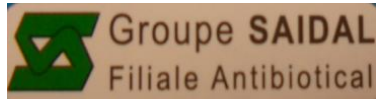


République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane MIRA de Béjaia  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie



# Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'État

Option : Génie Biologique

## Production de la pénicilline V par *Penicillium chrysogenum* à différents pH du milieu fermentatif

Présenté par : Mr. OUSALEM Fares  
Mr. SI HADJ MOHAND Ishac

Devant le jury:

Président : Mr. MADANI K. MCA  
Examineur : M<sup>elle</sup>. CHIBANE N. MACA  
Rapporteur : Mr. BOUKERROUI A. MCA

Promotion Juin 2012

## REMERCIEMENTS

*Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de microbiologie industrielle (VRAC) de la filiale ANTIBIOTICAL (Médéa) du groupe SAIDAL.*

*Nous remercions le Docteur Boukerroui Abdelhamid notre promoteur, pour avoir accepté de diriger ce travail. Son soutien et ses encouragements ont vu l'accomplissement de ce mémoire.*

*Nous tenons à exprimer notre reconnaissance à Messieurs Touati Abdelkrim et Belkacemi Abed, qui nous ont accueillis et dirigé pendant la durée de notre stage au sein du complexe ANTIBIOTICAL. Grace à eux, ont a pu réaliser ce modeste travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de nos vifs remerciements.*

*Nos remerciements vont aussi au Docteur Madani Khodir, Maitre de Conférences au département sciences alimentaires de la faculté des sciences de la nature et de la vie et Mademoiselle Chibane N., Maitre assistante à la faculté de Technologie, de l'université A.MIRA de Bejaia, pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de le juger.*

*Nos remerciements vont également à tous ceux qui ont contribués du près ou du loin à la réalisation de ce mémoire : Docteur Touati Abdelaziz chef de département de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université de Bejaia, Messieurs : Si Hadj Mohand Abderrahmane, Achour, Kamel, Amokrane, Benaissa Mustapha pour leurs précieuses aides, sans leurs efforts ce travail n'aura pas eu lieu.*

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à messieurs les assistants de laboratoire : Dergua Khaled, Ghraba Mohamed, ami M'hamed, ami Benaissa, pour leurs disponibilité, leurs confiance, leur enthousiasme, leur soutien ainsi que pour toutes nos longues discussions, scientifiques et autres.*

*Nous tenons à remercier en particulier Khalti Elyamna, notre ange gardien qui nous a soutenus dans les pires conditions. Nos remerciements vont aussi à nos nombreux camarades et amis(es) du laboratoire pour leur gentillesse et la bonne humeur générale dégagée par cette équipe. Nous remercions en particulier Dalila et Lamia, pour nous avoir supportés et collaborés avec nous durant les trois mois du stage.*

*Nous tenons à associer à ces remerciements nos familles, pour nous avoir soutenues tout au long de nos études, dans nos stages antérieurs, particulièrement monsieur OUSALEM Aomar, pour tout ce qu'ils ont fait pour nous et ce qu'ils nous ont apportés.*

**OUSALEM & SI HADJ MOHAND**

# DÉDICACES

*Je dédie ce modeste travail :*

- ✚ A mes très chers parents Abderrahmane et Yamina, qui sont ma fierté, mon inspiration, mon énergie, ma passion et la raison de ma réussite.*
- ✚ A la mémoire de mes grands parents.*
- ✚ A mes précieux frères et sœurs : Aissame, Noudjoud, Samra et mon cher Amazigh, sans eux la vie serait beaucoup compliquée pour moi.*
- ✚ A ma belle-sœur Nadia*
- ✚ A mes beaux frères : Rachid et Toufik*
- ✚ A mes adorables nièces et neveux : Rabii, Assales, syphaxe, Maroua et sarah.*
- ✚ A mon binôme et ami Fares et sa famille.*
- ✚ A mes amis(es) : Moussa, Smail, Mohand Cherif, Hamou, Saad, Djilali, Yacine, Tounsia, Djahida, Julia, Khouas et Amer.*
- ✚ A ma très chère amie Ouardia.*
- ✚ A mes amis(es) du tronc commun sciences de la nature et de la vie de l'université M.Maameri de Tizi-Ouzou*
- ✚ A mes amis(es) de la promotion Génie Biologique 2012*
- ✚ A mes estimables enseignants du primaire à l'université*
- ✚ A tous ceux qui sont chers à moi, qu'ils me pardonnent si je ne les ai pas cités.*

*Ishac SI HADJ MOHAND*

## DÉDICACES

*Avec l'aide de Dieu, le Tout Puissant, je dédie ce modeste travail :*

- ✚ A mes très chers parents Aomar et Saliha, en reconnaissance de tous les sacrifices, les efforts, l'amour et la gentillesse qu'ils m'ont toujours apportés, et : « Que Dieu leur accorde une très longue vie ».*
- ✚ A la mémoire de mes grands parents Jedi Seghir et Ima Zaza que dieu les accueille dans son vaste paradis.*
- ✚ A mon cher aimable frère Nabil que j'adore et j'estime trop pour le remercier et sa femme Hassina qui m'a encouragé pour la réussite de ce mémoire.*
- ✚ A ma chère adorable sœur Nora à qui je souhaite une bonne continuation dans ses études avec tous mes vœux de bonheur et de réussite dans sa vie.*
- ✚ A mes très chers grands parents maternels Jedi Alaoua et Ima Adja.*
- ✚ A toute ma famille : mes cousins et cousines, mes oncles à mes tantes.*
- ✚ A monsieur le chef de département TOUATI Abd aziz pour sa générosité et ses services qui m'a facilité d'atteindre mes objectifs.*
- ✚ A mon cher binôme Ishac et à toute sa famille.*
- ✚ A tous mes enseignants et à la promotion de Génie Biologique 2012.*
- ✚ A tous mes amis plus particulièrement : Mouloud, Ali, Ahmed, Fahim, Sonia et Chicha.*
- ✚ A tous ceux qui ont vécu pour une idée ou qui sont morts pour que la lumière de la science règne sur terre.*

*Enfin, à tous ceux de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail, en guise de reconnaissance.*

*Fares OUSALEM*

## SOMMAIRE

### ARREVIATIONS

### LISTE DES TABLEAUX

### LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

## SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### CHAPITRE I : PRESENTATION DE SAIDAL

I. Présentation de la filiale ANTIBIOTICAL.....	2
I.1. Historique.....	2
I.2. Objectifs stratégiques du Groupe.....	2
I.3. Présentation de la filiale ANTIBIOTICAL.....	3

### CHAPITRE II : *Penicillium chrysogenum*

II.1. Les moisissures.....	4
➤ Classification des moisissures .....	5
II.2. Deutéromycètes (ou champignons imparfaits).....	5
II.3. Classification du <i>P. chrysogenum</i> .....	5
II.4. Habitat.....	6
II.5. Mécanisme de croissance.....	6
II.6. Obtention de la souche .....	7

II.7. Paramètres influençant la production de la pénicilline par <i>P. chrysogenum</i> .....	7
II.7.1. Eléments nutritifs .....	7
II.7.1.1. Source de carbone et d'énergie.....	8
II.7.1.2. Source d'azote.....	8
II.7.1.3. Eléments minéraux.....	9
II.7.2. Facteurs physicochimiques .....	9
II.7.2.1. Température .....	9
II.7.2.2. Humidité .....	10
II.7.2.3. ph .....	10
II.7.2.4. Oxygène .....	10
II.7.2.5. Agitation .....	11
II.7.3. Facteurs biologiques .....	11
II.7.3.1. Stérilité .....	11
II.7.3.2. La concentration de l'inoculum .....	11
II.8. Développement et production industrielle.....	11
II.8.1. Développement .....	11
II.8.2. Utilisation industrielle.....	12
II.9. Conservation des souches.....	13
II.10. Réactivation des souches.....	13

## **CHAPITRE III : PENICILLINES**

III.1. Définition de l'antibiotique .....	15
III.2. Aspect historique de la découverte des pénicillines .....	15
III.3. Les beta-lactamines .....	15

III.4. Structure et classification .....	16
III.5. Mécanisme d'action des $\beta$ -lactamines .....	17
III.6. La pénicilline V .....	18
III.7. Structure de la pénicilline V .....	19
III.8. Biosynthèse de la pénicilline V .....	19
III.9. Stabilité des pénicillines .....	21
III.9.1. Stabilité en milieu acide (pH<3) .....	21
III.9.2. Stabilité en milieu basique (pH>8) .....	21
III.10. Spectre d'action des pénicillines .....	21

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **MATERIELS ET METHODES**

#### **I. Matériels**

I.1. Matériel biologique .....	23
I.2. Appareillage .....	23
I.3. Verrerie et petit matériels .....	24
I.4. Réactifs de qualité RP (Recta pur) .....	24
I. 5. Milieux de culture .....	25

#### **II. Méthodes**

II.1. Test de fermentation dans des fioles agitées.....	25
II.1.1. La germination .....	25
II.1.2. La fermentation .....	26
II.2. Dosage de lactose.....	27

II.2.1. Dosage de lactose dans le bouillon de fermentation de la pénicilline v par méthode du glucomètre .....	27
II.2.2. Dosage de lactose dans le bouillon de fermentation de la pénicilline V par méthode chimique (à l'anthrone) .....	27
II.3. Dosage de l'antibiotique .....	29

## RESULTATS ET DISCUSSION

### III. Résultats

#### 1<sup>er</sup> test de fermentation à pH4.

##### III.1.1 Germination

- pH et sédimentation ..... 31

##### III.1.2. Fermentation

- a- Dosage de lactose.....31
- b- Suivi du pH, sédimentation, et le titre de la péni V.....32

#### 2<sup>em</sup> test de fermentation à pH=5

##### III.2.1. Germination

- pH et sédimentation..... 33

##### III.2.2. Fermentation

- c- Dosage de lactose.....34
- d- Suivi du pH, sédimentation, et le titre de la péni V.....35

#### 3<sup>em</sup> test de fermentation à pH=6

##### III.3.1. Germination

- pH et sédimentation .....36

##### III.3.2. Fermentation

- e- Dosage de lactose.....36
- f- Suivi du pH, sédimentation, et le titre de la péni V.....37



## **4<sup>em</sup> test de fermentation à pH=7**

### III.4.1. Germination

- pH et sédimentation.....38

### III.4.2. Fermentation

- g- Dosage de lactose.....39
- h- Suivi du pH, sédimentation, et le titre de la pénicilline V.....40

## **5<sup>em</sup> test de fermentation à pH=8**

### III.5.1. Germination

- pH et sédimentation.....41

### III.5.2 Fermentation

- i- Dosage de lactose.....41
- j- Suivi du pH, sédimentation, et le titre de la pénicilline V.....42

## **IV. Récapitulations des résultats obtenus de cinq tests de fermentation pour la S1 et S2.**

IV.1. pH ..... 44

IV.2. Biomasse ..... 44

IV.3. Concentration de lactose ..... 45

IV.4. Titre de la pénicilline V ..... 45

## **V. Discussion**

V.1. Evolution des paramètres de la fermentation en fonction du temps ..... 46

V.1.1. pH ..... 46

V.1. 2. Biomasse ..... 46

V.1. 3. Concentration du lactose dans le milieu fermentatif ..... 48

V.1.4. Le titre de la pénicilline V ..... 50

**Conclusion.....51**

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

## Liste des abréviations

<b>6 APA :</b>	Acide 6 Aminopénicillinique
<b>Act:</b>	Activité
<b>ACV:</b>	$\delta$ - (L- aminoadipyl- L- cysteinyl- D- valine)
<b>ATB :</b>	Antibiotique
<b>CMP :</b>	Culture Medium Penicillium
<b>Dil:</b>	Dilution
<b>Do:</b>	Densité optique
<b>Ech:</b>	Echantillon
<b>ED:</b>	Eau distillée
<b>EDS:</b>	Eau distillée stérile
<b>EL :</b>	Extra Léger
<b>EPS:</b>	Eau peptonée stérile
<b>F<sub>d</sub></b>	Facteur de dilution
<b>Fig :</b>	Figure
<b>FMP:</b>	Fermentative Medium Penicillium
<b>IAT:</b>	Isopénicilline N acyl transférase
<b>IPN:</b>	Isopénicilline N
<b>L-<math>\alpha</math>-AAA :</b>	Acide L- $\alpha$ aminoadipique
<b>Log T :</b>	L'âge de fermentation
<b>N :</b>	Normal
<b>M :</b>	Molaire
<b>P:</b>	<i>Penicillium</i>
<b>Péni V:</b>	Pénicilline V
<b>PLP:</b>	Protéine Liant pénicilline
<b>POAA:</b>	Phenoxyacetic acid

**PV 07/01/12:** Penicillium V generation 07/ colonie 01/ année de conservation

**PV 07/02/12:** Penicillium V generation 07/ colonie 02/ année de conservation

**rpm:** rotation par minute

**Std:** Standard

**S1 :** Souche 1

**S2 :** Souche 2

**Tr/min:** Tour par minute

**UI :** Unité internationale

**VMP:** Vegetative Medium Penicillium

## Liste des tableaux :

**Tableau I :** Classification de *penicillium chrysogenum*.

**Tableau II:** Classification des  $\beta$ -lactamines.

**Tableau III :** pH et sédimentation après 40 heures de germination.

**Tableau IV:** Dosage de lactose par méthode chimique et par glucomètre.

**Tableau V :** Résultats du suivi de pH, sédimentation et le titre de la pénicilline V pour S1 et S2.

**Tableau VI :** pH et sédimentation après 40 heures de germination.

**Tableau VII :** Dosage de lactose par méthode chimique et par glucomètre.

**Tableau VIII :** Résultats du suivi de pH, sédimentation et le titre de la pénicilline V pour S1 et S2..

**Tableau IX :** pH et sédimentation après 40 heures de germination.

**Tableau X :** Dosage de lactose par méthode chimique et par glucomètre.

**Tableau XI :** Résultats du suivi de pH, sédimentation et le titre de la pénicilline V pour S1 et S2.

**Tableau XII :** pH et sédimentation après 40 heures de germination.

**Tableau XIII :** Dosage du lactose par méthode chimique et par glucomètre.

**Tableau XIV :** Résultats du suivi de pH, sédimentation et le titre de la pénicilline V pour S1 et S2.

**Tableau XV :** pH et sédimentation après 40 heures de germination.

**Tableau XVI :** Dosage de lactose par méthode chimique et par glucomètre.

**Tableau XVII :** Résultats du suivi de pH, sédimentation et le titre de la pénicilline V pour S1 et S2.

**Tableau XVIII :** Composition du corn steep liquor en acides aminés.

**Tableau XIX :** Absorbances des différentes concentrations du standard.

**Tableau XX :** Résultats des Do de différentes concentrations du standard de la pénicilline V.

**Tableau XXI :** pH et sédimentation des cinq tests de fermentation.

**Tableau XXII :** Dosage du lactose dans les cinq bouillons de fermentation pour S1 et S2.

**Tableau XXIII :** dosage du Titre de pénicilline V dans les cinq tests de fermentation pour S1 et S2

## Liste des figures

**Figure 01** : Principales classes des moisissures (**Frazier. 1967**).

**Figure 02** : Représentation schématique du *P. chrysogenum* (**Paul G. C. et al. 1998**).

**Figure 03** : Consommation du substrat et production de la pénicilline V.

**Figure 04** : Évolution du rendement en pénicilline en fonction des souches de *Penicillium* utilisées (**Patrick G. L. 2003**).

**Figure 05** : Procédé d'inoculation d'un milieu de culture liquide pour *P.chrysogenum*.

**Figure 06** : Le noyau  $\beta$ -lactame (Nauciel et Vildé, 2005).

**Figure 7** : Comparaison structurelle entre les peptidoglycanes et les  $\beta$ -lactamines (**De Wals, 2007**).

**Figure 8** : Structure chimique de la pénicilline V.

**Figure 9** : Les étapes de la biosynthèse de la pénicilline V. (**Miguel A. et al.1998**).

**Figure 10** : Évolution de la concentration du lactose durant la fermentation à pH4 pour S1.

**Figure 11** : Évolution de la concentration du lactose durant la fermentation à pH4 pour S2.

**Figure 12** : Évolution du pH, concentration de lactose, biomasse et le titre de la peni V durant la fermentation à pH4 pour S1.

**Figure 13** : Évolution du pH, concentration de lactose, biomasse et le titre de la peni V durant la fermentation à pH4 pour S2.

**Figure 14** : Évolution de la concentration du lactose durant la fermentation à pH5 pour S1.

**Figure 15** : Évolution de la concentration du lactose durant la fermentation à pH5 pour S2.

**Figure 16** : Évolution du pH, concentration de lactose, biomasse et le titre de la peni V durant la fermentation à ph5 pour S1.

**Figure 17 :** Évolution du pH, concentration de lactose, biomasse et le titre de la pénicilline V durant la fermentation à pH5 pour S2.

**Figure 18 :** Évolution de la concentration du lactose durant la fermentation à pH6 pour S1.

**Figure 19 :** Évolution de la concentration du lactose durant la fermentation à pH6 pour S2.

**Figure 20 :** Évolution du pH, concentration de lactose, biomasse et le titre de la pénicilline V durant la fermentation à pH6 pour S1.

**Figure 21 :** Évolution du pH, concentration de lactose, biomasse et le titre de la pénicilline V durant la fermentation à pH6 pour S2.

**Figure 22 :** Évolution de la concentration du lactose durant la fermentation à pH7 pour S1.

**Figure 23 :** Évolution de la concentration du lactose durant la fermentation à pH7 pour S2.

**Figure 24 :** Évolution du pH, concentration de lactose, biomasse et le titre de la pénicilline V durant la fermentation à pH7 pour S1.

**Figure 25 :** Évolution du pH, concentration de lactose, biomasse et le titre de la pénicilline V durant la fermentation à pH7 pour S2.

**Figure 26 :** Évolution de la concentration du lactose durant la fermentation à pH8 pour S1.

**Figure 27 :** Évolution de la concentration du lactose durant la fermentation à pH8 pour S2.

**Figure 28 :** Évolution du pH, concentration de lactose, biomasse et le Titre de la pénicilline V durant la fermentation à pH8 pour S1.

**Figure 29 :** Évolution du pH, concentration de lactose, biomasse et le titre de la pénicilline V durant la fermentation à pH8 pour S2.

**Figure 30 :** Évolution du pH des milieux fermentatifs (pH4, pH5, pH6, pH7 et pH8) de S1.

**Figure 31 :** Évolution du pH des milieux fermentatifs (pH4, pH5, pH6, pH7 et pH8) de S2.

**Figure 32 :** Évolution de la biomasse des milieux fermentatifs (pH4, pH5, pH6, pH7 et pH8) de S1.

**Figure 33 :** Évolution de la biomasse des milieux fermentatifs (pH4, pH5, pH6, pH7 et pH8) de S2.

**Figure 34 :** Évolution de la concentration de lactose dans les milieux fermentatifs (pH4, pH5, pH6, pH7 et pH8) pour S1.

**Figure 35 :** Évolution de la concentration de lactose dans les milieux fermentatifs (pH4, pH5, pH6, pH7 et pH8) pour S2.

**Figure 36 :** Évolution du titre de pén. V dans les milieux fermentatifs (pH4, pH5, pH6, pH7 et pH8) de S1.

**Figure 37 :** Évolution du titre de pén. V dans les milieux fermentatifs (pH4, pH5, pH6, pH7 et pH8) de S2.

**Figure 38 :** Courbe de standard de lactose.

**Figure 39:** Courbe d'étalonnage du standard de la Pénicilline VK.

## Introduction

En fermentation industrielle le souci d'optimiser est permanent chez l'opérateur en vue d'améliorer les résultats. La maîtrise de la production fait appel à des études approfondies des différents éléments qui constituent le procédé mis en place afin de pouvoir agir d'une manière efficace selon les attentes qualitatives et quantitatives (en produit ou en biomasse), tout en respectant l'aspect économique réalisant une meilleure production avec de moindres coûts en matières premières.

Plusieurs travaux de recherche sont effectués pour une meilleure productivité de la souche utilisée dans le procédé de production de la pénicilline V, en faisant varier les paramètres influençant la productivité de la souche tel que :

- le type et la concentration des sources nutritives,
- les facteurs physicochimiques et biologiques (température, agitation oxygénation concentration de l'inoculum),
- la durée de la fermentation.

C'est dans ce cadre que notre travail s'inscrit, tout en étant le souci de l'entreprise ANTIBIOTICAL. Celle-ci ne cesse de vérifier la productivité des souches de *Penicillium Chrysogenum* à différents pH du milieu de fermentation. 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.

Pour cela, nous avons procédé par les tests de deux souches fournies par le laboratoire, sur un milieu standard et aussi sur quatre autres milieux de fermentation, préparés avec des pH initiaux suivants : 4, 5, 6, 7 et 8. Les cinq tests de fermentation sont effectués en culture submergée dans des fioles agitées.

Pour la détermination de la productivité, la concentration des sucres totaux, la croissance de ces souches et le dosage du titre de la pénicilline V a été réalisé par une méthode colorimétrique (spectrophotomètre) et le suivi des sucres totaux par deux méthodes : Chimique à l'antrone et par glucomètre.



## **I. Présentation de la filiale ANTIBIOTICAL**

### **I.1. Historique**

En 1989 et suite à la mise en œuvre des réformes économiques, SAIDAL devient une entreprise publique économique dotée d'une autonomie de gestion et fut choisie parmi les premières entreprises nationales pour acquérir le statut de société par actions (**Aouni N et Bitouri M. 2006**).

En 1993 des changements ont été apportés aux statuts de l'entreprise lui permettant de participer à toutes opérations industrielles ou commerciales pouvant se rattacher à son objet social par voie de création de sociétés nouvelles ou de filiales (**Aouni N et Bitouri M. 2006**).

En 1997, la société SAIDAL a mis en œuvre un plan de restructuration qui s'est traduit par sa transformation en groupe industriel le 02 février 1998 (**Aouni N et Bitouri M. 2006**).

Le Groupe SAIDAL est une société par actions, au capital de 2.500.000.000,00 DA, qui se présente par ses entités centrales de gestion, d'un centre de recherche et de développement, de centre de distribution, d'une direction de marketing et information médicale et trois filiales de production (**Aouni N et Bitouri M. 2006**).

La mission principale est de développer, de produire et de commercialiser des produits à usage humain et vétérinaire (**Aouni N et Bitouri M. 2006**).

La vision du Groupe réside dans sa capacité de se projeter dans le futur et d'acquérir une position de leader au niveau national et régional tout en pénétrant le marché international. (**Aouni N et Bitouri M. 2006**).

### **I.2. Objectifs stratégiques du Groupe**

Les objectifs du groupe sont :

- La recherche de la satisfaction totale du client, par la mise en place progressive du processus de management de la qualité.
  
- La diversification de la gamme de production par le biais d'une politique de recherche et de développement de nouveaux médicaments génériques dans les formes galéniques de nouvelles générations et la mise en place d'une veille technologie.
  
- Le développement du partenariat déjà engagé à travers des projets avec des laboratoires de notoriété internationale soit de la forme de société en joint-venture soit par le biais d'accord de façonnage.

- la préservation et l'augmentation des parts du marché national assureront la pérennité du Groupe.

- La pénétration de marché à l'exportation et la recherche permanente de l'accroissement des performances économiques et financières, tout en intégrant les préoccupations de santé publique du pays.

### **I.3. Présentation de la filiale ANTIBIOTICAL**

ANTIBIOTICAL est située à MEDEA (deux cent kilomètre au sud d'Alger), s'étend sur une superficie de 25 hectares dont plus de 19 hectares couvert, 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 la fabrication des médicaments depuis l'obtention du principe actif jusqu'à la mise en forme galénique du produit à savoir :

- L'unité de production des matières premières en vrac par fermentation et semi-synthèse ;

- Deux bâtiments de production de produits finis, l'un consacré aux produits pénicilliniques et l'autre aux non pénicilliniques ;

- Une unité de production d'article de conditionnement (imprimerie) ;

- D'une station de traitement des effluents nécessaires au fonctionnement de toutes les installations du complexe, appelée services généraux.

- D'un laboratoire doté de plusieurs structures pour effectuer toutes les analyses et contrôles réglementaires dont un laboratoire pilote pour les besoins de la fermentation et la synthèse et d'un laboratoire chargé de la recherche et développement galénique. Le laboratoire central est doté aussi d'une animalerie pour l'élevage des animaux de laboratoire ;

- D'une station de récupération des solvants ;

- D'une station de traitement des effluents pour la protection de l'environnement.

Ces unités répondent aux normes internationales les plus exigeantes grâce à une technologie et un savoir faire de haut niveau.

Aujourd'hui la filiale fabrique plus de 40 formulations utilisées dans différents secteurs thérapeutiques et sous diverses formes de dosage (**Aouni N et Bitouri M. 2006**).

C'est aussi un fabricant de matières premières comme la pénicilline G benzathine (**Aouni N et Bitouri M. 2006**).

## II-1- Les moisissures

Les moisissures sont des champignons microscopiques. Ce sont des eucaryotes, hétérotrophes qui sont obligés de prélever le carbone et l'azote nutritif dans la matière organique.

Les aliments, en générale, sont des substrats très favorables à leur développement. En effet, elles ont une relative spécificité d'habitat et certaines sont mieux adaptées que d'autres à de basses teneurs en eau (xérophiles) (Cahagnier B, 1998).

Le terme de "moisissure" n'a pas réellement de signification systématique ; il est communément utilisé pour désigner les champignons microscopiques qui intéressent l'économie et l'environnement humains, de façon bénéfique ou néfaste. Il recouvre un ensemble composé d'organismes appartenant à plusieurs classes définies d'après leur mode de reproduction sexuée : Zygo- Asco-, Basidio- et Hyphomycètes (Cahagnier B, 1998).

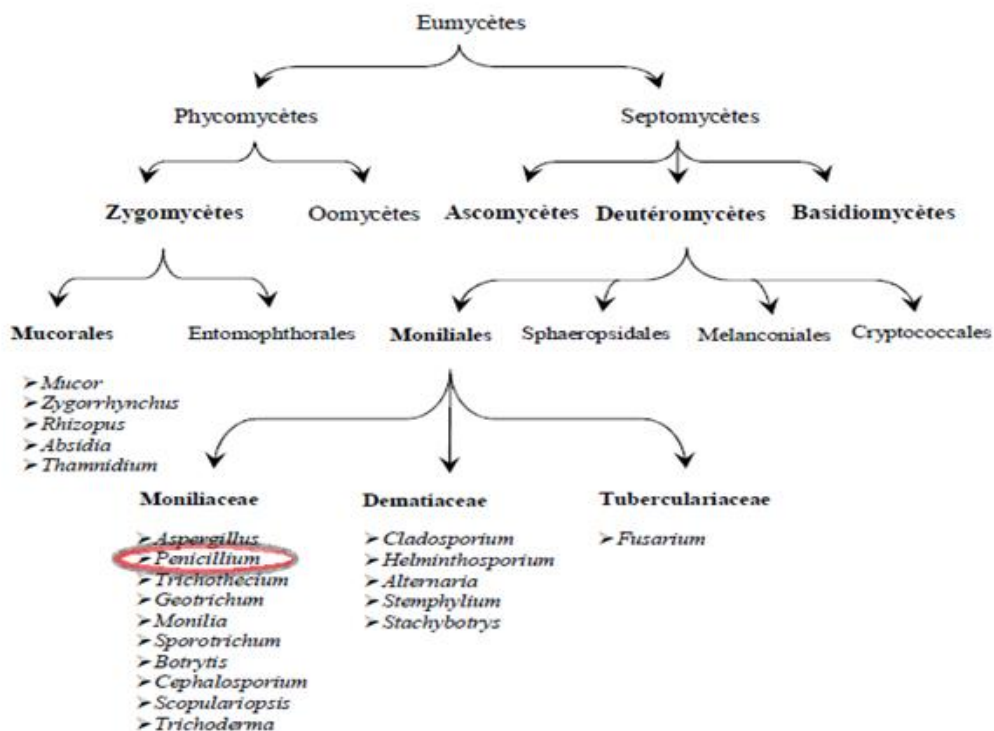


Fig. 01 : Principales classes des moisissures (Frazier, 1967)

## II-2- Classification

Les moisissures ne correspondent pas à un groupe systématique homogène, mais se situent en diverses familles de champignons microscopiques. Leur classification est basée sur des caractères morphologiques (structure du mycélium) et le mode de reproduction (**Davet, 1996**).

Les Eumycètes (les vrais champignons) forment un groupe très vaste incluant les classes principales des moisissures (**Bourgeois, 1989**), à savoir les Zygomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Deutéromycètes (**figure 01**).

### II-2- Deutéromycètes (ou champignons imparfaits)

Ce sont des ascomycètes ou des basidiomycètes qui ont perdu la partie sexuée de leur cycle biologique. De nombreuses espèces de ce groupe sont importantes économiquement. Les moisissures qui produisent la pénicilline (membres du genre *Penicillium*) font partie de ce groupe, ainsi que celles utilisées pour la fabrication des divers fromages (comprenant encore des membres du genre *Penicillium*).

Parmi les pathogènes, on trouve ceux qui provoquent la maladie de la tache de la feuille du céleri, la pourriture du céleri et la pourriture de la pomme de terre (**Jerome J et al., 2004**).

Il ne s'agit donc pas d'un regroupement naturel mais d'un ensemble artificiel créé par les systématiciens pour faciliter la reconnaissance toujours délicate des espèces de champignons appartenant à des classes variées. On en exclut, par principe, les champignons à thalle cénocytique ; ils ne comprennent donc que des champignons à thalle cloisonné ou des espèces levuriformes (**Bouchet Ph et al., 1999**).

### II-3- Classification du *P. chrysogenum*

Cette classification est basée sur des caractères purement morphologiques (Meyer A et al., 1995).

**Tableau 01** : classification de *penicillium chrysogenum* (Meyer A et al., 1995).

Subdivision	Deuteromycotina (Deutéromycètes)
Classe	Hyphomycètes
Ordre	Moniliales
Famille	Moniliaceae (hyalohyphomycetes)
Genre	Penicillium
Espèce	<i>Penicillium chrysogenum</i>

### II-4- Habitat

*P. chrysogenum* est une espèce ubiquiste. Cette espèce a été isolée de substrats et habitats divers, entre autres :

Eau (cours d'eau), forêts (tecks, hêtres, peupliers, chênes, conifères), papier, plantes (euphorbiacées, halophytes, vigne), poussière atmosphérique, produits alimentaires (céréales), sol (cultivé ou non, sols salins, champs de tourbe, marécages, sédiments de rivière, rhizosphère) (Pitt J I et Hocking A D, 1999).

Très commun, en raison notamment d'activités cellulolytiques, amylolytiques et lipolytiques (Larpent J P Sanglier J J, 1989).

### II-5- Mécanisme de croissance

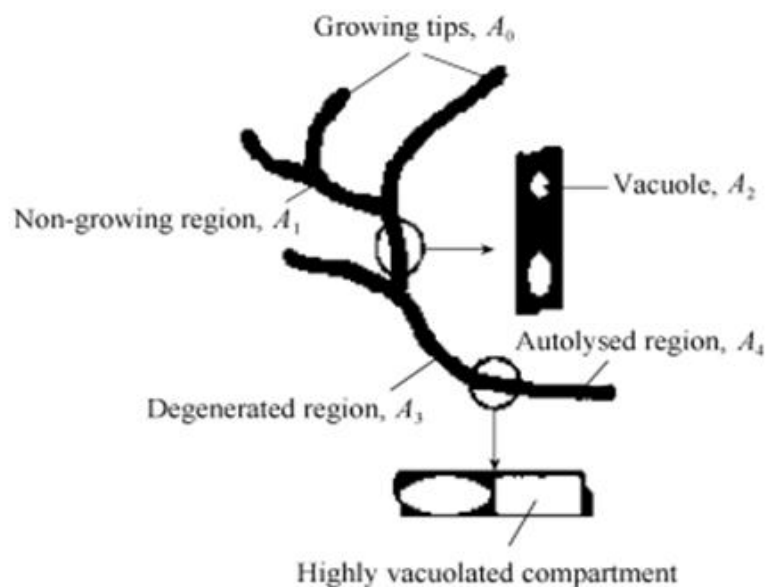
*P. chrysogenum* présente des membranes dans ses hyphes. Ce sont des hyphes filamenteux multicellulaires dont l'intégralité du cycle de croissance inclue des germinations de spores, la poussée des bouts de croissance des hyphes, la formation des branches ainsi que la formation et la différenciation des conidiophores (Paul G C et al., 1998).

Les modèles dynamiques de fermentation prennent en compte uniquement la croissance des hyphes sous ses propres conditions de fermentation, il n'y a donc pas lieu de considérer la germination des spores tout comme la formation des conidiophores. L'augmentation des hyphes influe seulement sur l'extension et le nombre des poussées de

bouts de croissance. En établissant la structure morphologique du modèle dynamique du processus de fermentation de la pénicilline. Paul *et al* divisent les hyphes en cinq régions distinctes :

- la zone de croissance active  $A_0$ ,
- la zone non-croissante  $A_1$ , considérée comme zone de production de la pénicilline,
- la zone  $A_2$  où il n'y a que les vacuoles qui ont pris le relais après l'arrêt du cycle de croissance,
- La région  $A_3$  est celle de la dégénérescence où du métabolisme inactif, la région  $A_4$  est celle de l'autolyse (**Paul G C *et al.*, 1998**).

La représentation schématique des cinq régions hyphales ci-dessus est montrée dans la figure 2.



**Fig. 02** : représentation schématique du *P. chrysogenum* (**Paul G C *et al.*, 1998**)

## **II-6- Obtention de la souche**

Mis à part le fait qu'on peut se procurer rapidement les souches entretenues dans les collections Internationales, il est indispensable d'opérer un travail systématique de prélèvements à partir du milieu naturel et des matières organiques en décomposition (**Bouchet Phet *al.*, 1999**).

C'est ainsi qu'a été isolée, à partir d'un melon moisi acheté au marché de Peoria (Illinois, Etats-Unis), la fameuse souche de *P. chrysogenum*, la première utilisée pour la production industrielle de la pénicilline (**Bouchet Ph et *al.*, 1999**).

## **II.7. Paramètres influençant la production de la pénicilline par *P. chrysogenum***

La production de la pénicilline par *P. chrysogenum* est un excellent exemple d'une fermentation pour laquelle l'ajustement soigneux de la composition moyenne du milieu est employé pour réaliser des rendements maximums (**Demain A L., 2000**).

### **1.7.1. Eléments nutritifs**

*P. chrysogenum* est un microorganismes hétérotrophe, elle exige donc la présence des éléments nutritifs de base (carbone, azote et ions minéraux) dans le milieu qui assure leur croissance. Cette moisissure possède une panoplie enzymatique extrêmement riche qui lui permet d'utiliser plus efficacement encore que d'autres microorganismes les substrats les plus complexes. Leur digestion doit commencer dans le milieu extérieur par des enzymes excrétées (extracellulaires) ou liées à la paroi, car seules les molécules de taille relativement petite peuvent franchir les parois et gagner le cytoplasme (**Davet, 1996**).

#### **1.7.1.1. Source de carbone et d'énergie**

Pratiquement tous les composés organiques peuvent être utilisés comme source de carbone et d'énergie par *penicillium chrysogenum*. elle peut métaboliser le glucose, lactose et le saccharose avec quelques polysaccharides comme l'amidon et la cellulose (**Boiron, 1996 ; Nicklin et *al.*, 2000**). Aussi produire des lipases extracellulaires capables d'hydrolyser les lipides en glycérol et acides gras (**Boiron, 1996**).

La production rapide des cellules, qui peuvent se produire quand des niveaux élevés de glucose sont employés comme source de carbone, ne mène pas aux rendements élevés d'antibiotiques. La fourniture du lactose lentement hydrolysé, en combinaison avec la

disponibilité limitée d'azote, stimule une plus grande accumulation de pénicilline après l'arrêt de la croissance (**Demain A L, 2000**).

### 1.7.1.2. Source d'azote

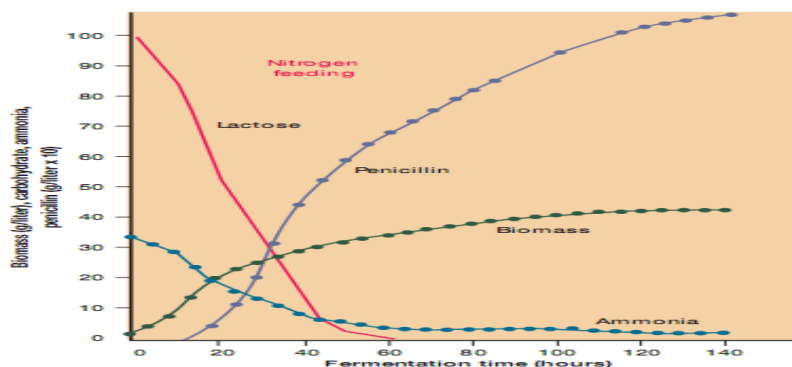
*P. chrysogenum* comme la plupart des moisissures assimilent l'ammoniaque sous forme de sels ( $\text{NH}_4^+$ ) dont la présence réprime l'utilisation d'autres sources azotées (nitrate, acides aminés, protéines). L'ammoniaque est transformé en acide glutamique, en glutamine ou en d'autres acides aminés par transamination (**Boiron, 1996**), alors que elle ne peut pas fixer l'azote atmosphérique (**Punt et al., 2000**).

Dans la recherche d'une source azotée à bas prix, le choix s'est porté sur les eaux de trempage du maïs (*corn steep liquor*) dont l'usage s'est révélé extrêmement précieux (**Asselineau J et Zelta J P, 1973**).

En utilisant, en culture en profondeur, un milieu contenant 3% de lactose et 2% de *corn steep liquor*, on constate que la croissance du champignon se fait d'abord aux dépens des composés azotés du milieu. Ceci entraîne la formation d'ammoniac et une faible élévation du pH (**Asselineau J et Zelta J P, 1973**).

### 1.7.1.3. Eléments minéraux

La présence des ions minéraux et métaux dans le milieu de culture est nécessaire pour la croissance et la reproduction de *P. chrysogenum*, il s'agit essentiellement de sulfate, de magnésium, de potassium, de sodium et de phosphore avec des concentrations plus au moins différentes selon l'espèce (**Uchicoba et al., 2001**). Des traces d'éléments tels que le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène, sont nécessaires pour la production des cytochromes, des pigments, des acides organiques, etc... (**Boiron, 1996**).



**Fig. 03** : consommation du substrat et production de la pénicilline V



## **II.7.2. Facteurs physicochimiques**

Les facteurs physicochimiques ont une grande influence sur le développement des moisissures ainsi que sur la germination, nous examinerons successivement quelques paramètres importants.

### **II.7.2.1. Température**

La température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne, elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores (**Bourgeois, 1989**). *P. chrysogenum* est mésophile avec des optima de croissance à 25°C (**Botton et al., 1999 ; Julien, 2002**).

### **II.7.2.2. Humidité**

Les moisissures ont en général un faible besoin en eau par rapport aux autres microorganismes (**Davet, 1996**). Néanmoins, l'humidité a une grande influence sur le développement non seulement sur la croissance mycélienne et la sporulation mais plus particulièrement sur la germination des spores (**Bourgeois, 1989**). Les moisissures à mycélium cloisonné tel que *P. chrysogenum* peuvent en général se développer à des potentiels hydriques de l'ordre de 20 MPa (méga pascal) (**Davet, 1996**).

### **II.7.2.3. pH**

Est un critère fondamental du développement et de l'activité de *P. Chrysogenum*, cette dernière se développe dans une zone de pH de 4.5 – 8.0 (**Botton et al., 1999**), bien qu'ils soit capable de croître dans une large gamme de pH avec une tendance à croître dans des milieux légèrement acide.

Cependant, les enzymes extracellulaires produites dans des milieux complexes peuvent avoir des optima de pH d'activité très différents (plus acides ou plus basiques) (**Botton et al., 1999**). Le pH influe sur la croissance de ces microorganismes soit indirectement en agissant sur la disponibilité des éléments nutritifs (à pH acide, le fer reste sous forme d'ions ferreux assimilable), soit directement par action sur la membrane cellulaire.

Par ailleurs, *P. chrysogenum* modifie souvent le pH du milieu par absorption sélective et échange d'ions, production de CO<sub>2</sub> ou de NH<sub>3</sub> ou par production d'acides (**Boiron, 1996**).

Le maximum de production de pénicillines correspond à la période de consommation du lactose période correspondant à une zone de stabilité du pH (le pH étant stabilisé entre 6,5 et 7,5). Une variation de pH en dehors de cette zone entraîne une baisse importante du rendement en pénicilline (**Asselineau J et Zelta J P, 1973**).

#### **II.7.2.4. Oxygène**

La quantité d'oxygène mise à la disposition *P. chrysogenum* est un facteur important de son développement, considérée comme espèce exigeante, sa croissance est aux régions périphériques des substrats. (**Bourgeois, 1989 ; Botton et al., 1999**).

#### **II.7.2.5. Agitation**

La culture en milieu liquide dans des récipients agités et le plus souvent des fioles d'Erlenmayer, placées sur des appareils d'agitation qui favorisent la diffusion de l'air à travers les tampons de coton servant à les boucher. Elle joue un rôle dans la dispersion des agglomérations de spore qui augmente considérablement la croissance des pelotes. Par ailleurs, il se produit des pelotes plus petites, qui se fragmentent et tendent à disparaître avec une agitation intense et une formation des pelotes plus grande dont la croissance dans leurs centre est empêché par limitation du déplacement des substances nutritives (**Brizuela MA et al., 1998**).

### **II.7.3. Facteur biologique**

#### **➤ Stérilité**

La stérilisation des milieux de germination et de fermentation est primordiale. Elle est assurée en générale par un traitement thermique pour éliminer les contaminants présents dans les matières premières puis et l'ensemencement s'effectue aseptiquement

## II.8. Développement et production industrielle

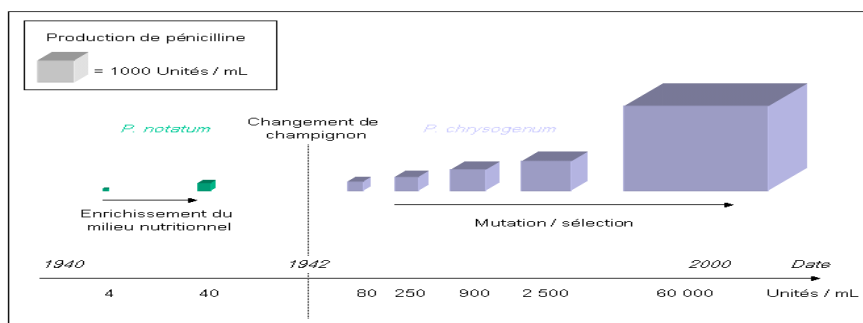
### II.8.1. Développement

Le *P. chrysogenum* est adapté pour la fermentation submergée, et est employé couramment dans la production industrielle de la pénicilline (Yang R D, 2001).

Les efforts concentrés sur l'amélioration de la production ont permis de gagner plusieurs ordres de grandeur en quelques années : initialement, un millilitre de culture permettait d'obtenir 4 unités de pénicilline en 200 heures (Patrick G L, 2003).

La première étape a consisté en un changement du milieu de culture. Son enrichissement en nutriments plus adaptés à la souche utilisée a permis de passer à 40 unités / ml de culture, soit un accroissement d'un facteur 10. Mais la culture en surface était intrinsèquement limitée et les chercheurs n'ont eu de cesse de passer à une culture en volume (Patrick G L, 2003).

Il a été rapidement clair que *P. notatum* ne permettrait pas ce changement de technologie. Après un criblage d'échantillons de moisissure qui permettra la migration vers le procédé volumique : *P. chrysogenum* permettra de produire 80 unités / ml de culture en volume, avec une capacité de production accrue par rapport à la variété *notatum*. En effet, le passage en cuves de fermentation permet un changement d'échelle. La sélection génétique d'un mutant a rapidement permis d'atteindre 250 unités / ml de culture puis 900 puis 2 500 unités / ml. Aujourd'hui, les sélections successives ont abouti à des souches qui produisent plus de 60 000 unités / ml de culture en 200 heures, soit plus de quinze mille fois que la souche de départ (figure 4) (Patrick G L, 2003).



**Fig. 04 :** Évolution du rendement en pénicilline en fonction des souches de *Penicillium* utilisées (Patrick G L, 2003)

## **II.8.2. Utilisation industrielle**

C'est la source de plusieurs antibiotiques de  $\beta$ -lactamines qui produisent de manière significative, la pénicilline. D'autres métabolites secondaires de *P. chrysogenum*, incluent diverses variétés, différentes de pénicillines, telles que la roquefortine C, la méléagrine, la chrysogénine, les acides secaloniques, le sorrentanone et la sorbicilline (**Hoog G S et al., 2000**).

Le *P. chrysogenum*, a été employé industriellement pour produire la xanthocilline X, afin de traiter la perte de fabrication de pâte à papier, et pour produire l'oxydase de polyamine d'enzymes, la phosphogluconate-déshydrogénase et l'oxydase de glucose (**Hoog G S et al., 2000 ; Shen H D et al., 2003**).

## **II.9. Conservation des souches**

Les souches mères constituent un des trois éléments avec le substrat et les régulations nécessaires pour réaliser une bio-production spécifique et efficace. Elles résultent souvent d'un processus de sélection relativement long et éventuellement coûteux. Elles font dès lors partie du capital de l'entreprise qui les exploite et possèdent une valeur concurrentielle parfois significative (**Crueger W et Crueger A, 1990**).

Par ailleurs, comme il s'agit de matériel vivant, elles présentent une certaine fragilité vis-à-vis de leur environnement et une tendance naturelle à l'évolution. Pour maintenir les performances de l'activité industrielle qui les utilise, il convient dès lors d'assurer à la fois leur conservation (éviter les agressions liées à l'environnement) et leur stabilité (éviter toute modification de leurs caractéristiques métaboliques et donc génétiques) sur le long terme (**Larpen-Gourgau M et Sanglier J J, 1992**).

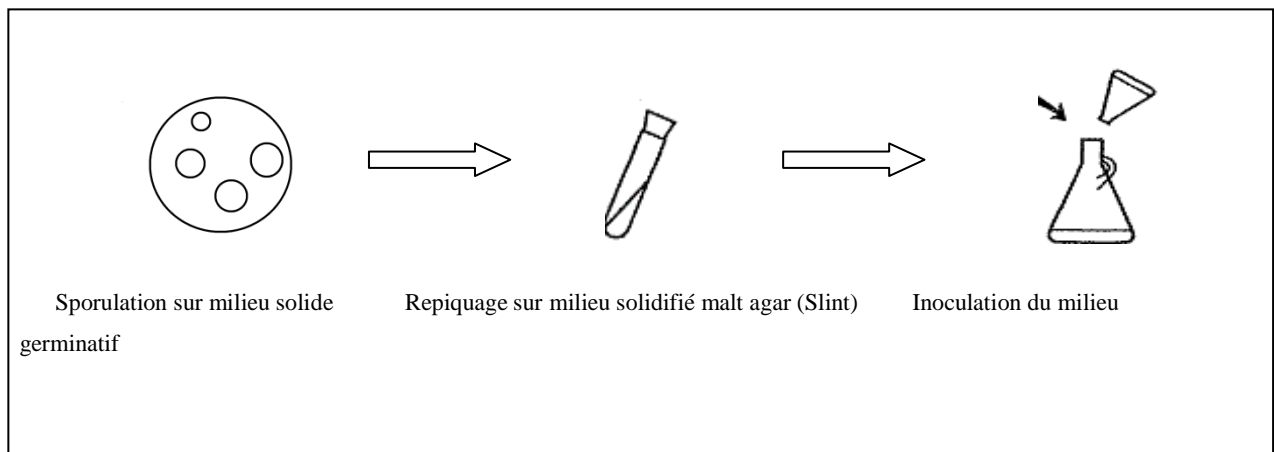
A cette fin diverses technologies peuvent être mise en œuvre :

- Gélose inclinée
- Conservation sur sol
- Conservation sur silicagel anhydre
- Congélation
- Lyophilisation (**Botton B et al., 1990**).

## II.9. Réactivation des souches et préparation des inoculums

La préparation d'inoculum des fermentations utilisant les organismes mycéliens (filamenteux) est plus compliquée que celle pour le processus unicellulaire (bactérien et de levure). La majorité des mycètes utilisées dans le domaine industriel tel que *P.chrysogenum* sont capables de sporulation asexuée. Trois techniques de base ont été développées pour produire une grande concentration de spores pour usage d'inoculum :

- Sporulation sur un milieu solidifié : la plupart des mycètes sporulent sur des milieux appropriés d'agar.
- Sporulation sur un milieu solide : beaucoup d'organismes filamenteux sporulent à profusion sur la surface des grains de céréales.
- Sporulation dans une culture submergée : beaucoup de mycètes qui sporulent dans une culture submergée ont fourni un milieu adéquat. Cette technique est plus commode que l'utilisation des milieux solide ou solidifié parce qu'il est plus facile de l'utiliser aseptiquement et elle peut être appliquée à grande échelle (Stanbury *et al.*, 1995)



**Fig. 05 :** Procédé d'inoculation d'un milieu de culture liquide pour *P.chrysogenum*

### **III.1. Définition de l'antibiotique :**

Les antibiotiques sont des composés chimiques élaborés par des microorganismes (bactérie ou champignon) ou par synthèse chimique qui agissent par inhibition de certains processus vitaux à l'égard des autres micro-organismes (**Euzéby, 2004**). Leur activité se manifeste à faibles doses sur les microorganismes, et n'ont pas de toxicité sur l'hôte (**Mc Dermott et al., 2003**). Ils agissent sur les bactéries, soit en les empêchant de construire leur paroi protectrice lors de leurs reproductions, soit en les empêchant de fabriquer les protéines nécessaires à leur survie (**Cazivalsilio, 2001**).

### **III.2. Aspect historique de la découverte des pénicillines :**

En fait, l'histoire des antibiotiques a commencé en 1929, date à laquelle **Alexander Fleming** a constaté qu'une moisissure, se développant naturellement sur des fruits et des fromages, a empêché la prolifération du bacille de la diphtérie et de celui du charbon dans des boîtes où il a cultivé ces microorganismes en laboratoire. Il émet l'hypothèse que ce champignon, qui est un pénicillium, élabore une substance bactéricide qu'il nomme pénicilline (**Kangni, 2003**).

En 1941, la pénicilline est employée pour la première fois en thérapeutique et depuis elle est devenue l'antibiotique le plus connu (**Fauchère et Avril, 2002**).

### **III.3. Les beta-lactamines :**

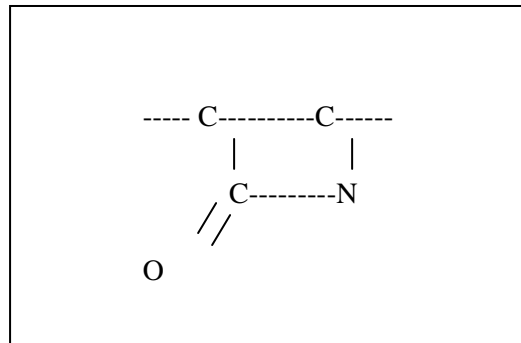
Les  $\beta$ -lactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus importante, aussi bien par le nombre et la diversité des molécules utilisables que par leurs indications en thérapeutique et en prophylaxie des infections bactériennes. La grande variété de leur mode d'administration, leur large spectre d'activité antibactérienne associé à une action bactéricide, 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  $\beta$ -lactamines comprend un grand nombre de molécules, toutes caractérisées par la présence d'un cycle  $\beta$ -lactame, indispensable à l'activité antibiotique (**Cavallo et al., 2004**).

Les  $\beta$ -lactamines ont un effet bactéricide sur les bactéries en voie de croissance. Leur association avec un aminoside est en règle synergique. Par contre une association avec un ATB

bactériostatique (chloramphénicol, tétracyclines) peut avoir un effet antagoniste (C-Nauciel et Vildé, 2005).

Elles ont en commun un noyau  $\beta$ -lactame (figure 06), elles représentent une analogie structurale avec la terminaison D-ala-D-ala du précurseur du peptidoglycane (C-Nauciel et Vildé, 2005).



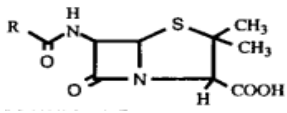
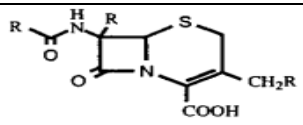
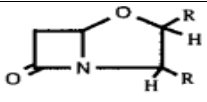
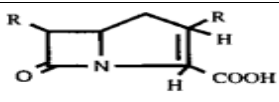
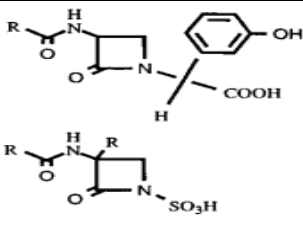
**Fig. 06 :** Le noyau  $\beta$ -lactame (C-Nauciel et Vildé, 2005).

#### III.4. Structure et classification

Il existe de nombreuses variétés de  $\beta$ -lactamines qui se distinguent par spectre d'activité et leurs propriétés pharmaceutiques (Nauciel et Vildé, 2005).

Les  $\beta$ -lactamines ont en commun un cycle  $\beta$ -lactame tétra-atomique. En fonction de leur structure chimique et leurs activités antibactériennes, les  $\beta$ -lactamines se composent de quatre groupes : Les pénèmes, céphèmes, pénèmes et les monobactames (voir Tableau N° II ). On peut aussi ajouter les inhibiteurs de  $\beta$ -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  $\beta$ -lactamines : Ticarcilline-acide clavulanique et amoxicilline-acide clavulanique...(Edjohn et al., 1997).

**Tableau II:** Classification des  $\beta$ -lactamines. (Axel et Brakhage, 1998).

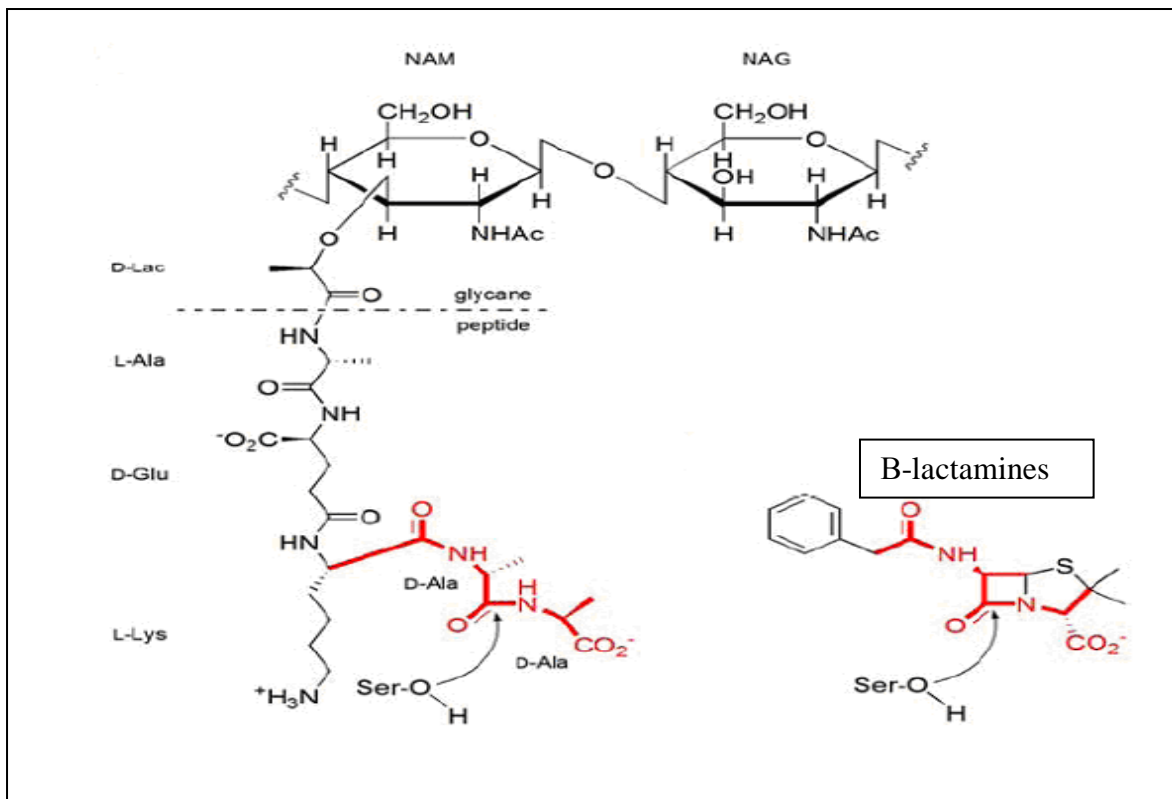
Classe des $\beta$ -lactames naturels	Structures	Antibiotiques
Pénames		Pénicillines
Céphèmes ou (Ceph-3-em)		Céphalosporines Céphamycines Céphabacines Chitinivorines
Clavames ou Oxapénames		Acide Clavulaniques
Carbapénèmes		Thienamycines Acides olivanique Epithienamycines
Monolactames		Nocardicines  Monobactames

### III.5. Mécanisme d'action des $\beta$ -lactamines

Toutes les  $\beta$ -lactamines ont le même mécanisme d'action : elles bloquent la synthèse du peptidoglycane, qui est le polymère spécifique de la paroi des bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Ce blocage intervient par inhibition de certaines enzymes responsables de la transpeptidation, par analogie structurale avec le D-alanyl-D-alanine terminal du pentapeptide (**figure 07**), étape essentielle de la synthèse du peptidoglycane. La fixation est irréversible et l'antibiotique se comporte comme un substrat suicide (**Chatellet, 2007**).

La conséquence de cette interaction moléculaire est l'inhibition de la biosynthèse et du remodelage du peptidoglycane (**Charpentier et Novak, 2000**) suite à l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame, rupture de la liaison amide et acylation du site actif sérine et la formation d'un complexe covalent inactivant le site actif de l'enzyme, d'où arrêt de la croissance bactérienne (bactériostase). Pour être actives, les  $\beta$ -lactamines vont devoir atteindre leur cible en pénétrant dans la paroi bactérienne et se fixer sur les PLP (**Cavallo et al., 2004**).





**Fig. 07 :** Comparaison structurelle entre les peptidoglycanes et les  $\beta$ -lactamines (De Wals, 2007)

### III.6. La pénicilline V :

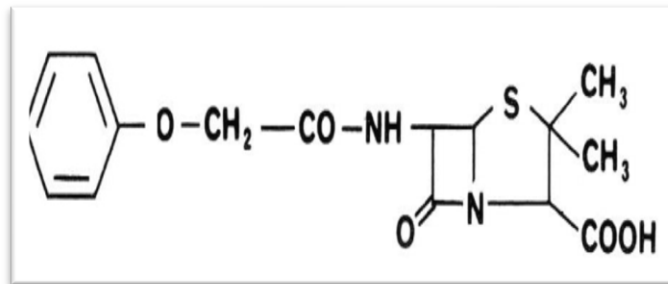
La phénoxyéthylpénicilline (pénicilline V) est un antibiotique bactéricide de la famille des bêtalactamines, du groupe des pénicillines naturelles, du type des phénoxyéthylpénicillines. La phénoxyéthylpénicilline est l'acide (2S,5R,6R)-3,3-diméthyl-7-oxo-[(phénoxyéthyl)amino]-4-thia-1-azabicycloheptane-2-carboxylique, substance élaboré par certaines souches de *Penicilium notatum* ou par d'autres organismes apparentés, dans un milieu de culture additionné d'un précurseur de chaîne latérale (acide phénoxyéthylacétique), ou obtenu par tout autre moyen (acylation de l'acide 6-aminopénicillanique) (Hilder et al., 2002).

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

### III.7. Structure de la pénicilline V :

La structure de base des pénicillines consiste en un noyau thiazolidine (5 membres dont le soufre avec lequel débute la nomenclature des liaisons chimiques) fusionné à un noyau  $\beta$ -lactame (4 membres ayant un carbone à la position 6) (Bejaoui N, 1996).

Pour la pénicilline V, la chaîne latérale en C<sub>6</sub> est composée de l'acide phénoxyacétique.



**Fig. 08** : Structure chimique de la pénicilline V

### III.8. Biosynthèse de la pénicilline V :

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

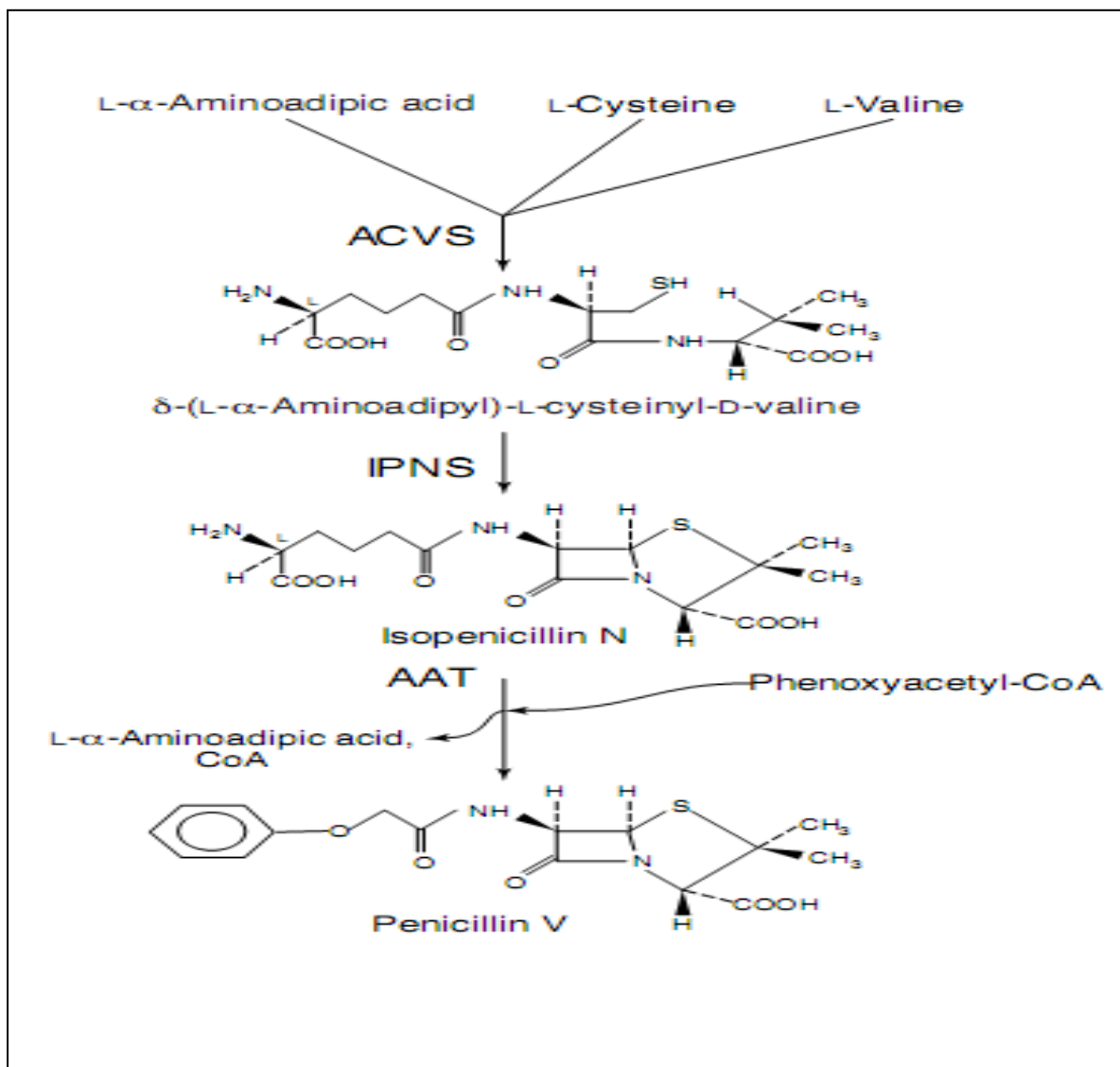
Toutes les pénicillines et les céphalosporines naturelles produites par les microorganismes eucaryotes ou procaryotes sont synthétisées par le même triacide aminé, l'acide L- $\alpha$ -aminoadipique, L-cystéine et L-valine. Chez les champignons, le L- $\alpha$ -AAA est dérivé de la voie spécifique des 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, 1999**).

Dans la première réaction de la voie de biosynthèse des pénicillines et des céphalosporines, il ya condensation des précurseurs (acides aminés) pour la formation du tripeptides  $\delta$ -(L-  $\alpha$ -aminoadipyl)-L-cysteiny-D-valine (ACV). Cette réaction est catalysée par une seule enzyme la ACV synthase (**Brakhage, 1999**).

Dans la deuxième étape, il y a la transformation oxydative du tripeptide en une structure bicyclique formée d'un noyau  $\beta$ -lactame et d'un noyau thiazolidinique qui est caractéristique aux pénicillines. Le composé résultant, l'Isopénicilline N (IPN) possède une faible activité antibiotique, cette réaction est catalysée par l'Isopénicilline N synthase. L'Isopénicilline N est le composé en commun entre les pénicillines et les céphalosporines (**Brakhage, 1999**).

Dans la troisième et dernière étape de la biosynthèse de la pénicilline, la chaîne latérale hydrophile du L- $\alpha$ -AAA de l'IPN est échangée par un groupement acyle hydrophobe catalysée par l'acyle Coenzyme A : isopénicilline N acyle transférase (IAT) (**Brakhage, 1999**).

L'approvisionnement du milieu de culture en acide phénoxyacétique ou l'acide phénylacétique, la synthèse peut être dirigé principalement vers la pénicilline V ou la pénicilline G respectivement (**Brakhage, 1999**).



**Fig. 09 :** Les étapes de la biosynthèse de la pénicilline V (**Miguel A et al., 1998**)

### III.9. Stabilité des pénicillines :

La pénicilline V acide n'est pas hygroscopique, elle est très stable et on l'utilise par voie orale. La pénicilline garde son activité pendant une année à température inférieure à 37°C.

#### III.9.1. Stabilité en milieu acide (pH<3)

En milieu acide (pH<3), les pénicillines subissent une isomérisation, liée à la rupture de cycle  $\beta$ -lactame et la formation de cycle imidazoline, en transformant en acide pénicillique, qui ne sont pas actifs. A l'exception de pénicilline V acide, qui est 25 fois plus stable que la pénicilline G à pH=2 (Dobrevá et Nevena, 1981).

#### III.9.2. Stabilité en milieu basique (pH>8)

En milieu basique, les pénicillines se dégradent facilement en subissant une hydrolyse à la température ambiante et à pH >8, le cycle  $\beta$ -lactame s'ouvre, la pénicilline passe sous la forme de l'acide pénicilloïque, qui est inactif (Dobrevá et Nevena, 1981).

### III.10. Spectre d'action des pénicillines :

- Contre les cocci Gram positif

Les pénicillines naturelles ont une activité supérieure aux autres  $\beta$ -lactamines contre les staphylocoques, en l'absence de mécanismes de résistance. Elles sont très actives contre les streptocoques, les pneumocoques et aussi contre les entérocoques.

- Contre les autres aérobies à Gram positif

*Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus anthracis*, *Streptobacillus moniliformis* et Gram négatif *Pasteurella multocida*.

- Contre les aérobies à Gram négatif

Théoriquement actives contre les *Neisseriaceae*.

- Contre les anaérobies

Seules les espèces *Bacteroides fragilis* et *Clostridium difficile* ont une résistance naturelle.

Les autres espèces d'anaérobies sont naturellement sensibles.

- Contre les spirochètes

Activité contre *Borrelia spp*, *Leptospira spp*, *Treponema pallidum*.

- Pénicillines anti staphylococciques

Spectre très étroit sur *Staphylococcus aureus*.

- Aminopénicillines

Enterobacter du groupe I (*Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Proteus mirabilis*, et sur les souches d'*Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes* et contre *Bartonella spp*.

- Carboxypénicillines

Elargissement du spectre des aminopénicillines aux espèces *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumani*, enterobacter groupe III (*Serratia spp*, *Enterobacter spp*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* (**Pacannowski J, 2007**).

## **Introduction :**

*P. Chrysogenum* se développe dans une zone de pH comprise entre 4.5 et 8.0 (**Botton et al., 1999**). Par souci de trouver un pH optimum pour la culture des deux souches proposées, nos tests de fermentation sont portés sur cinq milieux de fermentation et leur pH initial est dans l'ordre suivant : 4, 5, 6, 7, 8.

La production de la pénicilline V commence par la germination de la souche *P. chrysogenum* réactivée au préalable sur un milieu gélosé incliné (Slant) suivie par une fermentation pendant 9 jours.

Dès le deuxième jour, on contrôle la productivité de la souche par détermination des Titres de l'antibiotique, le dosage du lactose, l'estimation de la biomasse par la mesure de la sédimentation et la mesure du pH du bouillon de fermentation.

## **I. Matériels**

### **I.1. Matériel biologique**

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 Slant.

Leur souche mère est *P. chrysogenum NPSQVI LORDO 11,5* fournie par un partenaire italien "ALCHIM TECH", le 02 juillet 1996. Cette souche a été importée sous forme lyophilisée. Cette dernière, réactivée le 04 mars 2003, est conservée sur Quartz le 19 mars 2003 avec une productivité de 41 538 UI/ml.

### **I.2. Appareillage**

- Agitateur magnétique ;
- Agitateur mécanique ;
- Agitateur rotatif "Continental Instrument" ;
- Bain-marie ;
- Autoclave (stérilisation à chaleur humide, 121 °C/1,1bar) ;
- Balance analytique "GIBERTINI" ;
- Centrifugeuse "CENTRIFUGE 4225" ;

- Chambre stérile (Hôte à flux laminaire);
- Chambres thermostatique (25 °C, 55% d'humidité) "Continental Instrument" ;
- Chambres thermostatique (37 °C) "Continental Instrument" ;
- Étuve (stérilisation du matériel à chaleur sèche /250°C) ;
- Glucomètre ;
- Microscope photonique "Olympus" ;
- pH mètre ;
- Pompe à vide ;
- Réfrigérateur (+4°C) ;
- Spectrophotomètre "Perkins Elmer".

### **I.3. Verrerie et petit matériels**

- Matériels usuels (tubes à essai, boîtes Pétri...etc.) ;
- Papier huilé ;
- Papier buvard ;
- Papier de filtration.

### **I.4. Réactifs de qualité RP (Recta pur)**

- Acétate de sodium anhydre ;
- Acétonitrile ;
- Acide orthophosphorique ;
- Acide phénoxyacétique ;
- Acide sulfurique ;
- Alcool éthylique ;
- Carbonate de calcium ;
- Chlorure de fer Héxa-hydraté ;
- Chlorure de sodium ;
- Chlorure d'hydroxylamine ;
- Hydroxyde de potassium ;
- Hydroxyde de sodium ;
- Phosphate de potassium diacide ;
- Phosphate de potassium monobasique ;
- Lactose ;
- Solution d'acide chlorhydrique 1,5N ;

- Solution d'acide chlorhydrique 6 N ;
- Solution d'hydroxyde de sodium NaOH 1 N ;
- Solution d'hydroxyde de sodium NaOH 6 N ;
- Solution alcoolique ;
- Solution d'anthrone 0,2% ;
- Solution tampon phosphate 1 N à pH = 7 ;
- Sulfate ammonium ;
- Sulfate d'ammonium ferrique ;
- Sulfate de cuivre Penta-hydraté ;
- Sulfate magnésium Hépta-hydraté.
- Sulfate potassium

### **I.5. Milieux de culture**

Leur composition figure en annexes :

Annexe I : Milieu de germination "VMP" V

Annexe II : Milieu de fermentation "FMP" V

## **II. Méthodes**

### **II.1. Test de fermentation dans des fioles agitées**

La fermentation passe par 02 étapes.

#### **II.1.1. La germination**

La germination est une étape permettant de faire germer les spores. De ce fait, on choisit pour chaque souche un Slant où les spores sont réparties uniformément sur toute la surface (tapis verdâtre).

- Effectuer un *scraping* à l'aide d'une pipette stérile.
- Ajouter 6 ml d'EDS.
- Mélanger bien la suspension.

#### ➤ **Inoculation du milieu germinatif**



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

Incuber les fioles dans la chambre thermostatique 25°C/55 % d'humidité sous agitation de 220 rpm pendant 40h.

### II.1.2. La fermentation

Après 40 h de germination, on mesure la sédimentation, le pH et on réalise des observations microscopiques pour confirmer l'absence de contamination.

Mesure de pH du milieu qui doit être compris entre 5,3 et 5,7

Pour lire la sédimentation, on centrifuge 10 ml de bouillon dans un tube conique gradué à 10, à une vitesse de 3000 tr/min pendant 10 min.

✓ Calcul :

$$\text{Sédimentation (\%)} = \text{Lecture} \times 10$$

NB : Le pourcentage de la sédimentation doit être compris entre 15 et 20 %

✓ Les résultats récapitulatifs du suivi de la sédimentation et du pH dans les cinq tests de fermentation pour S1 et S2 figurent dans le **Tableau XX (annexe 8)**

Les fioles d'Erlen Meyer de 500 ml préalablement préparées, contenant chacune 35 ml du milieu "FMP" V, sont inoculées avec 04 ml du milieu de germination.

Remarque : pour chaque souche, 06 fioles ont été préparées.

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

Remarque :

Dès le 2<sup>ème</sup> jour de la fermentation on réalise des observations microscopiques pour confirmer l'absence de contaminations, on procède au dosage des sucres par méthode chimique et celle du glucomètre, on mesure la sédimentation, le pH, et la détermination de la

productivité de chaque souche par mesure du titre de la pénicilline VK par spectrophotométrie.

## II.2. Dosage du lactose :

### II.2.1. Dosage du lactose dans le bouillon de fermentation de la pénicilline V par glucomètre

#### Procédure expérimentale :

➤ **préparation de l'échantillon :**

-Peser 50 g de bouillon, ajouter 25 ml de HCl 6 N laisser sous agitation pendant 5 min puis filtrer la solution

➤ **Dosage :**

-Transférer 50 ml de filtrat dans une fiole jaugée de 100 ml ;

-Mettre en ébullition pendant 30 min à 100 °C ;

-Refroidir et neutraliser à pH = 7 avec NaOH 6N compléter le volume jusqu'au trait avec la solution tampon pH=7 ;

-Agiter puis mettre dans un bain marie et à une température de 37 °C ;

-Faire la lecture sur le glucomètre.

✓ Calcul

$$[\text{Lactose}] \text{ g/l} = \text{lecture sur le glucomètre} \times f_d$$

## II.2.2. Dosage de lactose dans le bouillon de fermentation de la péni V par méthode chimique (à l'anthrone)

### Procédure de travail :

#### ➤ Préparation de la l'échantillon :

- Centrifuger un échantillon du bouillon à 4000 rpm pendant 10 mn ;
- Filtrer le surnageant à travers un papier filtre ;
- Ajouter 20 ml d'eau distillée et 25 ml d'acide chlorhydrique 1,5 N ;
- Introduire 5 ml de filtrat dans une fiole jaugée de 100 ml ;
- Mélanger et chauffer à 100 °C pendant une (01) heure ;
- Refroidir à température ambiante et ajuster le pH à 7 avec NaOH 1 N ;
- Compléter le volume avec l'eau distillée jusqu'au trait ;
- Procéder aux dilutions selon l'âge de fermenteur.

#### ➤ Dilutions selon l'âge de fermenteur :

### De Log 0 à Log 24

- Agiter bien la solution mère ;
- Prendre 5ml de cette solution et les transférer dans une fiole de 50 ml ;
- Compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée ;
- Prélever 2 ml de solution préparée et ajouter 4ml de solution d'anthrone 0,2% ;
- Mélanger et chauffer à 100°C pendant 5 mn ;
- Refroidir à température ambiante et faire la lecture à la DO à une longueur d'onde ( $\lambda=620\text{nm}$ ).

#### ✓ Calcul :

$$\text{Concentration des sucres totaux (g/l)} = D_o \times f_d / F$$

### De log 24 au log216 (Harvest)

- Agiter bien la solution mère ;
- Prélever 2 ml de la solution préparée et ajouter 4 ml de la solution d'anthrone 0,2 % ;
- Mélanger et chauffer à 100°C pendant 5 mn ;
- Refroidir à température ambiante et faire la lecture de la Do à une longueur d'onde 620nm.

✓ **Calcul :**

$$\text{Concentration des sucres totaux (g/l)} = D_o \times f_d / F$$

**N.B :** F : Facteur déterminé à partir de la courbe de standard

$f_d$  : facteur de dilution

✓ les résultats récapitulatifs du dosage du lactose dans les cinq bouillons fermentatifs Figurent dans le **Tableau XX1 (annexe 9)**

### **II.3. Dosage de l'antibiotique**

Le dosage de l'antibiotique commence du 2<sup>ème</sup> jusqu' au 9<sup>ème</sup> jour de la fermentation, ceci afin d'évaluer la productivité de la souche. La recherche du titre de production se fait par deux méthodes.

#### **II.3.1. Dosage par spectrophotométrie**

Le principe de la méthode est l'absorption spécifique de la lumière par certaines molécules d'antibiotiques.

##### **➤ Protocole expérimental**

La méthode se base sur le fait que la pénicilline réagit rapidement avec l'hydroxylamine pour donner un acide hydroxylamique 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 vérifié pas dans le cas où la solution de pénicilline serait mélangée précédemment avec la solution ferrique.

##### **➤ Procédure de travail**

#### **Préparation de la courbe standard :**

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 quelque goutte de tampon phosphate (pH 6), puis compléter le volume à 10 ml avec de l'eau distillée.

Prendre 7 tubes à essai (6 pour les échantillons et 1 pour le blanc)

- Mettre 2,5 ml d'ED dans chaque tube ;
- De chaque fiole (A) on retire 0,6 ml qu'on verse dans chaque tube échantillons;
- Ajouter 2 ml de la solution alcoolique dans chacun des 6 tubes échantillons ;
- Ajouter 2 ml de l'alun de fer dans le 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 la solution du blanc afin d'avoir le zéro optique ;
- Faire la lecture de la densité optique à 480 nm ;
- Tracer la courbe de la lecture de la Do de chacune des 6 solutions en fonction des concentrations en UI/ml ;
- On devrait obtenir une droite passant par l'origine.

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

$Tg \alpha = Km$

✓ **Calcul :**

Titre = Do x Km (UI/ml)
-------------------------

- ✓ Les résultats des Do le graphique de la courbe d'étalonnage figurent dans le **Tableau IXX (annexe 5)**.

NB : La procédure de lecture des Do du standard s'applique aux échantillons de la fermentation en remplaçant le standard par le filtrat du bouillon.

- ✓ Les résultats des Do et le titre de la péni V figurent dans les **Tableaux (V, VIII, XI, XIV et XVII)**.

### III. Résultats

#### 1<sup>er</sup> test de fermentation à pH=4

##### III.1.1. Germination

➤ **pH et sédimentation**

**Tableau III :** pH et sédimentation après 40 heures de germination.

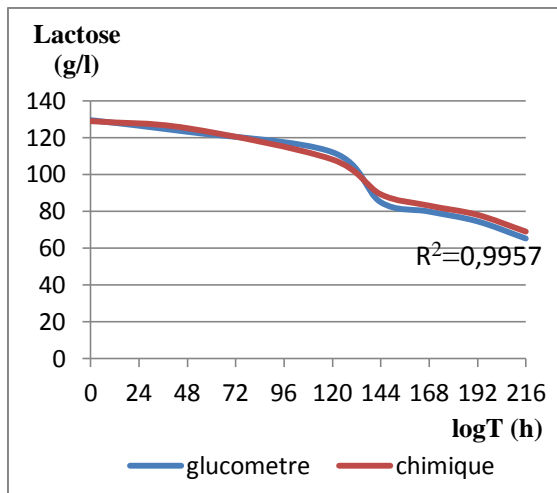
Souche	pH	Sédimentation %
PV 07/01/12 (S1)	5,21	18
PV 07/02/12 (S2)	5,31	15

##### III.1.2. fermentation

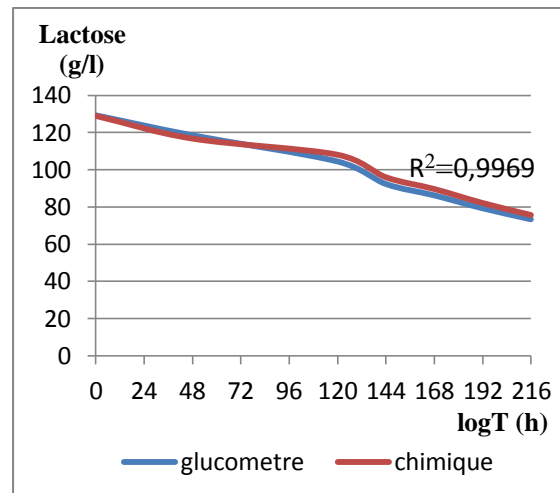
➤ **Dosage de lactose dans le bouillon de fermentation**

**Tableau IV:** Dosage de lactose par méthode chimique et par glucomètre.

LogT (h)	S1 (PV 07/01/12)			S2 (PV 07/02/12)		
	[Lactose](g/l) Par glucomètre	[Lactose] (g/l) Par méthode chimique		[Lactose](g/l) Par glucomètre	[Lactose] (g/l) Par méthode Chimique	
		Do	Concentration (g/l)		Do	Concentration (g/l)
0	129,42	0,878	128,93	129,42	0,878	128,93
48	123,08	0,852	125,11	118,64	795	116,74
120	112,02	0,736	108,08	104,56	736	108,08
144	84,92	0,607	89,14	92,44	654	96,04
168	79,82	0,565	82,97	86,32	611	89,72
192	74,52	0,531	77,98	79,36	560	82,23
216	65,22	0,469	68,87	73,42	516	75,78



**Fig. 10 :** Evolution de la concentration du lactose durant la fermentation à pH4 pour S1.

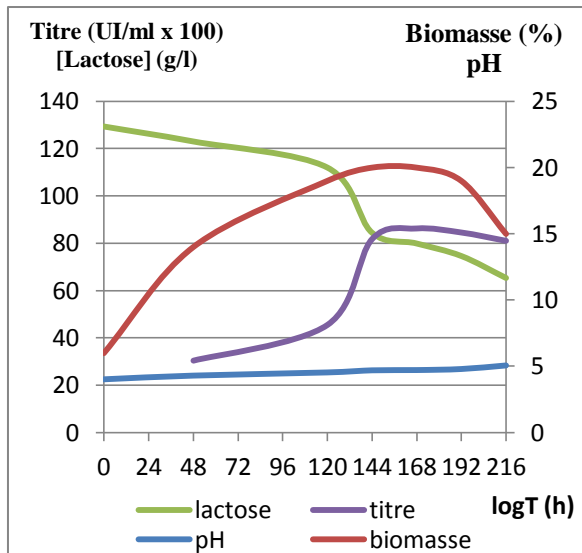


**Fig. 11 :** Evolution de la concentration du lactose durant la fermentation à pH4 pour S2.

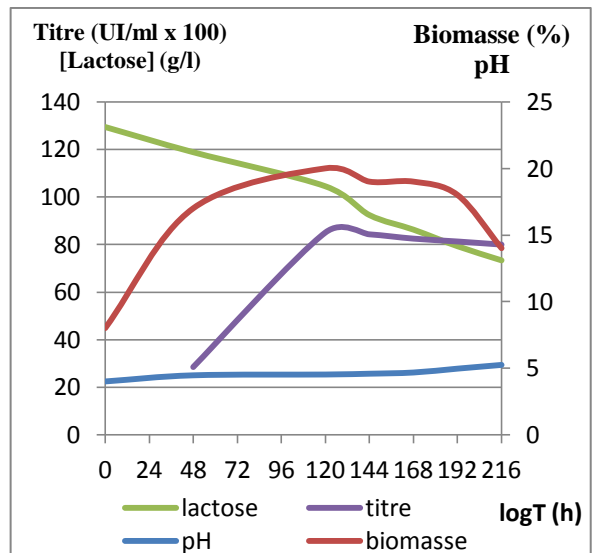
➤ **Suivi du pH, sédimentation et le titre de la péni V**

**Tableau V :** Résultats du suivi de pH, sédimentation et le Titre de la péni V pour S1 et S2.

Souche	LogT (h)	Do des échantillons	Titre= Do × 19619 (UI/ml)	Sédimentation (%)	pH
PV 07/01/12 (S1)	0	-	-	6	4
	48	0,155	3041	14	4,28
	120	0,232	4552	19	4,52
	144	0,417	8182	20	4,68
	168	0,440	8632	20	4,70
	192	0,431	8460	18	4,78
	216	0,413	8110	15	5,05
PV 07/01/12 (S2)	0	-	-	6	4
	48	0,146	2864	17	4,46
	120	0,433	8495	20	4,52
	144	0,429	8420	19	4,58
	168	0,420	8240	19	4,67
	192	0,414	8120	18	4,96
	216	0,407	7980	14	5,24



**Fig. 12 :** Evolution du pH, concentration de lactose, biomasse et le Titre de la péni V durant la fermentation à pH4 pour S1.



**Fig. 13 :** Evolution du pH, concentration de lactose, biomasse et le Titre de la péni V durant la fermentation à pH4 pour S1.

## 2<sup>ème</sup> test de fermentation à pH=5

### III.2.1. Germination

#### ➤ pH et sédimentation

**Tableau VI :** pH et sédimentation après 40 heures de germination.

Souche	pH	Sédimentation %
PV 07/01/12 (S1)	5,41	16
PV 07/02/12 (S2)	5,30	17

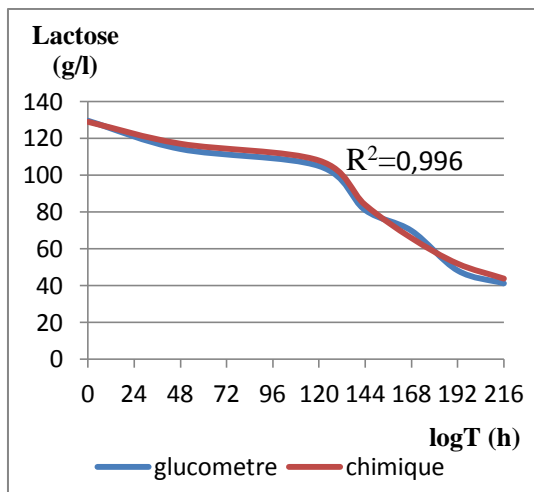


### III.2.2. fermentation

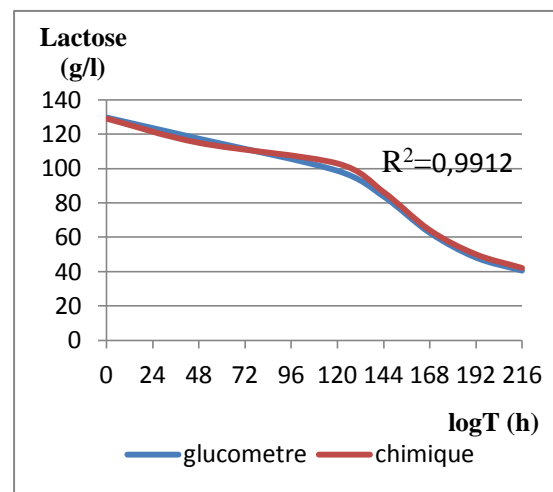
#### ➤ Dosage de lactose dans le bouillon de fermentation

**Tableau VII :** Dosage de lactose par méthode chimique et par glucomètre.

LogT(h)	S1 (PV 07/01/12)			S2 (PV 07/02/12)		
	[Lactose](g/l) Par glucomètre	[Lactose] (g/l) Par méthode Chimique		[Lactose](g/l) Par glucomètre	[Lactose] (g/l) Par méthode Chimique	
		Do	Concentration (g/l)		Do	Concentration (g/l)
0	129,56	0,878	128,93	129,56	0,878	128,93
48	114,22	0,797	117,04	117,25	0,782	114,83
120	104,96	0,735	107,93	98,54	0,700	102,80
144	81,03	0,591	83,85	83,67	0,587	86,20
168	69,84	0,449	65,93	62,48	0,436	64,02
192	48,22	0,354	51,98	48,02	0,340	49,93
216	41,23	0,299	43,90	40,41	0,286	42,00



**Fig. 14 :** Evolution de la concentration du lactose durant la fermentation à pH5 pour S1.

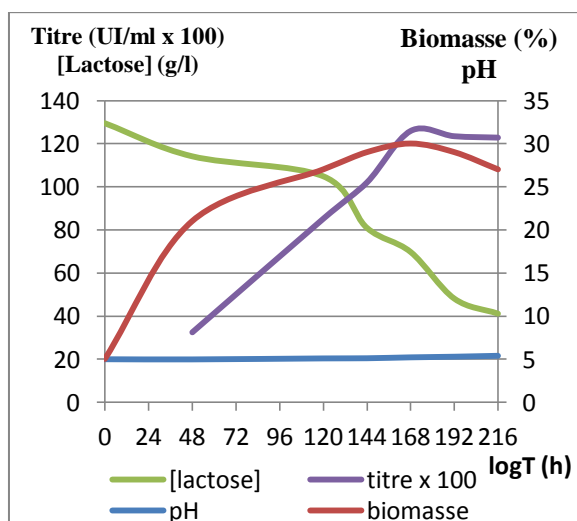


**Fig. 15 :** Evolution de la concentration du lactose durant la fermentation à pH5 pour S2

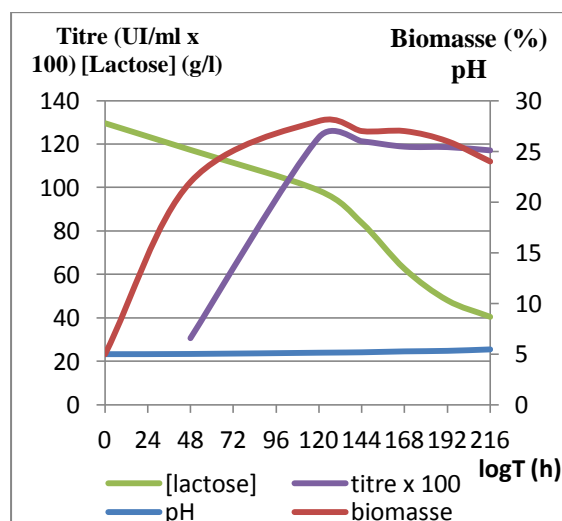
➤ **Suivi de pH, sédimentation et le titre de la péni V**

**Tableau VIII** : Résultats du suivi de pH, sédimentation et le Titre de la péni V pour S1 et S2

Souche	LogT (h)	Do des échantillons	Titre= Do × 19.619 (UI/ml)	Sédimentation (%)	pH
PV 07/01/12 (S1)	0	-	-	5	5
	48	0,165	3237	21	4,98
	120	0,434	8515	27	5,10
	144	0,520	10202	29	5,12
	168	0,642	12595	30	5,23
	192	0,629	12350	29	5,31
	216	0,619	12153	27	5,42
PV 07/01/12 (S2)	0	-	-	5	5
	48	0,156	3061	22	5,02
	120	0,628	12321	28	5,14
	144	0,619	12140	27	5,18
	168	0,605	11869	27	5,27
	192	0,587	11869	26	5,32
	216	0,582	11720	24	5,46



**Fig. 16** : Evolution du pH, concentration de lactose, biomasse et le Titre de la péni V durant la fermentation à pH5 pour S1.



**Fig. 17** : Evolution du pH, concentration de lactose, biomasse et le Titre de la péni V durant la fermentation à pH5 pour S2.

### III.1. 3<sup>ème</sup> Test de fermentation à pH=6 (milieu standard)

#### III.3.1. Germination

##### ➤ pH et sédimentation

**Tableau IX :** pH et sédimentation après 40 heures de germination.

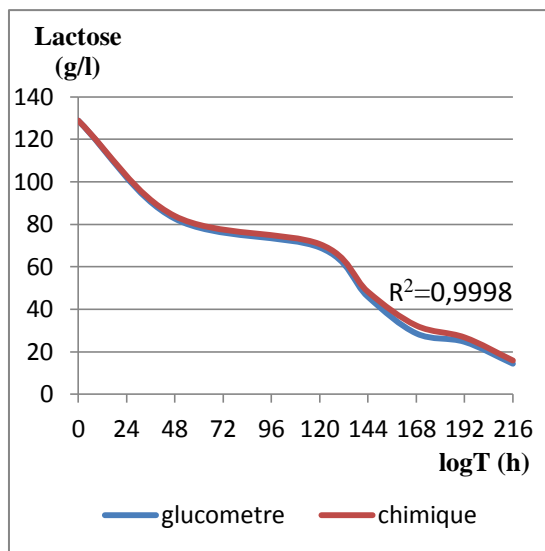
Souche	pH	Sédimentation %
PV 07/01/12 (S1)	5,31	16
PV 07/02/12 (S2)	5,30	15

#### III.3.2. Fermentation

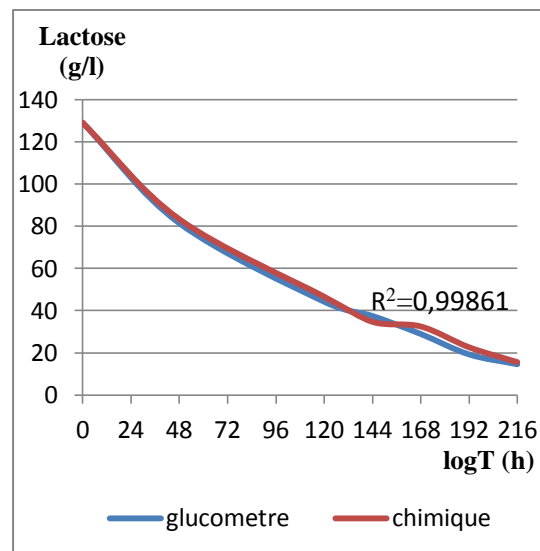
##### ➤ Dosage de lactose dans le bouillon de fermentation

**Tableau X :** Dosage de lactose par méthode chimique et par glucomètre.

LogT (h)	S1 (PV 07/01/12)			S2 (PV 07/02/12)		
	[Lactose](g/l) Par glucomètre	[Lactose] (g/l) Par méthode Chimique		[Lactose](g/l) Par glucomètre	[Lactose] (g/l) Par méthode Chimique	
		Do	Concentration (g/l)		Do	Concentration (g/l)
0	129	0,878	128,93	129	0,878	128,93
48	82,82	0,572	84,00	81,44	0,567	83,27
120	69,23	0,482	70,78	44,21	0,317	46,55
144	45,98	0,329	48,31	37,44	0,236	34,66
168	28,78	0,221	32,45	28,93	0,221	32,45
192	24,8	0,183	26,87	19,25	0,154	22,61
216	14,52	0,109	16,00	14,58	0,106	15,57



**Fig. 18 :** Evolution de la concentration du lactose durant la fermentation à pH6 pour S1.

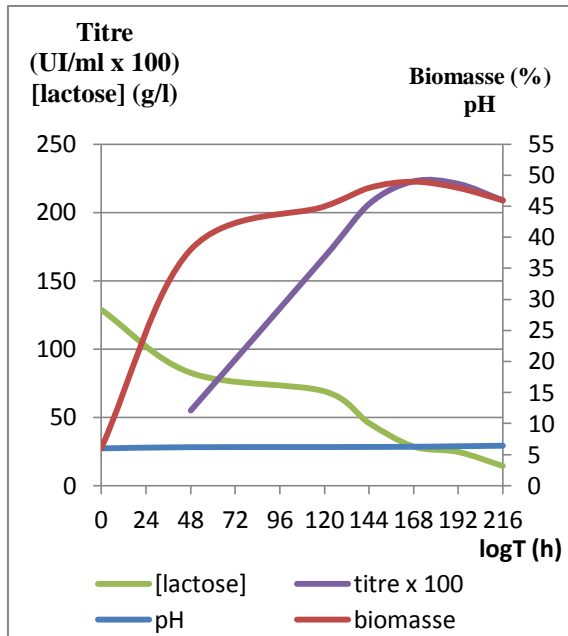


**Fig. 19 :** Evolution de la concentration lactose durant la fermentation à pH6 pour S2.

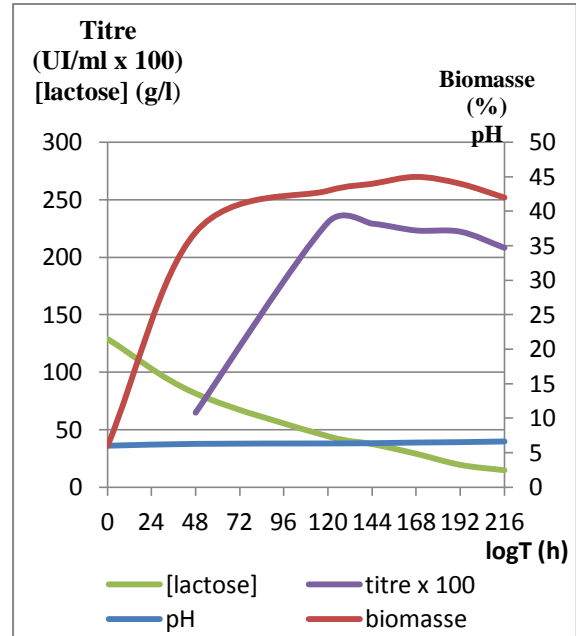
➤ **Suivi de pH, sédimentation et le titre de la péni V**

**Tableau XI :** Résultats du suivi de pH, sédimentation et le Titre de la péni V pour S1 et S2.

Souche	LogT (h)	Do des échantillons	Titre= Do × 19.619 (UI/ml)	Sédimentation (%)	pH
PV 07/01/12 (S1)	0	-	-	6	6
	48	0,290	5510	38	6,18
	120	0,854	16758	45	6,20
	144	1,023	20064	48	6,22
	168	1,133	22230	49	6,24
	192	1,127	22116	48	6,32
	216	1,065	20900	46	6,40
PV 07/01/12 (S2)	0	-	-	6	6
	48	0,342	6498	37	6,27
	120	1,173	23009	43	6,33
	144	1,167	22900	44	6,37
	168	1,137	22305	45	6,46
	192	1,081	22200	44	6,52
	216	1,009	20800	42	6,62



**Fig. 20 :** Evolution du pH, concentration de lactose, biomasse et le Titre de la péni V durant la fermentation à pH6 pour S1.



**Fig. 21 :** Evolution du pH, concentration de lactose, biomasse et le Titre de la péni V durant la fermentation à pH6 pour S2.

#### 4<sup>eme</sup> test de fermentation à pH=7

##### III.4.1. Germination :

###### ➤ pH et sédimentation :

**Tableau XII :** pH et sédimentation après 40 heures de germination.

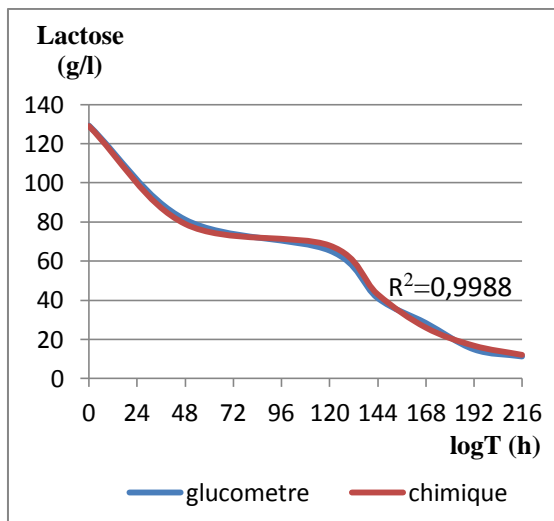
Souche	pH	Sédimentation %
PV 07/01/12 (S1)	5,32	19
PV 07/02/12 (S2)	5,39	18

### III.4.2. Fermentation

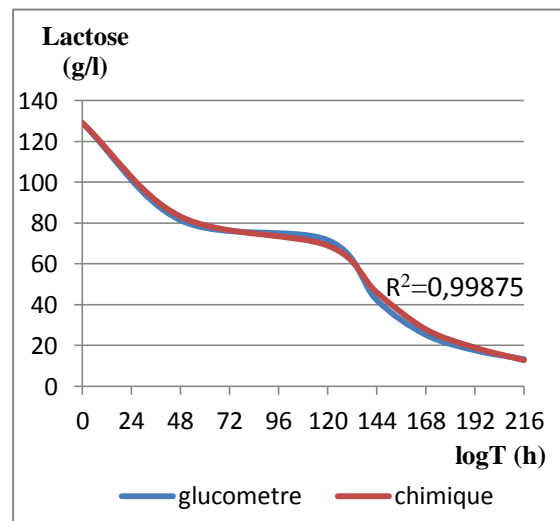
#### ➤ Dosage de lactose dans le bouillon de fermentation

**Tableau XIII :** Dosage de lactose par méthode chimique et par glucomètre.

LogT (h)	S1 (PV 07/01/12)			S2 (PV 07/02/12)		
	[Lactose](g/l) Par glucomètre	[Lactose] (g/l) Par méthode Chimique		[Lactose](g/l) Par glucomètre	[Lactose] (g/l) Par méthode Chimique	
		Do	Concentration (g/l)		Do	Concentration (g/l)
0	129,17	0,879	129,08	129,17	0,879	129,08
48	80,26	0,538	79,00	84,44	0,567	83,27
120	68,44	0,463	67,99	71,64	0,470	69,02
144	43,96	0,293	43,03	47,32	0,314	46,11
168	26,86	0,177	25,99	28,57	0,191	28,05
192	17,08	0,114	16,74	19,88	0,130	19,09
216	11,28	0,082	12,04	13,26	0,088	12,92



**Fig. 22 :** Evolution de la concentration du lactose durant la fermentation à pH7 pour S1.

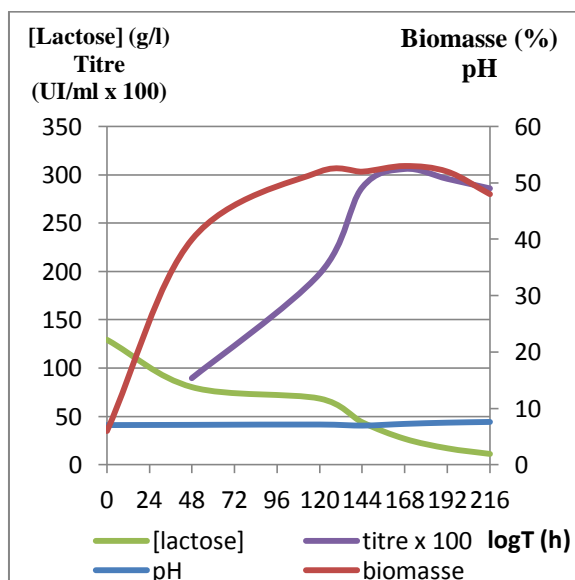


**Fig. 23 :** Evolution de la concentration du lactose durant la fermentation à pH7 pour S2.

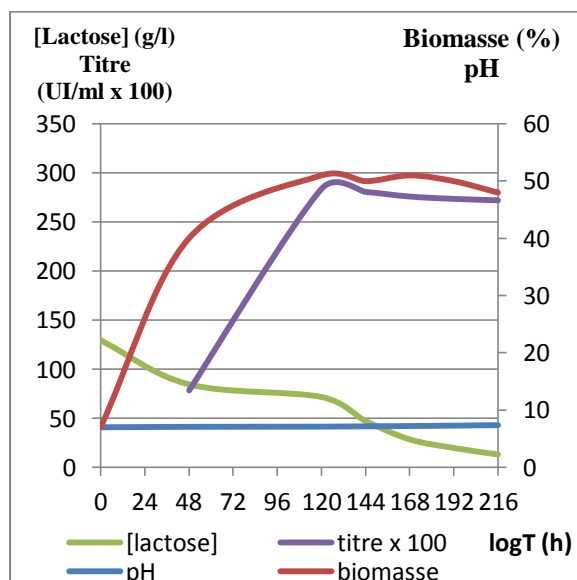
➤ **Suivi de pH, sédimentation et le Titre de la péni V pour S1 et S2**

**Tableau XIV** : Résultats du suivi de pH, sédimentation et le titre de la péni V pour S1 et S2.

Souche	LogT (h)	Do des échantillons	Titre= Do × 19.619 (UI/ml)	Sédimentation (%)	pH
PV 07/01/12 (S1)	0	-	-	6	7
	48	0,458	8985	40	7,04
	120	0,854	19756	52	7,10
	144	1,462	28683	52	6,91
	168	1,560	30606	53	7,22
	192	1,508	29585	52	7,44
	216	1,488	28593	48	7,57
PV 07/01/12 (S1)	0	-	-	7	7
	48	0,422	7852	40	7,08
	120	1,447	28389	51	7,12
	144	1,431	28075	50	7,18
	168	1,407	27603	51	7,23
	192	1,395	27368	50	7,31
	216	1,387	27220	48	7,40



**Fig. 24** : Evolution du pH, concentration de lactose, biomasse et le Titre de la péni V durant la fermentation à pH7 pour S1.



**Fig. 25** : Evolution du pH, concentration de lactose, biomasse et le Titre de la péni V durant la fermentation à pH7 pour S2.

## 5<sup>ème</sup> test de fermentation à pH=8

### III.5.1. Germination

#### ➤ pH et sédimentation

**Tableau XV :** pH et sédimentation après 40 heures de germination.

Souche	pH	Sédimentation %
PV 07/01/12 (S1)	5,43	20
PV 07/02/12 (S2)	5,37	16

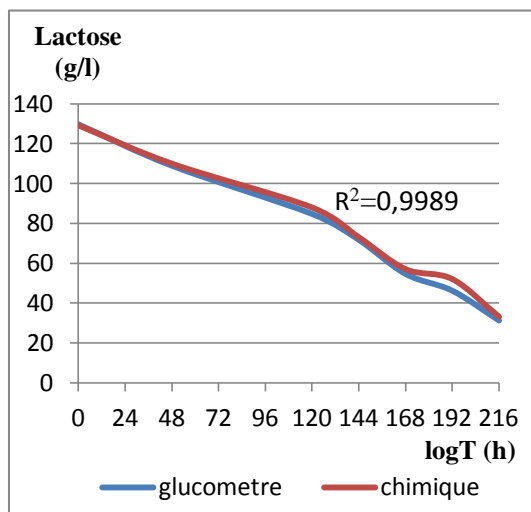
### III.5.2. Fermentation

#### ➤ Dosage de lactose dans le bouillon de fermentation

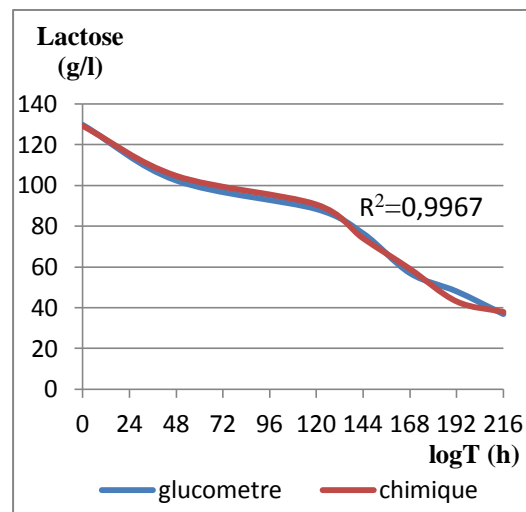
**Tableau XVI :** Dosage de lactose par méthode chimique et par glucomètre.

LogT (h)	S1 (PV 07/01/12)			S2 (PV 07/02/12)		
	[Lactose](g/l) Par glucomètre	[Lactose] (g/l) Par méthode chimique		[Lactose](g/l) Par glucomètre	[Lactose] (g/l) Par méthode chimique	
		DO	Concentration (g/l)		DO	Concentration (g/l)
0	129,66	0,880	129,23	129,66	0,880	129,23
48	108,88	0,749	109,99	102,34	0,713	104,70
120	84,66	0,599	87,96	88,28	0,619	90,60
144	71,69	0,497	72,99	76,32	0,504	74,01
168	54,58	0,388	56,97	56,87	0,402	59,03
192	46,16	0,293	51,98	47,88	0,293	43,03
216	31,22	0,225	33,04	36,75	0,258	37,88





**Fig. 26 :** Evolution de la concentration du lactose durant la fermentation à pH8 pour S1.

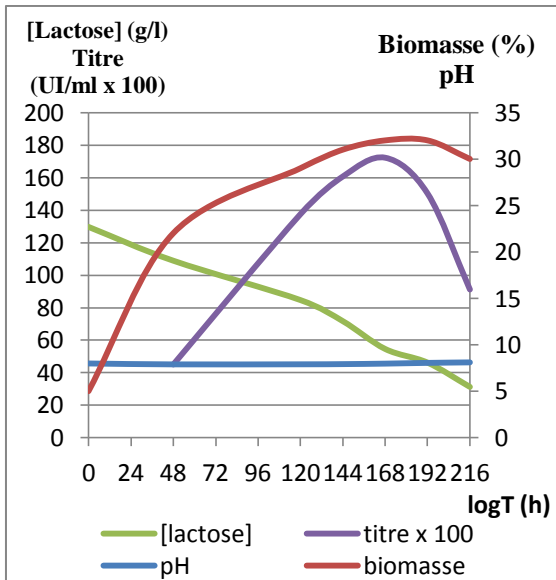


**Fig. 27 :** Evolution de la concentration du lactose durant la fermentation à pH8 pour S2.

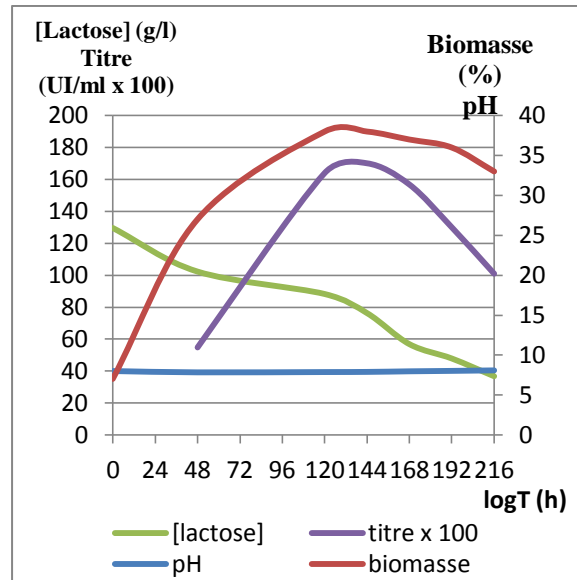
➤ **suivi de pH, sédimentation et le titre de la péni V pour S1 et S2 :**

**Tableau XVII :** Résultats du suivi de pH, sédimentation et le titre de la péni V pour S1 et S2.

Souche	LogT (h)	Do des échantillons	Titre= Do × 19.619 (UI/ml)	Sédimentation (%)	pH
PV 07/01/12 (S1)	0	-	-	5	8
	48	0,230	4512	22	7,89
	120	0,701	13753	29	7,90
	144	0,819	16068	31	7,92
	168	0,878	17225	32	7,98
	192	0,766	15028	32	8,07
	216	0,465	9123	30	8,13
PV 07/01/12 (S2)	0	-	-	7	8
	48	0,280	5493	27	7,82
	120	0,619	12144	36	7,86
	144	0,836	16401	38	7,88
	168	0,867	17010	38	7,96
	192	0,663	13007	37	8,02
	216	0,515	10104	33	8,09



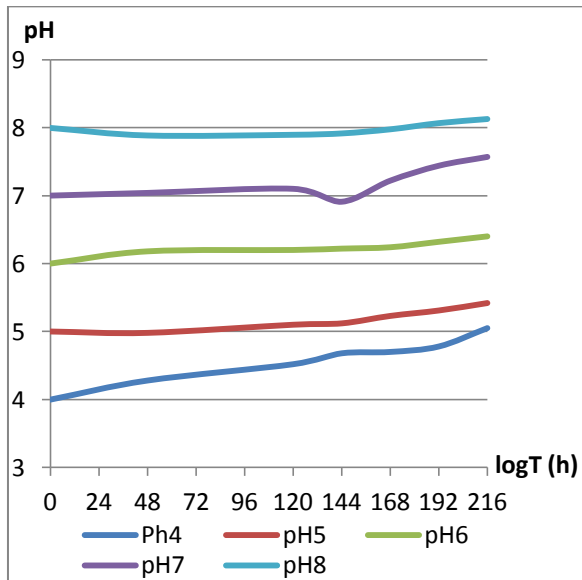
**Fig. 28 :** Evolution du pH, concentration de lactose, biomasse et le Titre de la péni V durant la fermentation à pH8 pour S1.



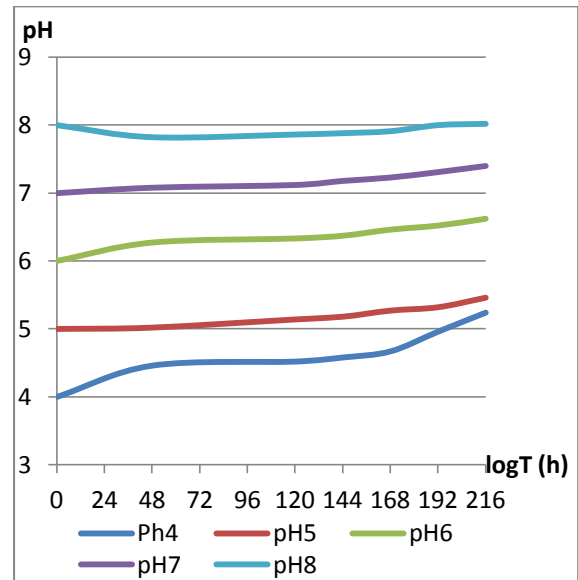
**Fig. 29 :** Evolution du pH, concentration de lactose, biomasse et le Titre de la péni V durant la fermentation à pH8 pour S2.

## IV. Récapitulation des résultats obtenus des cinq tests de fermentation pour la S1 et S1

### IV.1. pH

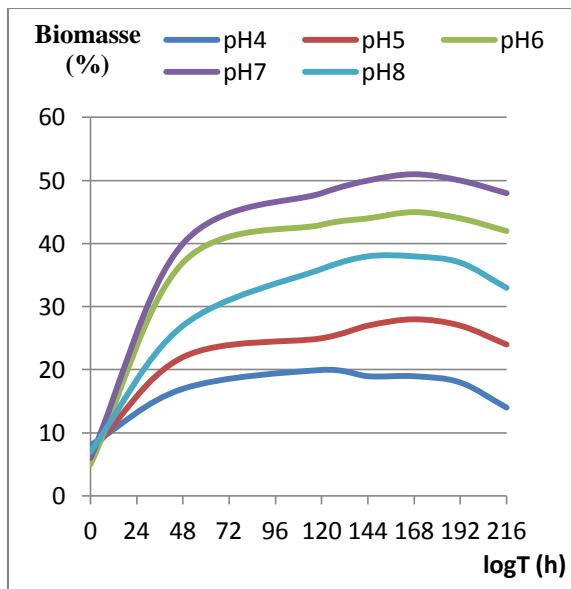


**Fig. 30 :** Evolution du pH des milieux fermentatifs (pH4, pH5, pH6, pH7 et pH8) de S1.

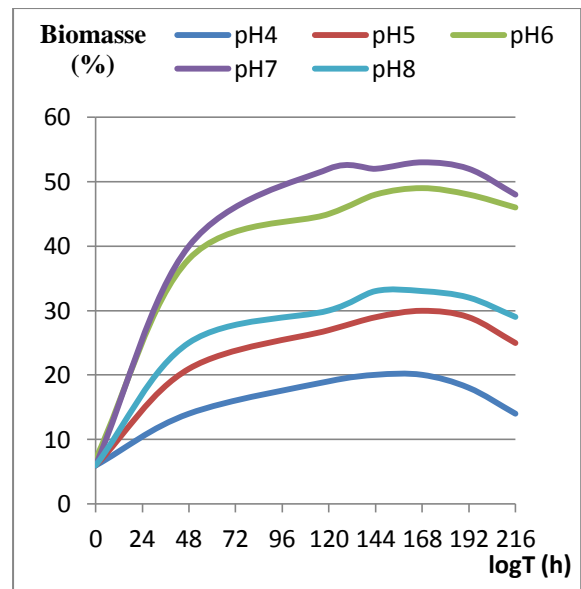


**Fig. 31 :** Evolution du pH des milieux fermentatifs (pH4, pH5, pH6, pH7 et pH8) de S2.

### IV.2. Biomasse :

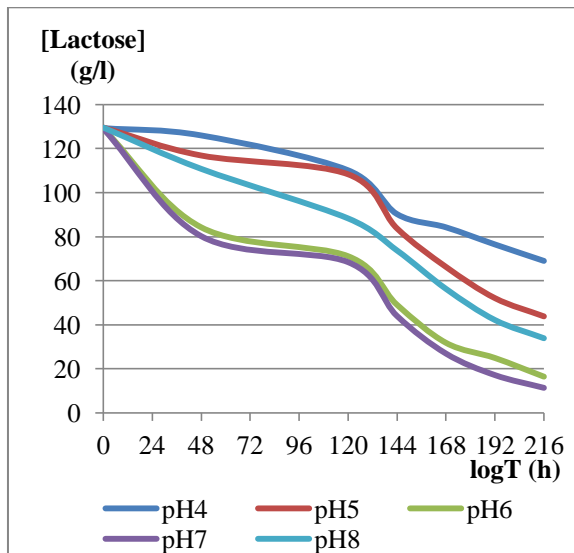


**Fig. 32 :** Evolution de la biomasse des milieux fermentatifs (pH4, pH5, pH6, pH7 et pH8) de S1.

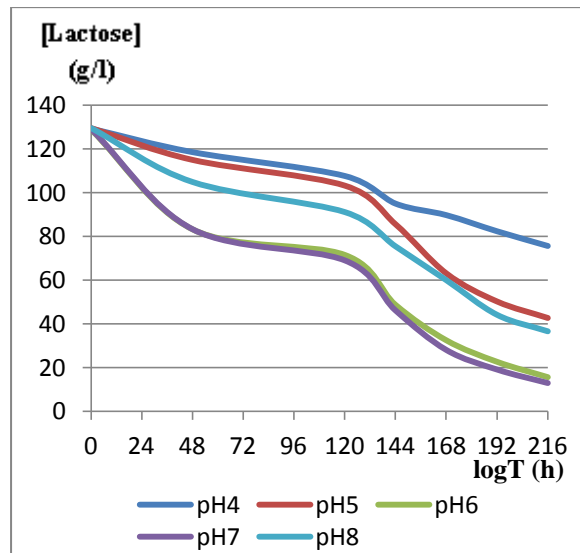


**Fig. 33 :** Evolution de la biomasse des milieux fermentatifs (pH4, pH5, pH6, pH7 et pH8) de S2.

### IV.3. Concentration du lactose :

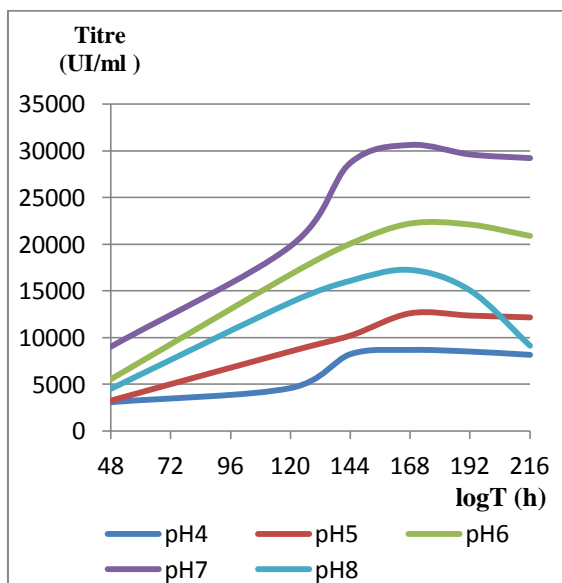


**Fig. 34 :** Evolution de la concentration de lactose dans les milieux fermentatifs (pH4, pH5, pH6, pH7 et pH8) pour S2.

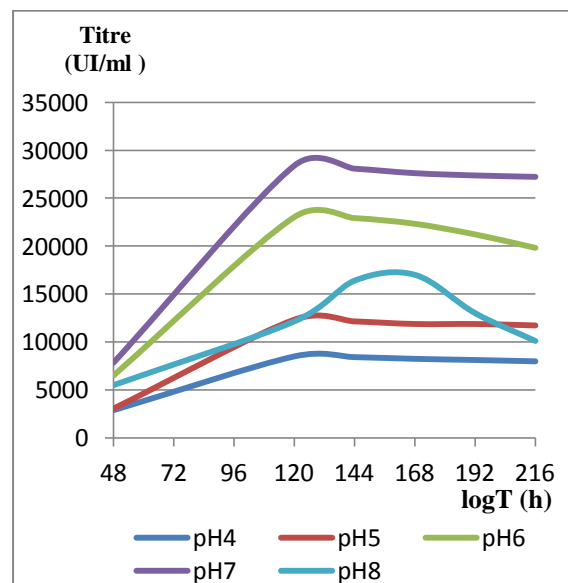


**Fig. 35 :** Evolution de la concentration de lactose dans les milieux fermentatifs (pH4, pH5, pH6, pH7 et pH8) pour S2.

### IV.4. Titre de la péni V



**Fig. 36 :** évolution du Titre de la péni V dans les milieux fermentatifs (pH4, pH5, pH6, pH7 et pH8) de S1.



**Fig. 37 :** évolution du Titre de la péni V les milieux fermentatifs (pH4, pH5, pH6, pH7 et pH8) de S2.

## **V. Discussion :**

### **V.1. Evolution des paramètres de la fermentation en fonction du temps :**

#### **V.1.1. le pH :**

D'après les figures (29 et 30) l'évolution du pH en fonction de l'âge de la fermentation pour S1 et S2 est pratiquement stable, qui tend à s'alcaliniser vers la fin de la fermentation pour les cinq tests de fermentation effectués.

La stabilité du pH est due à la présence de l'huile de soja dans le milieu de culture **(Changhua, 2009)**.

Toute fois l'alcalinisation du milieu à la fin de la fermentation est due à l'accumulation de l'ammoniac gaz ( $\text{NH}_3$ ) résultant de la décomposition des composés azotés du milieu (protéines ou acides aminés) **(Jérôme et al., 2004)**.

#### **V.1.2. La biomasse :**

Selon les figures (31 et 32), les courbes de croissance des deux souches dans les cinq milieux de fermentation présentent toutes quatre (4) phases :

##### **A. Phase exponentielle :**

La phase exponentielle (log0 à log48), les deux souches entrent dans la phase de multiplication rapide pour les cinq tests de fermentations effectués.

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 **(Thonart, 2007)**.

##### **B. Phase de ralentissement :**

Cette phase est apparue de log48 à log120 pour S1 et S2, dans les cinq tests de fermentations réalisés.

Selon **Thonart** le ralentissement de la croissance des deux souches pour les tests de fermentation (pH6, pH7 et pH8) est dû à la diminution des éléments nutritifs dans le milieu fermentatif. (**Thonart, 2007**).

Pour les tests de fermentation portés sur pH4 et pH5 la phase de ralentissement est due, selon **Stahl J P**, à l'effet inhibiteur de croissance du pH acide (2,5-5) de milieu fermentatif sur l'ensemble de l'activité cellulaire, la solubilité des nutriments et sur la perméabilité de la membrane cellulaire (**Stahl J P, 1997**).

### **C. Phase stationnaire :**

Cette phase est apparue du log120 à log192 pour les deux souches exploitées et sur les cinq tests de fermentation accomplis. Toute fois le pourcentage de la biomasse des deux souches diffèrent d'un test de fermentation à un autre. Des valeurs maximales ont été enregistrées pour le test de fermentation à pH7 de l'ordre de 53% pour la S1 et de 51% pour S2. Cependant des valeurs minimales ont été observées pour le test de fermentation à pH4 à raison de 19% pour S1 et de 20% pour la S2.

Dans cette phase la concentration en cellules atteint son niveau maximal. Cependant, la croissance cellulaire s'arrête mais celle-ci conserve une bonne activité métabolique élaborant de grandes quantités de métabolites secondaires. (**Thonart, 2007**).

### **D. Phase de déclin :**

Le déclin de la croissance apparait de log192 à log216 (Harvest) pour S1 et S2 dans les cinq tests de fermentation effectués.

Cette phase résulte du vieillissement du mycélium qui perd sa flexibilité qui est exposé aux forces de cisaillement engendré par l'agitation, l'épuisement de milieu, le manque d'oxygénation, l'accumulation du CO<sub>2</sub> et des déchets, aussi l'autolyse des cellules végétatives, ces facteurs entraînent la diminution du nombre de cellules vivantes (**Bal, 2006**).

**Thonart** rapporte qu'on observe toujours une division chez certaines cellules par consommation de la matière organique libérée par les cellules mortes, mais, la vitesse de croissance est inférieure à celle de la mortalité cellulaire (**Thonart, 2007**).

### V.1.3. Concentration de lactose dans le milieu fermentatif :

Le profil des graphiques des figures (10, 11, 14, 15, 18, 19, 22, 23, 26 et 27) montrent une bonne corrélation ( $R^2 \in [0,9957-0,9998]$ ) entre les résultats obtenus par la méthode du glucomètre et ceux déterminés par la méthode chimique (à l'anthrone) cela veut dire que l'utilisation des deux méthodes converge vers les mêmes résultats vue leur précision d'analyse. Ce qui donne le choix à l'industriel d'utiliser une seule méthode en optant pour la plus rapide et la moins onéreuse.

La régression de la concentration du lactose dans les milieux fermentatifs est en fonction de la phase de croissance de S1 et de S2 et la quantité de la biomasse formés dans ces milieux :

De log0 à log48, on remarque une diminution importante de la concentration de lactose dans les milieux fermentatifs menés à pH6 et à pH7, qui correspond à la phase exponentiel de la croissance de S1 (fig. 20 et 24) et de S2 (fig. 21 et 25), ce qui implique une grande consommation de lactose par les deux souches. En revanche, une légère diminution de la concentration du lactose dans les milieux fermentatifs menés à pH4, pH5 et pH8 (fig. 34 et 35), cela est du à une faible croissance des deux souches dans ces milieux (fig. 32 et 33), ce qui implique une faible consommation de lactose.

Les graphiques des figures (34 et 35) montrent que, de log48 à log120, une légère diminution de la concentration de lactose dans les cinq milieux fermentatifs, ce qui signifie une baisse de consommation de lactose par les deux souches, puisque, S1 et S2 sont en phase de ralentissement de la croissance.

De log120 à log216 les mêmes figures indiquent, une diminution importante de la concentration du lactose dans les milieux fermentatifs menés à (pH6 et pH7) vue les quantités importantes de la biomasse dans ces milieux qui a engendré une grande consommation de lactose. Par contre une baisse intermédiaire est enregistrée pour les milieux fermentatifs effectués à (pH5 et pH8) due aux quantités moyennes de la biomasse dans ces milieux. Par ailleurs, la faible croissance du mycélium de S1 et S2 dans le milieu fermentatif mené à pH4 a conduit à une faible consommation du lactose qui a causé une légère diminution du lactose résiduel dans le bouillon de fermentation.

#### **V.1.4. Le Titre de la pénicilline V :**

D'après les graphiques des figures (36 et 37) la synthèse de la pénicilline V dans les milieux fermentatifs (pH4, pH5, pH6, pH7 et pH8) apparaît dès log48 à faible concentration et atteint son maximum à 120h pour la S2 alors que, la S1 atteint sa valeur maximale à log168 de la fermentation.

Dès log120, on remarque un faible déclin uniforme de la synthèse de la pénicilline V pour la S2 et à partir de log168 pour la S1, et cela jusqu'à la fin de la fermentation (HARVEST). Ces résultats sont enregistrés pour les tests de fermentation menés à (pH4, pH5, pH6 et pH7).

Le maximum de production de pénicilline V correspond à la période de consommation du lactose période correspondant à une zone de stabilité du pH (le pH étant stabilisé entre 6.5 et 7.5). Une variation de pH en dehors de cette zone entraîne une baisse importante du rendement en pénicilline (Asselineau J et Zelta J P, 1973).

Par contre le test de fermentation mené à pH8 fait exception avec une importante baisse de la concentration de la pénicilline V dès log120 pour la S2 et log168 pour S2.

Cette baisse importante du Titre de la pénicilline V pour les deux souches dans ce milieu de fermentation, après avoir atteint sa valeur max de 17225 UI/ml à log120 pour S2 et de 17010 UI/ml à log168 est due à deux raisons :

➤ **La dégradation en milieu alcalin :**

C'est en fait à  $\text{pH} \geq 8$  qu'apparaissent les attaques de l'ion  $\text{OH}^-$  sur le carbonyle du lactame avec ouverture du cycle. En générale, l'ultime stade de dégradation du lactame se situe lors de la fermentation de l'acide pénicilloïque. Toutefois, dans des conditions plus drastiques, une décarboxylation en acide pénilloïque peut être observée (Dam et Boudet, 1992).

➤ **La phénoxy méthylpénicilline amidohydrolase :**

Elle hydrolyse la phénoxy méthylpénicilline en 6-APA, elle a été isolée de *P.chrysogenum*. Le pH optimum de cette enzyme est de 7,6 dans un tampon phosphate (Whiteman et abraham, 1996).



En se référant aux graphiques (figure 36 et 37), on remarque que l'évolution de la synthèse de la pénicilline V entre la S1 et la S2 durant la fermentation est pratiquement pareil.

La production de la pénicilline V dans les milieux fermentatifs de pH4 et pH5 sont minimales avec une valeur maximale de 8632 UI/ml à log168 pour la S1 et de 8495 UI/ml à log120 pour la S2 dans le milieu fermentatif à pH4 (fig. 12 et 13), aussi, pour le bouillon de fermentation à pH5, la S1 atteint un maximum de production de 12595 UI/ml à log 168 et la S2 12321 UI/ml à log120 (fig. 16 et 17). Cela peut être expliqué par la difficulté des deux souches de *P.chrysogenum* à se développer sur des pH plutôt acides afin de former une biomasse nécessaire pour une meilleure production de la pénicilline V.

Le profil des graphiques (fig. 20 et 21) montrent que, la productivité de (S1 et S2) en milieu fermentatif menés à pH6 est modérée avec des maximums de production de 22230 UI/ml à log 168 pour la S1 et de 23009 UI/ml pour la S2.

En revanche, qu'une meilleure productivité des deux souches est enregistrée pour le test de fermentation mené à pH7 qui atteint une valeur maximale de 28389 UI/ml à log120 qui baisse légèrement à 27220 UI/ml au Harvest de même pour la S1 qui atteint une valeur maximale de 30606 UI/ml à log168 subissant après, une légère baisse jusqu'à 29193 UI/ml (fig. 24 et 25).

Par comparaison entre les différents tests de fermentation (fig. 36 et 37), on constate que la fermentation à pH=7 permet une multiplication importante du mycélium des deux souches, par conséquent, elles assurent une meilleure production de la pénicilline V, cela nous permet de constater que le pH=7 est le plus convenable pour la croissance des deux souches de *P.chrysogenum* exploités.

La production de la pénicilline V est relativement proportionnelle à la biomasse du mycélium **(MOO-YOUNG M, 1985)**.

Cela explique les résultats obtenus de la fermentation effectuée à pH7 par rapport aux autres tests de fermentation.

## Conclusion

On conclue que le pH du milieu fermentatif est en relation directe avec la croissance de *P.chrysogenum* qui à son tour influence la production de la pénicilline V.

L'utilisation de la méthode chimique (à l'antrone) et celle du glucomètre pour le dosage du lactose dans les différents tests de fermentation, convergent vers les mêmes résultats, cela assure une bonne précision de ces deux méthodes.

La consommation du lactose par les deux souches est proportionnelle à la quantité de la biomasse dans les bouillons de fermentation qui explique ainsi les concentrations importantes du lactose résiduelle dans les milieux à faible croissance (pH4, pH5 et pH8) par rapport aux faibles concentrations enregistrées aux milieux à grande croissance mycélienne (pH6 et pH7).

Même si S1 atteint son maximum de production de la pénicilline V tardivement par rapport à S2, le comportement (consommation de lactose, croissance et production de pénicilline V) de ces deux souches est pratiquement le même dans les différents bouillons de fermentation.

Les meilleures performances des deux souches sur le milieu fermentatif effectué à pH7 par rapport aux autres milieux de fermentation exploitées, nous ont permis à déterminer que le pH=7 est le plus convenable pour une meilleure production de la pénicilline V par *P.chrysogenum* en culture submergé en mode batch.

## Références Bibliographiques

### A

- ❖ **Aouni N et Bitouri M. (2006).** Proposition d'un plan communication, Filiale Antibiotical Médéa.
- ❖ **Asselineau J et Zelta J P. (1973).** Antibiotiques. Structures et exemples de modes d'action. (Eds.), HERMANN, Paris, pp.114.
- ❖ **Axel A et Brakhage A A. (1998).** Molecular Regulation of  $\beta$ -Lactam, Biosynthesis in Filamentous Fungi. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Edition: D-80638 Munich. Germany. 547 p.

### B

- ❖ **Boiron P. (1996).** Organisation et biologie des champignons. (Eds.), Nathan, Paris, pp.19-79.
- ❖ **Botton B, Breton A, Fevre M, Gauthier S, Guy P, Larpent J P, Reymond P, Sanglier J J, Vayssier Y et Veau P. (1999).** Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle. Edition : Masson. Paris. 426p.
- ❖ **Botton B, Breton A, Fevre M, Gauthier S, Guy Ph, Larpent J P, Reymond P, Sanglier J J, Vayssier Y et Veau P. (1990).** Biotechnologies Moisissures Utiles et Nuisibles Importance Industrielle. (Eds), Masson, Paris, pp. 27-29.
- ❖ **Bouchet Ph, Guignard J L et Villard J. (1999).** Les Champignons. Mycologie Fondamentale et Appliquée. (Eds.), Masson, Paris, pp.111-169.
- ❖ **Bourgeois C M, Mescle J F , Zucca J. (1989).** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. (Eds.), Lavoisier, Paris, pp. 216-244.
- ❖ **Brakhage A A. (1999).** Biosynthesis of  $\beta$ -lactam compounds in microorganisms. In: Barton D , Nakanishi K. (Eds.), Comprehensive Natural Products Chemistry. In:

Kelly J W, (Eds.), Aminoacids, Peptides, Porphyrins and Alkaloids, Elsevier Science, Amsterdam, pp. 159–193.

- ❖ **Brakhage A A. (1998).** Molecular regulation of  $\beta$ -lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 547–585.
- ❖ **Brizuela MA, García L, Pérez L & Mansur M. (1998).** Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Rev. Iberoam. Mic.* **15**, 69–74
- ❖ **Bush K et Mobashery S. (1998).** How  $\beta$ -lactamases have driven pharmaceutical drug discovery. From mechanistic knowledge to clinical circumvention. *Med. Biol.* **456**, 71-98.

## C

- ❖ **Cahagnier B. (1998).** Moisissures des aliments peu hydratés. (Eds.), TEC & DOC-Lavoisier, Paris, pp. 39.
- ❖ **Cavallo J D, Fabre R, Jehl F, Rapp C et Carrabé E. (2004).**  $\beta$ -lactam antibiotics. *EMC-Maladies infectieuses.* **01**, 129-202.
- ❖ **Cazivalsilio D. (2001).** Antibiotique. (Eds.), Enilia, Canada, pp. 1-4.
- ❖ **Charpentier E et Novak R. (2000).** Mort bactérienne et antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines. *médecine/sciences* **.16**, 1125-1127.
- ❖ **C-Nauciel C et Vildé J L. (2005).** Bactériologie médicale. (Eds.), Doin, Paris, pp. 17-19.
- ❖ **CRUEGER W et CRUEGER A. (1990).** *Biotechnology. A textbook of industrial Microbiology.* 2n Edition : Science Tech Publishers. Sunderland (USA). **19**, 52-57.

## D

- ❖ **Davet P. (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. (Eds.), INRA, Paris, pp.52-57.

- ❖ **Demain A L. (2000).** Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 455–63.
- ❖ **Dobreva et Nevena A. (1989).** Manuel et formation Vrac, tome 1. (Eds.), Chimilvest, Bulgarie, pp. 39-41.
- ❖ Dossier technique de la filiale **Antibiotical Médéa. (2003).** 58p.

#### **E**

- ❖ **Edjohn L, Mouton Y, Bascker Y, Debbreuil L and Thabot A. (1997).** Antibiotiques, antiviraux anti infectieux. *Médecine thérapeutique.* **4**, 71-101.
- ❖ **Euzéby JP. (2004).** Evaluation in vitro de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. *Dictionnaire de la Bactériologie vétérinaire*, pp. 1-10.

#### **F**

- ❖ **Fauchère J L et Avril J L. (2002).** Bactériologie générale et médicale. Edition: Ellips Marketing. 368p.
- ❖ **Frazier WC. (1967).** Food microbiology. (Eds.), Academic presse, London, pp. 3-429.

#### **H**

- ❖ **Hilder E F , Klampfl, C W, Buchberger W et Haddad P R. (2002).** Electrophoresis. (Eds.), fed, Germany, pp. 414.
- ❖ **Hoog G S, Guarro J, Gené J et Figueras F. (2000).** *Atlas of Clinical Fungi.*(Eds.), Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht), pp. 23-26.

#### **J**

- ❖ **Jerome J, Perry, James T, Staety ET Stephen Lory. (2004).** Microbiologie. Edition : Dunod Paris. 580p.
- ❖ **Julien R. (2002).** Les moisissures parlons-en. *Objectif prévention.* **25**, 7-8.

## K

- ❖ **Kangni S P. (2003).** Les antibiotiques.Dossier santé. (Eds.), TEC & DOC- Lavoisier, Paris, pp. 1-5.

## L

- ❖ **Larpent J P et Sanglier J J. (1989).** Biotechnologie des Antibiotiques. (Eds.), Masson, Paris, pp. 67.
- ❖ **LARPENT GOURGAU M et SANGLIER J J. (1992).** *Biotechnologie. Principes et Méthodes.*Biosciences et Techniques. (Eds.), Doin, Paris, pp. 52-53.
- ❖ **HERMANSE G et BIOT A. (1986).** Biotechnologie des antibiotiques. (Eds.), Médecines- science, Flammarions, Paris, pp. 39-359.

## M

- ❖ **McDermott P F, Walker R D, and White D G. (2003).** Antimicrobials. Modes of Action and Mechanisms of Resistance. *International Journal of Toxicologie.* **22**, 135-143.
- ❖ **Miguel A, Peñalva, Robert T, Rowlands and Geoffrey T. (1998).** The optimization of penicillin biosynthesis in fungi. Elsevier. Edition: Americaine de Boueck université. 424p.
- ❖ **Meyer A, Deiana J, Lecher H. (1995).** Cours de Microbiologie Générale. Biosciences et techniques. (Eds.), Doin, Paris, pp. 92.

## N

- ❖ **Nicklin J, Graeme-Cook K, Paget T et Killington R. (2000).** L'essentiel en microbiologie. (Eds.), Berti, Paris, pp. 210-216.

## P

- ❖ **Pacannowski J. (2007).** Pénicillines. Hôpital Saint-Antoine. Service des Maladies Infectieuses et Tropicales. (Eds.), Maloine, Paris, pp. 207.
- ❖ **Patrick G L . (2003).** Chimie pharmaceutique. Edition : De Boeck. 629p.
- ❖ **Paul G C, Syddall M T, Kent C A et Thomas C R. (1998).** A structured model for penicillin production on mixed substrates. *Biochem. Eng. J.* (Eds.), Dunod, Paris, pp. 11-21.
- ❖ **Pitt J I et Hocking A D. (1999).** Fungi and food spoilage. Second edition. A Chapman and Hall Food Science Boo. (Eds.), John Wiley and Sons. Ltd . England, pp. 289-290.
- ❖ **Punt P J, Van Biezen N, Conesa A, Albers A, Mangnus J et Van den Hondel C. (2002).** Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production.  
*Trends Biotechnol.* **20**, 200-206.

## R

- ❖ **Reshetilova T A, Solovyeva T F, Baskunov B P and Kozlovsky A G. (1995).** Study of the alkaloid composition of the food-infecting penicilles. *Food Addit. Contam.* (Eds.), Marcel Dekka, New York, pp. 461-466.

## S

- ❖ **Stahl J P. (2006).** Epidemiology, control and treatments of antimicrobial resistances: highlights of the 45th ICAAC, Washington, 2005. *Med Mal Infect.* **36**, 290-6.
- ❖ **Shen H D, Chou H, Tam M F, Chang CY, Lai H Y and Wang S R. (2003).** Molecular and immunological characterization of Pen ch 18, the vacuolar serine protease major allergen of *Penicillium chrysogenum*. **10**, 993–1002.
- ❖ **Stanbury P F, Whitaker A and Hall SJ. (1995).** Principles of fermentation technology (2<sup>nd</sup> edition) . (Eds.), Butter Worth Heineman, pp. 13-160.

- ❖ **Strohl W R. (1997).** Biotechnology of antibiotics. Edition: Marcel Dekker ,New York. 882p.

#### U

- ❖ **Uchikoba T, Mase T, Arima K, Yonezawa H and Kaneda M. (2001).** Isolation and characterization of a trypsin-like protease from *Trichoderma viride*. *Biol. Chem.* **382**, 1509-1513.

#### Y

- ❖ **Yang R D. (2001).** Modern Industrial Microbiology South China University of Technology Press, pp. 53.



## Annexe 1

### Milieu liquide "VMP" V

Milieu liquide pour germination dans des fioles agitées

- Dextrose anhydrous (Difco).....	30g
- Lactose monohydraté (Technical grade).....	10g
- Corn steep liquor (50% DS) (Roquette).....	30g
- Pharmamedia (Traders).....	10g
- Sulfate ammonium (Merck).....	02g
- Calcium carbonate (Technical grade).....	05g
- Phosphate potassium monobasique (Merck).....	0,5g
- Huile de soja (Technical grade) .....	05g
- Eau distillée.....	1000ml

#### Préparation :

- Dissoudre les quantités des ingrédients selon l'ordre de la liste de la composition ;
- Mesurer le pH qui varie entre  $5,15 \pm 0,15$  ;
- Distribuer le milieu à raison de 75ml dans des fioles de 500ml ;
- Boucher les fioles avec un tapis de gaze et du coton ;
- Stériliser à  $121^{\circ}\text{C}$  pendant 20min (1,1 bar) ;
- pH après stérilisation doit être de  $5,80 \pm 0,2$ .

## Annexe 2

### Milieu liquide "FMP" V

Milieu liquide de fermentation dans des fioles agitées

- Acide phénoxyacétique (Sigma).....12g
- Lactose monohydraté (technical grade).....130g
- Pharmamedia (Traders).....32,5g
- Sulfate ammonium (Merck).....12g
- Calcium carbonate EL (Baslini).....10g
- Phosphate potassium monobasique (Merck).....05g
- Sulfate potassium (Merck).....05g
- Huile de soja (Technical grade).....10g
- Eau distillée.....1000ml

#### Preparation:

- Dissoudre l'acide phénoxyacétique dans 20ml d'alcool éthylique pure ;
- Dans une autre fiole, préparer 700ml d'ED avec 04g d'hydroxyle de potassium (KOH) puis, ajouter le POAA à cette fiole ;
- Ajuster le pH à :
  - 3,65 avec HCl 1,5N pour le milieu à pH4.
  - 4,78 avec HCl 1,5N pour le milieu à pH5.
  - 6,60 avec KOH (20%) pour le milieu standard (pH6).
- Ajouter les ingrédients et compléter le volume à 1000ml avec l'ED ;
- Distribuer le milieu à raison de 35ml par fiole de 500 ml ;
- Boucher les fioles avec du coton cardé et de la gaze ;
- Stériliser le milieu à 121°C pendant 20min (1,1 bar) ;
- Ajuster le pH aseptiquement à :
  - 7.00 avec 0,20 ml de KOH (20%) stérile.
  - 8.00 avec 0,30 ml de KOH (20%) stérile.

### Annexe 3

#### Corn steep liquor

- Apparence	jaune vers brune liquide
- Substance sèche	48-55% (p/p)
- Acidité libre	0,5% (p/v)
- pH	3,8 - 4,1
- Sucres réducteurs	2,0%
- Nitrosamine	1,6 – 2,4%
- Total nitrogène	3,7 – 3,8%
- Protéines (N × 6,25)	23 – 24%
- Acides amines libres	11 – 12% (substance sèche)

**Tableau XVIII : Composition en acides aminés:**

Acide aminé	Composition mg/100g de matière sèche
Acide aspartique	50 - 62
Thréonine	580 - 620
Sérine	530 - 580
Acide glutamique	280 - 330
Proline	1450 - 1600
Glycine	500 - 600
Cystéine	NMT 50
Alanine	2300 - 2500
Valine	840 - 920
Méthionine	450 - 500
Isoleucine	450 - 500
Leucine	2600 - 2750
Tyrosine	Traces
Phénylalanine	850 - 920
Lysine	80 - 90

## Annexe 4

### Préparation des réactifs pour le dosage du lactose par glucomètre

#### 1-Préparation du tampon phosphate 0.1M pH=7 :

- Dissoudre 13,609g de phosphate monobasique  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dans une fiole jaugé de 1 litre et compléter avec de l'eau distillé jusqu'au trait de jauge ;
- Laisser sous agitation jusqu'à la dissolution complète du solide ;
- Transférer de cette dernière 250ml dans fiole jaugé de 1 litre ;
- Ajouter 145.5 de NaOH (2N) ;
- Ajouter 500ml d'eau distillé ;
- Corriger le PH à 7 avec NaOH (0.1N) ou  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (45%) ;
- Compléter le volume jusqu'au trait de jauge avec de l'ED.

#### 2) Préparation de solution acide chlorhydrique (6N) :

- Transférer 498 ml HCl (37%) dans une fiole jaugé de 1 litre et compléter avec de l'ED jusqu'au trait de jauge.

#### 3) préparation de la solution d'hydroxyde de sodium NaOH (6N) :

- Dissoudre 240g de NaOH dans une fiole jaugé d 1 litre et compléter avec de l'ED jusqu'au trait.

#### 4) Préparation de la solution d'hydroxyde de sodium NaOH (0,2N) :

- Dissoudre 8g de NAOH dans une fiole jaugé d 1 litre et compléter avec de l'ED jusqu'au trait de jauge.

#### 5) préparation de la solution d'acide orthophosphorique $\text{H}_3\text{PO}_4$ (5%) :

- Transférer 5ml de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  dans une fiole jaugé de 100ml et compléter avec de l'ED jusqu'au trait de jauge.

## Annexe 5

### Préparation de la courbe standard du lactose pour le dosage du lactose par méthode chimique (à l'anthrone)

#### Réactifs :

- Lactose ;
- Solution d'acide chlorhydrique HCl 1,5N ;
- Solution d'hydroxyde de sodium NaOH 1N ;
- Solution d'anthrone 0,2%.

#### Préparation de la courbe standard de lactose :

- Peser soigneusement 0,075g de saccharose et les transférer dans une fiole jaugée de 50ml ;
- Ajouter une quantité suffisante d'eau distillée pour le dissoudre puis compléter jusqu'au trait ;
- Agiter bien la fiole et prélever 5ml de la solution préparée dans une fiole de 100ml propre et sèche, ensuite ajouter 20ml d'eau distillée et 25ml d'acide chlorhydrique 1,5N ;
- Mélanger et chauffer à 100°C pendant 1 heure ;
- Refroidir à température ambiante, ajouter 37ml de NaOH 1N et ajuster le pH à 7 puis compléter avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge ;
- Prélever dans 5 tubes à essais propres et secs : 1cc, 2cc, 3cc, 4cc, 5cc de la solution ;
- Introduire avec la pipette dans les quatre premiers tubes de l'eau distillée en quantité ;suffisante à porter le volume à exactement 5ml, bien mélanger en tournant.
- Ces solutions contiennent : 15; 30; 45; 60; 75 $\mu$ g/ml ;
- Prélever 2 ml de chaque solution dans 5 tubes propres et secs ;
- Ajouter 4ml de solution d'anthrone à 0,2% ;
- Mélanger et chauffer à 100°C pendant 5minutes ;
- Refroidir à température ambiante par immersion dans un b cher d'eau distillée ;
- Faire la lecture de la Do au spectrophotomètre   une longueur d'onde ( $\lambda=620$ ).

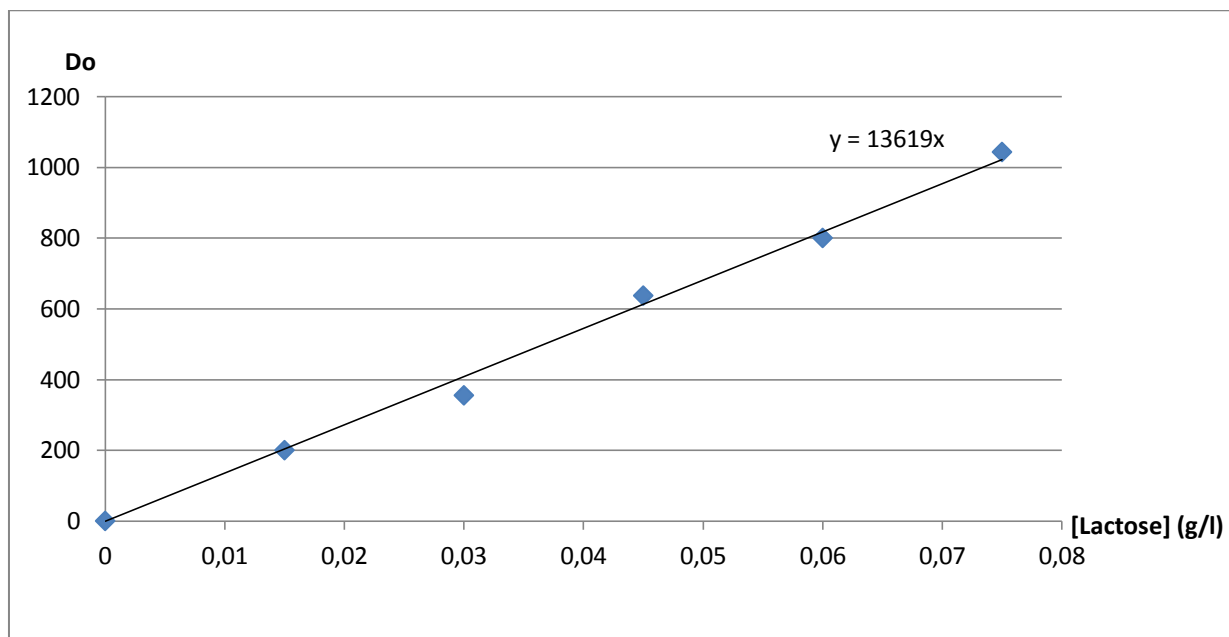
**Préparation du blanc et obtention de la courbe DO=f([lactose]) :**

- Prendre dans un tube à essai 4ml d'eau distillée et 8ml de la solution d'anthrone;
- Faire la lecture au spectrophotomètre pour avoir le zéro optique ;
- Tracer la courbe sur Excel de la lecture de la DO en fonction des concentrations ;
- On obtient une droite passant par l'origine ;
- Déterminer le facteur en calculant la tangente de la pente.

➤ **Courbe standard de lactose :**

**Tableau XIX :** Absorbances des différentes concentrations du standard

Concentration du lactose (g/l)	0,015	0,03	0,045	0,06	0,075
Absorbance	0,200	0,355	0,637	0,800	1,043



**Figure 38 :** courbe standard du lactose

## Annexe 6

### Préparation des solutions pour le dosage de l'antibiotique par spectrophotomètre

#### 1- chlorure d'hydroxylamine :

Dissoudre 175g de chlorure d'hydroxylamine dans 300ml d'ED à 60°C puis refroidir à 25°C, porter le volume à 500ml. Laisser la solution dans une chambre climatisée, la solution est stable à 25°C pendant un mois environ.

#### 2- Réactif alcalin :

Dissoudre 86,5g d'hydroxyde de sodium et 10,3g d'acétate de sodium anhydre dans 350ml d'ED, refroidir à 25°C puis porter le volume à 500ml dans un ballon gradué, stocker à 25°C.

#### 3- 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.

#### 4- Sulfate d'ammonium ferrique (alun de fer) :

Ajouter soigneusement 47ml d'acide sulfurique concentré à 350ml d'ED et dissoudre dans cette solution 100g de sulfate d'ammonium ferrique  $12 \text{ H}_2\text{O}$ .

Refroidir à 25°C et porter le volume à 500ml 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.

#### 5- Tampon phosphate pH 6 :

-Dissoudre dans 100ml d'ED, 2g de phosphate de potassium monoacide ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) et 8g de phosphate de potassium diacide ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

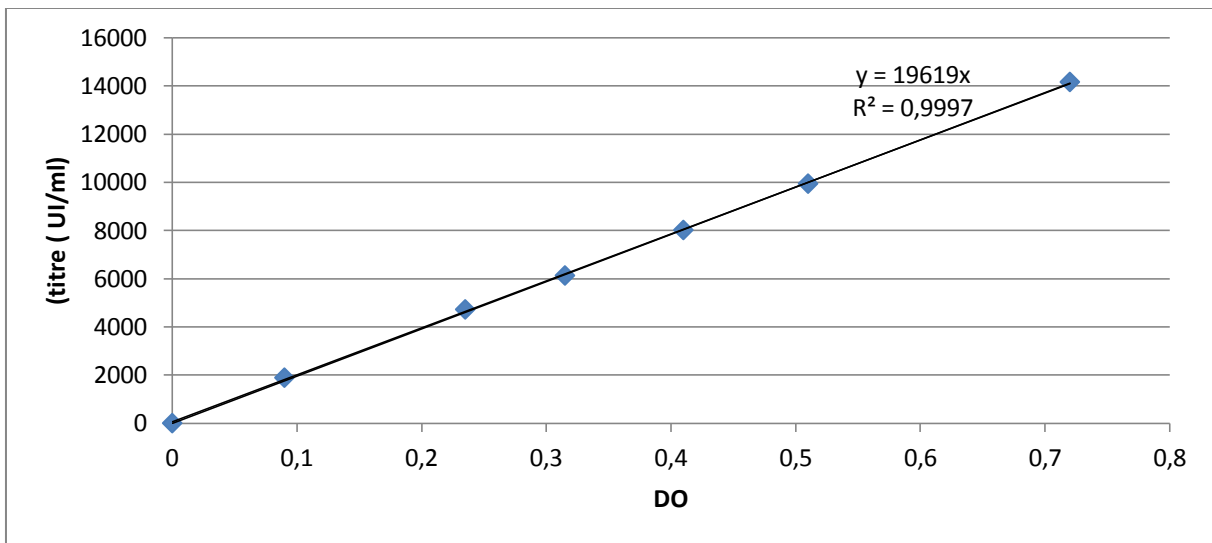
-Vérifier le pH qui doit être entre 5,95 et 6,05.

## Annexe 7

### Résultats de la préparation de la courbe d'étalonnage du standard de la Peni V

**Tableau XX** : résultats des Do de différente concentration du standard de la peni V

[standard] mg/ml	8,85	5,9	5,01	3,83	2,95	1,18
[standard] UI/ml	14160	9440	8016	6128	4720	1888
DO Echantillon	0,720	0,510	0,410	0,315	0,235	0,090



**Figure 39** : Courbe d'étalonnage du standard de la Pénicilline VK

Calcul du Km :

$$K_m = \text{Tg } \alpha = 19619$$



## Annexe 8

### Récapitulation des résultats du suivi du pH et sédimentation des cinq tests de fermentation

**Tableau XXI : pH et sédimentation des cinq tests de fermentation.**

Souche	LogT	pH					Sédimentation %				
		pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
PV :07/01/12 (S1)	0	4	5	6	7	8	6	5	6	6	5
	48	4,28	4,98	6,18	7,04	7,89	14	21	38	40	25
	120	4,52	5,10	6,20	7,10	7,90	19	27	45	52	30
	144	4,68	5,12	6,22	6,91	7,92	20	29	48	52	33
	168	4,70	5,23	6,24	7,22	7,98	20	30	49	53	33
	192	4,78	5,31	6,32	7,44	8,07	18	29	48	52	32
	216	5,05	5,42	6,40	7,57	8,13	15	27	46	48	29
PV :07/02/12 (S2)	0	4	5	6	7	8	8	5	9	7	7
	48	4,46	5,02	6,27	7,08	7,82	17	22	37	40	27
	120	4,52	5,14	6,33	7,12	7,86	20	28	43	48	36
	144	4,58	5,18	6,37	7,18	7,88	19	27	44	50	38
	168	4,67	5,27	6,46	7,23	7,91	19	27	45	51	38
	192	4,96	5,32	6,52	7,31	8,00	18	26	44	50	37
	216	5,24	5,46	6,62	7,40	8,02	14	24	42	48	33

## Annexe 9

**Récapitulation des résultats du dosage de la concentration du lactose dans les cinq bouillons de fermentation pour les deux souches exploitées.**

**Tableau XXII :** Dosage du lactose dans les cinq bouillons de fermentation pour S1 et S2

Souche	LogT	Dosage de lactose dans le milieu de fermentation (g/l)				
		pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
PV : 07/01/12 (S2)	0	129,42	129,56	129	129,17	129,66
	48	126,08	116,88	84,16	80,26	110,88
	120	110,20	108,35	71,04	68,44	88,35
	144	90,24	83,78	48,96	43,96	73,78
	168	84,22	66,32	31,68	26,86	56,32
	192	76,42	52,16	24,80	17,08	42,16
	216	68,92	43,88	16,32	11,28	33,88
PV : 07/01/12 (S2)	0	129,42	129,56	128,93	129,08	129,66
	48	118,64	115	83,27	83,27	105
	120	107,71	103,25	46,55	69,02	91,25
	144	95,04	85,57	34,66	46,11	75,57
	168	89,77	63,12	32,45	28,05	60,12
	192	82,38	50,28	22,61	19,09	44,28
	216	75,64	42,75	15,57	12,92	36,75

## Annexe 10

### Résultats récapitulatifs du dosage du titre de la pénicilline V dans les cinq tests de fermentation pour S1 et S2

**Tableau XXIII** : dosage du Titre de pénicilline V dans les cinq tests de fermentation pour S1 et S2

Souche	LogT (h)	Titre de pénicilline V en UI/ml				
		pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
PV : 07/01/12 (S1)	48	3041	3237	5510	8985	4512
	120	4552	8515	16758	16755	13753
	144	8182	10202	20064	28683	16068
	168	8632	12595	22230	30606	17225
	192	8460	12350	22116	29585	15028
	216	8110	12153	20900	29193	9123
PV : 07/01/12 (S2)	48	2864	3061	6498	7852	5493
	120	8495	12321	23009	28389	12144
	144	8420	12140	22900	28075	16401
	168	8240	11869	22305	27603	17010
	192	8120	11869	21200	27368	13007
	216	7980	11720	19800	27220	10104

## Résumé

Le but du présent travail consiste à étudier le comportement physiologique et la production de la pénicilline V en culture submergée dans des fioles agitées, par deux souches de *P. chrysogenum*, sur une gamme de pH des milieux de fermentation variant de 4 à 8.

Les résultats obtenus montrent que les deux souches présentent un comportement (consommation du lactose, croissance du mycélium, évolution du pH et croissance de la production de la pénicilline V) similaire dans les 5 tests de fermentation.

Le suivi de la concentration du lactose résiduel dans les milieux fermentatifs par une méthode chimique à l'antrone et une autre par glucomètre et le dosage du titre de la pénicilline V a été réalisé par la méthode spectrophotométrique. Les résultats nous ont permis de montrer que le pH de 7 est le pH optimum de la croissance et de la production de la pénicilline V pour les deux souches exploitées.

**Mots clefs :** culture submergée, fermentation, pénicilline V, *Penicillium chrysogenum*.

---

## Summary

The aim of this work is to study the physiological behavior and the production of penicillin V in submerged culture in flasks agitated by two strains of *P. chrysogenum* on a range of pH of the media of fermentations ranging from 4 to 8.

The results show that the two strains exhibit similar behavior in the five fermentations tests (lactose consumption, mycelia growth, changes in pH and production of penicillin V).

Monitoring the concentration of lactose in the fermentative medium by a chemical method (to anthrone) and a glucometer method and another dosage of penicillin as was done by a colorimetric method (to spectrophotometer). The results show that the optimum pH for growth and production of penicillin V by two strains of *P. chrysogenum* studied is pH=7.

**Key words:** fermentation, penicillin V, *penicillium chrysogenum*, submerged culture.