République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE DE MEDEA

Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Génie des Procédés et Environnement

Mémoire de Fin d'Etudes pour l'Obtention du Diplôme de Master en
Génie des Procédés

Spécialité : **Procédés Pharmaceutiques**

THEME

OPTIMISATION DES CONDITIONS DE CULTURE LORS DE LA PRODUCTION DE LA PENICILLINE VK PAR *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*

Proposé et dirigé par :

M elle KHAOUANE LATIFA. *Dr. BENKORTEBI OTHMANE.*

Mr. BELKACEMI Abed

Etudié par :

M elle BAILICHE LAMIA.
M elle OULD ZEMIRLI DALILA.

Promotion 2011 - 2012

Remerciments

*Toute notre gratitude, grasse et remerciement a **ALLAH**, qui nous a dirigé dans la voie de la science, et nous a donné le courage et la volonté pour arriver a ce niveau.*

Nous exprimons en premier lieu nos remerciements à notre promotrice M elle KHAOUANE Latifa, enseignante à l'UYFM pour le soutien et l'encouragement et surtout la patience tout au long de ce travail.

Nous remercions aussi notre co-promoteur Dr. BENKORTEBI Othmane chef de département de Génie de procédés et environnement.

Nous adressons également nos remerciements au Mr. HANINI Salah, Professeur à L'UYFM.

Un grand remerciement à l'ensemble du personnel du group SAIDAL à l'issue de trois agréables mois, en particulier Mr K. Dergua pour ses précieux conseils, notre co-encadreur au niveau du complexe Mr. ABED , sans oublier M elle AMEL , Mr M.GHERABA , F.OUSALEM , I.SI HADJ MOHAND et M me YEMNA, BESMA, AMINA, SORIA, HADJER.

Nous tenons à associer à ces remerciements Mr. BEN DJERDI ABD RAOUF pour tout ce qu'ils ont fait pour nous et ce qu'ils nous ont apportés.

Nous tenant aussi à remercier nos enseignants du primaire jusqu'aux études supérieurs particulièrement M me TALEB.

Enfin, nous remercions sincèrement tous ceux qui-de prés ou de loin-nous ont aidées durant toute la période de ce travail.

MERCI

Dédicace

***J**e remercie **ALLAH** le tout puissant de m'avoir donné la force et le courage pour accomplir ce modeste travail, que je dédie à:*

***L**a plus belle bougie qui a éclaircie toute ma vie depuis les neufs mois*

Jusqu'à présent, avec sa lumière douce j'ai pu parcourir ce chemin sous ses conseils

*et ses orientations, que **ALLAH** la protège et la garde pour qu'elle puisse continuer à éclaircir ma vie, merci, je t'adore **maman**.*

***J**'oublierai jamais ces paroles « il faut compter sur soit pour atteindre les buts », celui qui ma toujours pousser en avant; à toi **papa** un grand merci.*

***A**ux plus belles sœurs qui fleurissent ma vie : **Hadjira** et **Leila**; merci infiniment.*

***A** mon adorable frère qui veille à: mon bonheur **Mohamed**; merci.*

***A** mon beau frère **Ahmed**, sans oublier les petits : **Abd Elmalek** et **Zakaria**.*

***A** tous mes oncles et tantes qui m'ont encouragé jusqu'au bout de ce travail principalement :*

Ahmed, Aissa, Moussa** et **Mouhamed.

A** mes cousines: **Sara, Meriem, Soumia et Aicha.

***A** chaque membre du groupe **NLMD** : **Dalila, Nesserine, Meriem et Nedjoua**, à tous les souvenirs...*

T**u connais tous mes secrets, appuis tous mes projets, tu sais toujours me motiver et m'encourager à continuer, je te respecte énormément, merci **Dalila.

***A** tous mes amis qui m'ont aidé et soutenu avec leurs conseils et encouragements.*

A** tous les étudiants de ma promotion spécialement au département de GPP : **Chahra, Sihem

Fatiha, Amina, Nabila, Samira, Mouna, Dalel.

***A** vous tous merci.*

LAMIA

Dédicace

*Avant tout, je remercie **ALLAH**, qui m'a donné la force, la santé et la volonté d'élaborer ce modeste travail.*

J'adresse très chaleureusement mes profondes dédicaces à ma très chère mère, et à mon très chère père, qui mon beaucoup encouragés et qui mon tout sacrifier afin d'atteindre mon but, ma réussite est pour vous.

A ma sœur qui fleuris ma vie : AMEL et son conjoint AMINE ,leurs enfants : WISSEM ,SARAH,LOUBNA et SIRINE.

A ma sœur qui m'a encouragée et aidée jusqu'au bout de ce travail : SOUMIA et son conjoint ABD RAOUF, leurs petit : SID AHMED.

A mes adorables frères qui veillent sur moi : HAKIM ,MOUHAMED et leurs conjoints RACHIDA,HADJER , leurs enfants.

A mon mari SOUFIANE pour sa confiance « merci infiniment » et à toute ma 2ème famille spécialement ma mère YEMINA et mon père ALI ainsi qu'à mes belles sœurs AMEL, CHAFIKA, BACHIRA, SOUMIA et leurs familles, sans oublier les filles : NESSRINE, HOUDA, HADJER,…

*A chaque membre du groupe **NLMD** je n'oublierai jamais tous les souvenirs avec vous **NESSRINE, LAMIA, MERIEM, NADJOUA.***

A toutes mes amies: KARIMA, HAFIDA, NAIMA Et leurs familles.

A tous les étudiantes de ma promotion (2012) : CHAHRA, SIHEM, FATIHA, AMINA, NABILA, SAMIRA, MOUNA, DALEL.

Vous avez toujours restées à mes cotés malgré les moments difficiles que nous avons traversées ensemble, merci LAMIA, merci NESSRINE.

Tous ceux qui m'aiment et que j'aime trouveront ici l'expression de ma plus profonde gratitude.

DALILA

Sommaire

Remerciement i
Dédicace ii
Résumé iv
Abréviation v
Nomenclature vi
Liste des tableaux vii
Liste des figures viii

Introduction générale 1

Chapitre I. Généralité sur les antibiotiques

I.1. Historique 3
I.2. Définition des antibiotiques 3
I.3. Nomenclature 4
I.4. Objectifs de la recherche sur les antibiotiques 4
I.5. Propriétés communes des antibiotiques 5
I.6. Classification des antibiotiques 5
I.6.1. Classifications d'après le spectre d'action 5
I.6.2. Classification selon le mode d'action 5
I.6.3. Classification selon l'origine 5
I.6.4. Classification d'après le mécanisme d'action 6
I.6.5.Classification d'après leurs propriétés physico-chimiques, ou d'après leurs charges électriques 6
I.6.6. Classification selon la structure chimique 6
I.7. Résistance bactérienne aux antibiotiques 7
I.8. Perspectives et avenir des antibiotiques 8
I.8.1 Nouvelles voies de recherche sur les antibiotiques 8
I.9. Mode d'action des antibiotiques 9
I.10. Avantages et inconvénients des antibiotiques 10
I.10.1. Avantages 10
I.10.2. Inconvénients 10

Chapitre II. Les pénicillines

II.1. Les pénicillines 11
II.1.1. Généralités et Définitions 11
II.1.2. Historique 11
II.1.3. Composition chimique et fabrication 14
II.1.4. Préparation des pénicillines 15
II.1.5. Usage théorique 15
II.1.6. Classification des pénicillines 16
II.1.7. Types de pénicilline 16

II.2. La phénoxyméthylpénicilline (pénicilline V) 17
II.2.1. Définition 17
II.2.2. Structure chimique 18
II.2.3. Biosynthèse 18
II.3. *Penicillium chrysogenum* 20
II.3.1. Les moisissures 20
II.3.2. Classification 21
II.3.3. Deutéromycètes (ou champignons imparfaits) 21
II.3.4. Classification du *P. chrysogenum* 21
II.3.5. Habitat 22
II.3.6. Mécanisme de croissance 22
II.3.7. Obtention de la souche 23

Chapitre III. La fermentation

III.1. Introduction 25
III.2. Définition 25
III .3. Les Conditions physiquement et chimiquement contrôlées 26
III.3.1. Température 26
III.3.2. pH 26
III.3.3. Vitesse d'Agitation 26
III.4. Les techniques de fermentation 27
III.4.1. Batch 27
III.4.2. Fed-batch 27
III.4.3. Continue 28
III.5. Croissance microbienne 28
III.5.1. Bilan chimique 28
III.5.2. Différents Stades de la croissance d'un micro-organisme. 29
III. 5.2.1. La phase de latence 30
III. 5.2.2. La phase d'accélération 30
III.5.2.3. La phase de croissance maximale ou exponentielle 30
III. 5.2.4. La phase de décélération ou phase de freinage 30
III.5.2.5. La phase stationnaire maximale 31
III.5.2.6. Phase de déclin 31
III.6. Sources nutritives pour la fermentation industrielle 31
III.7. Conclusion 32

Chapitre IV. Modélisation par les plans d'expériences

Partie 1 : Matériels et méthodes

IV.1.1. Lieu 33
IV.1.2. But 33
IV.1.3. Les paramètres environnementaux 33

a. La température 33
b. Le pH 33
c. La vitesse d'agitation (rpm) 33
IV.1.4. Matériels 34
a. Matériels biologique 34
b. Appareillages, verreries et matériels 34
c. Milieux de culture 34
IV.1.5. Préparation du matériel biologique 34
IV.1.5.1. Réactivation sur boites 34
IV.1.5.2. La germination 35
IV.1.5.3. La fermentation 36
IV.1.6. Les plans d'expériences 37
IV.1.6.1. Plans factoriels complets à deux niveaux 2^k 37
IV.1.6.2. Plan d'optimisation et de modélisation 38
IV.1.7. Conditions de culture 39
IV.1.8. Méthode analytique 39
IV.1.8.1. Dosage de l'antibiotique 39
IV.1.8.2. Dosage de sucre 41
a. Méthode chimique 41
b. Méthode du glucomètre 43
IV.1.8.3. Analyse de la biomasse 43
Partie 2 : Résultats et discussions
IV.2.1. Modélisation et analyse 45
IV.2.2. Optimisation 46
IV.2.3. Etude de la cinétique de production de la pénicilline dans les conditions optimale 47
Conclusion générale 48
Références bibliographiques
Annexes

Liste des figures

Figure I.1.	Mode d'action des antibiotiques	09
Figure II.1.	Structure chimique générale des pénicillines.	11
Figure II.2.	Les Staphylocoques ne peuvent pas se développer à proximité de *Penicillium notatum*	13
Figure II.3.	Penicillium utilisé pour fabriquer la pénicilline.	14
Figure II.4.	Structure de la pénicilline VK.	18
Figure II.5.	Biosynthèse de la pénicilline VK.	19
Figure II.6.	Principale classe des moisissures.	20
Figure II.7.	Représentation schématique du mycélium de *P. chrysogenum.*	23
Figure II.8.	Arrangement global des segments du mycélium de *P. Chrysogenum.*	23
Figure III.1.	Cuves à fermentation utilisées pour la fabrication du rhum (Barbade).	26
Figure III.2.	Différents stades de la croissance d'un micro-organisme	29
Figure IV.1.1.	Morphologie des colonies	35
Figure IV.1.2.	Développement de souche sur **CMP**	35
Figure IV.1.3.	La souche dans le **VMP**	36
Figure IV.1.4	Observation de mycélium par le microscope(x100).	37
Figure IV.1.5.	Représentation géométrique d'un domaine expérimental de 2 facteurs à 2 niveaux.	38
Figure IV.1.6.	Tubes coniques pour sédimentation	44
Figure IV.2.1.	Tracé de la surface de réponse de rendement en pénicilline VK à partir du modèle de l'équation: effet de la température et de la vitesse d'agitation.	45
Figure IV.2.2.	Tracé de la surface de réponse de rendement en pénicilline VK à partir du modèle de l'équation: effet de la température et du pH	46
Figure IV.2.3.	Evolution de la biomasse, du sucre et du produit en fonction du temps de fermentation.	47

Liste des tableaux

Tableau I.1.	Les familles d'antibiotiques.	07
Tableau II.1.	Types de pénicillines.	17
Tableau II.2.	Classification du *P. chrysogenum*	21
Tableau IV.1.1.	Matrice d'expérience d'un plan factoriel complet 22.	38
Tableau IV.1.2.	Exemple d'une matrice d'un plan CCD à 3 facteurs.	39
Tableau IV.1.3.	Éventail expérimentale et les niveaux de chaque facteur	39

Liste des abrévations

6-APA	**A**cide 6-**A**mino **P**énicillanique.
ACV	δ-(L-α-**A**minoadipyl)-L-**C**ysteinyl-D-**V**aline).
ADN	**A**cide **D**ésoxyribo **N**ucléique
ATB	**A**n**ti**b**i**otique.
CMP	**C**ulture **M**edium **P**enicillium.
DO	**D**ensité **O**ptique.
ED	**E**au **D**istillée.
FMP	**F**ermentative **M**edium **P**enicillium.
Gluco	**Gluco**mètre.
IPN	**I**so **P**énicilline **N.**
Log t	**L**'âge de fermentation.
L-α-AAA	**A**cide **L**-α **A**mino-**A**dipique.
P	***P**enicillium.*
pH	**P**otentiel **H**ydrogéne.
POAA	**P**hen-**O**xy-**A**cetique **A**cide.
PV 07/01/12	***P**enicillium* **V** génération 07/ colonie 01/ année de conservation.
PV 07/02/12	***P**enicillium* **V** génération 07/ colonie 02/ année de conservation.
rpm	**R**otation **P**ar **M**inute.
Séd	**Séd**imentation.
SM	**S**ouche **M**ère.
Spectro	**Spectro**photomètre.
TR/min	**T**ou**r** par **min**ute.
UI	**U**nité **I**nternationale.
VMP	**V**egetative **M**edium **P**enicillium.

الخلاصة: تحسين العوامل الحيوية لإنتاج البنسلين

هذه الدراسة تهدف إلى تحسين العوامل الحيوية (سرعة الخلط، درجة الحرارة ودرجة الحموضة الابتدائية) لإنتاج البنسلين بواسطة *البنسليوم كريزوجينوم* .

تم إجراء التحسين باستخدام التصميم العاملي من نوع CCD عن طريق استعمال برنامج مينيتاب.

التصميم يتكون من 18 تجربة ، التي تشمل أربعة تكرارات في النقاط المركزية.

في إطار هذا النهج، كانت المستويات المثلى للعوامل الحيوية(180 لفة / دقيقة لسرعة الخلط، ودرجة الحرارة 24 درجة مئوية ودرجة الحموضة 6.8). ولوحظ وجود انتاج 38438 وحدة دولية / مل، والذي هو في اتفاق جيد مع التنبؤ (39800 وحدة دولية / مل) لوحظت في تجربة التاكد من صحة الفرضية. تحسين العوامل الحيوية ادى الى زيادة مردود انتاج البنسلين بحوالي 50 من المائة.

الكلمات الرئيسية : *البنسليوم كريزوجينوم*، تصميم التجارب، سرعة الخلط ، درجة الحرارة، درجة الحموضة ،مردود الانتاج ، بنسلين.

Résumé : Optimisation des Conditions de Culture de la Production de Pénicilline VK

Cette étude vise à optimiser les conditions de culture (vitesse d'agitation, la température et le pH initiale) de la production de pénicilline VK par *pénicillium chrysogénum*.

L'optimisation a été réalisée par un plan factoriel de type CCD à l'aide du logiciel MINITAB.

La conception se compose de 18 expériences, qui comprennent 4 répétitions à des points centraux.

En vertu de cette approche, les niveaux optimaux de conditions de culture étaient de 180 tr/min pour la vitesse d'agitation; une température de 24°C et un pH de 6.8. Une production de 38438 UI/ ml, qui est en très bon accord avec la prédiction (39800 UI / ml), a été observée dans l'expérience de validation. L'optimisation des conditions de culture a permis d'augmenter la production de pénicilline VK d'environ 50%.

Mots clés : *Pénicillium chrysogénum*, Plan d'expériences, Vitesse d'agitation, Température, pH, Rendement de production, Pénicilline VK.

Abstract: Optimization of Culture Conditions for Production of Penicillin VK

This study aims to optimize the culture conditions (agitation speed, temperature and initial pH) of the production of Penicillium chrysogenum by penicillin VK.

The optimization was performed by a factorial type CCD using MINITAB software.

The design consists of 18 experiments, which include four repetitions of the central points.

Under this approach, optimal levels of culture conditions were (180 rev / min to the stirring speed, a temperature of 24 ° C and pH 6.8). A production of 38438 IU / ml, which is in good agreement with the prediction (39 800 IU / ml), was observed in the validation experiment. The optimization of culture conditions has increased the production of penicillin VK approximately 50%.

Keywords: *Penicillium chrysogenum*, Design of Experiments, agitation speed, Temperature, pH, yield production, Penicillin VK.

Introduction GENERALE

SOMMAIRE

CHAPITRE I

GENERALITE SUR LES ANTIBIOTIQUES

CHAPITRE II

LES PENICILLINES

CHAPITRE III

LA FERMENTATION

CHAPITRE IV

MODELISATION PAR LES PLANS D'EXPERIENCES

PARTIE 1

MATERIELS ET METHODES

PARTIE 2

RESULTATS ET DISCUSSION

CONCLUSION GENERALE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

Introduction générale

Les pénicillines sont les premiers antibiotiques obtenus à l'échelle industrielle dont l'utilisation pour traiter les infections a entraînée une véritable révolution médicale au cours de la deuxième moitié du vingtième siècle.

Les pénicillines sont des antibiotiques bactéricides à spectre étroit appartenant à la famille des β-lactamines qui forment le plus grand groupe d'antibiotiques couvrant environ 60% du marché mondial. La production totale mondiale de la pénicilline en vrac s'estime à 25000 tonnes dont environ 70% sont vendus soit directement, c'est-à-dire la pénicilline V pour l'administration par voie orale et la pénicilline G pour l'utilisation dans l'alimentation animale, soit mélanger avec des sels stériles, ou convertie en amoxicilline et ampicilline par l'intermédiaire de l'acide 6-APA.

Ce produit d'intérêt pharmaceutique est synthétisé lorsque la croissance de la bactérie est stoppée ou significativement ralentie du fait d'un stress environnemental, généralement suite à une carence ou une limitation nutritionnelle. Ainsi, les opérations de production industrielle ont des durées importantes atteignant plusieurs jours. Elles sont d'une manière générale compliquées par un phénomène de non reproductibilité en fonction des conditions initiales (environnement physicochimique, qualité des matières premières, contaminations éventuelles…etc.), pouvant conduire dans des cas extrêmes à une absence totale de production. La compétition avec les pays émergents s'accélérant dans le domaine de la production industrielle d'anti-infectieux, il apparaît intéressant de progresser dans la capacité d'assurer de manière stable et reproductible un titre optimal et une productivité maximale à moindre coût.

Plusieurs facteurs affectent fortement la fermentation de la pénicilline VK avec comme conséquence la qualité finale du produit. Ainsi, nous allons étudier l'influence des facteurs environnementaux comme la vitesse d'agitation (rpm), la température (T) et le pH sur le rendement de production de l'antibiotique en question. Néanmoins peu d'études font mention d'éventuelles interactions entre ces différents paramètres. Ainsi il est très difficile de conclure sur l'influence majoritaire d'un facteur par rapport à un autre. L'objectif de cette mémoire consiste a optimisé ces facteurs pour obtenir une production maximale.

L'étude s'organise en six chapitres :

- Le premier chapitre, regroupe une synthèse bibliographiques sur les antibiotiques (historique, classification,……)
- Dans ce second chapitre, on donne une présentation sur les pénicillines.
- Dans le troisième chapitre, on aborde les aspects généraux de la fermentation (historique, principaux types de fermentation,……).
- Le quatrième chapitre « ***Matériels et méthodes*** » présente la souche utilisée, ainsi que les diverses techniques mises en œuvre pour les expérimentations réalisées.
- Le dernier chapitre **« *Résultats et discussions* »** présente la synthèse des résultats expérimentaux obtenus au cours du travail réalisé.

L'étude se termine par une conclusion générale rappelons les principaux résultats obtenus et par des perspectives illustrant la suite des travaux qui pouvant être envisagé dans le futur.

I.1. Historique

• **1877 :** Découverte de l'antibiose = antagonisme bactérien avec la bactéridie charbonneuse par Pasteur et Joubert.

• **1889 :** Le terme d'antibiote a été proposé par Vuillemin : "principe actif d'un organisme vivant qui détruit la vie des autres pour protéger sa propre vie".

• **1897 :** Thèse de Médecine de E. Duchesne :"Concurrence vitale entre Penicillium et bactéries".

• **1928 :** Découverte de la pénicilline G par A. Fleming : "Transformation vitreuse" de colonies de staphylocoques.

• **1935 :** Découverte des sulfamides.

• **1938-1942 :** Purification et usage en clinique de la pénicilline G par H. Florey, E. Chain.

• **1940 :** Le terme d'antibiotique a été proposé par R. Dubos.

Cette grande étape du progrès médical entraînant la découverte ultérieure de centaines molécules a engendré rapidement l'émergence de souches multi résistantes, d'où un usage des antibiotiques qui devra être de plus en plus raisonné, **[www.microbes-edu.org].**

I.2. Définition des antibiotiques

La définition d'un antibiotique a connue au moins deux évolutions dans le temps :

• Une définition stricto sensu qui définissait les antibiotiques dits vrais, donc elle exclue les antibiotiques dits de synthèse, elle a été faite par Waksman (1943) : "toutes les substances chimiques produites par des micro-organismes capables d'inhiber le développement et de détruire les bactéries et d'autres micro-organismes", **[Duval et *al*., (1989)].**

• Une définition plus générique qui regroupe toutes les substances douées d'une activité antibiotique qu'elles soit naturelles ou de synthèse, elle a été faite par Turpin et Velu (1957) :"Tout composé chimique, élaboré par un organisme vivant ou produit par synthèse, à coefficient chimiothérapeutique élevé dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des virus, des microorganismes ou même de certaines êtres pluricellulaires", **[www.microbes-edu.org].**

I.3. Nomenclature

Juste après leur isolement, les antibiotiques reçoivent un nom, et ceci avant que leurs structures chimiques ne soient établies. Parmi ces facteurs, nous citons, **[Breton et *al*., (1989)].**

Le nom du micro-organisme producteur, par exemple dérivé de pénicillium notatum.

1. Le nom d'une structure particulière : par exemple la tétracycline présente quatre cycles.
2. Le nom de laboratoire où se fait l'isolement de ces antibiotiques par exemple la nystatine.
3. Le nom d'une personne : bacitracine (de tracy, nom du malade d'où a été isolée la première souche productive).

La nomenclature se trouve singulièrement compliquée par le fait que d'une part un antibiotique a pu être découvert indépendamment par deux groupes de chercheurs, qui leur ont attribué chacun un nom. D'autre part, à un nom primitivement attribué par l'inventeur viennent se superposer des noms commerciaux, qui entrent en compétition d'où on peut trouver une demi-douzaine de noms pour le même antibiotique, **[Breton et *al*., (1989)].**

I.4. Objectifs de la recherche sur les antibiotiques

Avant 1960, environ 6% des antibiotiques nouvellement isolés étaient utilisés dans la thérapie, par la suite le pourcentage devient de plus en plus faible 2,6% entre 1961 et 1965, puis seulement 1% entre 1966 et 1971, ceci est essentiellement dû au faite que, à cause du coût extrêmement élevé des tests cliniques et que les industries ne retiennent que les antibiotiques qui présentent un réel progrès dans la thérapeutique.

Les principales raisons de la recherche de nouveaux antibiotiques, sont, **[Breton et *al*., (1989)].**

1. Dans plusieurs cas, les propriétés des antibiotiques connus ne sont pas optimales pour l'application thérapeutique, ou les améliorations suivantes sont nécessaires :
   - **a.** Une plus grande activité avec une toxicité inchangée au plus faible.
   - **b.** Diminution des effets secondaires.
   - **c.** Propriétés pharmacologiques améliorées.
2. Depuis le début de la chimiothérapie, le nombre de pathogènes résistants aux antibiotiques devient de plus en plus élevé.

I.5. Propriétés communes des antibiotiques

Les antibiotiques, bien que non toujours dépourvus d'effets secondaires pour les cellules eucaryotes, se distinguent essentiellement par leur toxicité sélectivement dirigée contre les bactéries, ce qui permet pour la plupart d'entre eux une administration par voie générale, **[Duval (1989)].**

Cette toxicité sélective est directement liée à leur mécanisme d'action : la plupart des antibiotiques agissent par inhibition spécifique chez les bactéries de certaines chaînes métaboliques au niveau d'une étape précise qui constitue leur site d'action, ou cible moléculaire.

Les réactions inhibées sont essentiellement des réactions de synthèse : synthèses protéiques, synthèse du peptidoglycane, des acides nucléiques, des folates.

L'effet antibactérien des antibiotiques s'exerce à une faible concentration, ce qui contribue aussi à leur tolérance par l'organisme, de l'ordre du milligramme par litre et parfois beaucoup moins ; il est relativement lent, demandant souvent quelques heures ; il peut être bactériostatique ou bactéricide selon la concentration et le temps de contact, **[Duval (1989)].**

I.6. Classification des antibiotiques

Il existe plusieurs modes de classification des antibiotiques selon le critère choisi tel que le spectre d'action, la cible bactérienne d'attaque, l'origine, et la composition chimique, [**Jensen & Demain, (1995)].**

I.6.1. Classification d'après le spectre d'action

C'est à dire l'ensemble des espèces bactériennes sur les qu'elles ils sont actives, certains d'entre eux agissent sur de nombreuses espèces bactériennes ; ils sont dits à spectre large, d'autres par contre, agissent sur un nombre limité ou même sur un seul germe bactérien: ils sont dits à spectre étroit ou à action spécifique, **[Nevena (1981)].**

I.6.2. Classification selon le mode d'action

Les antibiotiques agissent au niveau du métabolisme cellulaire sur des cibles très variées, [**Tankovic (2000)].**

I.6.3. Classification selon l'origine

Parmi un total de quelques 10700 antibiotiques décrits, environ 1600 proviennent de champignons, [**Nauman (1979)].**

I.6.4. Classification d'après le mécanisme d'action

On distingue :

- Les antibiotique bactéricides (qui tuent les bactéries), qui attaquent directement la membrane des bactéries en laissant ainsi échapper leur métabolites entraînant leur mort, ces composés qui comprennent notamment les pénicillines et les céphalosporines ;
- Les antibiotiques bactériostatiques (s'opposent à la prolifération bactérienne), sont efficaces parce que les bactéries ne peuvent se multiplier et qu'elles finissent par mourir ou être éliminer par les mécanismes de défense de l'organisme, les tétracyclines et les sulfamides sont des antibiotiques bactériostatiques, [**Cavallo et *al.*, (2004)**].

I.6.5. Classification d'après leurs propriétés physico-chimiques, ou d'après leurs charges électriques

- Antibiotiques de caractère acide (pénicillines, céphalosporines…).
- Antibiotiques de caractère basique (rifancines, macrolides, ...).
- Antibiotiques de caractère amphotère (tétracyclines,..), [**Nauman (1979)].**

I.6.6. Classification selon la structure chimique

- **Acides aminés et peptides**
- Homopeptides : Bacitracine ;
- Dérivés d'acides aminés : pénicillines, céphalosporines.
- **Glucides**
- Glucides purs ;
- Amino-glucosides : Streptomycine.
- **Quinones**
- Polycycles linéairement condensés ; tétracyclines ;
- Hétérocycles contenant l'oxygène.

- **L'actones macrocycliques :** Macrolides
- **Antibiotiques alicycliques**
- Cycloalcane : Cyclobreximide.

❖ **Antibiotiques aromatiques : Chloramphénicol**

Ces types de classification sont liés entre eux, il est donc possible d'établir une classification des antibiotiques basée sur ces critères et de définir des familles d'antibiotiques, [**Nauman (1979)].**

Tableau I.1. Les familles d'antibiotiques, [**Pharma-Flash., (2003)].**

Bêta-Lactamines	**Macrolides et apparentes**	**Tétracyclines**	**ATB à Structure aminée**
- Pénicillines - Céphalosporines	Erythromycine. Lincomycine.	Tétracycline Chlortétracycline Oxytétracycline.	Chloramphénicol Thiamphénicol
Polypeptide	**Aminoglycosides**		
Polymyxine Bacitracine Cyclosérine	**1er sous groupe**	**2eme sous groupe**	**3eme sous groupe**
	Streptomycine	Néomycine Framycétine	Gentamicine Vistamycine

I.7. Résistance bactérienne aux antibiotiques

Depuis leur découverte, les antibiotiques ont rendus d'inestimables services en pathologie infectieuse. Certaines infections à germes sensibles sont devenues très rares, même si elles n'ont pas complètement disparu.

En contrepartie, certaines maladies que l'on pouvait traité par des antibiotiques particuliers ne répondent plus à cette chimiothérapie. Au cours du temps, de nombreuses souches bactériennes sont devenues résistantes aux antibiotiques utilisés. Ce phénomène oblige les scientifiques à en mettre constamment au point de nouveaux auxquels les germes pathogènes sont sensibles.

Cette propriété de résistance aux antibiotiques est gouvernée par des gènes qui appartiennent soit au chromosome bactérien, soit au fragment d'ADN, indépendant du chromosome, contenu dans le cytoplasme : le plasmide.

Ce phénomène de résistance acquise est un processus naturel, mais il a été largement aggravé par l'utilisation inconsidérée des antibiotiques. En effet, plus ils sont utilisés et plus la probabilité de sélectionner des souches résistantes est importante. On arrive parfois même à une situation paradoxale : plus un traitement antibiotique est prescrit dans un service hospitalier et plus les malades ont de risques d'être atteints par l'infection qu'il est destiné à

combattre. Certaines souches bactériennes sont désormais résistantes à plusieurs antibiotiques. Toutefois, il reste des germes, comme les pneumocoques, sensibles à tous les antibiotiques.

Il faut que l'Organisation mondiale de la santé (OMS) lance des messages en ce sens rationaliser l'utilisation des antibiotiques, ne les prescrire qu'en cas de nécessité et de façon efficace selon des protocoles préétablis. Faute d'une gestion cohérente en la matière, nous pourrions bien être un jour privés de ce précieux outil pour lutter contre les maladies infectieuses, [**Cohen & Jacquot, (2001**)].

I.8. Perspectives et avenir des antibiotiques

Des résistances aux antibiotiques ne cessent de se faire jour ; même les médicaments les plus anciens et les moins utilisés sont aujourd'hui concernés. Or, les laboratoires pharmaceutiques ont pratiquement cessé d'en rechercher de nouveaux. Pour les spécialistes, la situation est grave.

Dans les années soixante, les antibiotiques guérissaient en quelques jours des infections autrefois mortelles ; les blessures infectées et les intoxications alimentaires ne risquaient plus de tuer ; des maladies comme la syphilis ou la gonorrhée paraissaient en voie d'éradication ; et on maîtrisait désormais des fléaux anciens tels que la peste et le choléra.

Vers ces années-là, on croyait que la bataille contre les infections bactériennes était gagnée, tout du moins dans le monde développé.

Aujourd'hui, la résistance aux antimicrobiens nous menace d'un retour en arrière, les résistances se répandent rapidement, particulièrement dans les hôpitaux, où de nombreuses souches bactériennes différentes entrent en contact les unes avec les autres et où les antibiotiques sont massivement employés. Le problème, c'est que plus on utilise un antibiotique, plus les résistances contre lui se répandent. Les médecins sont donc contraints à en essayer d'autres. Même des produits qui étaient utilisés en dernier recours sont en train de perdre de leur puissance, [**Cohen & Jacquot, (2001**)].

I.8.1. Nouvelles voies de recherche sur les antibiotiques

- Chimie combinatoire et la synthèse parallèle à haute vitesse.
- Criblage à haut débit, la recherche de nouvelles cibles bactériennes.
- Le développement d’antibiotiques innovants.

- La génomique et la protéomique permettront dans un proche avenir (identification et approche de la fonction des gènes) d'exploiter des cibles nouvelles.
- Les approches portant sur l'inhibition de la virulence des germes, …etc. "une classe d'agents antibactériens capables de moduler le comportement des bactéries dans leur environnement".

I .9. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent à l'échelon moléculaire au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie, **[Cohen & Jacquot, (2001**)].

Ils agissent par :

● **Toxicité sélective au niveau de la :**

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

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

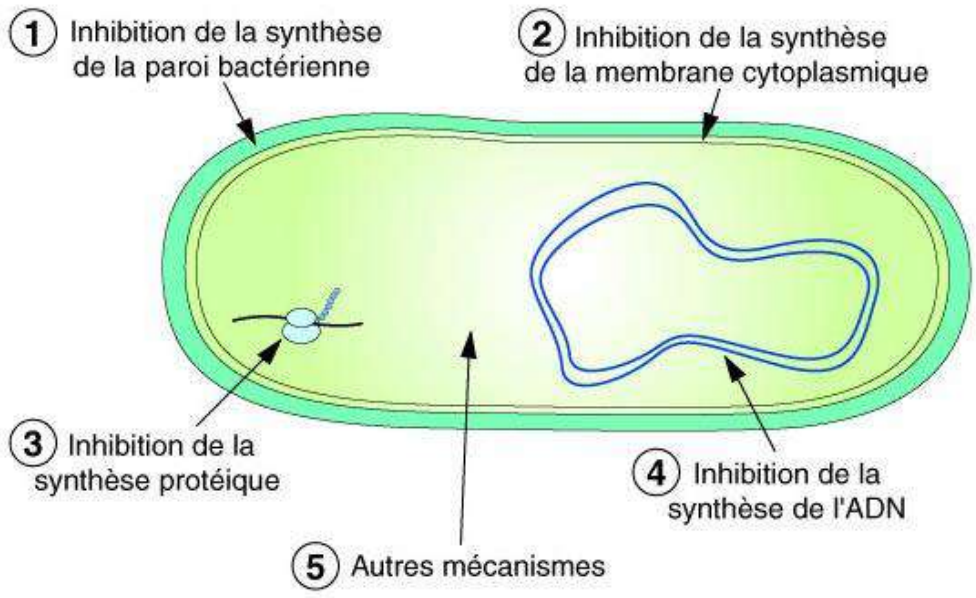


Figure I.1. Mode d'action des antibiotiques, [Cohen & Jacquot, (2001)].

I.10. Avantages et inconvénients des antibiotiques

Comme tous médicaments, les antibiotiques présentent des avantages et chez certaines personnes peuvent entrainer des effets indésirables (des inconvénients), **[Pieri & Kirkiacharian, (1992)].**

I.10.1. Avantages

- Elargissement du spectre antibactérien.
- Diminution du risque de développement de germes résistants.
- Augmentation de l'effet bactéricide (synergie ou potentialisation réciproque).

I.10.2. Inconvénients

- Potentialisation des effets secondaires néfastes.
- Augmentation des effets toxiques (néphrotoxicité).
- Incompatibilités chimiques (carbénicilline- Gentamicine).

.

II.1. Les pénicillines

II.1.1. Généralités et Définitions

Les pénicillines sont des antibiotiques d'origine biologiques ou de semi- synthèse, les plus actifs et les moins toxiques utilisés en chimie, faisant partie du groupe des bêtas lactamines. Elles ont certaines propriétés en commun tel que:

Structure chimique de base (noyau commun):

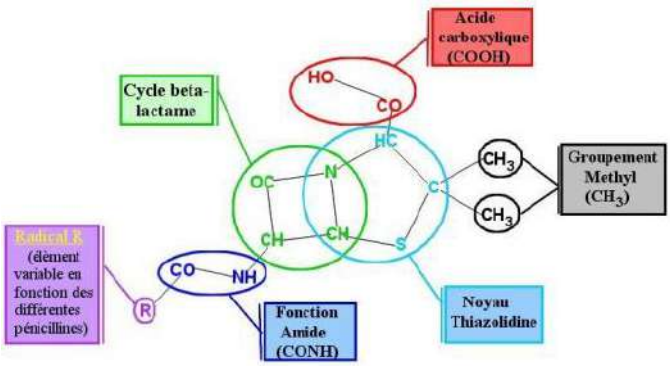


Figure II.1. Structure chimique générale des pénicillines, **[http://tpeantibio.e-monsite.com].**

Le noyau **bêta-lactame** a une structure cyclique, dans laquelle on trouve trois atomes de carbone et un d'azote. Le cycle bêta-lactame appartient à divers antibiotiques, tels la pénicilline et ont un mode d'action bien spécifique.

Le noyau **thiazolidine**, associé au cycle bêta-lactame forme l'acide **6-aminopénicillanique** qui est le noyau de base des pénicillines.

L'**acide carboxylique** est un groupement composé d'un atome de carbone, lié par une double liaison à un atome d'oxygène et lié par une liaison simple à un groupe hydroxyle, **[http://tpeantibio.e-monsite.com].**

II.1.2. Historique

Les pénicillines sont des substances initialement issues d'une souche de champignons ascomycètes appelés *Penicillium notatum*, il existe plus de 150 espèces de *Penicillium*, mais tous ne produisent pas ces molécules.

Les phénomènes de compétition chez les micro-organismes sont étudiés dès la fin du dix-neuvième siècle :

En 1877, Pasteur et de Joubert constatent que lorsque des bactéries du charbon, Bacillus anthracis, sont injectées à un animal en même temps que des bactéries usuelles les animaux ne contractent pas la maladie, **[Patrick (2003)].**

En 1897, le médecin français Ernest Duchesne soutient sa thèse de doctorat « Contribution à l'étude de la concurrence vitale chez les micro-organismes : antagonisme entre les moisissures et les microbes ». Il montre que les moisissures présentent une activité antimicrobienne : une culture d'Escherichia coli peut être éradiquée par l'introduction de *Penicillium glaucum*. Il observe également cette activité in vivo: «certaines moisissures (*Penicillium glaucum*), inoculées à un animal en même temps que des cultures très virulentes de quelques microbes pathogènes (B. coli et B. typhosus d'Eberth), sont capables d'atténuer dans de très notables proportions la virulence de ces cultures bactériennes». Ses travaux ne seront pas poursuivis et il faut attendre près de trente ans pour que le hasard permette à Fleming de remettre en évidence l'action bactériostatique des moisissures, **[Patrick (2003)].**

En1928, que l'Anglais Alexander Fleming (1881 – 1955), après un ensemencement de cultures de staphylocoques (bactéries), observa qu'une des préparations était contaminée par des moisissures, et que tout autour du champignon (identifié comme étant *Penicillium notatum*) les colonies microbiennes étaient détruites.

En septembre 1928, de retour de vacances, le docteur Alexander Fleming retrouve son laboratoire londonien et ses cultures de staphylocoques. Il a la mauvaise surprise de constater leur contamination par un champignon microscopique, *Penicillium notatum,* utilisé dans un laboratoire voisin. Ce genre de contamination n'est pas rare, mais avant de se débarrasser des cultures désormais inutilisables, il a le réflexe de les examiner attentivement. Il constate que les staphylocoques ne se développent pas à proximité du champignon (Figure II.2), il émet alors l'hypothèse que ce dernier synthétise une substance qui bloque le développement de la bactérie et l'appelle « pénicilline ». Fleming publie sa découverte en 1929 et signale les possibilités thérapeutiques « la pénicilline utilisée en doses massives n'est ni toxique ni irritante… elle peut constituer, par applications ou en injections, un antiseptique efficace contre les microbes ». Mais la pénicilline est très difficile à purifier et isoler en quantités appréciables et elle est bientôt oubliée. Il faut

attendre une dizaine d'années avant qu'elle revienne sur le devant de la scène, [**Heatley (1990)].**

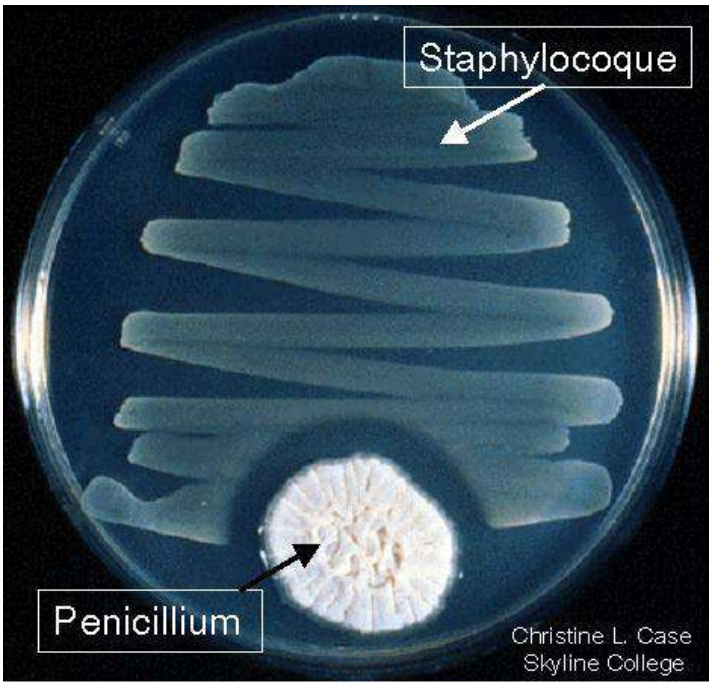


Figure II.2. Les Staphylocoques ne peuvent pas se développer à proximité de *Penicillium notatum,* [**Heatley (1990)].**

La substance active sécrétée par ce champignon fut nommée pénicilline. Fleming conseilla son emploi pour les pansements. Cependant, cette découverte tomba dans l'oubli et ce n'est qu'en 1940 qu'on recommença à s'y intéresser.

En 1945, Alexander Fleming se vit décerner le Prix Nobel de Médecine pour ses travaux sur la pénicilline et ses effets sur diverse maladie infectieuse.

Depuis, de nombreuses découvertes ont été réalisées, conduisant à une grande famille de composés que l'on nomme "Pénicillines". Certaines d'entre elles sont produites par des champignons tels que Penicillium ; d'autres sont synthétisées industriellement, souvent de manière semi-synthétique, c'est-à dire que leur fabrication utilise des procédés biologiques (microorganismes, enzymes…).

Pénicillium

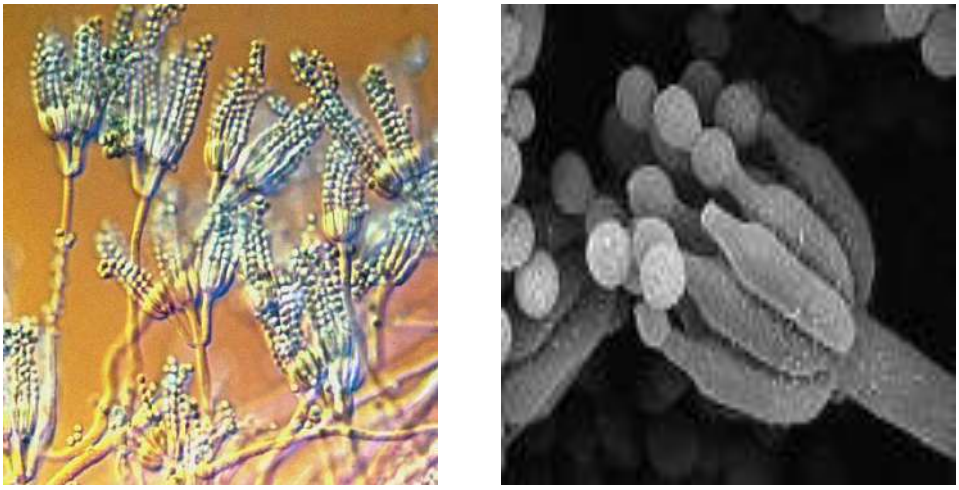


Figure II.3. Penicillium utilisé pour fabriquer la pénicilline, **[http://www.infectiologie.com].**

II.1.3. Composition chimique et fabrication

Comme dit précédemment, la pénicilline a été obtenue à partir de souches de champignons nommées *pénicillium notatum*. Ce n'est que plusieurs années après la découverte de la pénicilline que l'on élabora la formule chimique de celle-ci :

$C_8H_{11}N_2O_3S$ ---- R.

Cette formule chimique se divise en deux parties. Premièrement, $C_8H_{11}N_2O_3S$ est la formule de l'acide péniciloïque que l'on nomme également pénicilline naturelle. C'est ce qui est obtenu lors de la fermentation du champignon. Ensuite, le radical R qui est rattaché à la formule représente les différentes protéines que l'on peut greffer synthétiquement à la pénicilline naturelle. Comme il sera expliqué plus tard, on annexe différentes protéines à la pénicilline naturelle afin de diversifier le champ d'action de celle-ci. Chaque pénicilline possède un nom différent selon la protéine qui lui est annexée.

Pour ce qui est de la fabrication de cet antibiotique, elle se caractérise tout d'abord par une procédure longue et coûteuse. De plus, trois conditions doivent être respectées avant de produire un antibiotique à grande échelle. Premièrement, l'antibiotique doit couvrir un large spectre d'action. Deuxièmement, on doit s'assurer qu'il y ait absence d'effets secondaires néfastes. Finalement, on doit s'assurer que la fabrication de l'antibiotique sera rentable. Ce n'est qu'à partir du moment où les trois conditions sont

respectées que la production en usine de l'antibiotique peut commencer. La première phase de la production de la pénicilline est la fermentation du champignon *pénicillium notatum*. De cette opération, nous obtenons la pénicilline naturelle. La phase suivante, l'hémisynthèse, est l'étape où l'on annexe une protéine de façon synthétique à la pénicilline naturelle. Il est à noter que les travaux de l'hémisynthèse ont pour objectif de développer différentes pénicillines afin de remplacer certains antibiotiques antérieurs devenus inefficaces à la suite de développement de résistances ou d'élargir le spectre d'action de certaines pénicillines, **[Meyer et *al*., (1995)].**

II.1.4. Préparation des pénicillines

Les pénicillines furent d'abord obtenues par procédé de culture " en surface" où l'aération est nécessaire à la croissance du micro-organisme était obtenu en répartissant le milieu de culture solide sous très faible épaisseur dans des récipients plats.

On conçoit que l'espace nécessaire par ce procédé était particulièrement grand et que ce la n'était guère compatible avec une production importante.

Celle-là devient possible, par contre, par la mise en œuvre de la méthode des "cultures immergées" réalisée dans des obtenu par barbotage d'air stérile à travers le milieu de culture liquide.

D'où la production de la pénicilline s'effectue par fermentation " dirigée" en présence de précurseurs dans le bouillon fermenté, suivie par extraction des solvants organique

II.1.5. Usage théorique

Les pénicillines trouvent leur application dans le traitement des différents types d'infections tel que : pneumonies, méningites, angines, cellulites, abcès, sinusites, endocardites, fièvre et infections pulmonaires, urinaires, etc.…

Elles sont aussi utiles dans le traitement de l'anthrax, de l'érysipéloide de Rosenbach, des infections a gangrène gazeuse.

Elles servent d'adjuvant dan le traitement de la diphtérie et du tétamos où elles déploient une action exclusivement antibactérienne et antitoxique, dans la chirurgie septique (plaie, brûlure, etc…).

II.1.6. Classification des pénicillines

On peut classer les pénicillines actuelles selon leurs origines en trois catégories:

- Pénicilline "naturelles" obtenues par fermentation c'est-à-dire par la biosynthèse, comme la pénicilline G des pénicillines X,K,F dihydropénicilline F.
- Pénicilline" biosynthétiques" obtenus par " fermentation dirigée" en présence des précurseurs, ajoutés au milieu de fermentation comme la Pénicilline V.
- Pénicillines " semi-synthétiques" obtenues par synthèsechimique appelée " semi-synthétiques", en introduisant sur le carbone C_6 différent radicaux acylés ' ampicilline,oxocilline, etc…) .

II.1.7. Types de pénicilline

Il en existe quatre catégories :

- ❖ les pénicillines standards (sensibles aux pénicillinases):
  la pénicilline V et la pénicilline G ;
- ❖ les antistaphylococciques (spectre étroit mais résistance aux pénicillinases) : oxacilline, cloxacilline et flucloxacilline ;
- ❖ les aminopénicillines : l'ampicilline et l'amoxicilline ;
- ❖ les antipseudomonas : on en distingue deux sous-groupes, les carboxypénicillines, à savoir la témocilline et la ticarcilline, et les uréidopénicillines, dont la principale est la pipéracilline, **[Landry & Gies , (1990)].**

Tableau II.1. Types de pénicillines**, [Landry & Gies , (1990)]**.

Type de pénicilline(s)	*Molécule(s)*	*Chaîne latérale*	*Caractéristique(s)*
Sensibles aux pénicillinases	Pénicilline V	Phénoxyméthyl: Affinité pour les électrons	Molécule plus résistante à l'acidité gastrique
Résistantes aux pénicillinases	Méthicilline	Chaine latérale volumineuse et lipophile, groupements méthoxy	Protection de l'hydrolyse par les pénicillinases des staphylocoques
	Oxa-, cloxa-, dicloxa-, flucloxa-cilline	Groupement isoxazolyl	Résistance aux pénicillinases et à l'acidité grastrique
Aminopénicillines	Ampicilline, amoxicilline	Addition d'un groupe amino à la benzylpénicilline	Résistance à l'acidité gastrique Elargissement du spectre vers les Gram (-)
Carboxypénicillines et acyluréidopénicillines (pénicillines anti-pseudomonales)	Ticarcilline, carbénicilline, pipéracilline,...	Chaine latérale hydrophile	

II.2. La phénoxyméthylpénicilline (pénicilline V) :

II.2.1. Définition

La pénicilline V est la forme orale de la pénicilline. Sa molécule diffère de celle de la pénicilline G par le remplacement du groupe benzyle par un groupe phénoxyméthyle. Elle se fixe sur les PLP1 (protéines de liaisons aux pénicillines) son élimination est urinaire.

Elle n'est plus le traitement de référence de l'angine à Streptocoque beta-hémolytique du groupe A depuis les recommandations de 2005, la pénicilline A lui étant

désormais préférée en raison d'une plus grande fréquence de pénicillinases bactériennes rendant la pénicilline V inefficace dans cette indication, [**Shorderet (1992)].**

Nom commercial : Oracilline®

II.2.2. Structure chimique

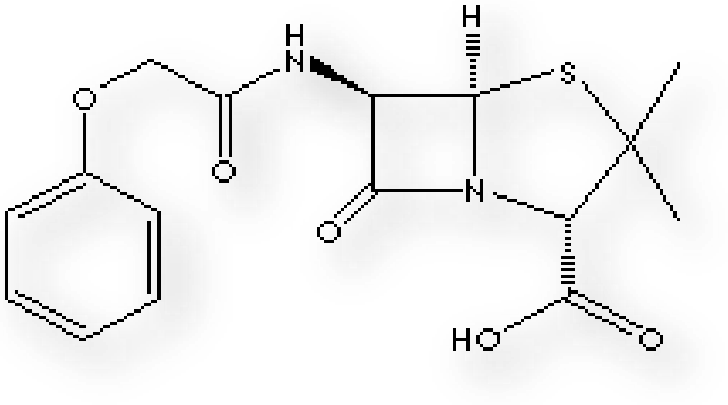


Figure II.4. Structure de la pénicilline VK, **[Bejaoui (1996)].**

II.2.3. Biosynthèse

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-α-aminoadipique, L-cystéine et L-valine. Chez les champignons, le L-α-AAA est dérivé de la voie spécifique des aminoadipates qui mène à la formation de la lysine.

Il peut être aussi obtenu par le catabolisme de la lysine bien que la contribution de cette voie dans la synthèse de la pénicilline n'est pas encore clarifiée, **[Brakhage (1998)].**

Dans la première réaction de la voie de biosynthèse des pénicillines et des céphalosporines, il ya condensation des précurseurs (acide aminés) pour la formation du tri peptides δ-(L-α-aminoadipyl)-Lcysteinyl-D-valine (ACV). Cette réaction est catalysée par une seule enzyme la ACV synthèse.

Dans la deuxième étape, il y a la transformation oxydative du tri peptide en une structure bicyclique formée d'un noyau β-lactame et d'un noyau thiazolidinique qui est caractéristique à la pénicilline. Le composé résultant, l'Isopénicilline N (IPN) possède une faible activité antibiotique, cette réaction est catalysée par l'isopénicilline N. l'isopénicilline N est le composé en commun entre les pénicillines et les céphalosporines.

Dans la troisième et dernière étape de la biosynthèse de la pénicilline, la chaine latérale hydrophile du L-α-AAA de l'IPN est échangée par un groupement acyle hydrophobe catalysée par l'acyle Coenzyme A : iso-pénicilline N acyle transférase (IAT).

L'approvisionnement du milieu de culture avec l'acide phénoxyacétique, la synthèse peu être dirigé principalement vers la pénicilline V ou la pénicilline G respectivement, **[Brakhage (1998)].**

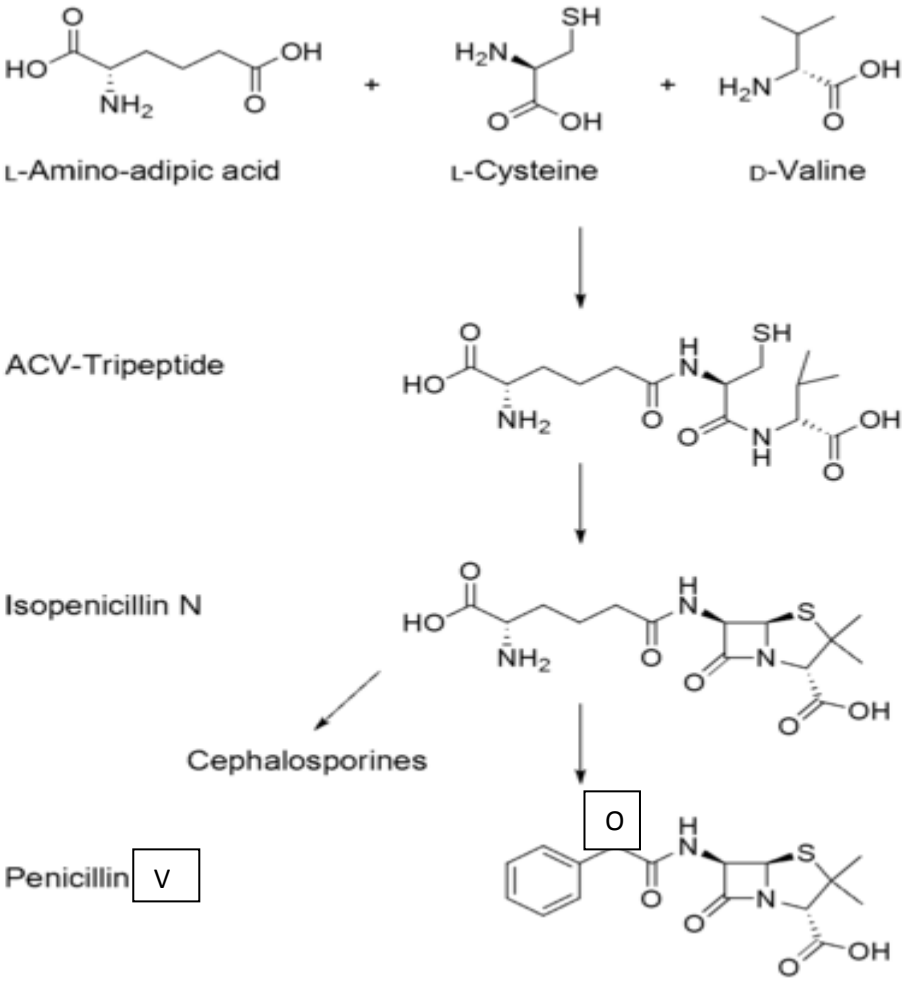


Figure II.5. Biosynthèse de la pénicilline VK, **[Miguel et *al*., (1998)].**

II.3. *Penicillium chrysogenum*

II.3.1. 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 (1998)].**

Le terme de "moisissure" n'a pas réellement de signification systématique ; il est communément utilisé pour désigner les champignons microscopiques qui intéresse 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 (1998)].**

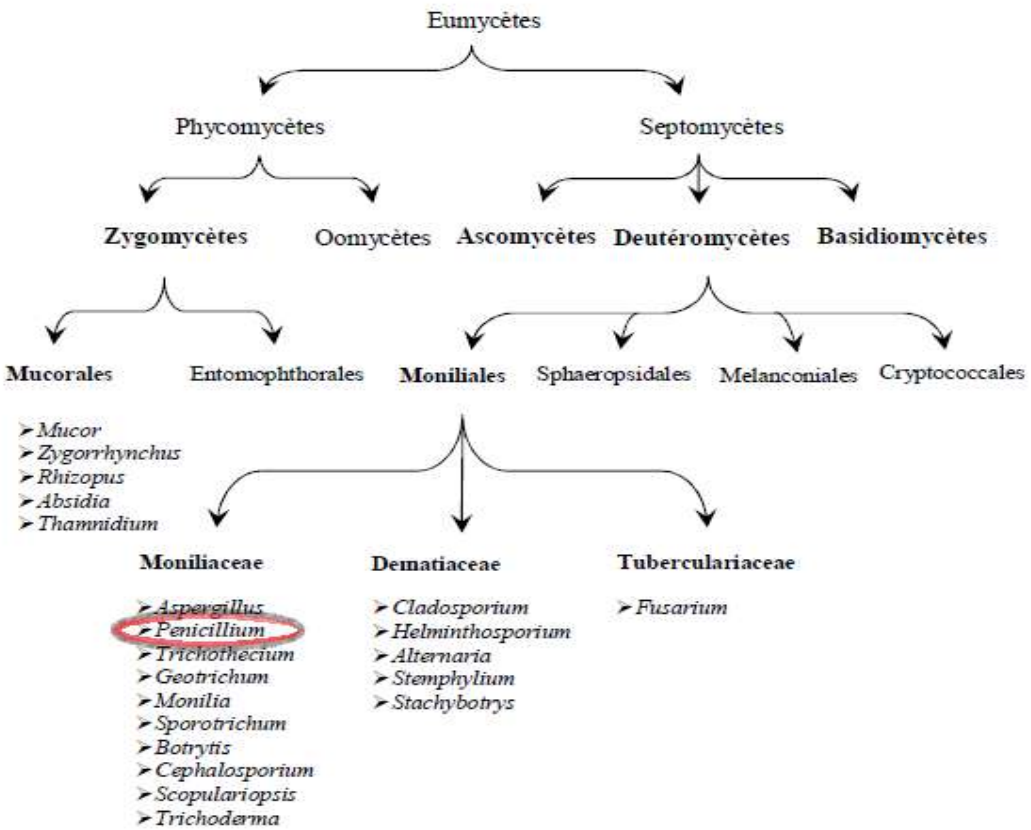


Figure II.6. Principale classe des moisissures, **[Frazier (1967)].**

II.3.2. 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 et *al*, (1989)]**, à savoir les Zygomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Deutéromycètes (voir fig. II.6).

II.3.3. 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 et *al.* (2004)].**

Il ne s'agit donc pas d'un regroupement naturel mais d'un ensemble artificiel crée 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 et *al.* (1999)].**

II.3.4. Classification du *P. chrysogenum*

Cette classification est basée sur des caractères purement morphologiques.

Tableau II.2. classification de *penicillium chrysogen*um, [**Meyer et *al.* (1995)]**.

Subdivision	Deuteromycotina (Deutéromycètes)
Classe	Hyphomycètes
Ordre	Moniliales
Famille	Moniliaceae (hyalohyphomycetes)
Genre	Penicillium
Espèce	*Penicillium chrysogenum*

II.3.5. 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 & Hocking, (1999)].**

Très commun, en raison notamment d'activités cellulolytiques, amylolytiques et lipolytiques, [**Larpent & Sanglier, (1989)]**.

II.3.6. 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 différentiation des conidiophores, **[Paul 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, dans lesquelles 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 et *al*., (1998)]**.

La représentation schématique des cinq régions hyphales ci-dessus est montrée dans la figure II.7. L'arrangement global de réaction est donné dans la figure II.8.

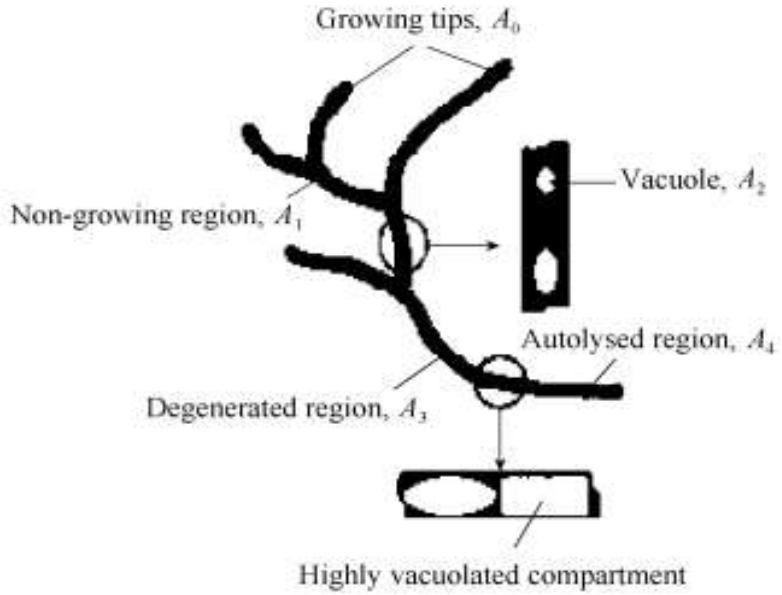


Figure II.7. Représentation schématique du mycélium de *P. chrysogenum*, **[Paul et *al.*, (1998)]**.

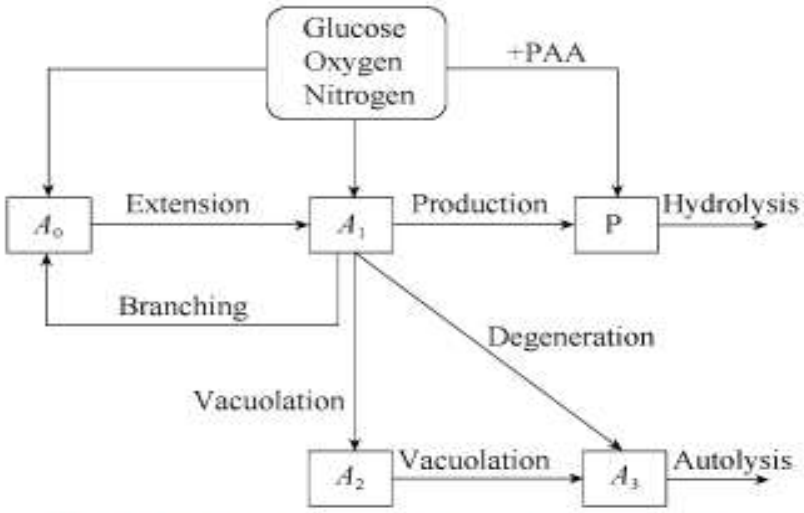


Figure II.8 : Arrangement global des segments du mycélium de *P. Chrysogenum*, **[Paul et *al.*, (1998)]**.

II.3.7. Obtention de la souche

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

III.1. Introduction

Au progrès des connaissances s'est ajoutée la nécessité de satisfaire des besoins d'hygiène, de santé et d'alimentation qui ont permis l'essor des procédés de fermentation et le développement de technologies appropriées aux cultures microbiennes massives : les ***fermenteurs***. L'homme maîtrise aujourd'hui les cultures de bactéries, levures, champignons, de cellules animales, végétales et d'insectes, de virus et bactériophages. Compte tenu de cette diversité, des caractéristiques spécifiques de chaque classe d'organismes et des particularités d'espèces, de très nombreux réacteurs de laboratoire ont été décrits. Nous abordons dans cet article la conception des fermenteurs industriels les plus utilisés et principalement dédiés aux cultures de bactéries, levures et champignons**,** **[Magasine, (1981)].**

III.2. Définition

Cette définition générale inclut en pratique toutes les réactions chimiques d'importance physiologique, et les scientifiques réservent souvent ce mot à l'action d'enzymes spécifiques, appelés ferments, produits par des micro-organismes telles que les moisissures, les bactéries et les levures. Par exemple, le lactase, ferment produit par les bactéries que l'on trouve en général dans le lait, fait tourner le lait en transformant le lactose (sucre du lait) en acide lactique.

Le type de fermentation le plus important est probablement la fermentation alcoolique, dans laquelle l'action de la zymase sécrétée par la levure transforme les sucres simples, comme le glucose et le fructose, en éthanol et en gaz carbonique.

En général, la fermentation provient de la décomposition de substances organiques complexes en substances plus simples sous l'action d'un catalyseur. Par exemple, sous l'action de la diastase, de la zymase et de l'invertase, l'amidon est décomposé (hydrolysé) en sucres complexes, puis en sucres simples, et finalement en alcool.

La fermentation est une étape d'un procédé industriel; elle s'insère dans un ensemble d'opérations unitaires qui aboutiront à la valorisation de la biomasse et/ou de ses composantes et/ou à la valorisation des produits de bioconversion, [**Moretti E & Feliponne F., (1999)].**



Figure III.1. Cuves à fermentation utilisées pour la fabrication du rhum (Barbade), [**www.egr.msu.edu/fermenteur**].

III.3. Conditions physiquement et chimiquement contrôlées

III.3.1. Température

La température de fermentation est un paramètre très important à contrôler parce qu'elle va influer sur le déroulement de la fermentation. Une température trop élevée risque de provoquer un arrêt de la fermentation. Par contre, dans le cas de températures très faibles, il y a le risque de non départ en fermentation (faible croissance des champignons), **[Martinez C., (2007)].**

III.3.2. pH

Le pH est un autre facteur important de la croissance des champignons, car il va déterminer l'activité métabolique des cellules. La valeur du pH a un effet sur la solubilité des nutriments et sur la perméabilité de la membrane cellulaire, **[Sánchez S, (2004)]**.

III.3.3. Vitesse d'Agitation

La vitesse d'agitation du liquide favorise le phénomène de diffusion jusqu'à un certain degré au delà duquel la vitesse de croissance des cristaux n'est plus influencée.

En outre, une agitation excessive peut provoquer la brisure des cristaux déjà formés et ne permit pas d'obtenir les cristaux de taille et forme désirées. Un autre aspect favorable

de l'agitation est d'empêcher les cristaux de se déposer sur la paroi froide, [**Chiminvest.P, (1990)].**

III.4. Techniques de fermentation

III.4.1. Batch

C'est pratiquement la seule technique utilisée lors de la production d'antibiotiques. Un même volume de milieu sert à réaliser les phases de croissance, de production et d'accumulation du produit.

Tout le bouillon obtenu est ensuite retiré du bio réacteur. Celui-ci doit donc permettre les opérations de remplissage, de vidange, de stérilisation, et doit assurer un brassage continu du milieu pour l'homogénéité de la culture et la dissolution de l'oxygène injecté sous forme d'air comprimé stérilisé,

III.4.2. Fed-batch

La technique du Fed-batch est une culture en batch, où la concentration en certaines substances est modulée par ajout contrôlé au cours du temps. Lors de la fabrication de la pénicilline, la concentration en glucose est maintenue à des valeurs précises au cours du temps. La consommation par l'organisme est compensée par l'ajout en continu et l'addition d'acide phénoxyacétique doit être faite à une période bien déterminée.

III.4.3. Continue

Elle consiste à maintenir le réacteur et son contenu dans un même état le plus longtemps possible, par prélèvement de milieu fermenté et apport de milieu frais en continu. Deux techniques sont possibles :

- la technique de la turbidité où la biomasse est maintenue constante par Prélèvement, cette technique n'est pas utilisée en production d'antibiotiques.

- la technique de la biomasse est maintenue constante par limitation de l'alimentation. Le prélèvement est calibré non pas sur l'accroissement de la biomasse, mais sur la vitesse de production en antibiotique, et l'alimentation, dont le volume compense le prélèvement,

contient des ingrédients de façon a maintenir toutes les concentrations ont des valeurs constantes, **[Baduel P., (1998)].**

III.5. Croissance microbienne

III.5.1. Bilan chimique

La croissance microbienne peut être considérée comme un ensemble de réactions chimiques en chaine, conduisant à la synthèse des constituants de la biomasse microbienne obtenue en fin d'opération. Globalement, le processus obéit au principe de la conservation de la matière.

On peut traduire le phénomène de la croissance microbienne par la réaction chimique suivante, qui s'applique à une action microbienne dans laquelle la biomasse est le seul produit formé, [**Dennis JE & Schnabel RB., (1991)].**

Carbone et source d'énergie + source d'azote + O_2 + l'autres biomasse + produit + sous-produits + Co_2 → de conditions$_2$ + H_2O + chaleur (énergie). **(III.1)**

III.5.2. Différents Stades de la croissance d'un micro-organisme

On distingue 6 phases successives :

I : latence

II : accélération de croissance

III : croissance exponentielle

IV : décélération de croissance

V : phase stationnaire

VI : déclin

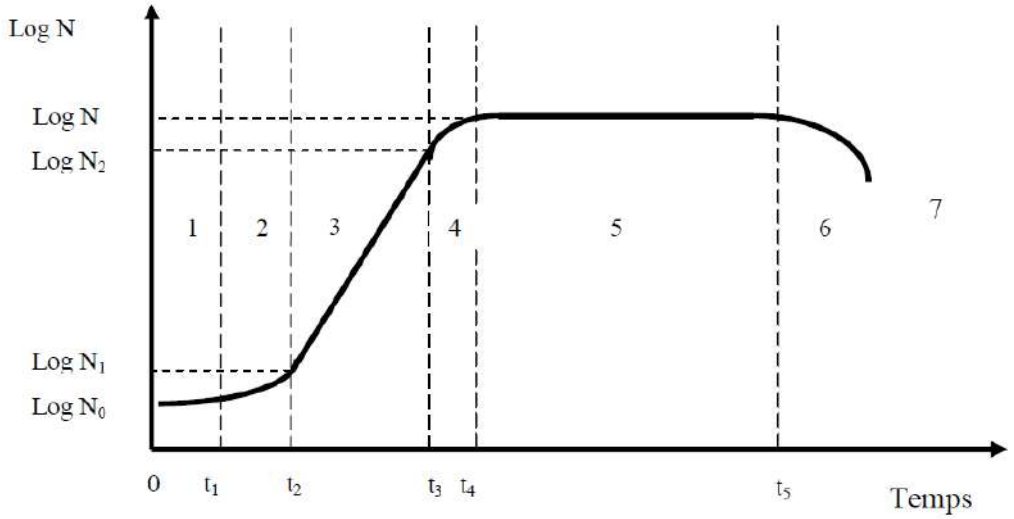


Figure III.2. Différents stades de la croissance d'un micro-organisme, [**Martinez, (2007)].**

La croissance microbienne se traduit par une augmentation en taille ou en nombre du micro-organisme. Pour provoquer une croissance microbienne dans une culture il faut fournir aux cellules initiales les nutriments nécessaires et les conditionnes environnementales favorables, **[Meyer**, (**1988) ; Buchanan, (1918)].**

III. 5.2.1. La phase de latence

Elle correspond à une phase de transition entre un état physiologique initial et un état de croissance proprement parlé. Il s'agit d'une phase d'adaptation au nouvel environnement. Cette phase dépend soit de l'âge de l'inoculum ; soit d'une adaptation enzymatique. La phase de latence peut être limitée en utilisant comme inoculum un pré culture prélevée en phase exponentielle.

III. 5.2.2. La phase d'accélération

Elle commence à partir de l'adaptation effective des cellules a leurs nouvelles conditions de culture, durant cette période, la valeur de taux spécifique de croissance (μ) augmente, jusqu'à atteindre sa valeur maximale (μ_{max}).

III.5.2.3. Phase de croissance maximale ou exponentielle

Lorsque les concentrations microbiennes sont exprimées en coordonnées semi-logarithmiques en fonction du temps, la pente de la droite correspond au taux spécifique maximal de croissance μ_{max} (h^{-1}).

$$\mu_{max} = \frac{y_{2+}y_1}{t_3 - t_2} \qquad (\textbf{III. 2})$$

$\boldsymbol{\mu_{max}}$ **:** La vitesse maximale de croissance

Y **:** concentration bactérienne

t **:** temps de croissance

Dans cette phase le taux de mortalité est nul, l'activité métabolique est maximale et le taux de croissance est constant.

III. 5.2.4. Phase de décélération ou phase de freinage

Elle intervient au fur et à mesure que le substrat s'épuise ou que des produits toxiques s'accumulent. La population continue a croitre mais le temps de génération augmente.

III.5.2.5. Phase stationnaire maximale

Au cours de cette phase, la population microbienne n'évolue plus ($\mu = 0$) donc la population demeure stationnaire. Il y a un équilibre entre le nombre de nouvelles cellules et le nombre de cellules qui meurent. Cette phase peut durer plusieurs heures et même plusieurs jours.

III.5.2.6. Phase de déclin

Elle correspond à un début de disparition des cellules et le milieu devient fortement défavorable à la multiplication des micro-organismes et entraine leur mort rapide.

III.6. Sources nutritives pour la fermentation industrielle

Des médias de croissance sont exigés pour la fermentation industrielle, puisque n'importe quel microbe exige l'eau, l'oxygène, une source d'énergie, une source de carbone, une source d'azote et des micronutriments pour la croissance, **[Jakeman D.L & Graham C.L., (2006)].**

A. **L'eau :** filtrations sur membranes et des passages sur résines échangeuses d'ions. La qualité d'une eau, déterminée par les traces de matières qu'elle contient, est un élément important pour obtenir des cultures optimales et reproductibles.
B. **Source de carbone :** a une influence majeure sur la biosynthèse des antibiotiques. En plus du type de sucre (glucose, galactose, lactose, saccharose, amidon, fructose etc.,) et du rapport entre eux, la concentration des sucres peut avoir un effet stimulant sur la production.

Il semble de ce fait nécessaire d'assurer une croissance équilibrée et de séparer nettement la phase de croissance de la phase stationnaire lorsqu'on souhaite produire l'antibiotique sur des sources carbonées simples**.**

C. Sources azotées et phosphate

Le microorganisme est normalement capable de synthétiser toutes ses molécules azotées à partir de l'ion (NH_4^+), mais au dépend d'énergie et de temps et ce d'autant plus que les souches productrices ont subi de multiples traitements.

- Dans les milieux dits synthétiques, l'ion ammonium est apporté sous forme de chlorure, phosphate, sulfate ou nitrate d'ammonium.
- Par contre dans les cultures industrielles, on met en œuvre des sources azotées naturelles, comme des farines de soja ou d'arachide. Ces farines sont riches en protéines mais apportent en même temps des acides nucléiques, des vitamines, des oligo-éléments, des lipides, des sucres, du soufre et du phosphore. En plus l'ion ammonium à la faculté de réguler certaines étapes qui participent à la production d'antibiotique, (Il est important de maîtriser la concentration de NH_4).

D. **Oligoéléments:** Fe, Zn, Cu, manganèse, Co.

E. Minéraux et vitamines

Les minéraux et les vitamines ont aussi une forte influence sur la croissance cellulaire et leur production. Les vitamines interviennent dans de nombreuses voies métaboliques en tant que précurseurs ou cofacteurs enzymatiques. Il est possible d'augmenter la tolérance en utilisant une stratégie basée sur un apport séquencé en vitamines.

III.7. Conclusion

Les technologies de la fermentation couvrent des domaines industriels variés. Dans le secteur alimentaire, il s'agit de la production des levures et ferments pour la production du pain, des fromages et des boissons alcoolisées, mais aussi des arômes, de certains acides, des acides aminés et de bio polymères . Dans le secteur chimique et pharmaceutique, il s'agit des vitamines, des antibiotiques, de divers produits tels que les stéroïdes. Les applications les plus récentes se sont développées grâce à la technologie de l'ADN recombinant; il s'agit principalement de la production des protéines à usage thérapeutique et de la production des enzymes. L'application des fermentations au domaine de l'environnement (destruction des déchets et traitement des eaux) fait l'objet d'articles.

IV.1.1. Lieu

Le présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie Industriel, complexe **ANTIBIOTICAL** du groupe **SAIDAL (MEDEA)**. Ce travail porte sur la production de la Pénicilline VK par la souche *Penicillium chrysogenum*.

Les différents analyses et tests ont été effectués dans le laboratoire de microbiologique de fermentation « VRAC » de l'unité ANTIBIOTICAL (SAIDAL), pendant une durée de trois mois.

IV.1.2. But

Evaluation de l'activité productrice de la pénicilline VK par la souche *Penicillium chrysogenum* et amélioration du rendement par la mise en jeux des différents paramètres environnementaux.

IV.1.3. Paramètres environnementaux

La croissance microbienne est influencée par les constituants du milieu de culture et par les facteurs physico-chimiques (T, pH, rpm), donc la connaissance de ces facteurs environnementaux pour une bactérie donnée va permettre de contrôler son développement, **[Martinez (2007)].**

a. **La température :** La température est un facteur qui affecte profondément les micro-organismes, comme tous les êtres vivants. En effet, les micro-organismes sont particulièrement sensibles à la température parce qu'ils sont unicellulaires et que leur température varie avec celle du milieu extérieur. Il est donc important de connaître les effets de la température sur la croissance du microorganisme et la thermo sensibilité des réactions catalysées par les enzymes.
b. **Le pH :** Indicateur de l'acidité ou de la basicité du bouillon de fermentation. Le pH fournit des informations sur l'évolution favorable ou défavorable de la culture.
c. **La vitesse d'agitation (rpm)** : C'est un facteur déterminant dans la fermentation ou elle intervient à trois niveaux :
    - Elle augmente les échanges entre les microorganismes et les constituants du milieu de culture.
    - Elle augmente la concentration de l'oxygène dissout dans le milieu.
    - Elle entraine les effets de cisaillements sur les microorganismes.

IV.1.4. Matériels

a. **Matériels 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

b. **Appareillages, verreries et matériels:** Les listes des appareillages, verreries et matériels figurent en **Annexes 1.**

c. **Milieux de culture:** Trois milieux de culture ont été utilisés et dans tous les cas le milieu de culture est stérilisé par une Autoclave (stérilisation à chaleur humide, 121 ^{0}C/1,1bar) pendant 20 minutes. Leurs compositions figurent en **Annexes 2.**

IV.1.5. Préparation du matériel biologique

IV.1.5.1. Réactivation sur boites

La suspension de spores congelées est décongelée dans un bain–marie à 37°C ou bien dans une chambre d'incubation, puis une série de dilutions est réalisés avec de l'eau peptonée stérile.

Des boites de pétrie contenant 25ml de **CMP (Annexe2)** sécher au pavant à 37°C pendant 3-4 jours sont inoculés avec 0.15 ml de chaque dilution, il est souhaitable d'avoir une concentration de colonies (8 à 12) obtenue habituellement avec la dilution entre10^{-3} et 10^{-5}. Les boites sont ensuite incubées dans une chambre d'incubation (humidité 55-60%) à 25 °C pendant 12 à 14 jours**, [Protocole expérimentale de SAIDAL].**

Après cette période d'incubation les colonies développées présentant les caractéristiques suivantes sont retenues (Figure IV.1.1) :

- Diamètre : 8-10 mm
- Couleur : vert avec un petit cercle au tour clair au milieu.
- Pigmentions sur l'agar : Absente.
- Sur l'arrière de la colonie : sans couleur.
- Vue : bonne, uniforme.
- Sporification : centre élevé avec les sept radiaux irréguliers.

Prélever des colonies typiques avec une spatule et homogénéiser chaque colonie dans un tube Potter contenant 2.0ml d'eau peptonée stérile 0.1%.

4 à 5 slants contenant 50 ml de **CMP** sont inoculés avec chaque suspension de colonie choisie et incubés à 25°C (humidité 55- 60%) pendant 13 à 14 jours, les slants sont renversés après 24 heures d'incubation (Figure IV.1.2)**, [Protocole expérimentale de SAIDAL].**



Figure IV.1.1. Morphologie des colonies



Figure IV.1.2. Développement de souche sur **CMP**.

IV.1.5.2. La germination

Des fioles d'une capacité de 500 ml et contenant 75 ml de **VMP (Annexe2)** chacune sont inoculées avec 0.5 ml de suspension de spores à partir :

- Des Slants frais (gratter la surface développée de chaque slant avec 6ml d'eau distillée stérile).

Les fioles sont ensuite incubées à 25°C (55-60% humidité) pendant environ **40 heures** dans un agitateur rotatif à **220 tr/min** (d=5cm). Le développement de la germination peut être contrôlé avec les paramètres suivants :

- pH : 5.5 ±0.2.
- VMP : environ 15% à 20% (sédimentation).

Contrôle de stérilité à l'aide d'une observation directe au microscope (mycélium apparait enchevêtré)**, [Protocole expérimentale de SAIDAL].**

Remarque : 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.



Figure IV.1.3. La souche dans le **VMP.**

IV.1.5.3. La fermentation

Des fioles de capacité de 500 ml et contenant chacune 35ml de milieu **FMP (Annexe2)** sont inoculées avec 4ml de bouillon prélevé à partir des fioles de germination bien développées. Les fioles sont ensuite incubées pendant **192 heures** dans un agitateur rotatif. La température d'incubation, la vitesse d'agitation et le pH initial sont variées au cours de cette étude**, [Protocole expérimentale de SAIDAL].**

Dès le 2ème 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**.**

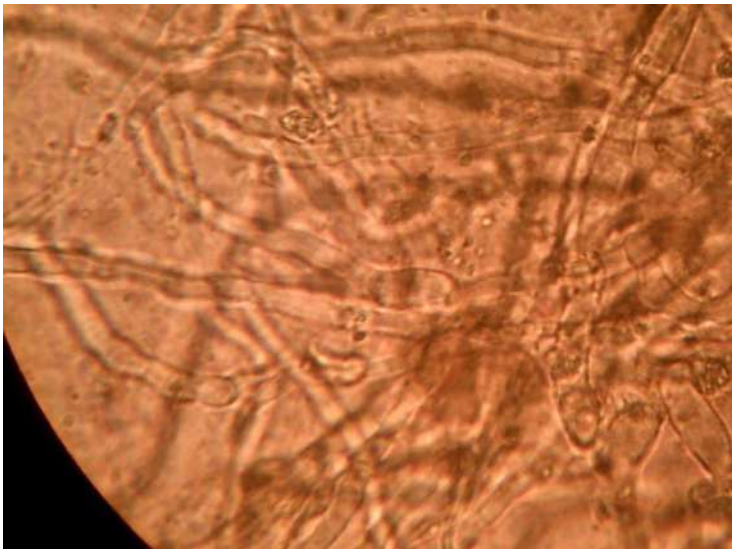


Figure IV.1.4. Observation de mycélium par le microscope(x100).

IV.1.6. Les plans d'expériences

La méthode des plans d'expérience est un modèle statistique permettant à un expérimentateur de limiter le nombre d'essais à réaliser lors d'une expérimentation afin de déterminer une réponse pour un grand nombre de facteurs étudiés.

En effet, un phénomène étudié peut toujours être modélisé sous la forme mathématique :

Y = *f*(x1, x2,…,xn).

Y étant la grandeur ou réponse à laquelle l'expérimentateur s'intéresse, ***f*** la fonction mathématique exprimant le mieux les variations de la réponse selon les différentes valeurs des facteurs (ou variables appelées **xi**).

Cette méthode consiste en une variation raisonnée des niveaux de tous les facteurs en même temps pour chaque essai. Les plans d'expérience vont ainsi permettre d'étudier l'influence simultanée d'un grand nombre de facteurs, de leurs interactions, pour conduire à une optimisation des conditions.

IV.1.6.1. Plans factoriels complets à deux niveaux 2^k

Les plans factoriels complets à deux niveaux sont les plus simples et permettent d'établir une base pour tout début d'expérimentation. Le principe de ce type de plan consiste en l'utilisation d'un niveau haut (+1) et d'un niveau bas (-1) pour un facteur xi

afin d'étudier son influence, sans pour autant faire varier celui-ci de manière trop importante. Les variations de ce facteur seront ainsi limitées par deux bornes.

Les plans factoriels complets 2^k prennent en compte l'étude de k facteurs ayant chacun deux niveaux. Une représentation géométrique peut être établie. Nous prendrons l'exemple de deux facteurs étudiés ayant chacun deux niveaux [Figure IV.1.5].

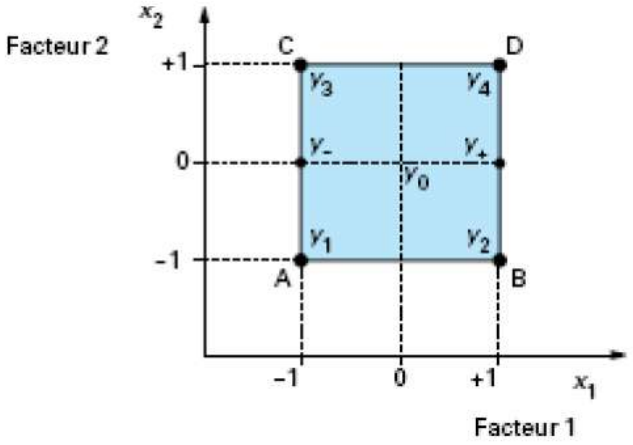


Figure IV.1.5. Représentation géométrique d'un domaine expérimental de 2 facteurs à 2 niveaux.

Le carré bleu représente le domaine d'étude auquel l'expérimentateur s'intéresse. Chaque point de ce carré peut être l'objet d'une expérience. Afin de limiter le nombre d'expérience, l'expérimentateur établit une loi du premier degré, permettant de se limiter à deux essais par facteurs, et exprimant l'évolution de la réponse en fonction des facteurs :

$y = a0 + a1x1 + a2x2 + a12x1x2$

Les meilleures expériences se situent au sommet du carré représentant le domaine d'étude (points A, B, C, D). Une matrice d'expérience correspondante au domaine d'étude est établie [Tableau IV.1.1].

Tableau IV.1.1. Matrice d'expérience d'un plan factoriel complet 2^2.

Essai	**Facteur 1**	**Facteur 2**
1 (A)	-1	-1
2 (B)	+1	-1
3 (C)	-1	+1
4 (D)	+1	+1

IV.1.6.2. Plan d'optimisation et de modélisation

Au cours de cette étude d'optimisation et de modélisation, nous avons utilisé un plan composite centré de type CCD (Central Composite Design).

Tableau IV.1.2. Exemple d'une matrice d'un plan CCD à 3 facteurs.

Essais	X1	X2	X3	
1	- 1	- 1	- 1	
2	+ 1	- 1	- 1	
3	- 1	+ 1	- 1	
4	+ 1	+ 1	- 1	**Plan Factoriel**
5	- 1	- 1	+ 1	
6	+ 1	- 1	+ 1	
7	- 1	+ 1	+ 1	
8	+ 1	+ 1	+ 1	
9	- 2	0	0	
10	+ 2	0	0	
11	0	- 2	0	**Points en Étoile**
12	0	+ 2	0	
13	0	0	- 2	
14	0	0	+ 2	
15	0	0	0	
16	0	0	0	**Points Centrés**
17	0	0	0	
18	0	0	0	

IV.1.7. Conditions de culture

L'éventail et les niveaux des trois facteurs indépendants sont donnés dans le tableau IV.1.3. La variable dépendante est le rendement en pénicilline VK. Un plan de type CCD de 18 essais expérimentaux a été généré par le logiciel statistique MINITAB. L'optimisation de la production est réalisée grâce à l'analyse statistique du plan factoriel et la méthodologie de surface de réponse (RSM)

Tableau IV.1.3. Éventail expérimentale et les niveaux de chaque facteur.

Facteurs	**symbole**	Éventail expérimentale et niveaux				
		-2	**-1**	**0**	**+1**	**+2**
Vitesse d'agitation	**X1**	180	200	220	240	260
Température	**X2**	23	24	25	26	27
pH	**X3**	4	5	6	7	8

IV.1.8. Méthode analytique

IV.1.8.1. Dosage de l'antibiotique

Le dosage de l'antibiotique commence du 2ème jusqu'au 8ème jour de la fermentation, ceci afin d'évaluer la productivité des souches PV 07/01/12, PV 07/02/12.

La recherche du titre de production se fait par la méthode de dosage par spectrophotométrie visible.

- **Procédure de détermination du Km solution d'alun de fer**

- **Méthode :** La méthode se base sur le fait que la pénicilline réagit rapidement avec l'hydroxylamine pour donner un acide hydroxamique qui forme une couleur pourpre avec l'ion ferrique dont la quantité peut être déterminé colorimetriquement. L'inversion des réactifs est utilisée pour obtenir des valeurs blanches car la réaction de pénicilline avec l'hydroxylamine ne se vérifie pas dans le cas ou la solution pénicilline serait mélangée précédemment avec la solution ferrique **, [Protocole expérimentale de SAIDAL].**
- **préparation de la solution standard :** Dans des fioles de 10ml faites la dissolution des différentes pesées du standard de la Péni V avec un volume très petit de tampon phosphate PH=6, pesée en mg 88.5, 59, 50.1, 38.3, 29.5, 11.8.
- **procédure de travail** :
    - Prendre pour chaque courbe (6 tubes) à essai pour la lecture des DO du standard et un tube pour le blanc.
    - Mettre dans chaque tube (6 tubes) 2.5ml d'eau distillée et 0.6ml de chaque fiole correspondante.

- Mettre dans le blanc 3.1ml d'eau distillée.
- Mettre 2ml de la solution alcalin dans les 6 tubes.
- Mettre 2ml de l'alun de fer dans le blanc.
- Agiter tous les tubes et laisser reposer pendant 5min.
- Ajouter dans les 6 tubes 2ml de la solution alcoolique.
- Agiter tous les tubes et reposes durant 5 min.
- Faire l'étalonnage de la spectrophotométrie avec le blanc afin d'avoir le zéro.
- Faire la lecture de la densité optique à 480nm.
- Tracer sur papier millimétrique la lecture de la DO de chacune des six solutions en fonction des concentrations UI/ml.
- On doit obtenir une droite passant à l'axe.
- calcul :

pente = Km.

NB : 1.6 UI = 10^{-3}mg.

Titre (T) = DO* Km. [UI/ml].

Les résultats des densités optiques (DO) figurent dans le tableau **5.2 (Annexe 5).**

Pour mesurer les (DO) des échantillons de fermentations, le standard est remplacé par les filtras des bouillons. La lecture se fait à une longueur d'onde de 480 nm dans le visible.

IV.1.8.2. Dosage de sucre

a. Méthode chimique

Objet : Détermination de taux des sucres, réducteurs dans un échantillon du bouillon fermentation de la pénicilline VK**, [Protocole expérimentale de SAIDAL].**

- **équipement (voire annexe 1)**

  -Balance analytique "GIBERTINI".

  -Spectrophotométrie "Perkins Elmer".

  -Bain-marie

  -verreries de laboratoire

- **Réactifs (voire annexe 3)**

  -Lactose.

  -Solution d'acide chlorhydrique HCl 1.5N.

  -Solution d'hydroxyde de sodium NaOH 1N.

  -Solution d'anthrone 0.2%.

- **Dosage**

- **Préparation de la courbe standard de lactose:**
  - Peser soigneusement 0.075g de lactose et les transférer dans une fiole jaugée de 50 ml.
  - 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 heur.
  - Refroidir à température ambiante, ajouter 37ml de NaOH (1N) et ajouter le pH à 7, puis compléter avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauger.
  - Prélever dans 5 tubes à essais propres et sécher : 1cc, 2cc, 3cc, 4cc et 5cc de la solution.
  - Introduction avec la pipette dans les quatre premiers tubes de l'eau distillée en quantité suffisante à porter le volume à exactement 5ml, bien mélangé en tournant,

- Ces solutions contient 15, 30, 45, 60, 75 mg/ml.
- Prélever 2ml de chaque solution dans 5 tubes propre et sec.
- Ajouter 4ml de solution d'authrone à 0.2%.
- Mélanger et chauffer à 100°C pendant 5min.
- Refroidir à température ambiante par immersion dans un bécher d'eau distillée.
- Faire la lecture de la **(DO)** au spectrophotomètre à longueur d'onde (λ=620nm).

- **préparation du blanc**
  - Prendre dans un tube à essais 4ml d'eau distillée et 5ml de la solution d'anthrone.
  - Faire la lecture au spectrophotomètre pour avoir le (0).
  - Tracer sur papier millimétrique la lecture de la (DO) de chacune des cinq solutions en fonction des concentrations.
  - On obtient une droite passent par l'origine.
  - Déterminer le facteur **F** à partir de la courbe en prend la tangente.

- **préparation de l'échantillon**
  - Centrifuger un échantillon du bouillon à 4000 rpm pendant 10min.
  - Filtrer le surnageant à travers un papier filtre.
  - Ajouter 20ml d'eau distillée et 25ml d'acide chlorhydrique 1.5N.
  - Introduire 5ml de filtrat dans une fiole jaugée de 100ml.
  - Mélanger et chauffer à 100°C pendant 1 heure.
  - Refroidir à température ambiante, et ajuster le PH à 7 avec de NaOH (1N).
  - Compléter le volume avec l'eau distillée jusqu'au trait.
  - Procéder aux dilutions selon l'âge du fermenteur.

De log 0 à log 24 :

- Agiter bien la solution mère
- Prendre 5ml de cette solution et les transfère dans une fiole de 50ml.
- Compléter jusqu'au trait de jauge avec l'eau distillée.
- Prélever 2ml de solution préparée et ajouter 4ml de solution d'anthrone 0.2%.
- Mélanger et chauffer à 100°C pendant 5min.
- Refroidir à température ambiante.

- Faire la lecture de la DO à une longueur d'onde **(λ=620nm).**
- Calcul de la concentration :

Concentration des sucre réducteur (g/l)= (DO/F) X 200.

De log 24 au Harvest :

- Agiter bien la solution mère.
- Prélever 2ml de solution préparée et ajouter 4ml de solution d'anthrone 0.2%.
- Mélanger et chauffer à 100°C pendant 5min.
- Refroidir à température ambiante et faire la lecture de la **(DO)** à une longueur d'onde λ=620nm.
- Calcule de la concentration :

Concentration des sucres réducteur (g/l) = (DO/F) X 20

DO: densité optique à (λ=620nm)

F : facteur déterminé à partir de courbe standard.

Les résultats des densités optiques (DO) figurent dans le tableau **5.1 (Annexe 5).**

b. Méthode du glucomètre

- **Préparation de l'échantillon**
  - Prendre 5ml de filtrat ajouté 10ml de HCl 6N (voire **Annexe3**).
  - Mettre en ébullition pendant 30 min
  - Refroidir et neutraliser à ph= 7 avec NaOH 6N (voire **Annexe 3**).
  - Compléter le volume jusqu'au trait avec la solution tampon pH= 7(0.1M) (voire **Annexe3**).
  - Agiter la solution et mettre dans un bain marie une température 37°C.
  - Faire la lecture avec glycomètre**, [Protocole expérimentale de SAIDAL].**

- Calcul :

Sucre totaux (g/l) = lecture glucomètre*facteur de dilution.

IV.1.8.3. Analyse de la biomasse

Cette méthode consiste à déterminer le pourcentage de sédimentation dans l'échantillon de bouillon de fermentation**, [Protocole expérimentale de SAIDAL].**

- **Matériels** (voire **Annexe1**)

  - Centrifugeuse "CENTRIFUGE 4225".

  - verreries de laboratoire**.**

- **Procédure**

  - Dans deux (02) tubes conique à base et gradués jusqu'à 10 ml conçues pour la centrifugation.
  - Transférer des volumes (10 ml) d'un échantillon du bouillon bien mélangé dans chacun des deux tubes.
  - Déposer les tubes d'une façon équilibrée.
  - Centrifuger 4000 Rpm pendant 15 mn.
  - Lire le niveau du culot et le niveau de surnageant.

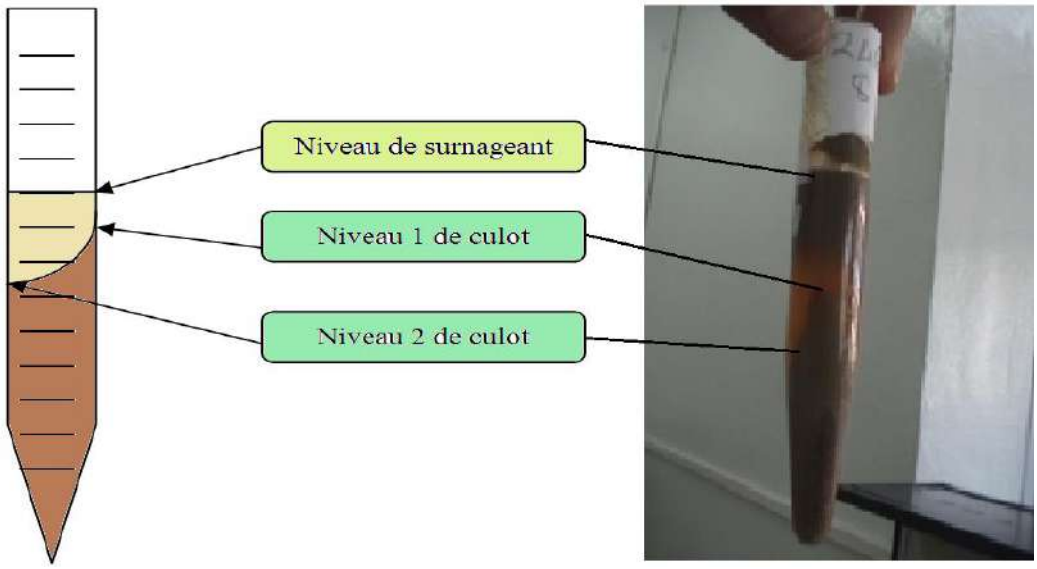


Figure IV.1.6. Tubes coniques pour sédimentation.

- **Calcul**

$\%\ \boldsymbol{de\ sédimentation} = \frac{\mathbf{10}\times(\boldsymbol{X_1}+\boldsymbol{X_2})}{\mathbf{2}}\ .\boldsymbol{L\ max}$, **[Protocole expérimentale de SAIDAL].**

X_1 : niveau 1 de culot du mycélium maximal.

X_2 : niveau 2 de culot du mycélium maximal.

L max : niveau de surnageant.

IV.2.1. Modélisation et analyse

Le coefficient de régression R^2 représente le pourcentage d'explication des valeurs expérimentales par le modèle. Ainsi, il permet d'évaluer la validité du modèle polynomial. Le coefficient de corrélation entre les valeurs des conditions de culture et le rendement des antibiotiques, avec l'aide de RSM (Eq. IV.2.1), a donné lieu à un bon ajustement (coefficient de régression global R^2 = 85,33%).
L'équation polynomiale du second ordre obtenu est la suivante:

$$P\ (UI/ml) = -1708143 - 3097\ X1 + 129469\ X2 + 151254\ X3 + 2\ X1^2 - 2673\ X2^2 - 2008\ X3^2 + 117\ X1*X2 - 121\ X1*X3 - 3786\ X2*X3 \qquad (IV.2.1)$$

Les tracés de la surface de réponse (Fig IV.2.1 et IV.2.2) ont été générés sur la base de l'équation IV.2.1. Les parcelles représentent les interactions de deux variables tout en maintenant l'autre constante. On constate que la diminution de la température, la diminution de la vitesse d'agitation et l'augmentation du pH a un effet positif sur la production de pénicilline VK.

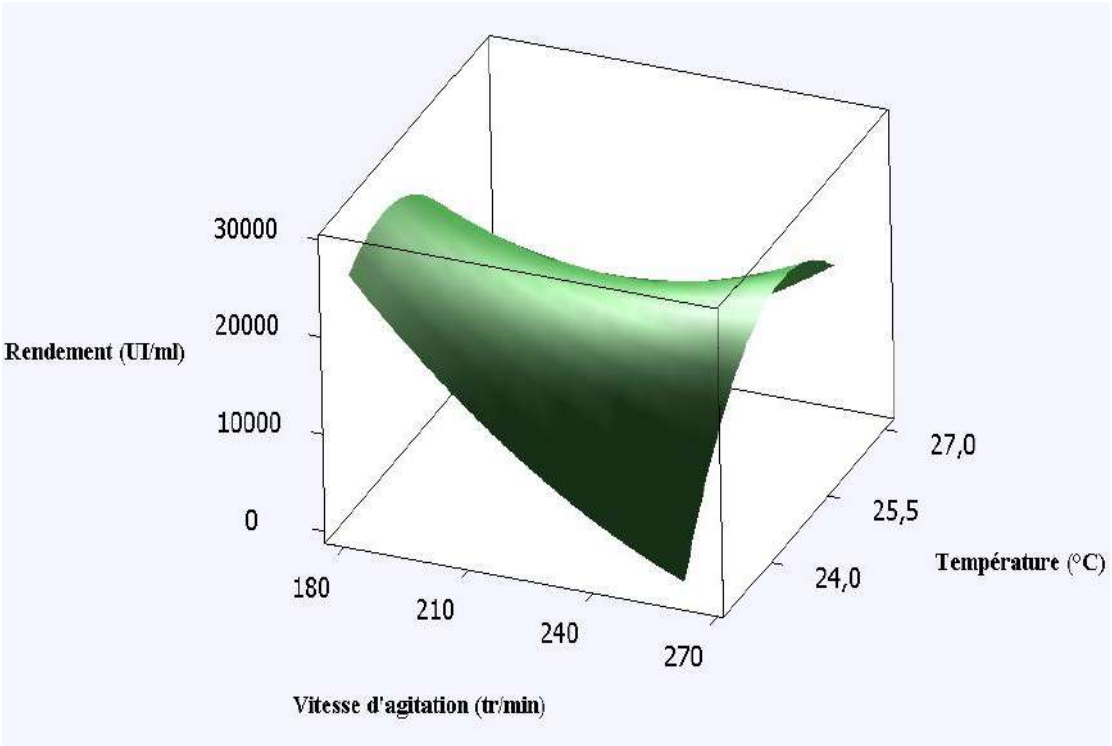


Figure IV.2.1. Tracé de la surface de réponse de rendement en pénicilline VK à partir du modèle de l'équation: effet de la température et de la vitesse d'agitation.

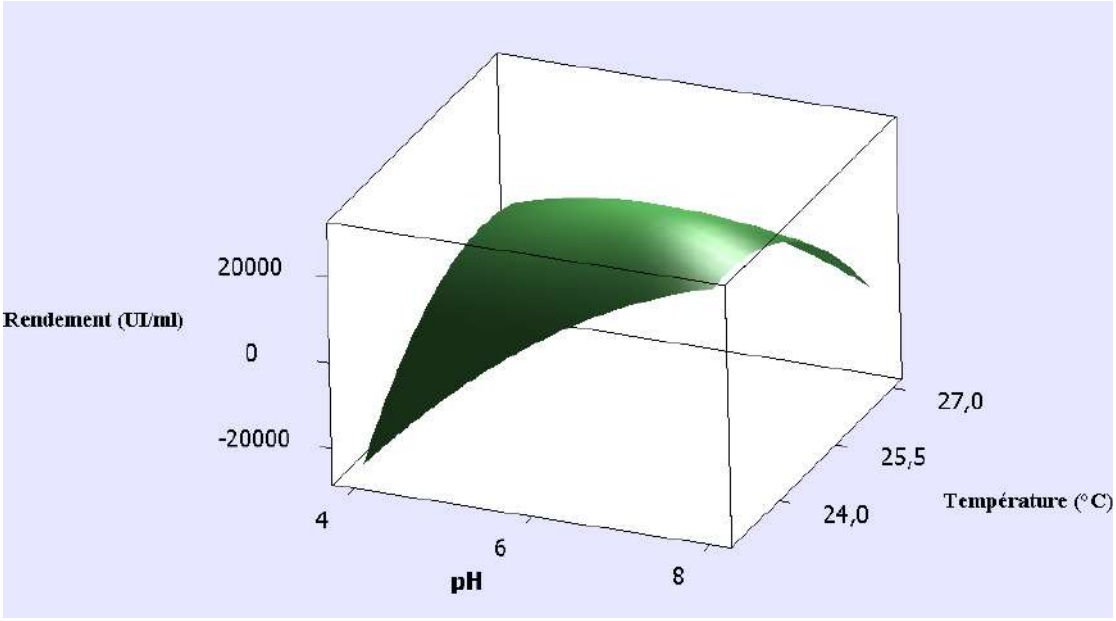


Figure IV.2.2. Tracé de la surface de réponse de rendement en pénicilline VK à partir du modèle de l'équation: effet de la température et du pH.

IV.2.2. Optimisation

L'optimisation de la production dans la technologie de fermentation grâce à l'analyse statistique du plan factoriel et la méthodologie de surface de réponse (RSM) est une pratique courante de nos jours. Cette technique a été appliquée pour la mise en valeur et l'optimisation des conditions de culture et la composition des médias pour les différents procédés de fermentation.

L'optimisation a été faite par le logiciel Minitab®. Une production de 39800 UI/ml a été prédite dans les conditions optimale suivante : une vitesse d'agitation de 180 tr / min, une température de 24 °C et un pH de 6.8. Ces conditions optimales pour la production de pénicilline ont été testées dans le laboratoire et ils ont donné une production de 38438 UI/ml. Cette étape a permis une amélioration de 50% de production par rapport aux conditions standard.

IV.2.3. Etude de la cinétique de production de la pénicilline dans les conditions optimale

La production de la pénicilline à été suivie au cours du temps dans des cultures batch aux conditions optimales obtenues. L'évolution de la biomasse, du sucre et du produit sont illustrées dans la figure IV.2.3.

La lecture du graphe nous permet de tirer les remarques suivantes :

- Le substrat est le facteur déclenchant la production de l'antibiotique, car lorsque le sucre est à son niveau le plus bas, l'antibiotique commence à apparaître dans le milieu de fermentation.
- L'augmentation de la production de l'antibiotique est indépendante de la biomasse, car au moment où la biomasse est stable le titre en antibiotique continue d'augmenter d'une façon linéaire. Ceci montre la forte dépendance de la production de l'antibiotique avec la concentration du substrat.

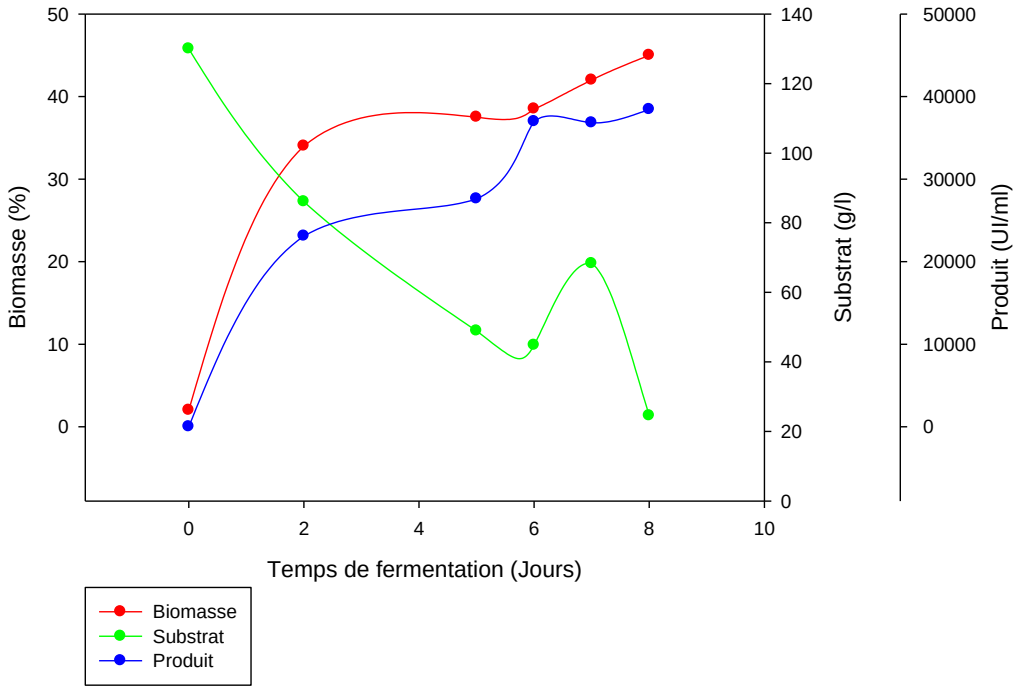


Figure IV.2.3. Evolution de la biomasse, du sucre et du produit en fonction du temps de fermentation.

Conclusion générale

Notre travail avait pour objectif d'optimiser les conditions de culture (vitesse d'agitation, température et pH) de la production de la pénicilline VK par le biais d'un plan d'expériences de type CCD.

Notre première contribution a portée sur la création de la matrice d'expérimentation pour cela, on a choisi un plan factoriel de type CCD à deux niveaux et trois facteurs (vitesse d'agitation, température et le pH).

Notre deuxième contribution à portée sur la réalisation des 18 expériences et le calcul du rendement en pénicilline V pour chaque expérience.

Notre troisième contribution à portée sur l'analyse des 18 essais réalisés et l'optimisation. Cette analyse nous a permis :

- d'établir un modèle polynomiale d'ordre 3 permettant de prédire le rendement en pénicilline.
- de déterminer les conditions optimales de production de la pénicilline VK qui ont été de 180 tr/min pour la vitesse d'agitation, une température de 24 °C et un pH de 6.8.

En perspective, tout en estimant avoir atteint notre objectif tracé pour cette étude, il serait intéressant de voir l'influence de d'autres paramètres tels que la concentration initiale en substrat, le taux d'oxygène, … etc, sur la production de la pénicilline VK.

Nomenclature

DO	Densité Optique	-
pH	Potentiel Hydrogène	-
P_{max}	Production maximale d'antibiotique	g/l
rpm	Rotations Par Minute	Tr/ min
T	Température	°C

Références bibliographiques

-B-

- **Baduel P., (1998). «** Fermenteur industriels ». Technique d'Ingénieur. Page 4.
- **Bejaoui N. (1996). «**Structure primaire de la β-Lactamase CARR-4 et génétique atomique des acides aminés R234 A S244 dans l'hydrolyse des antibiotiques». Thèse de Doctorat à la Faculté des Études Supérieures de I' Université Laval QUÉBEC. Page 12.
- **Boiron P. (1996). «**Organisation et biologie des champignons». Nathan Paris. Page: 19-79.
- **Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier Bouchet Ph., Guignard J. L., & Villard J. (1999)**. **«**Les Champignons, Mycologie Fondamentale et Appliquée». MASSON Paris. Page : 111-169.
- **Bouchet P.H.., Guignard J. L., Villard J. (1999)**. **«**Les Champignons, Mycologie Fondamentale et Appliquée». MASSON Paris. Page : 111-169.
- **Bourgeois C.M., Mescle J.F., & Zucca J. (1989). «**Microbiologie alimentaire-Aspect Microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments». Lavoisier. Paris. Page: 216-244.
- **Brakhage A. A. (1998). «**Molecular regulation of ß-lactam biosynthesis in filamentous fungi». *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (62): 547–585.
- **Breton A., Theilleux J., Sanglier J.J., Vobis G., & Larpent J.P. (1989)**, «Organismes producteurs : biologie, taxonomie et écologie, biotechnologie des antibiotique». ed. Masson. Page : 33 – 70.
- **Buchanan A., (1918). «** Life's phases in a bacterial culture .Journal of infection diseases». Page: 109-125.

-C-

- **Cahagnier B**, (**1998)**. **«**Moisissures des Aliments Peu Hydratés». Lavoisier TEC & DOC Paris. Page 39.

- **Cavallo J. D, Fabre R., Jehl F., Rapp C., & Garrabé E. (2004).** «Bétalactamines, E M C- Maladies Infectieuses». Ed. Elsevier. Page 130.
- **Chiminvest P., (1990).** Manuel de fermentation. Tome 1. Page : 132-154.
- **Cohen & Jacquot C. (2001**). « Abrégé de pharmacologie ». 5ème édition Masson Paris. Page : 347-349.
- **Crueger W. & Crueger A. (1990)**. **«***Biotechnology: A textbook of industrial microbiology*», 2nd edition, Sunderland (USA), Science Tech Publishers.

-D-

- **Davet P. (1996). «**Vie microbienne du sol et production végétale». INRA. Paris. Page : 52-57.
- **Dennis J.E. & Schnabel R.B., (1991). «** Numerical Methods for Unconstrained Optimization ». Society for Industrial and Applied Mathematics.
- **Duval J. (1989),** «Classification et mécanisme d'action des agents antibactérien». Le Minor, M. Véron, 2ème édition, Médecine-Science Flammarion, Page : 273 - 296.

-F-

- **Frazier W.C. (1967). «**Food microbiology». Academic presse. London. Page: 3-429.

-H-

- **Heatley N. G. (1990).** «Erly work at Oxford on penicillin». *Biochemist* (12): 4-7.
- **Hodgson D.A., Jakeman D.L. & Graham C.L., (2000). «** Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria». *Advenced in Microbial Physiology* (42): 47-238.
- **Hoog G. S., Guarro J., Gené J., & Figueras F. (2000)**. **«***Atlas of Clinical Fungi*» - *2nd Edition*, Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht).
- **http://www.infectiologie.com/site/medias/.../ pénicillines -Prazuck- 05. ppt.** (consulter le 18/06/2012).
- **http://tpeantibio.e-monsite.com/pages/la-molecule/presentation-chimique.html**. (consulter le 13/06/2012).

-J-

- **Jensen S. E., & Demain A. L. (1995).** «Beta-lactams». In Vining L.C. Stuttard C. Genetics and biochemistry of antibiotic production. Ed Butterworth- Heinemann, Newton, Mass. Page : 239-268.
- **Jerome J., Perry, James T., Staley, & Stephen L. (2004)**. **«**Microbiologie». DUNOD Paris. Page 580.

-L-

- **Larpent J. P., Sanglier J. J. (1989). «**Biotechnologie des Antibiotiques». MASSON. Paris Milan Barcelone Mexico. Page 67.

-M-

- **Magasine pour la science. La Microbiologie Industriel. Novembre (1981).** Edition Française de scientifique Américain.
- **Martinez C., (2007).** « Etude Métabolique, Cinétique et Modélisation : Influence des facteurs environnementaux ». Thèse de Doctorat. INP. Toulouse.
- **Meyer A.**, (**1988). «** Métabolisme cours de microbiologie générale ». Edition Doin. Page: 139-197.
- **Meyer A., Deiana J., Lecher H. (1995)**. **«**Cours de Microbiologie Générale». Biosciences et techniques DOIN. Paris. Page 92
- **Miguel A., Peñalva., Robert T., Rowlands and Geoffrey T. (1998). «**The optimization of penicillin biosynthesis in fungi». Elsevier. Page 424.
- **Moretti E. & Feliponne F., (1999). «** Acide citrique », journal of chemical physics volume 111.

-N-

- **Nauman M. (1979).** «Vade-Mecum : des antibiotiques agents chimiothérapiques anti-infectieux». Maloine S.A..Paris.
- **Nevena D. (1981).** «Manuel de formation vrac : tome I». Elaboré par CHIMINVEST. Bulgarie.

- **Noël Rouy.J. (1997). «**Procédés chimiques et biochimiques», École nationale supérieure de chimie de Paris, Rhône-Poulenc Rorer.

-P-

- **Patrick G. L. (2003).** «Chimie pharmaceutique». De Boeck.
- **Paul G. C., Syddall M.T., Kent C .A., Thomas C. R. (1998). «**A structured model for penicillin production on mixed substrates». *Biochem. Eng. J.,(*2): 11.21.
- **Peberdy.J.F, (1987). «***Penicillinium* and *Acremonium*». Plenum Press, New York and London, Page: 40-62.
- **Pharma-Flash (2003)**, «date de péremption et stabilité des médicaments», volume 30 n°06.
- **Pieri F. & Kirkiacharian S. (1992)**. « Pharmacologie et thérapeutique ». 2ème Ellipse. Paris. Page 321.
- **Pitt J. I., Hocking A. D. (1999)**. **«**Fungi and food spoilage». Second edition. A Chapman and Hall Food Science Book, Aspen Publication, Gaithersburg, Marylan, Page: 289-290.
- **Punt P. J., Van Biezen N., Conesa A., Albers A., Mangnus J. & Van den Hondel C. (2002)**. **«**Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production». *Trends Biotechnol.* (5): 200-206.

-S-

- **Sánchez S., Bravo V., Moya A., Castro E. & Camacho F., (2004)**. «Influence of temperature on the fermentation of D-xylose by Pachysolen tannophilus toproduce ethanol and xylitol». *Process Biochemistry* (39): 673-679.
- **Shen H. D., Chou H., Tam M. F., Chang CY, Lai H. Y., & Wang S. R. (2003)**. **«**Molecular and immunological characterization of Pen ch18, the vacuolar serine protease major allergen of *Penicillium chrysogenum*». *Allergy* (10): 993–1002.
- **Shorderet M. (1992). «**Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications». Éd. Frison Roche, Paris.

- **Stanbury P.F., Whitaker A & Hall S. J., (1995)**. **«**Media for industrial fermentations». In: Principles of fermentation technology. (ed. P. F. stanbury, A Whitaker and S. J. Hall), Pergamon, Oxford, New York, Tokyo. Page: 93-122**.**

-T-

- **Tankovic (2000).** «Mécanisme d'action des antibiotiques». In : J, Renaud.F, Hanson.W and Bouillet.C. Précis de bactériologie cliniques. Paris.

-U-

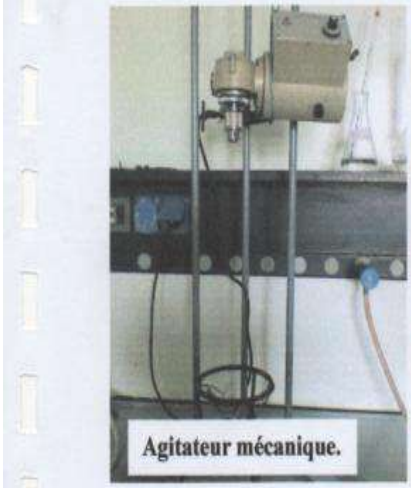
- **Uchikoba T., Mase T., Arima K., Yonezawa H. & Kaneda M. (2001). «**Isolation and characterization of a trypsine-like protase from *Trichoderma viride*». *Biol. Chem.* (382): 1509-1513.

-W-

- **www.egr.msu.edu/fermenteur** (consulter le 16/06/2012).
- **www.microbes-edu.org**, (consulté le 14/06/2012).

-Y-

- **Y. Landry, J-P. Gies. (1990)** « Pharmacologie moléculaire». Medsi / McGraw-Hill.
- **Yang R. D. (2001). «**Modern Industrial Microbiology». South China University of Technology Press. Page 53.


Agitateur mécanique.


Agitateur magnétique AMC80.


Autoclave



Balance normale.


Balance de précision.

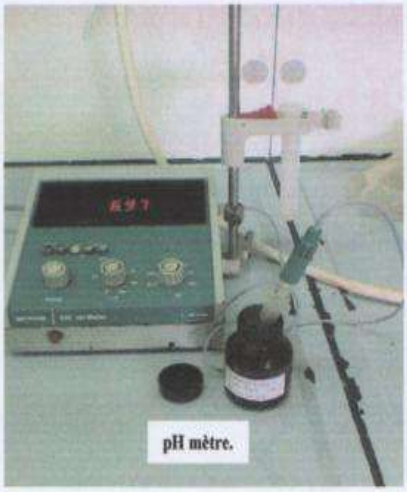

Bain ultrason.


Bain marie.


Broyeur de maïs.



Microscope optique (OLYMPUS)



pH mètre.



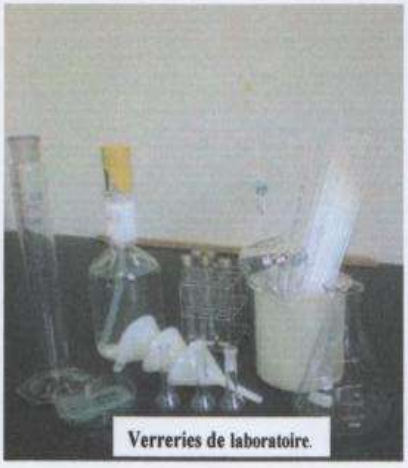
Hôte à flux laminaire.



Shaker rotatif.



Centrifugeuse 4225.



Verreries de laboratoire.



« Glucomètre ''accu-chek'' »

►Milieu solide gélosique (CMP) :

Composition :

Tableau 2.1. Les ingrédients de « CMP ».

Composé	Concentration (g / l)
Lactose (Merck)	**15**
Corn steep liquor (50%)	**5**
Peptone (Difco)	**5**
Chloride sodium (Merck)	**4**
Sulfate Magnésium Héptahydraté	**0.5**
Phosphate potassium monobasique	**0.6**
Chloride de Fer Hexa hydrate	**0.5**
Sulfate de cuivre péntahydraté	**0.2**
Bacto-Agar (Difco)	**30**

Préparation :

1. Dissoudre dan 700ml d'eau distillée toutes les quantités des ingrédients selon l'ordre de la liste de composition.
2. Complète le volume à 1000ml avec l'eau distillée puis mesurer le PH qui varier entre 4.55 ± 0.1.
3. Ajuster le PH=6.30 avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 20 %.
4. Chauffer le mélange après ajouter l'Agar et agiter.
5. Repartir le milieu dans des slants (40.200mm).
6. Stériliser à 122 ℃ pendant 20 min.
7. pH après stérilisation 6.10.
8. Séchage de milieu dans les slants pendant 2 joures.

►Milieu végétatif (milieu liquide) VMP

Compositions :

Tableau 2.2. Les ingrédients de « VMP ».

Composé	**Concentration (g / l)**
Dextrose anhydrous (difco)	**30**
Lactose monohydrate (technicale grade)	**10**
Corn step liquor (50%DS)	**30**
Phramamedia (Traders)	**10**
Sulfate Ammonium (Merck)	**2**
Calcium carbonate	**5**
Phosphate potassium (monobasic (Merc)	**0.5**
Huile de soja	**5**

Préparation :

1. Dissoudre les quantités des ingrédients selon l'ordre de la liste de la composition.
2. Mesurer le PH qui varie entre (5.15 ± 0.15).
3. Distribuer le milieu à raison de 75ml dans des fioles de 500ml.
4. Boucher les fioles avec un tapis de gaz et coton.
5. Stériliser à121°C pendant 20 min.
6. pH après stérilisation doit être 5.80 ±0.2.

►Milieu liquide fermentatif (FMP)

Composition :

Tableau 2.3. Les ingrédients de « FMP ».

Composé	Concentration (g / l)
Phenoxyacetic acide (sigma)	**12**
Lactose monohydrate (technicale grade)	**130**
Phramamedia(Traders)	**32.5**
Sulfate d'ammonium (Merck)	**12**
Calcium carbonate (EL Basslini)	**10**
Phosphate potassium monobasic (Merck)	**0.5**
Sulfate potassium (Merck)	**5**
Huile de soja	**10**

Préparation :

1. Dissoudre l'acide phenoxyacetique dans 20ml d'alcool éthylique pur.
2. Dans une autre fiole, préparer 700ml d'eau distillée avec 4g d'hydroxyle de potassium (KOH) puis, ajouter le POAA à cette fiole.
3. Ajouter les ingrédients à dessus et mètre 1000ml d'eau distillée.
4. Distribuer 35ml de milieu dans chaque fiole de 500ml.
5. Boucher les fioles avec du coton et de la gaz.
6. Stériliser pendant 20min à 121°C (1,1bar).
7. pH après stérilisation doit être 6.3 ±0.2.

- **Préparation de la solution d'acide chlorhydrique 6 N :**

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

- **Préparation de la solution d'acide chlorhydrique 1.5 N :**

- A partir de la solution d'HCl 6 N, transférer 250 ml dans une fiole jaugé de 1 litre et compléter avec de l'eau distillée jusqu'au trait.

- **Préparation de la solution d'hydroxyde de sodium 6 N :**

-Peser rapidement 240g de NaOH puis dissoudre dans quantité d'eau distillée suffisante pour la dissoudre. Après refroidissement complétez avec de l'eau distillée jusqu'à 1000 ml.

- **Préparation de la solution d'hydroxyde de sodium 1 N :**

- A partir de la solution de NaOH 6 N, transférer 167 ml dans une fiole jaugé de 1 litre et compléter avec de l'eau distillée jusqu'au trait.

- **Préparation de la solution d'hydroxyde de sodium 0.2 N :**

- A partir de la solution de NaOH 6 N, transférer 33 ml dans une fiole jaugé de 1 litre et compléter avec de l'eau distillée jusqu'au trait.

- **Préparation de la solution d'anthrone 0.2% dans H_2SO_4 à 96% :**

Ajouter à 500ml d'acide sulfurique à 96% contenus dans une coupe 1.0g de réactif (anthrone) ajouter jusqu'à obtenir une solution, complet et transférer immédiatement dans une bouteille avec un bouchon en verre.

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

Réactif s:

1-chlorure d'hydroxylamine :

Dissoudre 350g de chlorure d'hydroxylamine dans 600ml environ d'eau distillée à 60°C puis refroidir à 25°C, porter à 1000ml.

Laisser la solution dans une chambre climatisée, la solution est stable à 25°C pendant un mois environs.

2-réactif alcalin :

Dissoudre 173g d'hydroxyde de sodium et 20.6g d'acétate de sodium anhydre dans 700ml d'eau distillée refroidir à 25°C puis porter le volume à 1000ml dans un ballon gradué, stoker à 25°C.

3-solution alcoolique :

Mélange :

-Un volume de réactif hydroxylamine.

-Un volume de réactif alcalin.

- Huit volumes d'eau distillée.

- Deux volumes d'alcool éthylique 95%.

Régler le pH de mélange entre 6.9 et 7.1 avec l'hydroxylamine ou réactif alcalin si nécessaire.

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

-Ajouter soigneusement 94ml d'acide sulfurique concentrer à700ml d'eau distillée et dissoudre dans cette solution 200g de sulfate d'ammonium ferrique $12H_2O$.

-refroidir à 25°C et porter à1000ml dans un ballon gradué, filtré et stoker dans bouteille marron loin des sources lumineuses.

-le réactif devrait être stable pendant 1 mois à 25˚C.

5-tampon de phosphate pH=6 :

-Dissoudre dans 100ml d'eau distillée 2g de phosphate de potassium monoacide (K_2HPO_4), et 8g de phosphate de potassium diacide (KH_2PO_4) ;

-Vérifier le pH qui doit être entre (5.95 et 6.05).

- **Préparation de la solution de méthode glycomètre :**

- **Solution tampon phosphate (0.1M) pH=7 :**

- Dissoudre 13.609g de phosphate monobasique(KH_2PO_4) dans une fiole jaugé de 1 litre et compléter avec de l'eau distillée jusqu'au trait ;
- Laisser sous agitation jusqu'à la dissolution complète deu solide ;
- Transférer de cette dernière 250ml dans une fiole jaugé de 1 litre ;
- Ajouter 145.5ml de NaOH 0.2N ;
- Ajouter 500ml d'eau distillée ;
- Corriger le ph à 7 avec NaOH (0.1N) ou (H_3PO_4 5%) ;
- Compléter le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait.

Caractéristiques du corn steep liquor

- Apparence : Jaune marron d'une odeur forte et spécifique.
- Protéines : entre (23 et 24%).
- Sucre réducteur (20%).
- pH : entre (3.8 et 4.1).
- Nitrogène des amines entre (1,6 et 2 ,3%).
- Nitrogène totale (3,7 et 3,8%).
- Substance séchés (48 et 55%).
- Acide aminés libre: entre (11 et 12 %). « Substance sèche ».

Tableau 4.1. Composition en acides aminés du corn steep

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	50
Alanine	2300-2500
Valine	840-920
Méthionine	450-500
Isoleucine	450-500
Leucine	2600-2750
Tyrosine	Trace
Phénylalanine	850-920
Lysine	80-90

Calcul de F

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 5.1 : 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**

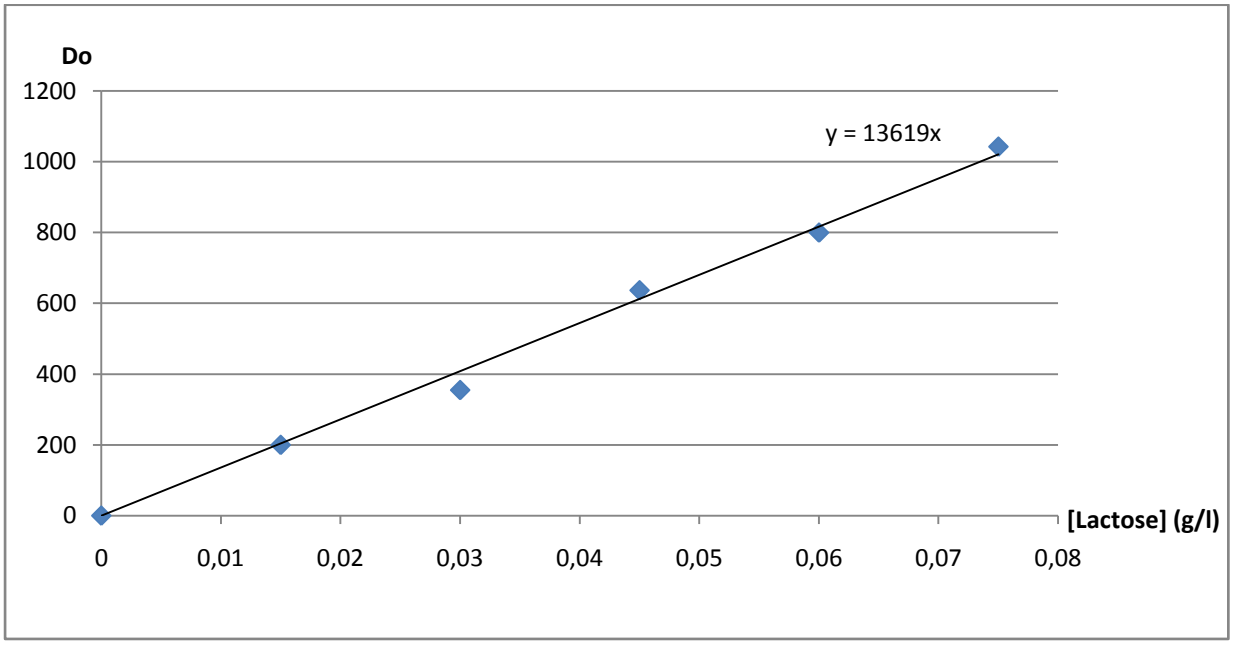


Figure 5.1 : courbe standard du lactose

Calcul de Km

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

Tableau 5.2 : 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**

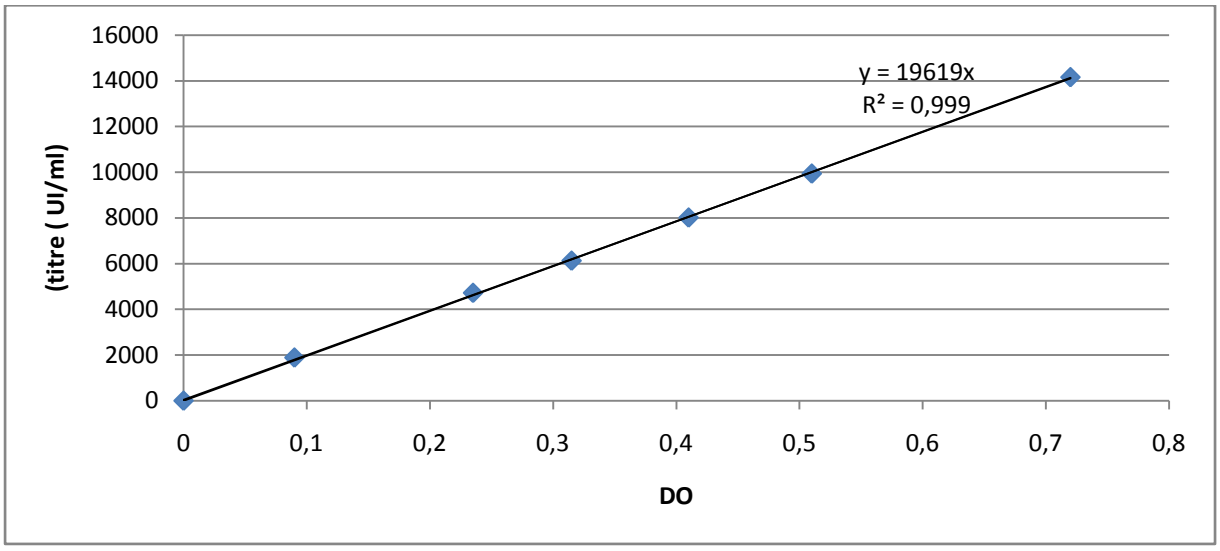


Figure 5.2 : Courbe d'étalonnage du standard de la Pénicilline VK

Calcul du Km :

Km= Tg α = 19619

Manipulation dans les locaux stériles

S'applique pour la manipulation dans des conditions aseptiques les différents souches productives d'antibiotique dans les locaux stériles, Chaque local stérile est composé de :

- **Une chambre pré stérile** : Ou le manipulateur doit faire tous ces préparatifs avant de rentrer pour effectuer son travail.
- **Une chambre stérile** : Une chambre stérile ou on fait l'ensemble des manipulations sous une hotte a flux laminaire munie d'un bec benzène



Figure 6.1. La chambre stérile et pré stérile.



Figure 6.2. La hotte.

Manipulation

- Eteindre les UV avant d'entrer dans le local stérile.
- Préparation des matériels nécessaires pour effectuer le travail (verreries stériles, réactifs, milieux de culture, tenus et gants).
- mettre le tenu stérile (combinaison chaussettes manchettes) dans le pré stérile avant d'entrer dans le stérile faire entré le matériel nécessaire pour le travail et le déposer sur une table se trouvant dans la stérile.
- éteindre les UV de la hotte, mettre en marche le flux laminaire à l'aide du bouton ou s'est mentionné (LAF) qui se trouve sur le coté droit de la hotte.
- Allumer le bec benzène se trouvant dans la hotte.
- A la fin de travail, éteindre le bec benzène et le flux laminaire.
- Sortir le matériel.
- Avec un chiffon imbibé d'eau de javel ou d'alcool essuyer la hotte et la table afin de les désinfecter.

- Remettre en marche les UV de la hotte.
- Enlever la tenue stérile.
- Mettre le matériel biologique en incubation.
- Prendre le reste du matériel pour le lavage.

L'agitateur INNOVA

7.1. Définition :

C'est un Agitateur horizontale à mouvements va et vient, à choix de plateaux avec un mouvement orbital pour but d'assurer l'homogénéisation d'un milieu.

7.2. Utilisation :

Pour assurer un bon fonctionnement et une bonne maitrise de l'équipement on va définir la différente instruction d'utilisation de l'agitateur relatif INNOVA.

7.3. Tableau d'affichage

4 témoins lamineux situés à droite de l'affichage numérique

- RPM : vitesse
- HOURS : temps restant
- C° : température
- (*) : pas de fonction



Figure 7.1. Agitateur horizontal INNOVA

- Raccorder l'appareil au réseau électrique.
- placer la plate forme sur l'agitateur, puis server les vis de fermenteur de la plate forme.
- Mettre les fioles sur l'agitateur.
- Mettre l'interrupteur sur position **ON**.

- Sélectionner la vitesse de consigne en utilisant les touches ▲▼ jusqu'à ce que la vitesse désirée soit affichée.
- Appuyer sur la touche **Start /Stop** pour démarrer et l'arrêt l'agitateur.