaire, dans cette phase la concentration en cellules atteint son niveau maximal. (Thonart, 2007).

I.1.2.3. Mesure du titre de la pénicilline V par spectrophotométrie

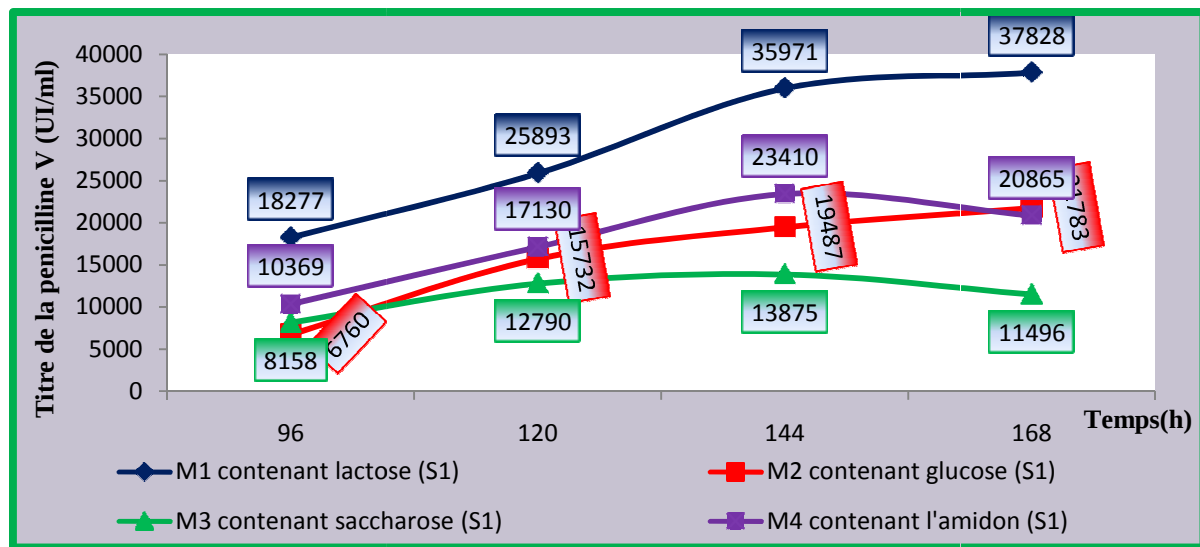


Figure 10 : Evolution du titre de la penicilline V en fonction du temps dans les milieux fermentatifs contenant différentes sources de carbone pour la souche S1.

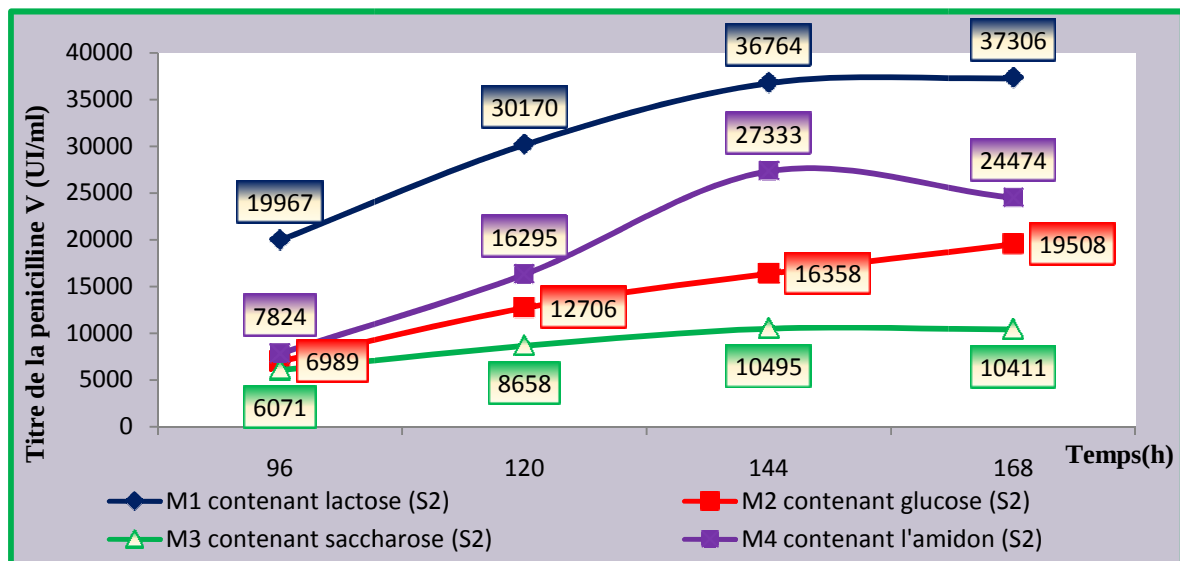


Figure 11 : Evolution du titre de la penicilline V en fonction du temps dans les milieux fermentatifs contenant différentes sources de carbone pour la souche 2.

Interprétations

D'après les graphes (figure 10, figure 11) la synthèse de la pénicilline V dans les milieux fermentatifs contenant le lactose (M1), l'amidon (M4), apparait des le 4^{ème} jours a de faible concentration et atteint son maximum a 168 h dans le milieu contenant le lactose (M1), et ce pour S1 et S2 et a 144 h dans le milieu contenant l'amidon (M4) et ce pour S1 et S2

Cette période correspond à la phase stationnaire ou idiophase ou il ya une activité métabolique élaborant de grandes quantités de métabolites secondaires « pénicilline V ». **(Thonart, 2007).**

Le maximum de production de la pénicilline V correspond à la période de consommation du substrat lactose période correspondant à une zone de stabilité du pH (6-6,5). **(Asselineau J et Zelta JP, 1973).**

Les substrats lentement assimilés tels que l'amidon **(Basak et Majumdar, 1973)** ont des meilleurs rendements de production d'antibiotiques chez les champignons.

Par contre le test de fermentation mené dans les milieux contenant le glucose(M2), saccharose (M3) comme sources de carbone (figure 10, figure 11), fait exception avec une importante baisse du titre de la pénicilline V comparant au milieu technologique contenant le lactose (M1), comme source de carbone.

La diminution du pH a directement influencé négativement sur le taux de pénicilline V dans les milieux fermentatifs contenant le glucose (M2) et le saccharose (M3) comme sources de carbone. Dans de nombreux cas, l'effet est dépendant de la dose, dans une zone de concentration situé entre 28 et 100 mM du glucose, une addition de 100 mM inhibe presque totalement la production de pénicilline jusqu'à ce qu'il y'ait carence en cette source carbonée. **(Larpent et Sanglier, 1990).**

La variation du pH entraine une baisse importante du rendement en pénicilline V. **(Asselineau J et Zelta JP, 1973).**

Le pH joue un rôle primordial dans la production des métabolites secondaires, des faibles variations de pH peuvent avoir des effets marqués sur la productivité d'une souche, c'est le cas des milieux qui contiennent le glucose (M2), saccharose (M3) comme source de carbone. **(Larpent et Sanglier, 1990).**

Les sucres tels que le glucose et le saccharose sont connus pour inhiber la production de nombreux métabolites secondaires. Cette "répression du catabolite" semble être due aux intermédiaires, produits du catabolisme rapide du glucose interférant avec les enzymes dans le processus du métabolisme secondaire. **Gallo et Katz (1972)**, ont rapporté que l'enzyme qui catalyse la formation du cycle du phénoxazinone d'actinomycine a été inhibée par le glucose.

Selon **(Aharonowitz et Demain, 1978)**, La lysine inhibe la biosynthèse des β -lactamines de manière plus au moins marquée, selon les souches productrices. Ainsi la lysine contrôle la biosynthèse de la pénicilline V par *P.chrysogenum* en rétro-inhibant et en répriment l'homocitrate synthétase, la première enzyme de la voie de biosynthèse de l' α -aminoadipate a partir de l' α -cétoglutarate .Cela conduit a une diminution de la concentration intracellulaire en α -aminoadipate et donc a une réduction de la production en pénicillines.

Revilla et al., (1986) a montré que le glucose réprimait la formation d' α -aminoadipyl-cysteinyl-valine, le premier intermédiaire de la voie de biosynthèse de la pénicilline chez *P.chrysogenum*, ce qui laisse supposer que le glucose favorise la synthèse de la lysine et son incorporation dans les protéines, diminuant d'autant la quantité d' α -aminoadipate disponible pour la production de l'antibiotique.

La baisse du titre de la pénicilline V a 168h (figure 10, figure 11) dans le milieu contenant l'amidon comme source de carbone (20865 UI/ml et 24307UI/ml) et ce pour les deux souches S1, S2 respectivement est due a la dégradation de la molécule dans un milieu alcalin ,en fait dans des pH alcalin qu'apparaissent les attaques de l'ion OH^- sur le carboxyle du lactame avec ouverture du cycle .En générale, l'ultime stade de dégradation du lactame se situe lors de la formation de l'acide penicilloïque. Toutefois, dans des conditions plus drastiques, une décarboxylation en acide pénilloïque peut être observée. **(Dam et Boudet, 1992)**.

Par comparaison entre les différents tests de fermentation, on constate que la fermentation dans le milieu contenant le lactose (M1) permet une multiplication importante du mycélium des deux souches, par conséquent elle assure une meilleure production de la pénicilline V, ce la nous permet de constater que la source de carbone lactose est la plus convenable pour la croissance des deux souches *P.chrysogenum* exploités.

Selon **Sanchez et Demain. (2002)**, la production de la pénicilline V est relativement proportionnelle a la biomasse du mycélium Ces résultats confirme l'évolution du titre de la

pénicilline V en fonction de la biomasse pour le milieu contenant le lactose (M1) comme source de carbone.

I.1.2.4. Dosage du titre par chromatographie liquide a haute performance

Le tableau ci-après regroupe le titre de la pénicilline V et le précurseur POAA déterminé par HPLC à partir du quatrième jour dans les quatre milieux étudiés, pour les souches S₁ et S₂.

Les valeurs qui manquent dans le tableau correspondent aux chromatogrammes qui ont des pics mal apparue due à des fautes de manipulations.

Les pics de la pénicilline V ne sont apparus dans les milieux contenant le glucose (M1) et saccharose (M3) comme source de carbone et de ce fait on n'a pas pu calculer le titre de l'antibiotique « pénicilline V ».

Tableau VI: Résultats de la productivité de la pénicilline V déterminé par HPLC au cours de la deuxième fermentation

souches	T(h)	Titre de la pénicilline V (UI/ml)				Titre POAA (g/l)			
S1		M1(V)	M2(V)	M3(V)	M4(V)	M1(V)	M2(V)	M3(V)	M4(V)
	96	13730			3580	3,99	6,08	6,97	5,75
	120				5207		6,04	6,59	5,56
	144	22937				0,27	5,84	4,93	
	168				1086		1,44	4,11	1,23
S2	96	11293			4297	4,04	7,05	6,47	6,86
	120	13041			7468	5,53	6,56	5,55	5,10
	144	18941				3,48		5,25	
	168				2953		1,56	5,24	0,63

La figure ci-après représente le chromatogramme des standards déterminé par HPLC

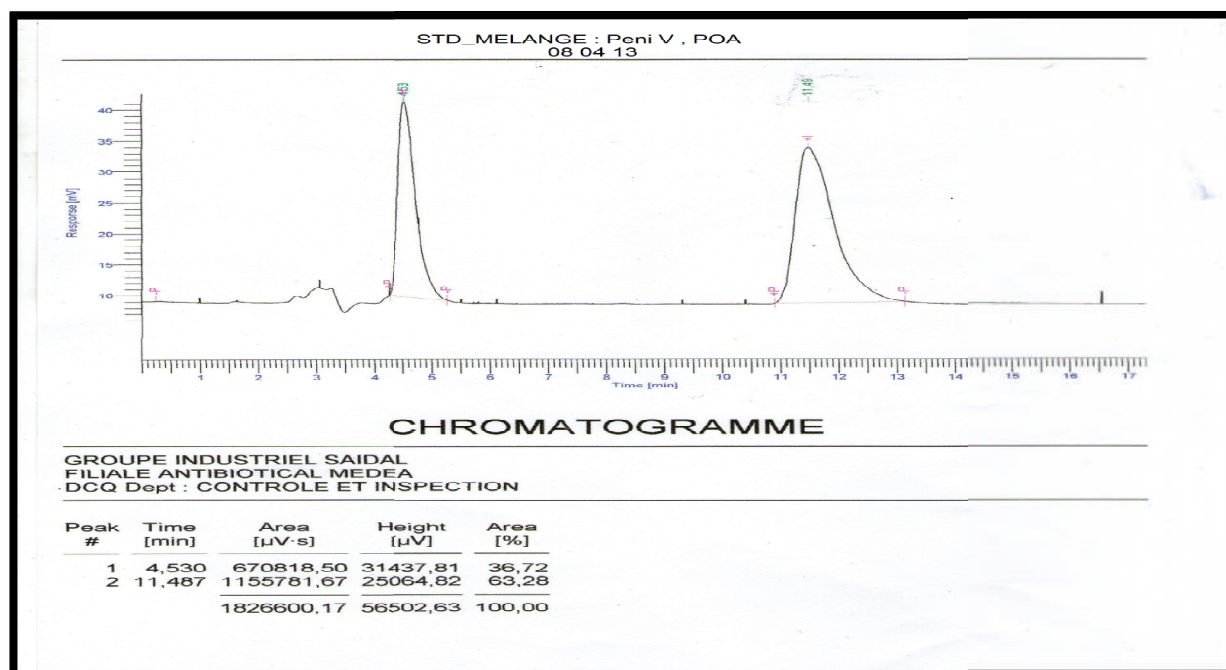


Figure 12 : Chromatogramme des standards de la pénicilline V et du précurseur POAA

Interprétations

Lors du dosage de l'antibiotique « pénicilline V » par chromatographie liquide à haute performance un chromatogramme (figure 12) contenant les standards de la pénicilline V et du précurseur POAA est obtenu après injection de 20 μl du mélange dans l'appareil.

Le premier pic correspond au précurseur POAA vue qu'il est polaire, et la phase stationnaire est apolaire (phase inverse) son élution rapide par la phase mobile polaire engendre un temps de rétention petit 4,53min.

Le deuxième pic correspond à la molécule pénicilline V vue que cette dernière est apolaire son adsorption a la phase stationnaire nécessite plus de temps (11,48 min) pour qu'elle soit élué par la phase mobile.

Le chromatogramme des standards est fait pour calculer le titre de pénicilline V et du précurseur POAA des échantillons

L'étude des variations de la productivité de la pénicilline V et du titre du précurseur POAA au cours de la fermentation déterminés par HPLC est représentés dans les graphes ci-après regroupant les valeurs du titre de la pénicilline V et du précurseur POAA pour les souches S₁ et S₂ à partir du quatrième jour du test de fermentation dans les quatre milieux étudiés.

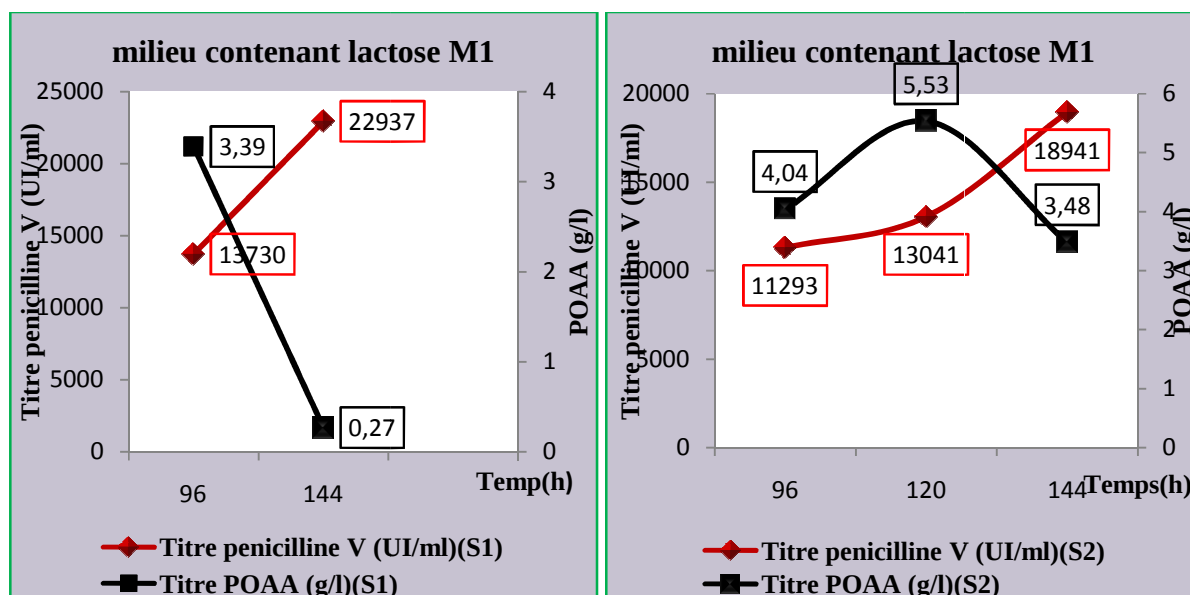


Figure 13 : Evolution du titre de la pénicilline V et du précurseur POAA déterminé par HPLC au cours du test de fermentation dans le milieu contenant le lactose comme source de carbone.

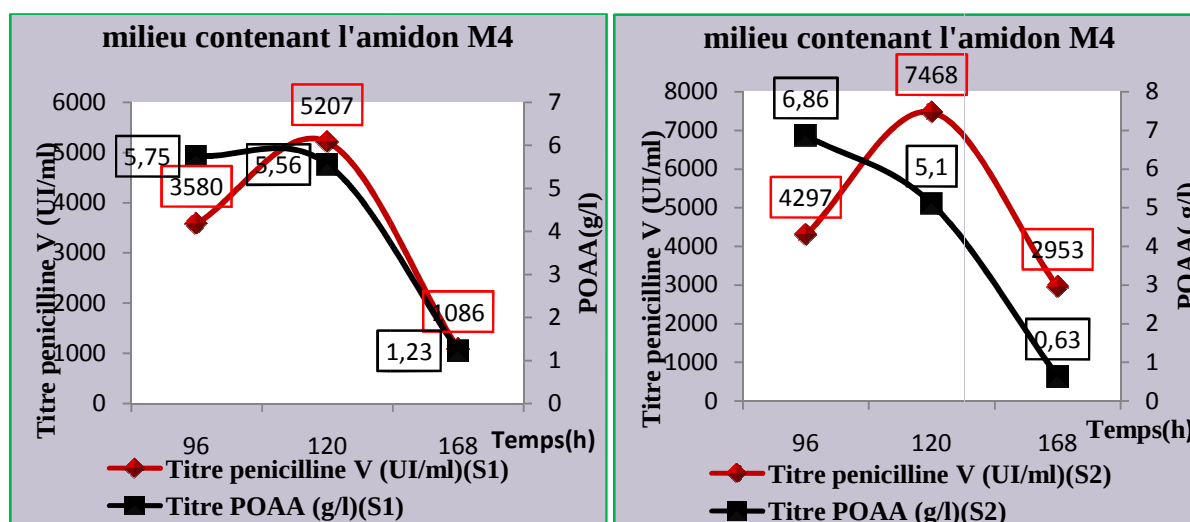


Figure 14 : Evolution du titre de la pénicilline V et du précurseur POAA déterminé par HPLC au cours du test de fermentation dans le milieu contenant l'amidon comme source de carbone.

Interprétations

Dans les milieux contenant le lactose (figure 14) et l'amidon (figure 15) la quantité de la pénicilline V est inversement proportionnelle a la concentration du précurseur POAA , on constate que lors de la biosynthèse de l'antibiotique il y avait une consommation du précurseur qui intervient a la troisième étape de la biosynthèse de la pénicilline V on remplaçant le groupement hydrophile de l' α AAA dans isopénicilline N (IPN) par le précurseur phénoxy acide acétique et par conséquent la molécule de la pénicilline V est obtenue. (Brakhage 1998 ; Emily et al ., 1996).

Le taux de la pénicilline V a diminué comparant au dosage par spectrophotomètre exemple du 4^{ème} jour du dosage dans le milieu contenant le lactose (M1) comme source de carbone la quantité de la pénicilline V obtenue par spectrophotomètre est (18277 et 19967 UI/ml) comparant a la quantité obtenu par HPLC (13730 et 10369 UI/ml) et ce pour les deux souches.

Cela est expliqué par le fait de la sensibilité et la performance de la méthode chromatographique (HPLC) qui a montré sa différence par rapport a la méthode colorimétrique (spectrophotométrie).

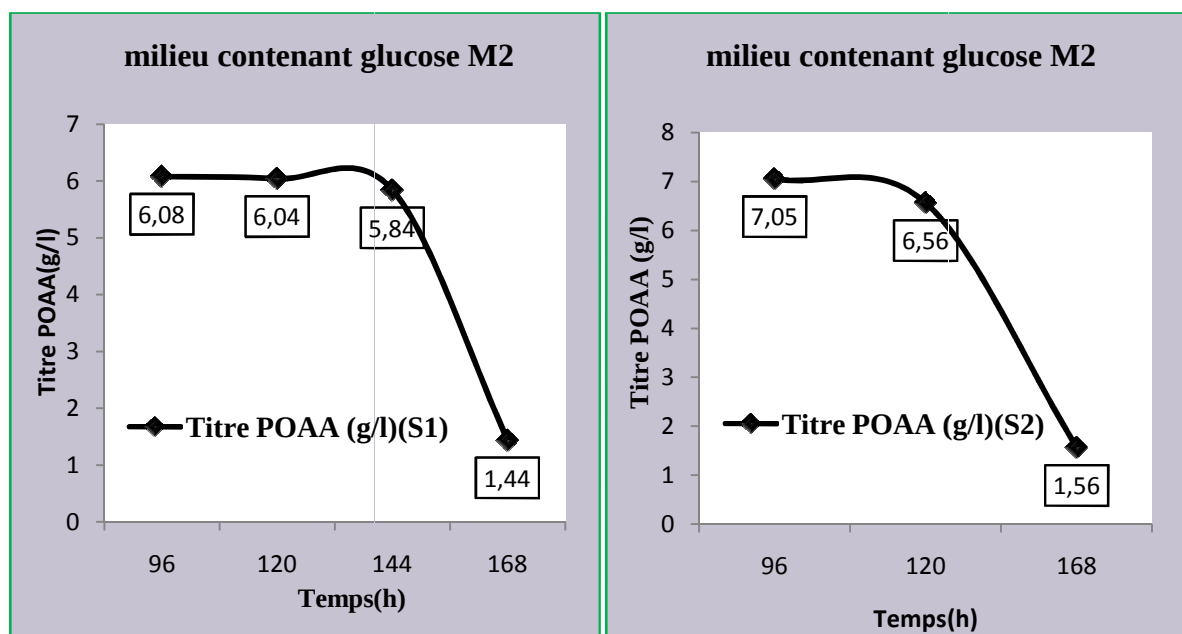


Figure 15 : Evolution du précurseur POAA déterminé par HPLC au cours du test de fermentation dans le milieu contenant le glucose comme source de carbone

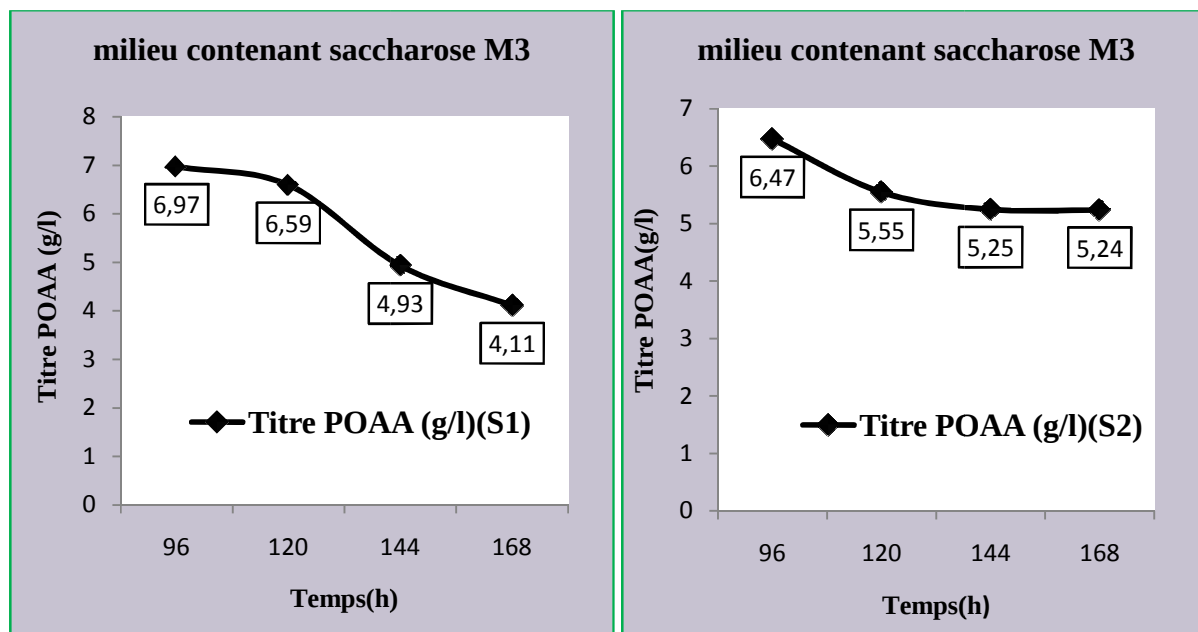


Figure 16 : Evolution du précurseur POAA déterminé par HPLC au cours du test de fermentation dans le milieu contenant le saccharose comme source de carbone.

Interprétations

Dans les milieux contenant le glucose (figure 15) et le saccharose (figure 16) la quantité du précurseur POAA a diminué progressivement au cours des quatre jours du dosage ce qui explique la biosynthèse de la pénicilline V mais il n'y avait pas apparition des pics de la pénicilline V dans les chromatogrammes. On suppose que le pH acide (4) du milieu contenant le glucose (M2), saccharose (M3) a influencé sur la molécule de la pénicilline V et de ce fait elle n'était pas détecté par HPLC.

Le taux du précurseur POAA dans le milieu contenant le saccharose est un peu élevé exemple du 7 jour de la fermentation (4,11, 5,24 g/l) et ce pour S1 et S2 respectivement, comparant aux autres milieux contenant lactose (M1), amidon (M4) et glucose (M2) ce la peut s'expliquer par la faible quantité de pénicilline V synthétisée obtenue par spectrophotométrie (11496, 10411 UI/ml) et ce pour S1, S2 respectivement.

I.2. Test d'activité biologique

Les résultats du test sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau VII : Résultats du test d'activité de la pénicilline V vis-à-vis de *Bacillus subtilis*

Milieux \ Germes	Diamètre des zones d'inhibition (Zi)
	<i>Bacillus subtilis</i>
Milieu (M1) V	-
Milieu (M2) V	-
Milieu (M3) V	-
Milieu (M4) V	-

Activité antimicrobienne

Il n'y avait pas de zone d'inhibition, donc la pénicilline V n'a pas agi sur le germe.

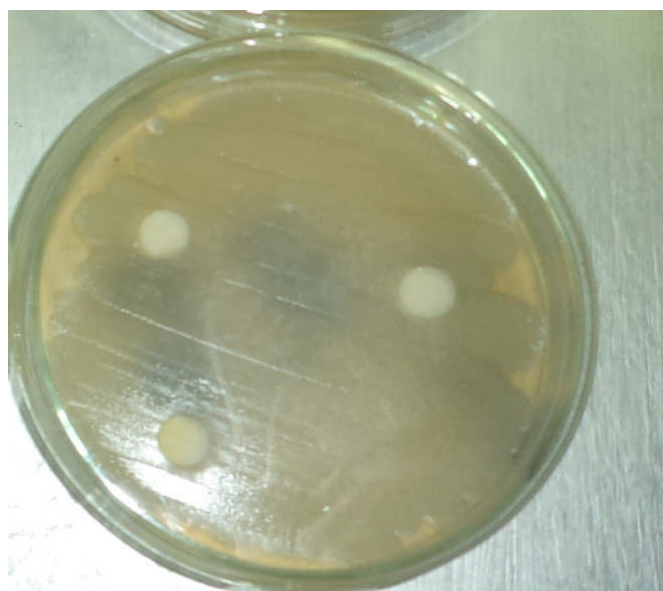


Figure 17 : Effet antimicrobien de la pénicilline V sur *Bacillus subtilis*.

Interprétations

La pénicilline V présente dans les filtrats avait perdu son activité parce que les filtrats étaient conservés dans un réfrigérateur à 4°C avant de les utiliser dans le test.

Conclusion

L'objectif principal de ce travail, entrant dans le cadre d'un projet de fin de cycle est d'étudier l'influence de la source de carbone sur de la production de la pénicilline V au sein du complexe Antibitical de Sidal.

Le choix de la source du carbone influence fortement le métabolisme secondaire et par conséquent la production d'antibiotique ou de mycotoxine (**Martain et Demain, 1980; Doull et Vining, 1990; Spizec et Tichy, 1995**).

La complexité de la fermentation des antibiotiques réside dans les réactions chimiques qu'elles comportent car ces dernières sont catalysées par des enzymes difficiles à contrôler directement.

Quatre paramètres semblent gouverner la cinétique de la fermentation et doivent être maîtrisés.

Le pH : l'évolution du pH de la culture microbienne est un témoin du métabolisme et de son développement.

La sédimentation : la détermination du pourcentage de sédimentation est capitale, car une augmentation excessive de la biomasse induit un gaspillage du produit tel que le milieu contenant l'amidon et une diminution de cette dernière entraîne une production insuffisante de l'antibiotique tel que les milieux contenant le glucose et le saccharose;

La concentration élevée du substrat influence négativement la croissance du champignon et par conséquent la production du métabolite secondaire (pénicilline V) tel que les milieux contenant le glucose et saccharose comme source de carbone.

Le sucre : c'est le paramètre le plus sensible de la fermentation, il joue deux rôles principaux :

✚ Soit il est considéré comme source de carbone et dans ce cas c'est la production de la Pénicilline V qui est favorisée tel que le lactose.

✚ Soit il est considéré comme source d'énergie et donc c'est la production de la biomasse qui est favorisée tel que l'amidon.

Le titre : le contrôle du titre permet de suivre le rendement de la production de la Pénicilline V.

La source du carbone qui favorise une bonne croissance du mycélium ainsi qu'un taux élevé en titre de pénicilline V et le lactose.

Les sources de carbone telles que l'amidon, la dextrine, le glucose et le saccharose sont communément utilisées comme des substrats de croissance pour produire des enzymes, des antibiotiques et d'autres métabolites secondaires par la fermentation. Cependant, la production est fréquemment limitée dû à un effet négatif exercé par la source du carbone. **(Sanchez et Demain, 2002).**

A la lumière des quelques expériences réalisées, nous pouvons également conclure que cette étude nous a permis de maîtriser quelques techniques de laboratoire de microbiologie industrielle et permis d'appréhender les problèmes auxquels sont souvent confrontés les industriels.

Les perspectives de ce travail consistent à :

- ❖ Varier la concentration des sources de carbone utilisées ;
- ❖ Utiliser un fermenteur de laboratoire car la fermentation dans des fioles agitées n'est pas adéquate pour permettre un bon suivi quant à la productivité de la souche, ainsi une meilleure optimisation de culture.
- ❖ Etudier d'autres paramètres influençant la cinétique de la fermentation de la pénicilline V tels que la vitesse d'agitation et le débit d'aération, humidité, température.
- ❖ Utiliser des logiciels (bioinformatique) pour une meilleure optimisation.
- ❖ Doser les sucres testés.
- ❖ Utiliser des méthodes plus récentes pour l'estimation de la biomasse tels que les techniques immunologiques et marquage radioactif.
- ❖ Etudier l'effet du pH acide sur la molécule de la pénicilline V

Références bibliographiques

A

- **Abdollahi A et Buchanan R L. (1981).** Regulation of aflatoxin biosynthesis: characterization of glucose as an apparent inducer of aflatoxin production. *J Food Sci* **46**, 143-146.
- **Aharonowitz Y et Demain AL. (1978).** Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **14**, 159- 164.
- **Aouni N et Bitouri M. (2006)** proposition d'un plan de communication, Filiale Antibiotical Médéa (Algérie).
- **Asan A. (2000).** Check list of *Aspergillus* and *Penicillium* species reported from Turkey. *Turk J Bot* **24(3)**, 151-168.
- **Asselineau J et Zelta JP. (1973).**Antibiotiques : structures et exemples de modes d'action. (Eds), Hermann , Paris.114 p.

B

- **Basak K et Majumdar SK. (1973).** Utilization of carbon and nitrogen source by *Streptomyces kanamyceticus* for kanamycin production. *Antimicrob Agents Chemother* **4**, 6 10.
- **(Bejaoui N. (1996).** Structure primaire de la β -lactamase CARR-4 et génétique atomique des acides aminés R234 AS244 dans l'hydrolyse des antibiotiques. Thèse de Doctorat, Faculté des Etudes Supérieures de l'Université Laval QUEBEC. p12.
- **Botton B, Breton A, Fevre M, Gauthier S, Guy Ph, Larpent JP, Reymond P, Sanglier JJ, Vayssier Y et Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. 2^{ème} (Eds), Masson, Paris. pp 27,166.
- **Bouchet Ph, Guignard JL et Vilard J. (1999).** Les champignons. Mycologie Fondamentale et Appliquée. (Eds), Masson, Paris. pp .111-169.
- **Bourgeois CM, Mescle JF, Zucca J. (1989).** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. (Eds), Lavoisier, Paris. pp.216-244
- **Brakhage AA. (1998).** Molecular regulation of β -lactam Biosynthesis in filamentous Fungi. *Microbiology and molecular Biology reviews.* **62 (3)**: 547-585.

- **Buchanan RL et Stahl HG. (1984).** Ability of various carbon sources to induce and support aflatoxin biosynthesis by *Aspergillus parasiticus*. *J Food Safety* **6**, 271-279.

C

- **Cahagnier B. (1998).** Taxonomie des moisissures. Moisissures des aliments peu hydratés. (Eds), Tec. & Doc. Paris. pp 39-90.
- **Calam CT. (1986).** Shake-flask fermentations. In : Manual of industrial microbiology and biotechnology. (Demain AL et Solomo NA, coord.) pp 59-65. Am. Soc. Microbiol, Washington D.C.
- **Castegnaro M et Pfohl-Leszkowicz A. (2002),** Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans *La sécurité alimentaire du consommateur*, Lavoisier, Tec&Doc.
- **Cavallo JD, Fabre R, Jehl F, Rapp C et Carrabé E. (2004).** β -lactam antibiotics. EMC-maladies infectieuses.**01**, 129-202.

D

- **Dam Y et Boudet RD. (1992).** Médicament antibiotique. (Eds), Internationales, Paris. 51p.
- **Davet . (1996) .**Vie microbienne du sol et production végétale. (Eds), Inra, Paris. pp. 52 -57.
- **Delauney S, Rondags E et Germain P. (2013).** Production d'antibiotiques par biotechnologies. (Eds), Techniques de l'Ingénieur. Paris. pp.2-3.
- **Demain AL. (1986).** Regulation of secondary metabolism in fungi. *Pure & App. chem*, **58(2)** .219-226.
- **Domsch KH, Gams W et Anderson TH. (1980).** Compendium of soil fungi. London: Academic press, vol 2.
- **Doull JC et Vining LC. (1990).** Physiology of antibiotic production in actinomycetes and some underlying control mechanisms. *Biotech Adv*, **8(1)**. 141-158.

E

- **Edjohn L, Mouton Y, Bascker Y, Debbreuill L et Thabot A. (1997).** Antibiotiques, antiviraux anti infectieux. Médecine thérapeutique.**4**, 71-101.
- **Eltem R. (2004).** Colonial and morphological characteristics of some *Aspergillus*. Species isolated from vineyards in Manisa and Izmir Provinces (Turkey). *Turk J Bot* **28**, 287-298.

- **Emily S, Pollack M D et Charles V. (1996).** Antibiotic use in the emergency department. The penicillins and cephalosporins. The *J of Emergency Medicine*. **14(2)**. pp 213-222.

- **Euzéby JP. (2004).** Evaluation in vitro de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Dictionnaire de la Bactériologie vétérinaire. pp.1-10.

F

- **Fauchère JL et Avril JL. (2002).** Bactériologie générale et médicale. (Eds) , Ellips Marketing. 368 p.

- **Fischer G et Dott W. (2003).** Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene. *Archives Microbiol* **179**, 75-82.

G

- **Gallo M et Katz E. (1972).** Regulation of secondary metabolite biosynthesis: catabolite repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose. *J Bacteriol* **109**,659-667.

H

- **Hawksworth DL. (1991).** The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, conservation. *Mycol Res* **95**, 641-655.

- **Hoog GS. Guarro J, Gené J, et Figueras MJ. (2000).** Atlas of clinical fungi. (Universitat Rovira i Virgili: Utrecht : CBS ; Reus). 1126 p.

J

- **Jerome J, Perry, James T, Staety et Stephen L. (2004).** Microbiologie. (Eds), Dunod Paris .580 p.

- **Julien R, (2002).** les moisissures parlons-en. *Objectif prévention*.**25**, 7-8

K

- **Kacholz T et Demain AL. (1983).** Nitrate repression of averufin and aflatoxin biosynthesis. *J Nat Prod* **46**, 499-506.

- **Klich MA. (1993).** Morphological studies of *Aspergillus* section varicolor and related species. *Mycologia* **85**, 100-107.

L

- **Larpent JP et Sanglier JJ. (1989).** Biotechnologie des Antibiotiques. (Eds), Masson, Paris. pp.67-200-202-203-212-216-345.
- **Luchese RH et Harrigan WF. (1993).** Biosynthesis of aflatoxin-the role of nutritional factors. *J Appl Bacteriol* **74**, 5-14.

M

- **Martin JF et Demain AL. (1980).** Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.***44**, 230-251.
- **Mc Dermott PF, Walker RD et White DG. (2003).** Antimicrobials, modes of action and mechanisms of resistance. *International Journal of Toxicology*. **22**, 135 143.
- **Meyer A, Delana J et Lecher H. (1995).** Cours de microbiologie générale. Biosciences et techniques. (Eds), Doin, Paris. 92p.

N

- **Neuhaus FC et Georgopapadakou NH. (1992).** Strategy in β -lactam design. In *Emerging targets in antibacterial and antifungal chemotherapy*. (Eds), Shapman and Hall, New-York. pp.205-273.

P

- **Penalva MA, Rowlands RT et Turner G. (1998).** The optimization of penicillin biosynthesis in fungi. *Trends Biotechnol* **16**, 483-489.
- **Pfohl-Leszkowicz A. (2001).** Définition et origines des mycotoxies. Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque, (Eds), Tec & Doc. pp 3-14.
- **Pitt JI et Hocking AD. (1999).** Fungi and food spoilage .Second Edition. A Chapman and Hall Food Science Boo. (Eds), John Wiley and Sons .Ltd, England. pp. 289 -290.

R

- **Revilla G, Lepez-Nieto MJ, Luengo JM et Martin JF. (1984).** Carbon catabolite repression of penicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. *J Antibiot* **37**, 781-789.

S

- **Sanchez S et Demain AL. (2002).** Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzy Microb Technol* **31**, 895-906

- **Solé M, Rius N et Lorén JG. (2000).** Rapid extracellular acidification induced by glucose metabolism in non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Internatl Microbiol* **3**,39-43.
- **Spizek J et Tichy P. (1995).** Some aspects of overproduction of secondary metabolites. *Folia Microbiol* **40**, 43-50.

T

- **Tipper DJ et Strominger JL. (1965).** Mechanism of action of penicillins: A proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **54**: 1133-1141.
- **Thonart Ph. (2007).** Industrie d'extraction et de fermentation (cours).Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux. Belgique.pp 41-42.

V

- **Voelker F et Altaba S. (2001).** Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbiology*, **147**, 2447-2459.

W

- **Whalley, AJ. (1994).** Science in Parliament **51**, 19.

Y

- **Yala D, Merad AS, Mohamedi D et Ouar-korichi MN. (2001).**Médecine du Maghreb, **91**.p5-12.

Z

- **(Zitouni, 2010).** Les penicillines.Officinal.N 83.

Annexe I

Appareillages

-  Agitateur magnétique
-  Agitateur mécanique
-  Agitateur rotatif (Continental Instrument)
-  Bain-marie
-  Autoclave (stérilisation à chaleur humide, 121°C/1, bar)
-  Balance analytique(GIBERTINI)
-  Centrifugeuse (CENTRIFUGE 4225)
-  Chambre stérile (Hôte à flux laminaire)
-  Chambres thermostatique (25°C, 37 °C, 55% d'humidité) Continental Instrument
-  Etuve (stérilisation du matériels à chaleur sèche/250°C)
-  HPLC (SHIMADZU classe VP)
-  Microscope photonique (Olympus)
-  pH mètre
-  spectrophotomètre (Perkins Elmer)

Verreries et petits matériels

-  matériels usuels (tubes à essai, boîtes Pétri, Erlen Mayer, pipettes, etc.)
-  papier huilé
-  papier buvard
-  papier de filtration
-  tubes Potter

Réactif

-  acétonitrile

Annexe II

Milieu "CMP" V

Milieu solide pour la réactivation de la souche

Composition :

- Dextrose anhydre (Difco).....30g
- Lactose monohydraté (Technical grade).....10g
- Corn steep liquor (Roquette).....30g
- Pharmamedia (Traders).....10g
- Sulfate d'ammonium (Merck).....02g
- Carbonate de calcium.....05g
- Phosphate potassium monobasique (Merck).....0,5g
- Huile de soja.....05g
- Eau distillée.....1000ml

Préparation

- Dissoudre dans 700 ml d'eau distillée toutes les quantités des ingrédients selon l'ordre de la liste à l'exception de l'agar ;
- Compléter le volume à 1000 ml avec l'ED ;
- Mettre en agitation pendant 5 à 10 min ;
- Mesurer le pH et ajuster à 6,30 avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 20% ;
- Ajouter l'agar sous agitation et chauffage ;
- Distribuer le milieu à raison de 35ml dans des fioles de 500 ml bouchées avec du coton cardé et de la gaze ;
- Stériliser à 121°C pendant 20 min (1,1bar) ;
- Mesurer le pH après stérilisation qui devrait être $6 \pm 0,2$;
- Répartir le milieu à raison :
 - ✚ 25 ml dans des boîtes de pétri ;
 - ✚ 50 ml dans des tubes à essai grand format (slant).

Annexe III

Milieu "VMP" V

Milieu liquide pour la germination des spores dans des fioles agitées

Composition :

- Dextrose anhydre (Difco).....30g
- Lactose monohydraté (Technical grade).....10g
- Corn steep liquor (Roquette).....30g
- Pharmamedia (Traders).....10g
- Sulfate d'ammonium (Merck).....02g
- Carbonate de calcium.....05g
- Phosphate potassium monobasique (Merck).....0,5g
- Huile de soja.....05g
- Eau distillée.....1000ml

Préparation

- Dissoudre les quantités des ingrédients selon l'ordre de la liste de la composition ;
- Agiter avec un agitateur mécanique ;
- Mesurer le pH qui doit être entre $5,15 \pm 0,15$;
- Distribuer le milieu à raison de 35 ml dans des fioles de 500 ml ;
- Boucher les fioles avec un tapis du coton cardé et de la gaze ;
- Stériliser à 121°C pendant 20 min (1,1 bar) ;
- pH après stérilisation doit être de $5,80 \pm 0,2$.

Annexe IV

Milieu "M1" V

Milieu liquide pour la fermentation dans des fioles agitées

Composition :

- Acide phénoxyacétique (Sigma).....12g
- Lactose monohydraté (Technical grade).....130g
- Pharmamedia (Traders).....32,5g
- Sulfate d'ammonium (Merck).....12g
- Carbonate de calcium.....10g
- Phosphate potassium monobasique (Merck).....05g
- Sulfate de potassium (Merck).....05g
- Huile de soja.....10g
- Eau distillée.....1000ml

Préparation

- Dissoudre l'acide phénoxyacétique dans 20 ml d'alcool éthylique pur ;
- Dans une autre fiole, préparer 700 ml d'ED avec 4g d'hydroxyle de potassium (KOH), puis ajouter le POAA à cette fiole ;
- Ajuster le pH à 6,6 avec la solution aqueuse d'hydroxyde de potassium (KOH) à 20%
- Ajouter les ingrédients et compléter le volume à 1000 ml avec l'ED ;
- Distribuer le milieu à raison de 35 ml par fiole de 500 ml ;
- Boucher les fioles avec du coton cardé et de la gaze ;
- Stériliser le milieu à 121°C pendant 20 min (1,1 bar) ;
- pH après stérilisation doit être de $6,3 \pm 0,2$.

Annexe V

Milieu "M2" V

Milieu liquide pour la fermentation dans des fioles agitées

Composition :

- Acide phénoxyacétique (Sigma).....12g
- Glucose200g
- Pharmamedia (Traders).....32,5g
- Sulfate d'ammonium (Merck).....12g
- Carbonate de calcium.....10g
- Phosphate potassium monobasique (Merck).....05g
- Sulfate de potassium (Merck).....05g
- Huile de soja.....10g
- Eau distillée.....1000ml

Préparation

- Dissoudre l'acide phénoxyacétique dans 20 ml d'alcool éthylique pur ;
- Dans une autre fiole, préparer 700 ml d'ED avec 4g d'hydroxyle de potassium (KOH), puis ajouter le POAA à cette fiole ;
- Ajuster le pH à 6,6 avec la solution aqueuse d'hydroxyde de potassium (KOH) à 20% ;
- Ajouter les ingrédients et compléter le volume à 1000 ml avec l'ED ;
- Distribuer le milieu à raison de 35 ml par fiole de 500 ml ;
- Boucher les fioles avec du coton cardé et de la gaze ;
- Stériliser le milieu à 121°C pendant 20 min (1,1 bar) ;
- pH après stérilisation doit être de $6,3 \pm 0,2$.

Annexe VI

Milieu "M3" V

Milieu liquide pour la fermentation dans des fioles agitées

Composition :

- Acide phénoxyacétique (Sigma).....12g
- Saccharose.....150g
- Pharmamedia (Traders).....32,5g
- Sulfate d'ammonium (Merck).....12g
- Carbonate de calcium.....10g
- Phosphate potassium monobasique (Merck).....05g
- Sulfate de potassium (Merck).....05g
- Huile de soja.....10g
- Eau distillée.....1000ml

Préparation

- Dissoudre l'acide phénoxyacétique dans 20 ml d'alcool éthylique pur ;
- Dans une autre fiole, préparer 700 ml d'ED avec 4g d'hydroxyde de potassium (KOH) puis ajouter le POAA à cette fiole ;
- Ajuster le pH à 6,6 avec la solution aqueuse d'hydroxyde de potassium (KOH) à 20% ;
- Ajouter les ingrédients et compléter le volume à 1000 ml avec l'ED ;
- Distribuer le milieu à raison de 35 ml par fiole de 500 ml ;
- Boucher les fioles avec du coton cardé et de la gaze ;
- Stériliser le milieu à 121°C pendant 20 min (1,1 bar) ;
- pH après stérilisation doit être de $6,3 \pm 0,2$.

Annexe VII

Milieu "M4" V

Milieu liquide pour la fermentation dans des fioles agitées

Composition :

- Acide phénoxyacétique (Sigma).....12g
- amidon80g
- Pharmamedia (Traders).....32,5g
- Sulfate d'ammonium (Merck).....12g
- Carbonate de calcium.....10g
- Phosphate potassium monobasique (Merck).....05g
- Sulfate de potassium (Merck).....05g
- Huile de soja.....10g
- Eau distillée.....1000ml

Préparation :

- Dissoudre l'acide phénoxyacétique dans 20 ml d'alcool éthylique pur ;
- Dans une autre fiole, préparer 700 ml d'ED avec 4g d'hydroxyde de potassium (KOH) puis ajouter le POAA à cette fiole ;
- Ajuster le pH à 6,6 avec la solution aqueuse d'hydroxyde de potassium (KOH) à 20% ;
- Ajouter les ingrédients et compléter le volume à 1000 ml avec l'ED ;
- Distribuer le milieu à raison de 35 ml par fiole de 500 ml ;
- Boucher les fioles avec du coton cardé et de la gaze ;
- Stériliser le milieu à 121°C pendant 20 min (1,1 bar) ;
- pH après stérilisation doit être de $6,3 \pm 0,2$.

Annexe VIII

Préparation des solutions pour le dosage de l'antibiotique par spectrophotométrie :

Chlorure d'hydroxylamine

Dissoudre 350 g de chlorure d'hydroxylamine dans 600 ml d'ED a 60 °C puis refroidir a 25°C, porter le volume a 1000ml. Laisser la solution dans une chambre climatisées, la solution est stable à 25°C pendant un mois environ.

Réactif alcalin

Dissoudre 173 g d'hydroxyde de sodium et 20,6 g d'acétate de sodium anhydre dans 700 ml d'ED , refroidir a 25°C puis porter le volume a 1000 ml dans un ballon gradué, stocker a 25°C .

Solution alcoolique

Mélanger :

- Un volume de réactif d'hydroxylamine
- Un volume de réactif alcalin
- Huit volumes d'ED
- Deux volumes d'alcool éthylique 95%

Régler le pH du mélange entre 6,9 et 7,1 avec l'hydroxylamine ou le réactif alcalin si nécessaire (la solution alcoolique doit être préparée chaque jour).

Sulfate d'ammonium ferrique (alun de fer)

Ajouter soigneusement 94 ml d'acide sulfurique concentré à 700 ml d'ED et dissoudre dans cette solution 200 g de sulfate d'ammonium ferrique 12 H₂O.

Refroidir à 25°C et porter le volume à 1000 ml dans un ballon gradué, filtrer sur papier filtre et stocker loin des sources de la lumière. Le réactif devrait être stable pendant 1 mois à 25°C.

Tampon phosphate

Dissoudre dans 100 ml d'ED, 2 g de phosphate de potassium monoacide (K_2HPO_4) et 8 g de phosphate de potassium diacide (KH_2PO_4).

Vérifier le pH qui doit être 6,43.

Annexe IX

Tableau VIII : Résultats des absorbances (DO) de différentes concentrations du standard de la pénicilline V

Standard mg/ml	1,18	2,95	3,83	5,01	5,9	8,85
Standard UI/ml	1888	4720	6128	8016	9440	14160
DO échantillon	0,046	0,226	0,275	0,343	0,515	0,665

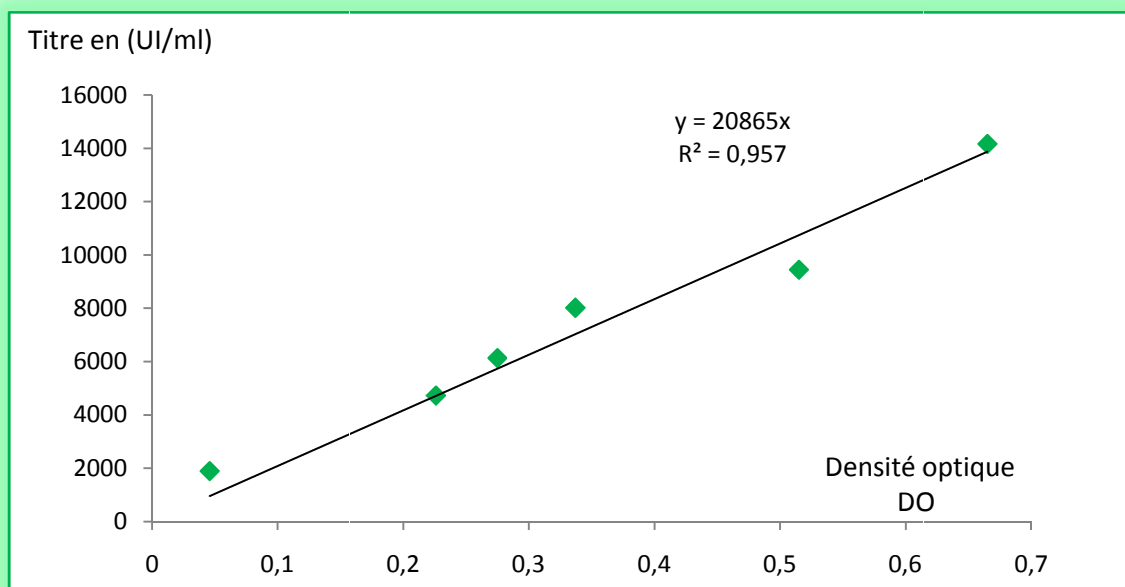


Figure 18 : Courbe d'étalonnage du standard de la pénicilline V

Calcul du Km :

$$Km = Tg \alpha = 20865(UI/ml)$$

Annexe X

❖ Préparation des solutions tampons et phase mobile

Solution Tampon I

- Peser avec exactitude 6,8045 g de KH_2PO_4 dans une fiole jaugée de 1000ml.
- Dissoudre dans l'eau distillée, puis compléter le volume jusqu'au trait de jauge.
- Ajuster le pH a 6 sous agitation avec une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) 1N.

Solution Tampon II

- Peser exactement 6,8045 g de KH_2PO_4 dans une fiole jaugée de 1000ml.
- Dissoudre dans l'eau distillée, puis compléter le volume jusqu'au trait de jauge.
- Ajouter 200 ml d'acétonitrile pour HPLC.
- Ajuster le pH a 6 sous agitation avec une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) 1%

Solution phase mobile

- Peser exactement 6,8045 g de KH_2PO_4 dans une fiole jaugée de 1000ml.
- Dissoudre dans l'eau distillée, puis compléter le volume jusqu'au trait de jauge.
- Ajouter 330 ml d'acétonitrile pour HPLC.
- Ajuster le pH à 4,5 sous agitation avec une solution d'hydroxyde de sodium (H_3PO_4) a 1%.
- Filtrer à travers une membrane filtrante de 0,45 μm .
- Dégazer dans un bain ultrason.

Préparation des standards

Solution standard de pénicilline V

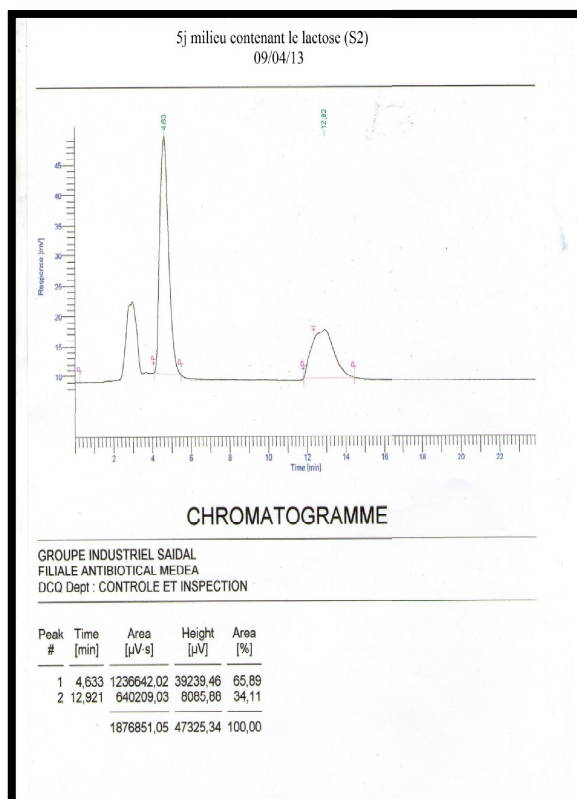
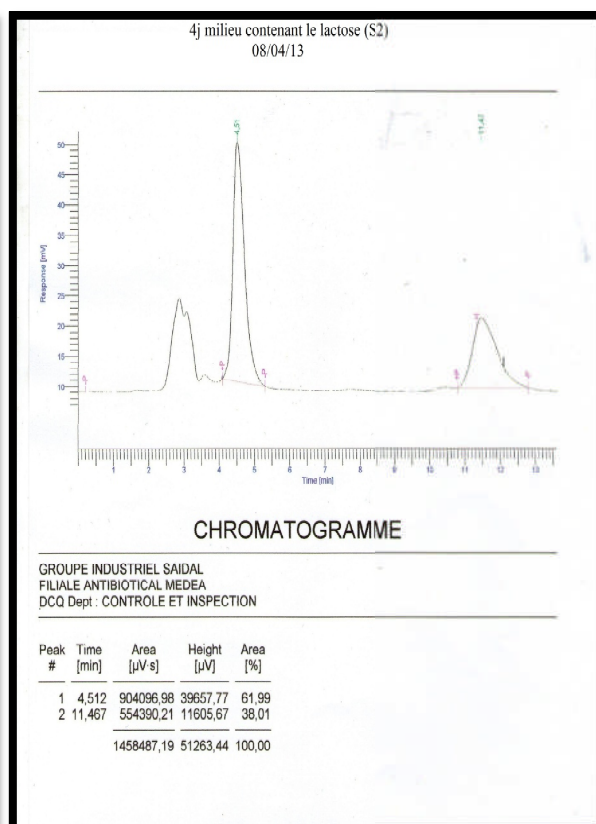
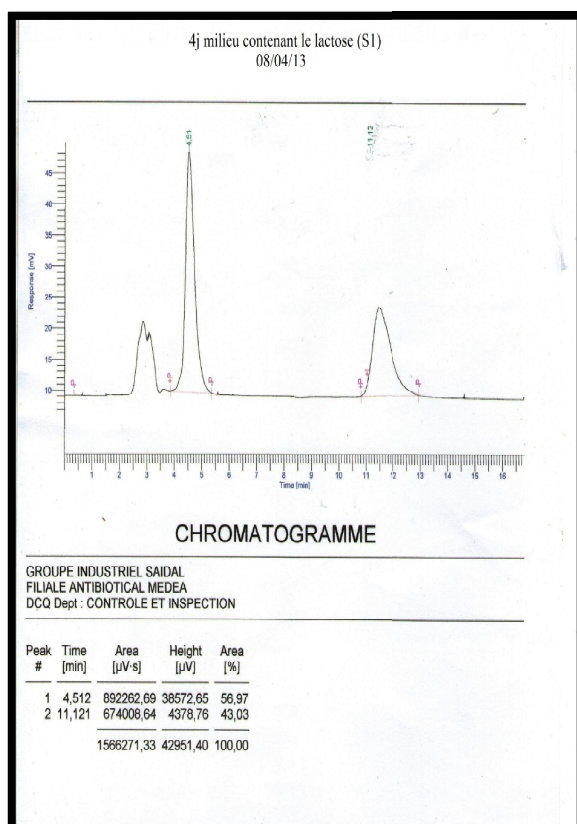
- Peser exactement 70 mg de pénicilline V std dans une fiole jaugée de 100 ml.
- Dissoudre avec la solution Tampon I et compléter le volume avec la même solution.

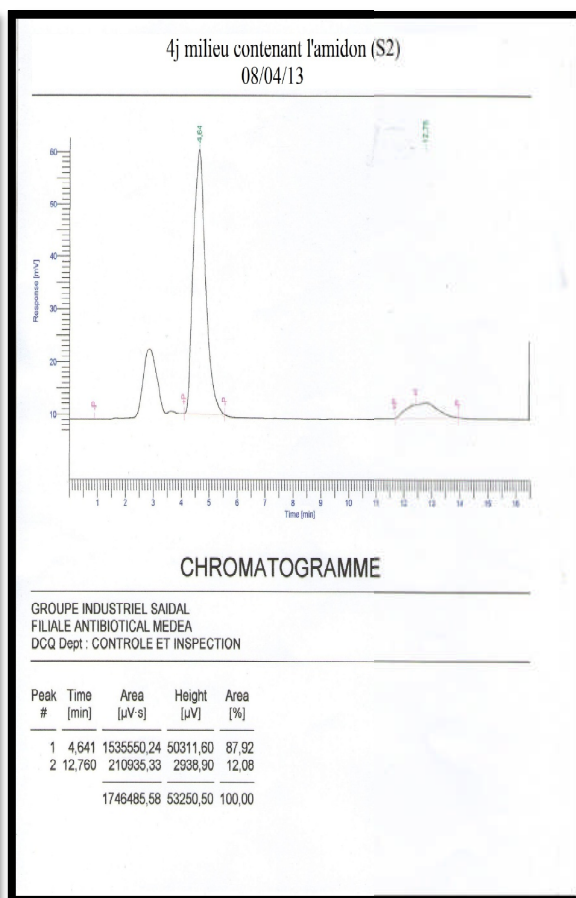
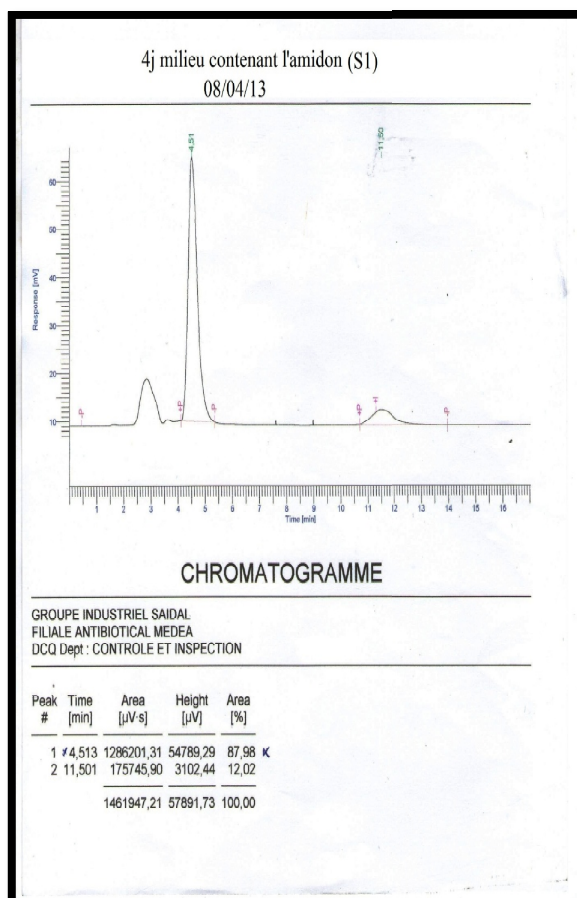
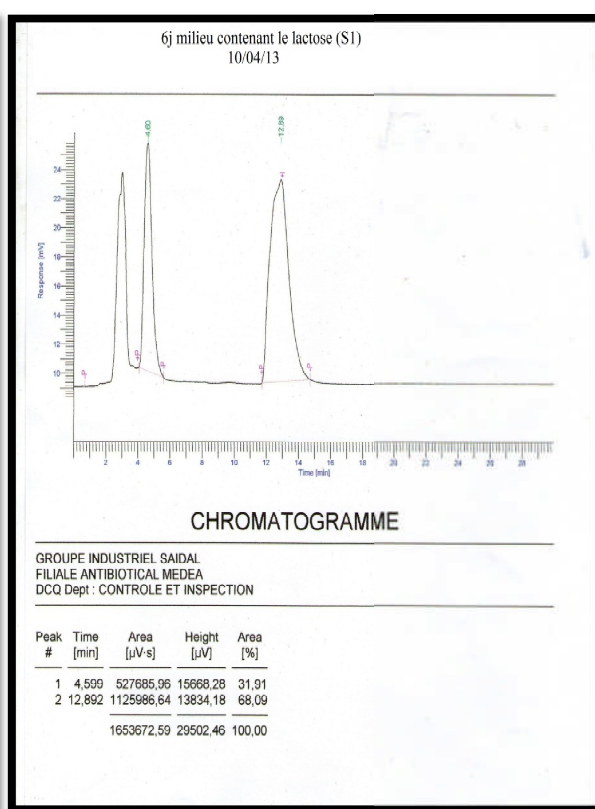
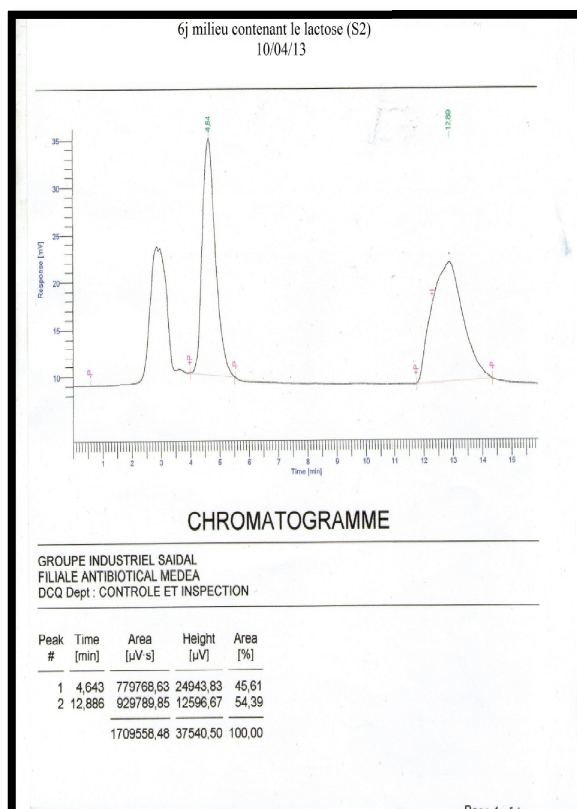
Solution standard précurseur PAO

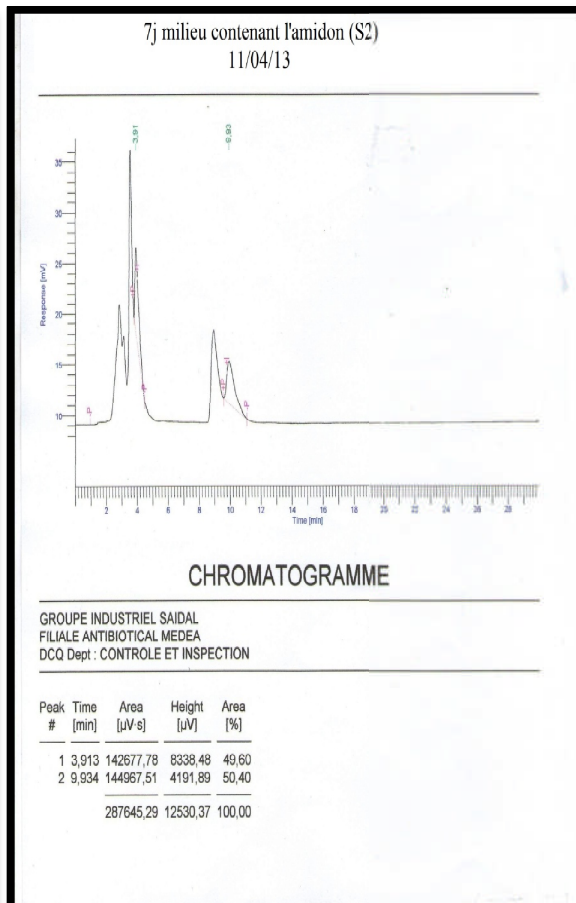
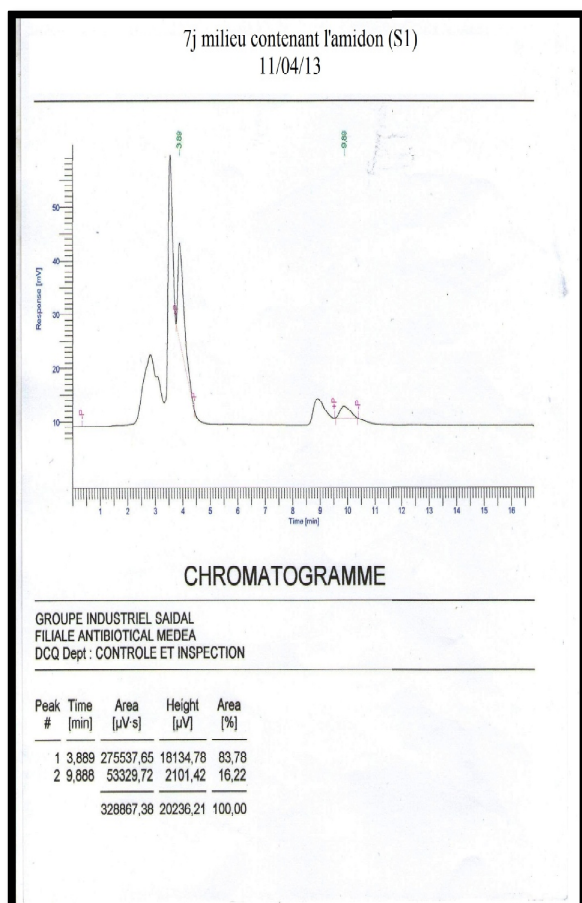
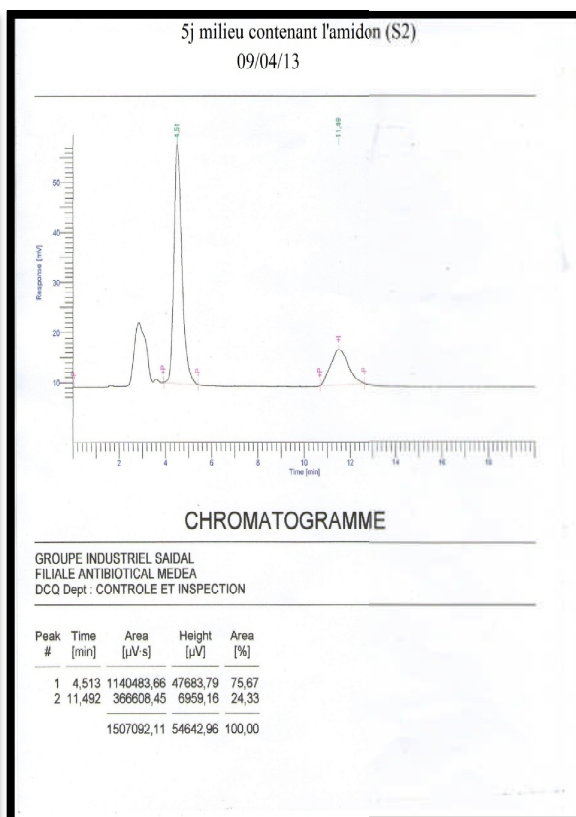
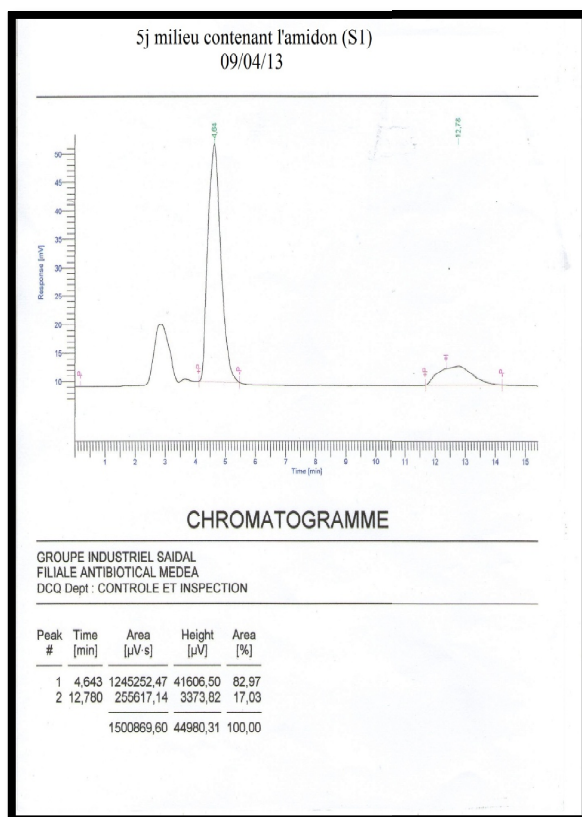
- Peser exactement 30 mg du PAO dans une fiole jaugée de 100 ml.
- Dissoudre avec la solution Tampon 1 sous agitation 70°C pendant 10 min.
- Compléter le volume a 100 ml avec la même solution

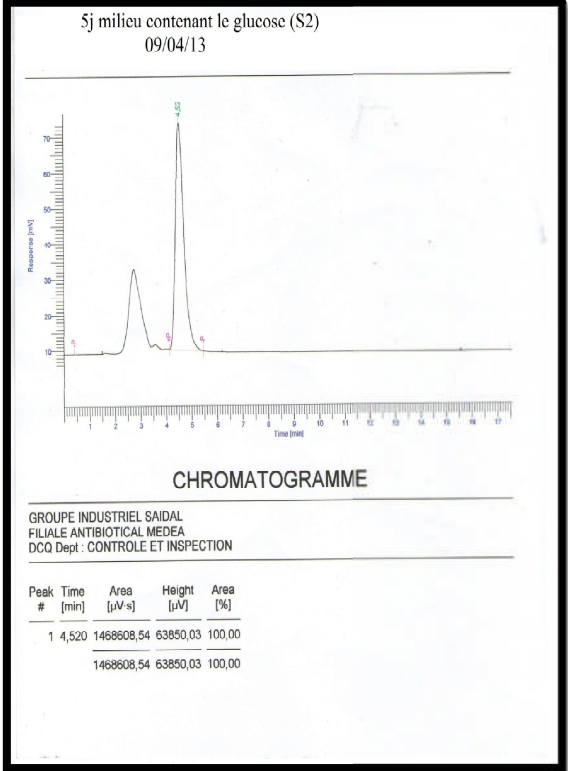
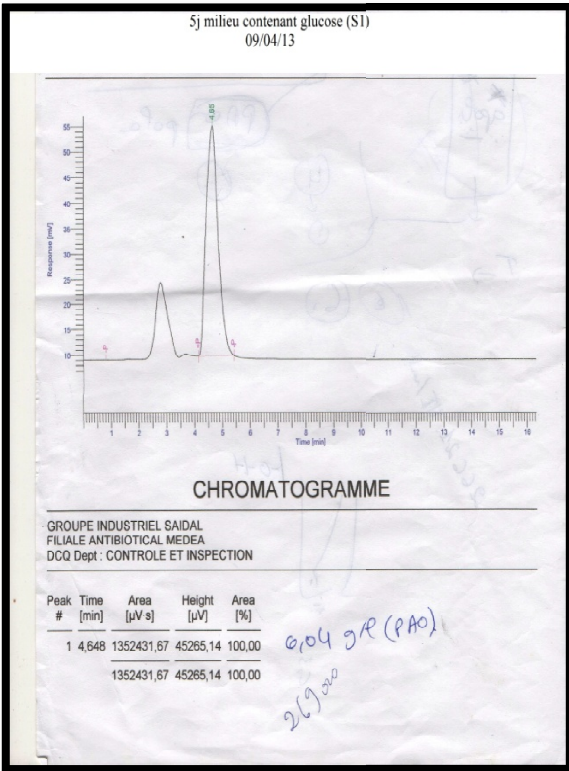
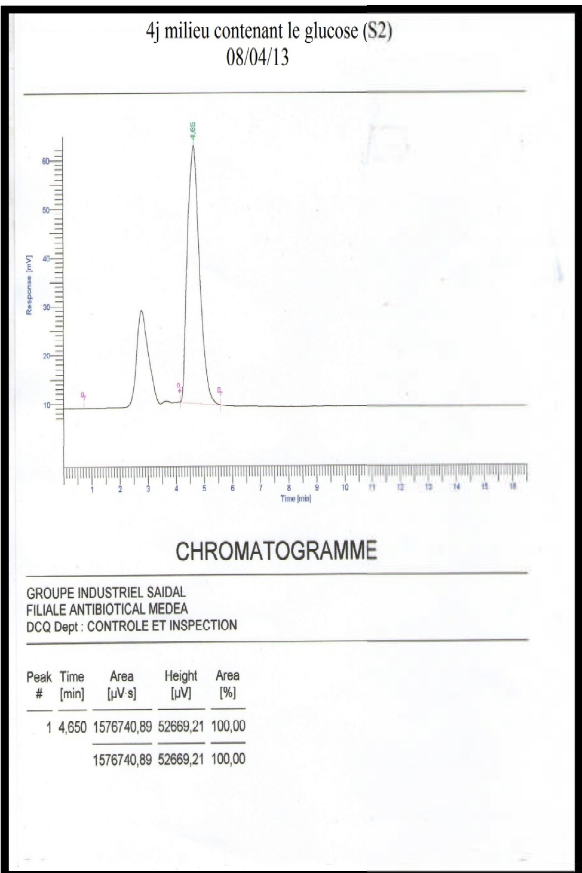
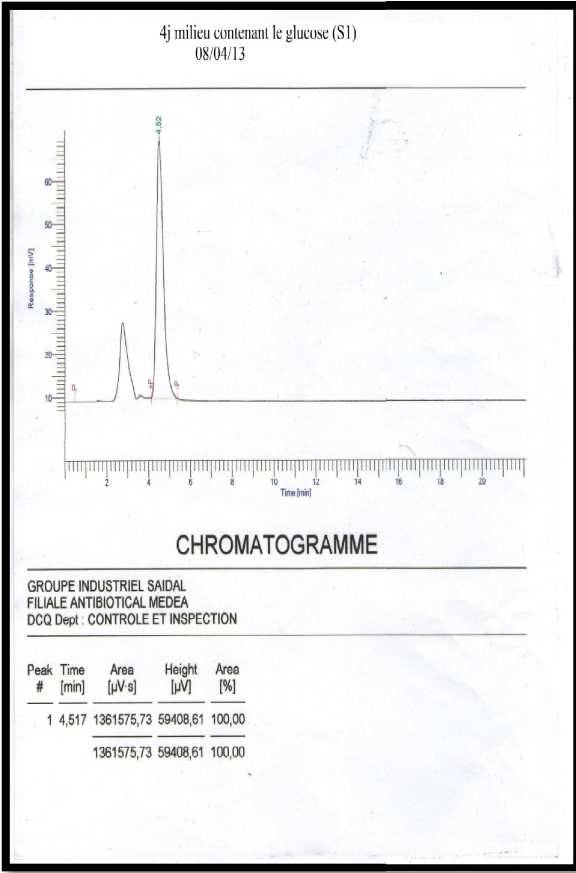
Annexe XI

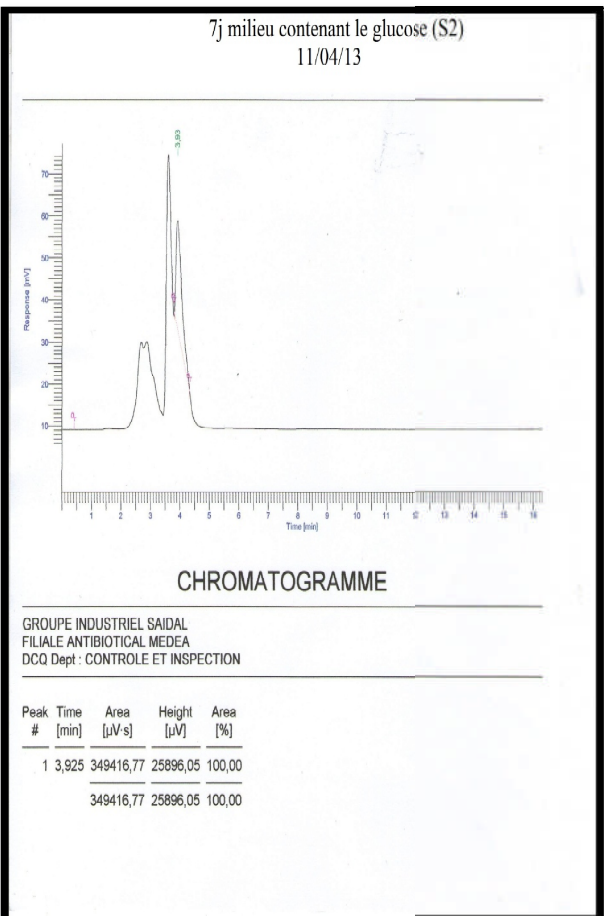
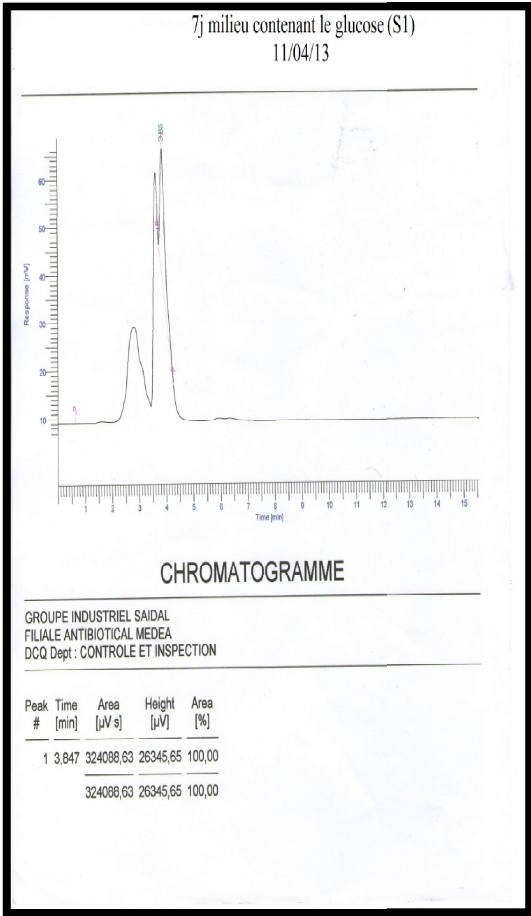
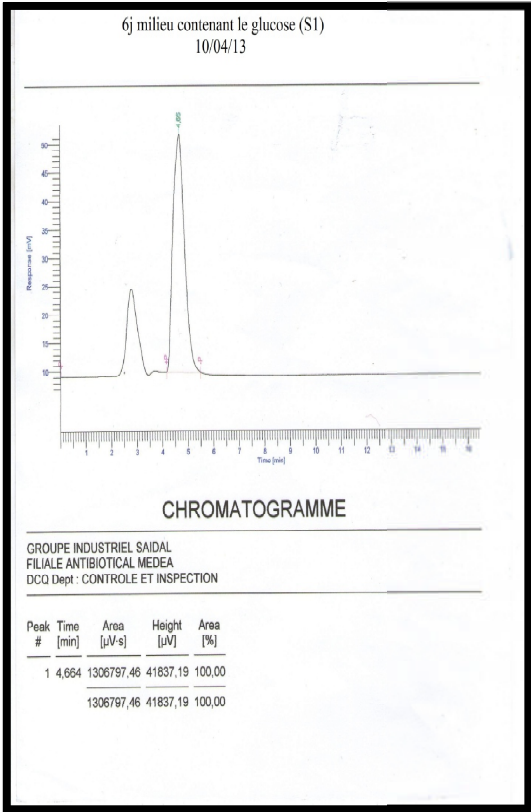
Les pics des échantillons obtenues par HPLC :

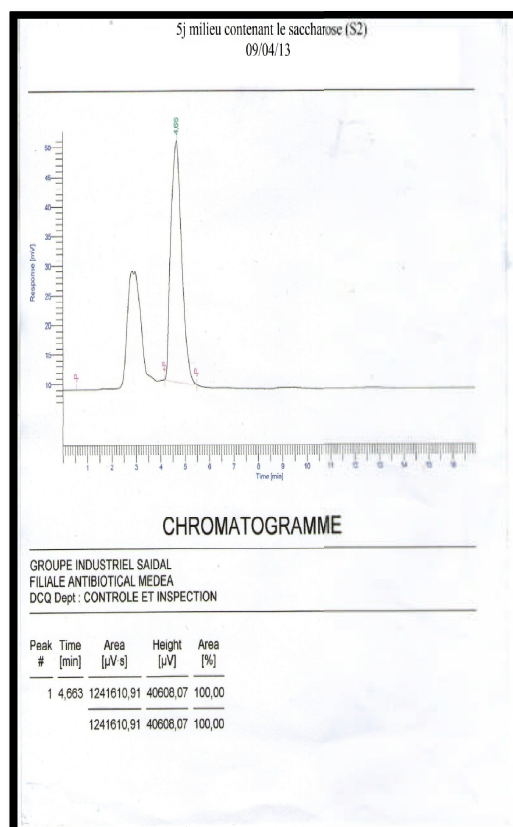
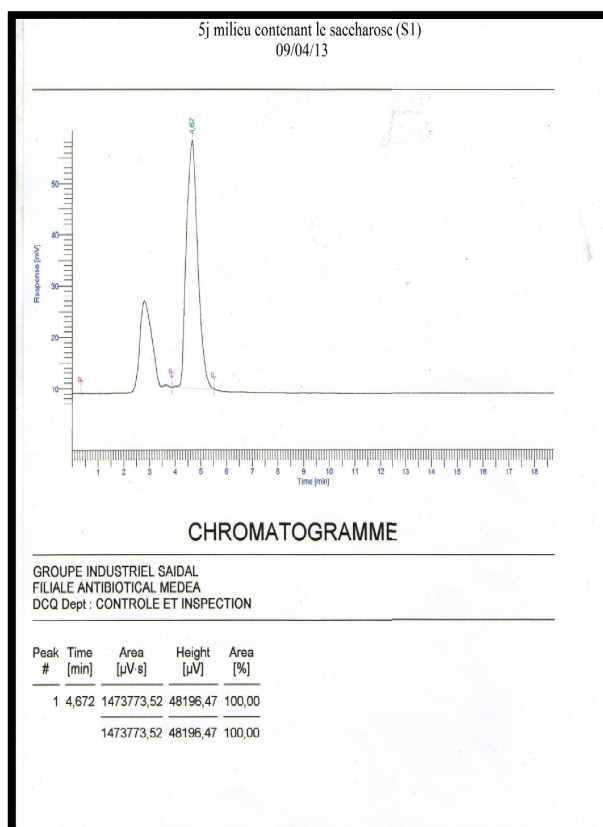
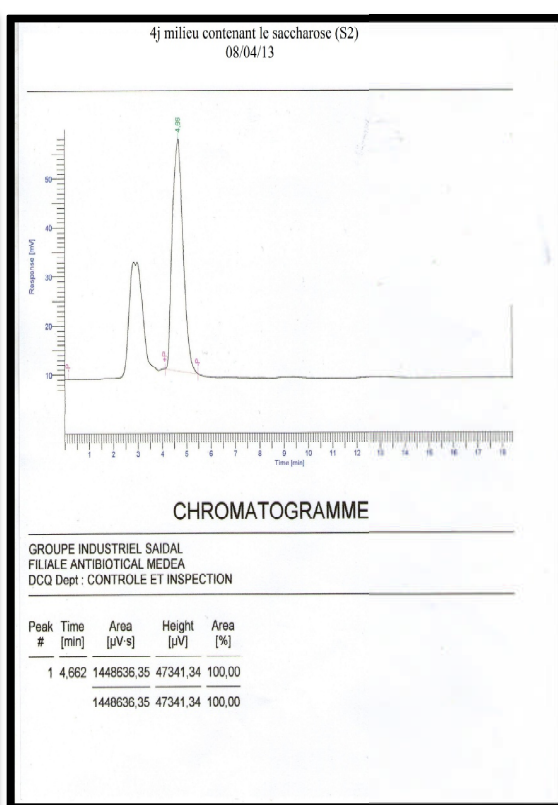
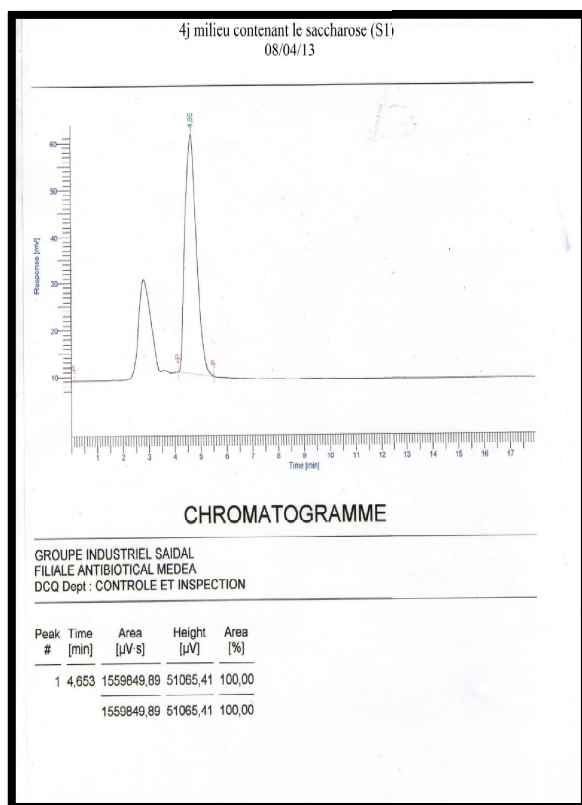


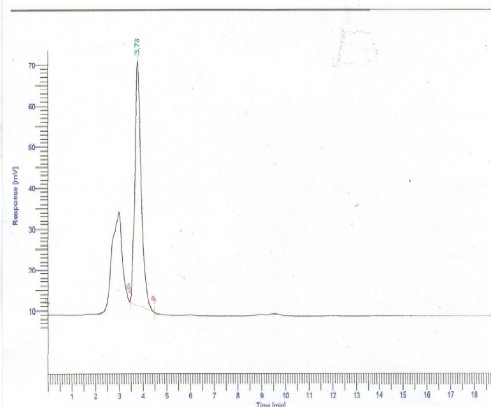








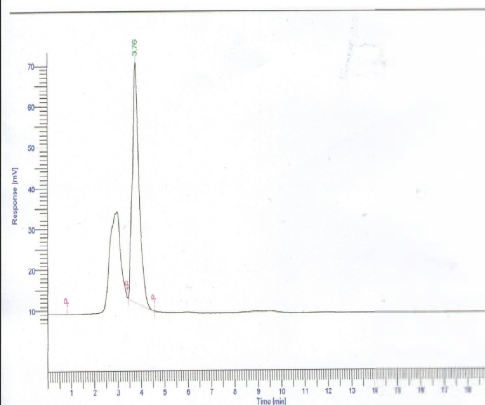


6j milieu contenant le saccharose (S1)
10/04/13

CHROMATOGRAMME

GROUPE INDUSTRIEL SAIDAL
FILIALE ANTIBIOTICAL MEDEA
DCQ Dept : CONTROLE ET INSPECTION

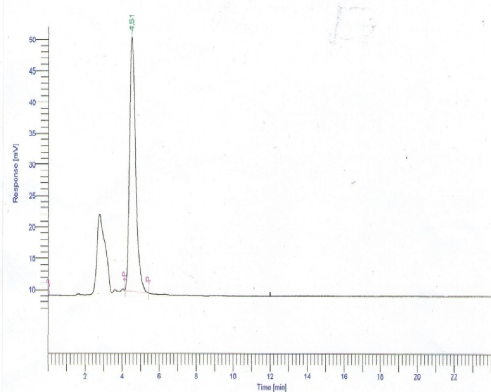
Peak #	Time [min]	Area [μV.s]	Height [μV]	Area [%]
1	3,778	1103354,71	59543,27	100,00
	1103354,71	59543,27		100,00

6j milieu contenant le saccharose (S2)
10/04/13

CHROMATOGRAMME

GROUPE INDUSTRIEL SAIDAL
FILIALE ANTIBIOTICAL MEDEA
DCQ Dept : CONTROLE ET INSPECTION

Peak #	Time [min]	Area [μV.s]	Height [μV]	Area [%]
1	3,763	1175436,22	58690,07	100,00
	1175436,22	58690,07		100,00

7j milieu contenant le saccharose (S1)
11/04/13

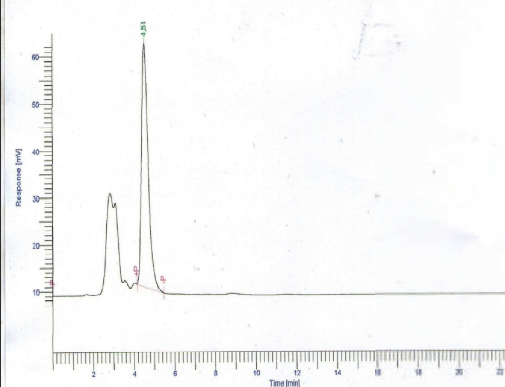
CHROMATOGRAMME

GROUPE INDUSTRIEL SAIDAL
FILIALE ANTIBIOTICAL MEDEA
DCQ Dept : CONTROLE ET INSPECTION

Peak #	Time [min]	Area [μV.s]	Height [μV]	Area [%]
1	4,511	919217,72	40505,49	100,00
	919217,72	40505,49		100,00

Software Version : 6.3.2.0646

Date

7j milieu contenant le saccharose (S2)
11/04/13

CHROMATOGRAMME

GROUPE INDUSTRIEL SAIDAL
FILIALE ANTIBIOTICAL MEDEA
DCQ Dept : CONTROLE ET INSPECTION

Peak #	Time [min]	Area [μV.s]	Height [μV]	Area [%]
1	4,511	1172826,91	51752,92	100,00
	1172826,91	51752,92		100,00

Résumé

L'objectif de cette étude est de montrer l'influence de plusieurs paramètres tels que : le pH et la biomasse sur la productivité de la pénicilline V par l'utilisation de différents sucres (amidon, lactose et glucose) ayant des vitesses de dégradation différentes.

L'optimisation de la cinétique de fermentation a été étudiée dans des fioles d'Erlenmeyer afin de synthétiser la Pénicilline V au niveau du complexe Antibiotical SAIDAL .

Notre étude a montré que le lactose a donné de meilleurs résultats comparant au glucose et l'amidon qui n'ont pas donné de meilleurs titres de pénicilline V.

Mots clé : *Pénicilline V ; Fermentation ; Cinétique ; P.chrysogenum.*

Abstract

The aim of this study was to show the dependence of antibiotic production efficiency on more parameters such as; pH, biomass on the productivity of antibiotic with the use of variety of sugar (starch, lactose and glucose) which have different degradation rate.

Optimization of the fermentation kinetics was carried out in an Erlenmeyer to produced Penicillin V at SAIDAL Antibiotical complex.

Our study shows that lactose gave the best results compared to glucose and starch which didn't give a high titer of penicillin V.

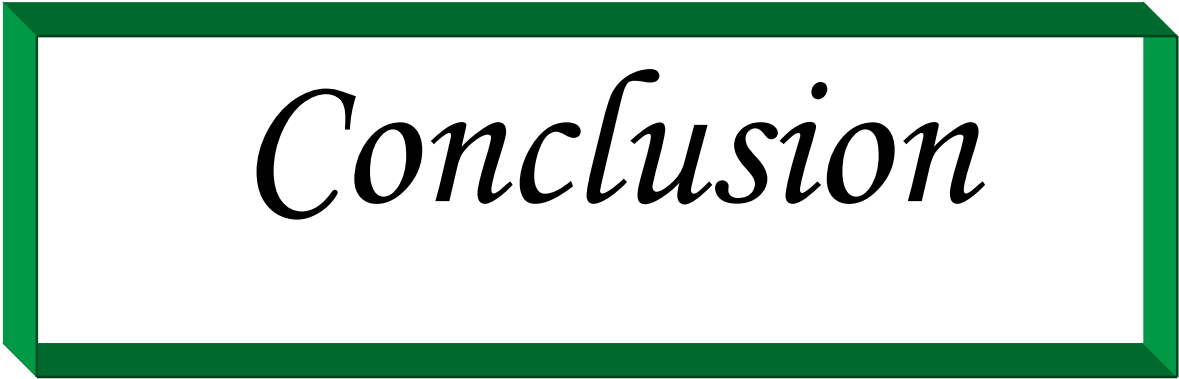
Key words; *Penicillin V; Fermentation; kinetic; P.chrysogenum.*

Introduction

Partie
Théorique



Partie pratique



Conclusion

*Références
bibliographiques*



Annexes

*Résultats et
discussions*