République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université YAHIA FARES 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

MODELISATION MULTIPLE D'UNE FERMENTATION INDUSTRIELLE

Proposé et dirigé par :

Dr. KHAOUANE Latifa. Pr. HANINI Salah.

Etudié par :

M^elle^ ALLAL Nadia
M^elle^ BOUDEKHANI Imene

2013- 2014

الحمد لله كما ينبغي

لجلال وجهه و عظيم سلطانه

Remerciements et gratitude

Au terme de ce modeste travail nous remercions en premier lieu à ALLAH le tout puissant de nous avoir prêté vie et toutes nos facultés pour mener à terme cette simple contribution.

Nous tenons à exprimer notre gratitude et nos sincères remerciements à notre promotrice Dr. KHAOUANE Latifa qui nous a aidé, guidé et a suivi attentivement la progression de notre travail, pour ses précieux conseils, sa générosité, et sa patience.

Nous somme profondément reconnaissant au Pr. HANINI Salah, d'avoir suivi et guidé avec bienveillance notre travail. Nous le remercions vivement pour son intérêt.

Nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements aux membres de jury de nous avoir honorés par leur présence et d'avoir accepté d'examiner notre modeste travail. Nous leurs devons les remerciements les plus sincères.

A tous les enseignants du département de Génie des Procédés et Environnement, on vous dit merci pour la qualité de votre enseignement qui restera gravé à jamais dans nos mémoires.

Merci à tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin durant ces années de recherche et d'étude. Nous ne pouvons pas conclure sans un mot de remerciement à tous nos collègues.

Dédicaces

Je dédié ce modeste travail :

À mes premiers professeurs dans la vie, ma tendre mère et mon cher père, qui mon comblés d'amour et d'affection, qui mon toujours encouragé et soutenus durant toutes mes années d'études et dans les moments les plus difficiles.

À mes chères frères Yacine, Amine et Mohamed.

À mon grand-père et ma grand-mère.

À mes chers oncles et leurs épouses, mes tantes et leurs épouses ainsi que tous mes cousins et cousines.

À toute ma famille maternelle et paternelle.

À mes amies : Siham A, Rafika, Nawel, Ahlem...

À mon fiancé Mohamed et sa famille.

À ma binôme Nadia et sa famille.

À ma promotion 2013/2014 sans exception.

À tout les personnes que je n'ai pas citées mais que je porte dans mon cœur.

Enfin, je me permets de dédier ce travail à tous ceux qui luttent pour le savoir en souhaitant apporter un plus à la chimie.

Imene

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A ma mère qui a fait de sa vie le chemin de ma réussite et de sa jeunesse une bougie qui brule pour m'éclairer pendant ma traversée.

A mon père, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger. Que ALLAH les gardes et les protèges.

A mes frères Saïd et Mohamed

A mes sœurs Khadidja, Hiba, et Nour

A tous les membres de ma famille

A tous mes amies fidèles Asmaa Bougasmi, Ahlem, Rafika, Nawel, Salima

A ma chère binôme Imene

A tous mes professeurs et enseignants pour leurs bonne formation depuis mes début jusqu'à la fin de mon cursus universitaire.

A mes amies de la promotion 2013-2014

Nadia

الملخص : **النمذجة المتعددة للتخمر الصناعي.**

الهدف من هذه الدراسة هو وضع نماذج متعددة للتركيب الحيوي للبنسلين G والتي تنتجها البنيسيليوم نوتاتوم من نمط fed-batch.
أول مساهمة ترتكز على تطوير30 شبكة عصبونية (RN) فردية لوضع نماذج لإنتاج البنسلين G بدلالة (وقت التخمر،درجة الحموضة ،PAK والنيتروجين).حيث تتميزهذه النماذج ببنية مماثلة: أربعة شبكات عصبونية في طبقة الدخول (وقت التخمر،درجة الحموضة ،PAK والنيتروجين)، طبقة مخفية مع عدد من شبكات عصبونية محسنة أثناء عملية التعلم و شبكة عصبونية في طبقة الخروج (تشكيل المنتج). مساهمتنا الثانية تركزت على مزج 30 RN الفردية مع اخذ معدل التوقعات الناتجة من 30 RN.
مزج 30 RN الفردية قد حسنت دقة و ضخامة التنبؤ.

الكلمات الجوهرية: النمذجة المتعددة، شبكة عصبونية ، التخمر، البنسلين، البنيسيليوم نوتاتوم.

Résumé : Modélisation Multiple d'une Fermentation Industrielle.

L'objectif de cette étude est la modélisation multiple de la biosynthèse de la pénicilline G produite par *Penicillium notatum* en mode fed-batch.
Notre première contribution a porté sur le développement de 30 réseaux de neurones (RN) individuels pour modéliser la production de pénicilline en fonction du temps de fermentation, *pH*, PAK et Azote. Ces modèles se caractérisent par une structure similaire : quatre neurones dans la couche d'entrée (temps de fermentation, *pH*, PAK, Azote), une couche cachée avec un nombre de neurones optimisé au cours du processus d'apprentissage et un neurone dans la couche de sortie (formation du produit). Notre deuxième contribution à porté sur la combinaison des 30 RN individuels en prenant la moyenne des prédictions résultantes des 30 RN.
La combinaison des RN individuels a amélioré la précision et la robustesse de la prédiction.

Mots clés : Modélisation Multiple, Réseaux de Neurones, Fermentation, Pénicilline, *Penicillium notatum.*

Abstract: Multiple Modeling of an Industrial Fermentation.

The objective of this study is the multiple modeling of the biosynthesis of penicillin G produced by *Penicillium notatum* in fed-batch mode.
Our first contribution focused on the development of 30 neural networks (RN) to model individual penicillin production as a function of fermentation time, *pH*, nitrogen, and PAK. These models are characterized by a similar structure: four neurons in the input layer (fermentation time, *pH*, PAK, nitrogen), a hidden layer with a number of neurons optimized in the learning process and one neuron in the output layer (product formation). Our second contribution focused on the combination of the 30 individual RN by taking the average of the resulting predictions from the 30 RN.
The combination of individual RN has improved the accuracy and robustness of prediction.

Keywords: Multiple Modeling, Neural Networks, Fermentation, Penicillin, *Penicillium notatum*.

Tables des matières

Tables des matières

Table des matières -i-
Abréviation -iv-
Nomenclature -v-
Liste des tableaux -vi-
Liste des figures -vii-

Introduction générale 1

Chapitre I. Les antibiotiques
I.1. Introduction 4
I.2. Historique des antibiotiques 4
I.3. Définition de l'antibiotique 5
I.4. Classes d'antibiotique 6
I.4.1. Selon la structure chimique 6
I.4.2. Selon le mode d'action 9
I.4.3. Selon le mécanisme d'action 10
I.4.4. Selon le spectre d'action 11
I.5. Les modes de production 11
I.6. propriétés communes des antibiotiques 13
I.7. Résistance bactérienne aux antibiotiques 13
I.7.1. sensibilité et résistance aux antibiotiques 13
I.7.2. Définition 14
I.7.3. Mécanisme de résistance 14
I.7.4. Support génétique de la résistance bactérienne 15
I.7.4.1. Résistance naturelle 15
I.7.4.2. Résistance Acquise 15
I.8. Que sont les pénicillines ? 16
I.9. Découverte de la pénicilline 16
I.10. Structure des pénicillines 17
I.11. Le Mécanisme d'action des ß-lactamines (La Pénicilline G) 18
I.12. La production de la pénicilline G 18
I.13. Conclusion 19

Chapitre II. Fermentation industrielle
II.1. Introduction 20
II.2. Historique de la fermentation 20
II.3. Définition de la fermentation 20
II.4. Objectifs de la fermentation 21
II.5. Les bioréacteurs 21
II.6. Fonctionnement des bioréacteurs 22
II.7. Etapes de la fermentation 23
II.7.1. Laboratoire 23
II.7.2. Atelier de préparation 23
II.7.2.1. Les sources de carbone et d'énergie 25
II.7.2.2. Rôle de l'azote 25

II.7.3. Atelier de fermentation 26
II.8. Les types de la fermentation 26
II.8.1. Le mode discontinu (ou batch) 26
II.8.2. Le mode semi-continu (ou fed-batch) 27
II.8.3. Le mode continu 28
II.9. Procédé de fermentation 28
II.10. Croissance microbienne en culture discontinue (batch) 29
II.10.1. Les étapes de la croissance 29
II.10.2. Influence des paramètres environnementaux sur la croissance 31
II.11. Conclusion 34

Chapitre III. Modélisation
III.1. Introduction 35
III.2. Historique 35
III.3. Définition 35
III.4. Principe de modélisation 36
III.5. Notion de modèle 36
III.5.1. Les modèles "boîtes-blanche" 36
III.5.2. Les modèles "boîtes-noire" 37
III.5.3. Les modèle "boîtes-grise" 37
III.6. Modélisation cinétique 38
III.6.1. Modèles non structurés 38
III.6.2. Modèles structurés 40
III.7. Modélisation à l'aide de réseaux de neurones 40
III.7.1. Définition Le réseau de neurones 41
III.7.2. Principe du neurone artificiel 41
III.7.3. Architecture des réseaux de neurones 42
III.7.3.1. Principe 42
III.7.3.2. Perceptron Multicouches 42
III.7.4. Construction d'un modèle 43
III.7.4.1. Les réseaux de neurones non bouclés 44
III.7.4.2. Les réseaux de neurones bouclés 44
III.7.4.3. Conception d'un réseau de neurones 45
III.7.4.3.1. Détermination des entrées/sorties du réseau de neurones 45
III.7.4.3.2. Choix et préparation des échantillons 46
III.7.4.3.3. Elaboration de la structure du réseau 46
III.7.4.3.4. Apprentissage 46
III.7.4.3.5. Validation et Tests 48
III.8. Conclusion 49

Chapitre IV. Modélisation multiple de la pénicilline G

IV.1. Procédé de fermentation de l'antibiotique 50
IV.1.1. Phase de préparation de l'inoculum à l'échelle laboratoire 50
IV.1.2. Phase de prégermination 50
IV.1.2.1. 1ère phase 50
IV.1.2.2. 2ème phase 51
IV.1.3. Phase de fermentation 51
IV.2. Les ajouts au cours de la fermentation 52

IV.2.1. Huile de soja "ou huile de lard" 52
IV.2.2. Saccharose 50 % & sulfate de sodium anhydre à 2,3 % 52
IV.2.3. Solution de phénylacétate de potassium à 30% "précurseur de la pénicilline G" 53
IV.2.4. Ammonium sulfate en solution à 25% 53
IV.2.5. Solution du polypropylène glycol 53
IV.2.6. Contrôle du pH 53
IV.2.7. Drainage du milieu de culture 53
IV.3. Contrôle in process 54
IV.4. Stockage du bouillon de culture 54
IV.5. Procédure de modélisation 55
IV.5.1. Collecte des données 55
IV.5.2. Sélection des entrées et des sorties du modèle neuronal 55
IV.5.3. Préparation de la base de données 56
IV.5.4. Mise en forme des données 56
IV.5.5. Conception et optimisation de chaque réseau de neurones 57
IV.6. Structure des RNSO obtenus 58
IV.7. Regroupement des réseaux de neurones 60

Conclusion générale et perspective 65

Références bibliographiques 66
Annexe 73

Chapitre I. Les antibiotiques

Tableaux I.1	Principaux antibiotiques classés selon leur mode d'action.	10
Tableaux I.2	Donne les principaux antibiotiques classés selon le mécanisme d'action.	10
Tableaux I.3	Principaux antibiotiques classés selon leur spectre d'action.	11

Chapitre II. Fermentation industrielle

Tableaux II.1	Différents types de paramètres contrôlant la fermentation.	26
Tableaux II.2	Classification des micro-organismes par la température.	32

Chapitre III. Modélisation

Tableaux III.1	Classification des différents types de modèle.	38

Chapitre IV. Modélisation multiple de la pénicilline G

Tableaux IV.1	Structure des RNSO utilisés dans la modélisation.	58
Tableaux IV.2	Vecteurs de régression linéaire issue de l'équation linéaire	63

Chapitre I. Les antibiotiques

Figures I.1	Les différentes classes d'antibiotiques en chiffre d'affaires.	6
Figures I.2	Photographie montrant le non développement des Staphylocoques à proximité de *Penicillium notatum*	17
Figures I.3	Structure chimique des pénicillines	17

Chapitre II. Fermentation industrielle

Figures II.1	Présentation d'un fermenteur	22
Figures II.2	Les différents modes de fonctionnement d'un bioréacteur construit par l'homme ou d'un bioréacteur naturel.	23
Figures II.3	Schéma de principe des procédés fermentaires.	24
Figures II.4	Réacteur discontinu.	27
Figures II.5	Réacteur semi continu.	28
Figures II.6	Réacteur continu.	28
Figures II.7	Différentes phases de la croissance bactérienne en milieu liquide non renouvelé (batch) décrites par Buchanan.	31

Chapitre III. Modélisation

Figures III.1	Diagramme schématique d'un modèle neuronal "boîte noire".	37
Figures III.2	Diagramme schématique de modèle neuronal hybride d'un réacteur chimique.	38
Figures III.3	Neurone artificiel.	41
Figures III.4	Différents types de fonction de transfert pour le neurone artificiel.	42
Figures III.5	Structure générale du Perceptron Multicouches.	43
Figures III.6	Réseau de neurones à n entrées, une couche de Nc neurones cachés et N_0 neurones de sortie.	44
Figures III.7	Réseau de neurone bouclé.	45
Figures III.8	Illustration de l'apprentissage supervisé.	47
Figures III.9	Illustration de l'apprentissage non supervisé.	47
Figures III.10	Démarche neuronale.	48

Chapitre IV. Modélisation multiple de la pénicilline G

Figures IV.1	Méthodologie de modélisation par les réseaux de neurones artificiels.	57
Figures IV.2	Regroupage des RN.	60
Figures IV.3	Comparaison entre les valeurs expérimentales et calculées par le RNC : **(a)** Test, **(b)** Validation.	61
Figures IV.4	Comparaison entre les valeurs expérimentales et calculées par le RNS : **(a)** Test, **(b)** Validation.	62
Figures IV.5	Représentation de l'*ESP*.	64
Figures IV.6	Représentation de *R*.	64

Abréviations

BFGS	**B**royden, **F**letcher, **G**oldfarb et **S**hanno.
ESP	**E**rreur **S**tandard de **P**rédiction.
IM	**I**ntra **M**usculaire.
IV	**I**ntra **V**eineuse.
PAK	**P**hénylacétate de potassium
PMC	**P**erceptron **M**ulticouches
REQM	**R**acine de l'**E**rreur **Q**uadratique **M**oyenne
RN	**R**éseau de **N**eurone
RNA	**R**éseau de **N**eurones **A**rtificiel
RNC	**R**éseau de **N**eurones **C**ombiné
RNFF	**R**éseau de **N**eurones de type **F**eed-**F**orward
RNS	**R**éseau de **N**eurones **S**ingulier
RNSO	**R**éseau de **N**eurones **S**tatique **O**ptimal

Nomenclature et Symboles

Symbole	Signification	Unité
b	Biais	--
Ks	Constante de Monod	g/l
P	Produit	γ/cc
pH	Potentiel hydrogène	--
R	Coefficient de Régression	--
S	Concentration en substrat	g/l
t	Temps de fermentation	h
w	Poids	--
X	Biomasse ou sédimentation	%
X_{max}	Concentration maximale de la biomasse	%
Y_e	La moyenne des données expérimentales	

Lettres Grecques

Symbole	Signification	Unité
α	Pente de la droite du meilleur ajustement linéaire	--
β	Ordonnée à l'origine de la droite du meilleur ajustement linéaire	--
μ	Vitesse spécifique de croissance	h^{-1}
μ_{max}	Valeur maximale de μ	h^{-1}

Exposants

Symbole	Signification
cal	Calculée
exp	Expérimentale

Indices

Symbole	Signification
i	Elément i d'un vecteur
i,exp	Elément i d'un vecteur de valeurs expérimentales
i,pred	Elément i d'un vecteur de valeurs prédites

Introduction générale

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, [Nielsen (1997)].

En raison de son ancienneté (plus de 50 ans), de son importance industrielle et face aux contraintes économiques de plus en plus nombreuses, des impératifs de qualités de plus en plus rudes, des exigences de réductions des coûts et enfin de réglementation de plus en plus contraignantes, en matière d'environnement et de sécurité, une optimisation de la production de la pénicilline s'avère nécessaire et la première étape vers une production optimale est la modélisation du processus.

Dans l'approche conventionnelle de modélisation en bioprocédés, on trouve les modèles cinétiques. Ces modèles, connus comme une stratégie de boîte blanche, fournissent une expression analytique reliant les caractéristiques clés du système physique à son comportement dynamique. Dans la modélisation cinétique, les valeurs des paramètres du modèle ont une signification physique, contiennent toujours les conséquences des suppositions introduites et des simplifications du fait de la complexité du cycle de fermentation. Ces modèles ont été et sont encore largement utilisés dans les procédés de fermentation [Paul et Thomas (1996); Zangirolami *et al.* (1997); Cruz *et al.* (1999); Benkortbi *et al.* (2007)]. Toutefois, dans certains cas, ces modèles ne s'appliquent pas, en raison de la non-linéarité inhérente du système, le manque de données expérimentales, l'inexactitude expérimentale, ou les écarts aux conditions idéales [Feyo de Azevedo *et al.* (1997); Silva *et al.* (2008); Saraceno *et al.* (2009)].

Dans l'approche non conventionnelle, on trouve les réseaux de neurones artificiels. À l'heure actuelle, les réseaux de neurones (RN) constituent une alternative intéressante dans la modélisation des processus non linéaires et très complexes. La littérature dédiée fait largement état

d'applications ou les RN offrent des solutions efficaces pour une large gamme de problèmes de fermentation, dont certains sont difficiles à traiter par les approches classiques [Tompos *et al.* (2007); Desai *et al.* (2008); Singh *et al.* (2008); Zhang *et al.* (2010); Khaouane *et al.* (2012); Dragoi *et al.* (2013); Khaouane *et al.* (2013); Nasr *et al.* (2013)].

Une des limitations du modèle neuronal singulier, est son manque de généralisation lorsqu'il est appliqué à de nouvelles données, i.e. le réseau neuronal formé donne de bonnes performances sur les données d'apprentissage, mais donne un rendement insatisfaisant pour les nouvelles données non présentent au cours du processus de formation du RN [Zhang (2008)]. La combinaison de plusieurs réseaux de neurones semble être une approche très prometteuse pour l'amélioration de la généralisation du réseau de neurones, car il est très difficile et parfois impossible de développer un réseau de neurones unique parfait [Furtuna *et al.* (2012)]. De nombreux chercheurs ont montré que, simplement par la combinaison de plusieurs réseaux neuronaux, des prévisions plus précises peuvent être obtenues qu'en utilisant seulement l'un des réseaux de combinaison [Zhang (2008); Ahmad et Zhang (2009); Furtuna *et al.* (2012); Tan *et al.* (2014)].

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail qui consiste à modéliser la production industrielle de pénicilline par les réseaux de neurones multiples (de type feedforward). Chaque réseau de neurones modélise le rendement de production de pénicilline en fonction du temps de fermentation, le *pH*, l'azote, et le PAK. L'étude s'organise en quatre chapitres, une conclusion générale et des perspectives :

- Le ***premier*** chapitre, regroupe une synthèse bibliographique relative aux antibiotiques en question. (Historique, classification, Les modes de production…).
- Dans le ***second*** chapitre, on aborde les aspects généraux de la fermentation: historique, définition, conditions de croissances, stœchiométrie et bilans, technologie de fermentation, principaux types de fermenteurs, différents paramètres gouvernants la cinétique de fermentation.
- Le ***troisième*** chapitre, concerne la modélisation par les réseaux de neurones. Un réseau de neurones est un système d'opérateurs non linéaires interconnectés, recevant des signaux de l'extérieur par ses entrées, et délivrant des signaux de sortie, qui sont les activités de certains neurons.

- Le ***quatrième*** chapitre traitera l'aspect de la modélisation multiple des données relatives à la cinétique de la pénicilline G.

L'étude se termine en fin par une conclusion générale qui rassemble les principaux résultats obtenus durant cette étude et trace les perspectives qui pourront être envisagées pour le futur.

Chapitre I.

Les antibiotiques

I.1. Introduction

De nombreux sondages l'attestent : la découverte des antibiotiques constitue le progrès thérapeutique majeur du siècle dernier dans le domaine médical.

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, [Touati (2004)].

I.2. Historique des antibiotiques

- **En 1877** : Terme d'antibiose. Pasteur et Joubert montrent l'action antagoniste entre microorganismes, [Guindo (2007-2008)].

- **En 1897 :** Emile Duchesne observe les propriétés bactéricides de certaines moisissures, [Encyclopédie Microsoft Encarta (2008)].

- **En 1900** : Le bactériologiste Rudolf Von Emmerich isole une substance la Pyocyanase, qui détruit in vitro les germes du Choléra et de la Dilphtérie, mais qui se révèle toutefois inefficace dans le traitement de ces maladies, [Encyclopédie Microsoft Encarta (2008)].

- **En 1929**: Alexander Fleming : Découverte de la pénicilline, [Guindo (2007-2008)].

- **En 1935** : l'allemand Domagk a utilisé le premier antimicrobien produit synthétiquement (la sulfanilamide), [Guindo (2007-2008)].

- **En 1944** : Waksman découvre la Streptomycine, employée pour traiter des maladies contre les quelles la Pénicilline et inefficace, en particulier la tuberculose, [Encyclopédie Microsoft Encarta (2008)].

- **En 1945**: Découverte du Chloramphénicol.

- **En 1948**: Découverte du Céphalosporines.

- **En 1949** : Découverte des Néomycines.

- **En 1950** : Découverte de l'Oxytétracycline.

- **En 1952** : Découverte de l'Erythromycine.

- **En 1955** : Découverte des Novobiocines.

- **En 1962** : Découverte des Lincomycines.

- **En 1963** : Découverte de la Gentamicine, [http:/www.u444.jussieu.fr/flahault/PCEM2 Penicilline0903.pdf].

I.3. Définition les antibiotiques

On appelle antibiotique "tout composé chimique, élaboré par un organisme vivant ou produit par synthèse, a cœfficient chimiothérapeutique élevé dont l'activité se manifeste à très faible dose, d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des virus, des micro-organismes ou même de certaines cellules des êtres pluri-cellulaires", [Cohen (1990)].

Les antibiotiques sont majoritairement représentés par des molécules d'origine naturelle et leurs dérivés. Ils peuvent aussi être d'origine synthétique ou semi-synthétique, [Newman *et al*. (2003) Singh et Barett (2006)].

Les antibiotiques sont définis par leur :

• Activité antibactérienne (spectre d'activité),

• Toxicité sélective (mode d'action),

• Activité en milieu organique (pharmacocinétique),

• Bonne absorption et diffusion dans l'organisme, [Boissier *et al,* (1993)].

I.4. Classes d'antibiotique

Il existe de nombreuses classifications des antibiotiques, selon leur formule chimique, leur origine et leur mode d'administration. La plus utilisée est celle basée sur leurs analogies de structure chimique, [Yala *et al*. (2001)]. La figure I.1 présente le chiffre d'affaires relatives des différentes classes d'antibiotiques.

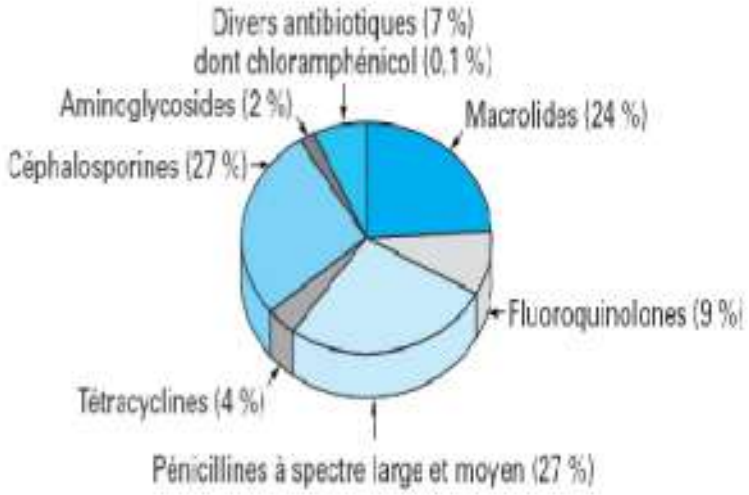


Figure I.1. Les différentes classes d'antibiotiques en chiffre d'affaires, [IMS International Marketing Service (1996)].

I.4.1. Selon la structure chimique

- **Les *β-lactamines :***

Le noyau de base est le cycle β-lactame. Les antibiotiques de cette famille sont bactéricides.

Ils se répartissent en trois groupes :

• *Groupe I* : il comporte le cycle β-lactame et un cyclethiazoline (ex : peni M et peni V),

• *Groupe II* : il comporte un cycle lactame et un cycle dihydrothiazine (ex : peni A),

• *Groupe III* : il comporte un noyau limité au cycle ß-lactame (ex : ***céphalosporines*****,** etc…).

- **Les *Aminosides* ou *Aminoglycosides***

Ce sont des hétérosides naturels formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol. Ce sont des antibiotiques rapidement bactéricides. Il existe plusieurs centaines de molécules naturelles et hémi-synthétiques. Elles sont classées par Umezawa en 1979 puis par Bryskier en1995 en fonction de la structure chimique centrale en trois classes :

- *Streptamine*
- 2 *désoxystreptamine*
- *Streptidine*

- ***Henicoles***

➢ ***Chloramphenicol et thiamphenicol***

Choramphénicol : Le *chloramphénicol* est un antibiotique bactériostatique à large spectre.

Thiamphénicol : Le *thiamphénicol* est très voisin chimiquement du *chloramphénicol*, son spectre d'action est similaire.

- **Les *Tétracyclines***

Les *tétracyclines* sont bactériostatiques, elles pénètrent bien dans les cellules, ces molécules présentent une grande homogénéité.

On distingue les cyclines naturelles et les cyclines semi-synthétiques.

Cyclines naturelles

- *Chlorotétracycline (Auréomycine®),*
- *Tétracycline base (Tetracyne ®).*

Cyclines semi-synthétiques

- *Oxytetracycline (Terramycine®),*
- *Doxycycline (Vibramycine®),*
- *Minocycline (Mynocine®).*

La *Doxycycline* et la *Minocycline* ont une meilleure activité in vitro et sont actives sur les souches bactériennes résistantes aux cyclines naturelles. Elles ont, de plus, une meilleure absorption digestive et une plus longue durée d'action.

- **Les *Polypeptides***

  On distingue 7 groupes :

  - Peptides linéaires,
  - Peptides cycliques représentés par la *Capréomycine*, la *Viomycine*, la *Dcycloserine* ou *Dcycloceine*,
  - *Glycopeptides* représentés par la *Vancomycine,*
  - *Glycolipopeptides* représentés par la *telcoplanine,*
  - *Lipopeptides* représentés par la *Daptomycine* la *Polymyxine,*
  - *Polypeptides thiazolidiques : Bacitracine* (actif sur cocci à Gram positif).

- **La *Vancomycine***

Le chlorhydrate de vancomycine représente le principe actif et est administré par voie intra-veineuse uniquement. Antibiotique à usage hospitalier.

- **La *Teicoplanine***

La molécule est un acide faible soluble dans l'eau et bien toléré en IV et en IM. Sa grande lipophile lui permet une meilleure diffusion tissulaire et un relargage lent. Antibiotique à usage hospitalier.

- **La *Polymyxine***

Appartient à la famille : peptidiques et au groupe V lipopeptides.

- ***Macrolides, Lincosanides, Synergistines***

Les *Macrolides*

Les macrolides sont des antibiotiques fréquemment utilisés en pratique de ville à cause de leur facilité d'emploi. Ils ont un spectre étroit, et sont parfaitement actifs sur les germes intracellulaires. Ils ont une excellente pénétration tissulaire.

Les *Lincosanides*

Ce groupe d'antibiotiques comprend la *lincomycine (Lincocine®)* et son dérivé hemi-synthétique chloré : la *clindamycine (Dalacine®)* qui tend à la supplanter.

Les *Synergistines*

Les *Synergistines* ou *Streptogramines* sont composées d'un mélange de deux types de molécules: la *streptogramine* A et B agissant synergiquement sur le plan bactériologique.

- **Les *Quinolones***

Structure

Les *quinolones* ont une structure générale dérivant de l'acide dihydro 1,4 oxo 4 *quinoléine* carboxylique, [Yala *et al*. (2001)].

I.4.2. Selon le mode d'action

Les antibiotiques agissent sur les micro-organismes par plusieurs mécanismes dont certains sont connus :

- Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne ;
- Changement de la fonction membranaire ;
- Inhibition de la synthèse protéique ;
- Inhibition des acides nucléiques.

Tableau I.1. Principaux antibiotiques classés selon leur mode d'action, [Helali (1999)].

Mode d'action	Antibiotiques
Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne	Pénicilline Céphalosporines Bacitracine Cyclosérine Vancomycine Ristocétine
Changement de la fonction membranaire	Polymyxines Imidazoles
Inhibition de la synthèse protéique	Aminoglucosides Tétracyclines Chloramphénicol Macrolides Lincomvcines
Inhibition des acides nucléiques	Quinolones Novobiocine Pyriméthamines Rifampicine Sulfamides Triméthoorime

I.4.3. Selon le mécanisme d'action

Il existe deux catégories d'antibiotiques :

Les antibiotiques bactériostatiques qui inhibent la croissance bactérienne en ralentissant puis arrêtant la multiplication.

Les antibiotiques bactéricides qui se fixent aux récepteurs spécifiques et entraînent la mort de la bactérie, [Helali (1999)].

Tableau I.2. Donne les principaux antibiotiques classés selon le mécanisme d'action, [Helali (1999)].

Mécanisme d'action	Antibiotiques
Bactériostatiques	Phenicoles Tétracyclines Sulfamides
Bactéricides	Pénicillines Céphalosporines Aminoglucosides

I.4.4. Selon le spectre d'action

Les antibiotiques peuvent être répartis en fonction de leur spectre d'action et de la largeur de ce spectre en :

- Antibiotiques à spectre d'action étroit détruisent des bactéries Gram positives (dont la paroi est composée d'une épaisse couche de peptidoglycanes) ;
- Antibiotiques à spectre d'action étroit, attaquant les bactéries Gram négatives (à paroi fine) ;
- Antibiotiques à spectre large, efficaces à la fois contre les bactéries Gram positives et contre les Gram négatives.

Le tableau I.3 donne les principaux antibiotiques classés selon leur spectre d'action.

Tableau I.3. Principaux antibiotiques classés selon leur spectre d'action, [http://www.microbe-educorg/étudiant/antibio1.html].

Famille	Antibiotiques	Gram+	Gram-
β-lactamines	Benzylpénicilline	+	-
	Oxaciline	+	-
	Ampicilline	+	+
	Imipénème	+	+
Aminosides	Gentamicine	+	+
Phénicolés	Chloramphénicol	+	+
Tétracyclines	Doxycycline	+	+
Macrolides	Erythromycine	+	-
Glycopeptides	Vancomycine	+	-
Quinolones	Acide nalidixique	-	+

I.5. Les modes de production

Les modes de production des antibiotiques sont : les organismes vivants tels que : les champignons, les bactéries, les végétaux supérieures et aussi la synthèse chimique à partir des molécules naturelles ; par exemple : la pénicilline est produite par un champignon ‘*’Penicillium Notatum* ‘’ et l'érythromycine est produit par la bactérie ‘’ *Streptemyses Erythreus*, par contre le chloramphénicol est un antibiotique de synthèse chimique. [Derety (1999); Acar (1998); Boissier *et al.* (1993)].

- Les **bactéries** productrices appartiennent généralement à des genres soumis à différenciation :

  - ✓ La classe des *actinomycètes* représente actuellement le groupe responsable de la majeure partie des antibiotiques produits industriellement. Ce sont des bactéries rencontrées sur tous les substrats organiques. Les sols en sont le réservoir principal. Elles sont à Gram positif et de morphologie très variée. Les souches productrices d'antibiotiques sont aérobies et de formes mycéliennes.

    Les *actinomycètes* ont la capacité d'excréter de nombreuses enzymes hydrolytiques (protéases, lipases, amylases, cellulases), et ainsi de se développer à partir de substrats complexes polymérisés.

    La classification des *actinomycètes* se fait à partir de critères morphologiques et biochimiques. Dans ce groupe bactérien, le genre *Streptomyces* est le plus abondant et il est responsable de la majeure partie de la production actuelle des antibiotiques.
  - ✓ En dehors des actinomycètes, des bactéries du genre *Bacillus* produisent des antibiotiques de nature essentiellement peptidique. Ces bactéries à Gram positif, mobiles, aérobies, anaérobies ou aéro-anaérobies, se caractérisent par une différenciation prononcée, et leur production d'antibiotiques est en relation avec cette différenciation.

    Leurs spores sont extrêmement résistantes aux conditions défavorables.
  - ✓ Il convient cependant de signaler que certains Pseudomonas, bactéries à Gram négatif, aérobies strictes, non filamenteuses, non sporogènes, sans différenciation significative, produisent quelques antibiotiques. Les Pseudomonas producteurs, comme les Bacillus et les actinomycètes, se caractérisent par l'excrétion d'enzymes exocellulaires hydrolytiques, [Delaunay et al. (2007)].

- Les **champignons** ont été à l'origine de la découverte et de la production industrielle d'antibiotiques. Plusieurs milliers d'antibiotiques produits par ces organismes sont connus, mais un petit nombre seulement est commercialisé. Une dizaine d'organismes fongiques est exploitée industriellement. Ils appartiennent aux genres *Aspergillus, Penicillium*, *Cephalosporium, Helminthosporium, Fusidium*. Ce sont des champignons imparfaits qui se reproduisent végétativement en formant des spores exogènes bourgeonnées (ou conidies).

Selon les genres, ces conidies peuvent être isolées, disposées en chaînettes ou en glomérules, [Delaunay *et al*. (2007)].

I.6. 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 J. (1989)].

Cette toxicité sélective est directement liée à leur mécanisme d'action : la plupart des antibiotiques agissent par inhibition spécifique chez les bactéries de certaine chaîne métabolique 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 de faible concentrations, ce qui contribue aussi à leur tolérance par l'organisme, de l'ordre des milligrammes 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 J. (1989)].

I.7. Résistance bactérienne aux antibiotiques

I.7.1. Sensibilité et résistance aux antibiotiques

Il faut distinguer la sensibilité du germe *in vitro* et *in vivo*. Certains antibiotiques ont une pharmacocinétique qui ne leur permet pas d'atteindre les germes dans les foyers infectieux de certains organes ou tissus. Il s'agit des mécanismes de résorption, de diffusion, de transformation et d'élimination des antibiotiques dans l'organisme de l'hôte, Peu d'antibiotiques sont capables de traverser la barrière hémo-méningée et donc d'être utiles dans les méningites, affections redoutables chez l'enfant. Certains germes sont plus sensibles à certains antibiotiques qu'à d'autres :

Cocci-gram (+) sensibles à la pénicilline G, Salmonelles sensibles au chloramphénicol, etc.

La résistance aux antibiotiques peut être spontanée ou acquise. La résistance acquise peut être limitée à un seul antibiotique ou concerner plusieurs d'entre eux (résistance croisée), La résistance est croisée pour une même famille d'antibiotiques. La résistance acquise survient par

mutation chromosomique Ou par transfert extra-chromosomique (résistance plasmidique), [Cohen (1993) ; Raffi & Caillion (1992)].

I.7.2. Définition

La notion de résistance est relative et, en pathologie infectieuse, on dit qu'une souche bactérienne est résistante à un antibiotique lorsqu'une modification de son capital génétique lui permet de tolérer une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que la concentration qu'il est possible d'obtenir in vivo à la suite d'un traitement.

Bactériologiquement, cette concentration est inférieure à celle qui inhibe la croissance de la majorité des souches appartenant à la même espèce bactérienne (in vitro). Cliniquement, elle est supérieure aux concentrations thérapeutiques, c'est-à-dire Celles qui peuvent être obtenues in vivo pour un traitement avec des doses usuelles de l'antibiotique, [Simonet (1988); Lambert & Technovosky (1995) ; Guindo (2007)].

I.7.3. Mécanisme de résistance

Les conditions de l'activité d'un antibiotique peuvent être schématisées de la manière suivante :

- L'antibiotique doit pénétrer dans la cellule bactérienne.
- Trouver la cible moléculaire de son action.
- Y parvenir sous forme active et se maintenir au contact de cette cible à une concentration suffisante pour inhiber l'agent pathogène.

Les mécanismes de résistance peuvent concerner une ou plusieurs de ces conditions.

- ✓ Inactivation enzymatique de l'antibiotique : la souche bactérienne résistante produit des enzymes spécifiques à chaque groupe ou famille d'antibiotique ; ainsi l'antibiotique est soit détruit par une hydrolyse (bêta-lactames, et céphalosporinase), soit modifié dans sa structure chimique (aminosides et chloramphénicol).
- ✓ Modification de la cible : cette modification de la cible peut se faire par altération ou par by-pass.

  L'altération : est une transformation de la cible de telle sorte que la nouvelle configuration n'est plus reconnue par l'antibiotique : c'est le cas des *bêta-lactamines*, *aminosides*, *quinolones*, *rifamycines*, *tétracyclines* et des *glycopeptides*.

Le By-pass: c'est une déviation par duplication de la cible de l'antibiotique, la seconde version étant résistante à l'antibiotique : cas des sulfamides et du triméthoprime.

Diminution de l'accumulation de l'antibiotique dans la cellule bactérienne, elle se fait par diminution de la perméabilité membranaire aux antibiotiques, ce qui entraîne une réduction de la diffusion de l'antibiotique dans l'espace périplasmique et par la même une réduction de la quantité de l'antibiotique pouvant accéder à la cible.

Elle est généralement liée à une diminution quantitative de différentes protéines de la membrane externe appelée porines et qui ont normalement pour rôle de laisser diffuser les substances hydrophiles dont certains antibiotiques.

I.7.4. Support génétique de la résistance bactérienne

I.7.4.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque correspond à la résistance de toutes les souches d'une même espèce ou d'un même genre bactérien à un antibiotique. Elle est généralement due soit à une absence de cible pour l'antibiotique soit à une imperméabilité de la paroi bactérienne à l'antibiotique. La résistance naturelle fait partie du patrimoine génétique habituel de l'espèce bactérienne.

I.7.4.2. Résistance Acquise

La résistance acquise correspond à l'acquisition de la résistance par une souche normalement sensible. L'acquisition de la résistance peut être liée :

- **Résistance par mutation chromosomique**: elle est due à une altération de l'information génétique endogène.
- **Résistance par acquisition de gène**: elle est due à l'acquisition d'informations génétiques exogènes (acquisition de plasmides ou de transposons).

La multi-résistance acquise est transférable en bloc d'une bactérie résistante à une bactérie sensible par intermédiaire d'un plasmide. Comme les plasmides, les transposons sont des facteurs de dissémination des gènes de résistance. Leur grande mobilité entre plasmides différents participe à la large distribution des gènes et la constitution des plasmides de résistance multiple, [Simonet, (1988) ; Lambert et Technovosky (1995) ; Guindo (2007)].

I.8. Que sont les pénicillines ?

Les pénicillines dérivent de moisissures du genre *penicillium* (par exemple *p notatum*) et s'obtiennent par l'extraction de culture submergées croissant en milieu spécial. La pénicilline naturelle la plus en usage actuellement est la pénicilline G. a partir de brassages de fermentation de pénicillium de l'acide 6-aminopénicillanique à été isolé sur une grande échelle il et alors été possible de synthétiser une variété presque illimitée de composés analogues à la pénicilline, en accouplant le groupe amino libre de l'acide pénicillanique à des groupes carboxyles libre de radicaux différents, [Jawatz *et al* (1973)].

I.9. Découverte de la pénicilline

Le 3 septembre **1928**, le docteur Alexander Fleming, de retour de vacances, constate que les boîtes de Pétri, où il faisait pousser des staphylocoques, ont été envahies par des colonies cotonneuses d'un blanc verdâtre ; *Penicillium notatum,* [Bergogne-Bérézin & Dellamonica (1999) ; Doucet (1998) ; Anonyme (1997)].

Alors qu'il doit désinfecter ces boîtes contaminées, Fleming s'aperçoit qu'autour des colonies de moisissure, il existe une zone circulaire dans laquelle le staphylocoque n'a pas poussé. Il émet l'hypothèse qu'une substance sécrétée par le champignon en est responsable et lui donne le nom de pénicilline, [Doucet (1998) ; Milhaud *et al*. (1982)].

Il fallait attendre une dizaine d'années avant que la pénicilline ne revienne sur le devant de la scène. C'est en **1939,** que Howard Walter Florey et Ernest Boris Chain, réussirent à isoler l'agent actif de la pénicilline [Doucet (1998) ; Anonyme. b, (1997)], ils ont fait des essais thérapeutiques sur l'animal (Chain), puis sur l'homme (Florey), [Milhaud *et al.* (1982)].

1942-1945: développement des procédés industriels de préparation des pénicillines, [Milhaud *et al.* (1982)].

1949 : Behrens mettait en évidence la notion de précurseur et de préparation de pénicillines biosynthétiques, [Milhaud *et al*. (1982)].

1950 : préparation des pénicillines « retard », [Milhaud *et al.* (1982)].

1959 : Batchelor, isolait l'acide amino-6 pénicillinique et préparait des pénicillines semi-synthétiques, [Milhaud *et al*. (1982)].

En octobre **1964**, Dorothy Crowfoot Hodgkin recevait un prix Nobel en chimie pour avoir découvert la structure moléculaire de la pénicilline, [Anonyme (1997)].

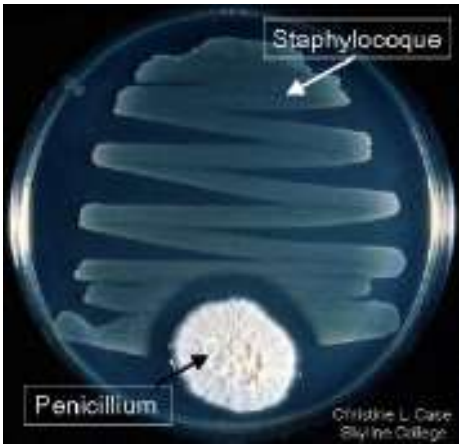


Figure I.2. Photographie montrant le non développement des Staphylocoques à proximité de *Penicillium notatum***,** [http//www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/penicilline/penicilline.htm].

I.10. Structure des pénicillines

La pénicilline est devenue un médicament produit en quantité industrielle alors même que sa structure chimique n'était pas encore complètement élucidée et son mode d'action totalement inconnu. Cette structure, donnée dans la figure IV.2, est relativement inattendue car elle fait apparaître un bicycle assez tendu, [http//www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/penicilline/ penicilline.htm]. Les pénicillines sont constituées d'un noyau thiazolidine attaché à un noyau béta - lactam, portant un groupement amine secondaire (R-NH), [Helali (1999)].

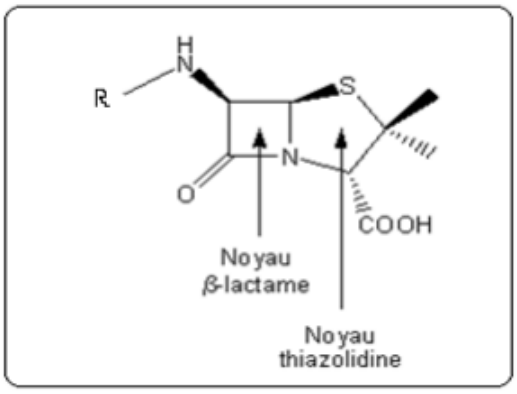


Figure I.3. Structure chimique des pénicillines,
[Http//www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/penicilline/penicilline.htm].

I.11. Le Mécanisme d'action des ß-lactamines (La Pénicilline G)

Les *ß-lactamines* qui comprennent les pénicillines et les céphalosporines, exercent leur effet antibiotique sur les germes possédant une paroi riche en peptidoglycane et sont sans effet sur les organismes dépourvus de paroi, comme les mycoplasmes, [Baumgartner, Schorderet & col (1989)].

Elles agissent principalement en perturbant la synthèse de la paroi bactérienne. Après avoir pénétré dans l'espace périplasmique à travers l'enveloppe bactérienne, les ß-lactamines se lient à différents enzymes fixés sur la membrane cytoplasmique. L'action la plus importante a lieu sur les transpeptidase. Des modèles stéréochimiques montrent que les ß-lactames ont une structure très semblable au dipeptide D-alanine-D-alanine qui termine les chaînes Polypeptides des précurseurs du peptidoglycane. Ces transpeptidase enlèvent le D-alanine terminal de ce polypeptide pour qu'une liaison puisse se former entre le groupe carboxy libre du D-alanine restant et un groupe NH_2 d'un acide aminé d'une chaîne polypeptidique adjacente «reste sérine».

Les *ß-lactames* sont prises comme substrats au lieu de ce dipeptide, ce qui produit une acylation de l'enzyme. Cette réaction étant irréversible, il peut en résulter un blocage de l'activité enzymatique, d'ou une faiblesse du peptidoglycane, par où la cellule va se déformer en fonction des forces Osmotiques du milieu. En outre, un signal de nature inconnue peut activer les hydrolases. Physiologiquement ces hydrolases ne sont activées que brièvement à des zones strictement limitées de la surface cellulaire, lors de la croissance, de l'initiation d'une cloison intercellulaire ou de la séparation de deux cellules à la fin de la division. Le faux signal produit au contraire une activation à grande échelle, de longue durée et située à des endroits inadéquats, entraînant alors la lyse de la bactérie, [Baumgartner, Schorderet & col (1989)].

I.12. La production de la pénicilline G

La production de la pénicilline G ce fait par un processus long et complexe constitué essentiellement par trois étape :

1- Etape de préparation au laboratoire ;

2- Etape de fermentation ;

3- Etape d'extraction.

I.13. Conclusion

Les antibiotiques ont depuis 55 ans transformés le pronostic et le traitement des maladies infectieuses et des infections en général. On leur doit, pour une bonne part, l'allongement de l'espérance de vie.

Les antibiotiques sont les seuls médicaments capables de guérir définitivement un patient et dans un délai très court d'une infection qui aurait pu être mortelle.

Les antibiotiques sont groupés par familles ou classes en fonction de leurs propriétés structurales. Leur mode, mécanisme et spectre d'action.

Chapitre II.

Fermentation industrielle

II.1. Introduction

Dans un contexte industriel, les milieux de fermentation ne sont pas toujours stériles et les conditions opératoires rendent souvent difficile, voire impossible, le travail aseptique. La flore indigène demeure une source fréquente d'accidents de fermentation qui nuisent à la qualité du produit final pouvant le rendre impropre à la consommation, [Castro Martinez (2007)].

II.2. Historique de la fermentation

- La découverte et la maîtrise des techniques de fermentation sont intimement liées à la fabrication de la bière et du pain, qui ont suivi la mise en place des cultures de céréales ; les premières cultures céréalières dateraient de **8000 avant Jésus-Christ.** en Mésopotamie. Des tablettes sumériennes de **4000 avant Jésus-Christ** font référence au "pain liquide", ancêtre de la bière, et la corporation des boulangers existait déjà en Egypte ancienne vers **2700 avant Jésus-Christ,** [Hess (2007)].
- **En 1815 :** Etude qualitative et quantitative de la fermentation alcoolique par Gay-Lussac en complément des travaux de lavoisier, [Khaouane (2008)].
- **En 1915 (durant la première guerre mondiale) :** obtention par fermentation anaérobie de sucres d'acétonne-butanol en Angleterre. Permet l'obtention de solvants organiques permettant de préparer des explosifs (dynamite), réalisé par Chaïm Weizmann scientifique juif qui sera le premier présidant de l'état d'Israël, [Khaouane (2008)].

II.3. Définition de la fermentation

La fermentation est un processus produisant de l'énergie par oxydation de composés organiques, principalement des glucides, où un donneur d'électron, *NADH* cède ses électrons à un accepteur endogène.

Dans la respiration les électrons sont donnés à un accepteur exogène, l'oxygène pour la respiration aérobie et le nitrate ou le sulfate pour la respiration anaérobie. La fermentation ne nécessitant pas l'absence totale d'oxygène, certaines levures comme Saccharomyces cerevisiae (S. cerevisiae) et certaines bactéries comme Lactobacillus plantarum (Lb. plantarum) utilisent la fermentation en présence d'oxygène pour dégrader les sucres, [Prescott *et al.*(2003) ; Weiss *et*

al.(1968)]. La fermentation est définie comme étant la transformation chimique à l'aide d'enzyme de composés organiques, [Ghasem (2007)].

II.4. Objectifs de la fermentation

La définition précédentes laissent entendre que les micro-organismes peuvent produire divers composer dont l'homme a besoin pour son alimentation ou son industrie.

Les objectifs que les fermentations sont de trois ordres :

- Obtenir des "corps" microbiennes (biomasse microbienne) pour eux même à des fins alimentaires, médicales, pharmaceutique, agricole ou industrielle ;
- Produire des "outils biologique " que l'on appelle des enzymes ;
- Synthétisé des métabolites non catalytiques que l'homme utilise dans des domaines très divers : des composés énergétiques (méthane, éthanol), des matières premières chimique intéressantes (éthanol, butanol) ou des composants alimentaires (acides aminés, vitamines.., [Rahal (2005)].

II.5. Les bioréacteurs

Les bioréacteurs sont utilisés de manière classique dans l'industrie agroalimentaire (fermentation et traitement de l'eau) et pharmaceutique (production de protéines). Ils sont généralement définis comme des dispositifs dans lesquels les processus biologiques ou biochimiques se développent sous un environnement contrôlé (*pH*, température, pression, apport en nutriments etc.), [Martin (2004)].

Dans sa forme la plus simple (Figure II.1), le fermenteur est une cuve de géométrie appropriée équipée ou nom de système d'agitation, d'homogénéisation et d'aération munie d'entrées (inputs) et de sorties (outputs) permettant la charge (milieu de culture, inoculum, gaz divers) et la récolte ultérieure, [Demeyer *et al.* (1982)].

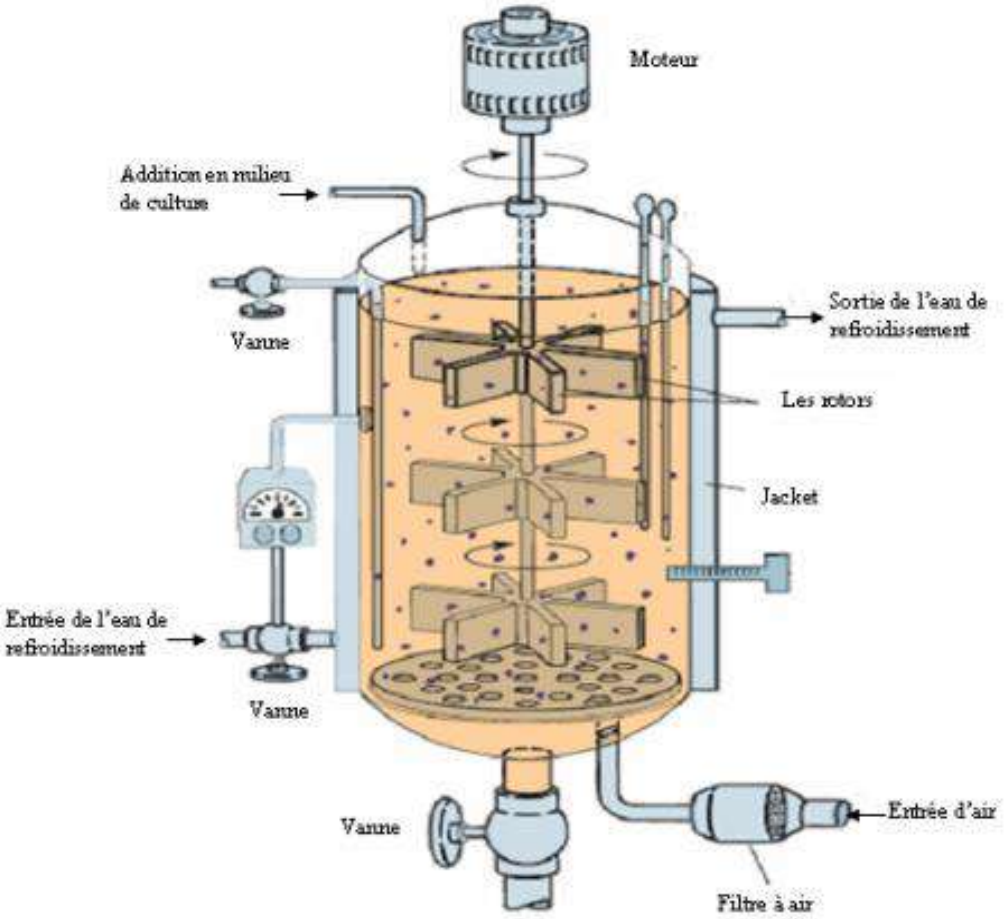


Figure II.1. Présentation d'un fermenteur, [Ghasem (2007)].

II.6. Fonctionnement des bioréacteurs

Les bioréacteurs les plus courants sont des cuves agitées et aérées si les microorganismes cultives sont aérobies. Selon le mode d'apport du substrat carbone, on distingue les bioréacteurs batch (discontinu), continus et fed-batch (discontinu-alimente). Ces modes de fonctionnement ont un impact sur la composition du milieu de culture, notamment en termes de concentration en substrat et en biomasse, [Delafosse (2008)].

La figure II.2. Présente un schéma conceptuel du fonctionnement d'un bioréacteur. Il s'agit d'un récipient de volume V dans lequel se développent les organismes. Ce récipient est rempli par un milieu de renouvellement avec un débit Q_{in} et se vide avec un débit Q_{out}. Ces deux débits peuvent être choisi par l'expérimentateur ou résulteront du calcul d'une loi de contrôle (dans ce cas ils dépendront de l'état du système).On distingue 3 modes d'alimentation classiques des bioréacteurs, [Bernard (2004)].

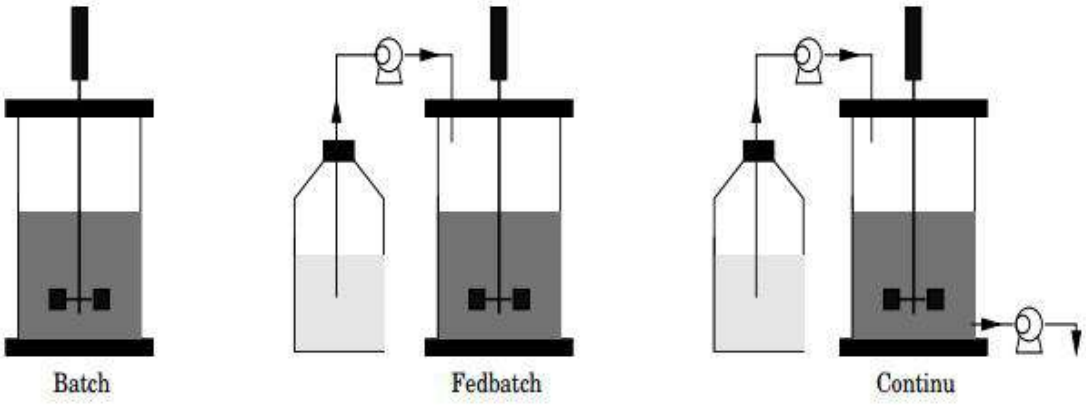


Figure II.2. Les différents modes de fonctionnement d'un bioréacteur construit par l'homme ou d'un bioréacteur naturel, [Bernard (2004)].

II.7. Etapes de la fermentation

II.7.1. Laboratoire

Une des étapes les plus importantes de la fermentation est la collection des souches sur lesquelles on effectue plusieurs tests génétiques, microbiologiques et biochimiques.

Une fois les tests révèlent que les souches sélectionnées produisent bien on procède à la préparation de l'inoculum (tout ou partie d'une culture qui est utilisé pour ensemencer un milieu), [Aliturki & Yahoum (2005)].

II.7.2. Atelier de préparation

Dans l'atelier de préparation a lieu la préparation des milieux qui se fait en mélangeant des quantités bien définies des différents composants du milieu.

Une fois le milieu prêt on passe à sa stérilisation soit à l'intérieur de la cuve de fermentation soit on le stérilise à part selon les moyens dont notre installation est dotée, [Aliturki & Yahoum (2005)].

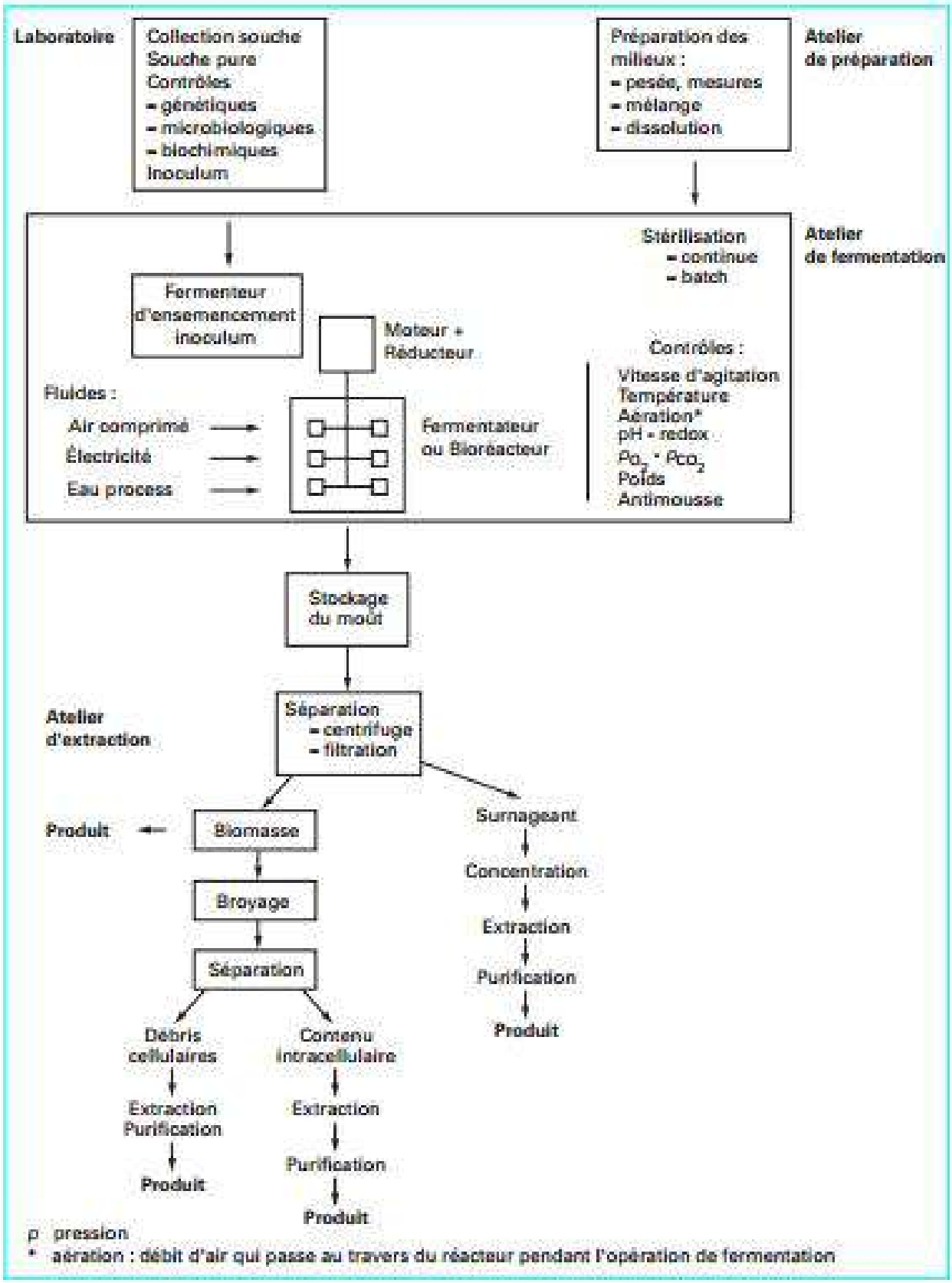


Figure II.3. Schéma de principe des procédés fermentaires, [Delaunay *et al.* (2007)].

II.7.2.1. Les sources de carbone et d'énergie

On trouve dans cette catégorie les oses, les polyholosides, les acides gras, les triglycérides et dans une moindre mesure, les protides, [Larpent et Sanglier (1991)].

- **Les oses et leurs dérivés**

Le glucose est une excellente source de carbone très répandue pour stimuler la croissance microbienne. Quelquefois, il est un précurseur direct de l'antibiotique lorsque celui-ci contient dans sa structure des chaînes latérales glycosylée. Des exemples sont les *aminoglycosides*, les *macrolides* et les *glycopeptides*.

- **Les acides gras et leurs dérivés**

Ils se trouvent dans les huiles, sous forme de triglycérides. Les huiles les plus utilisées sont les huiles de soja, d'arachide, de maïs et de colza. Les acides gras peuvent remplir des fonctions multiples, [Larpent et Sanglier (1991)] :

- Ils peuvent être utilisés comme sources de carbone et d'énergie ;
- Ils exercent des actions physico-chimiques liées à leurs propriétés tensioactives : formation d'émulsions, encapsulation de matériaux hydrophobes, réduction des mousses, modification de la perméabilité de la membrane cellulaire ;
- Certains acides gras sont également des précurseurs.

II.7.2.2. Rôle de l'azote

La biomasse est composée en moyenne de 6% d'azote. Cet élément nécessaire à la synthèse protéique constitue un des éléments essentiels à la croissance des levures et au bon déroulement de la fermentation.

Généralement l'azote est ajouté sous forme de phosphate d'ammonium, avant le début de la fermentation alcoolique. La supplémentation en azote permet d'augmenter la vitesse de fermentation quelle que soit la souche utilisée ou les conditions de fermentation, [Bely *et al.* (1990); Blateyron & Sablayrolles (2001)].

II.7.3. Atelier de fermentation

Dans l'atelier de fermentation on effectue l'ensemencement du germinateur à l'aide de l'inoculum préparé au laboratoire puis après l'achèvement de la durée de germination on passe à l'ensemencement du fermenteur (après avoir effectué les contrôles adéquats).

Tout au long d'un cycle de germination ou de fermentation ainsi qu'avant le passage d'une étape à une autre il y a des contrôles de certains paramètres importants qui se fonts de manière à mener au mieux cette opération, [Aliturki & Yahoum (2005)].

Le tableau suivant résume les différents types de paramètres contrôlant la fermentation :

Tableau II.1. Différents types de paramètres contrôlant la fermentation.

Types de paramètre	Paramètres
Thermo physique	- La température, - La pression, - L'agitation, - Les mousses, - Les débits gazeux et liquides d'injections.
Chimique	- Le pH, - Le potentiel redox, - L'oxygène dissous, - Le gaz carbonique dissous, - Les substances organiques ou minérales présentent dans le milieu.
Biologique	- La croissance et le décès des cellules, - L'évolution physiologique, - La biomasse.
Rhéologique	- Viscosité

II.8. Les types de la fermentation

II.8.1. Le mode discontinu (ou batch)

Le mode discontinu: le substrat est introduit initialement dans le bioréacteur contenant les souches microbiennes. Les réactions s'effectuent à volume constant et le procédé s'arrête par épuisement du substrat ou inhibition de la biomasse ou le produit, [Guenounou (2009)].

Le système est ferme et garde un volume constant. Les espèces sont introduites à l'instant initial (inoculum pour des micro-organismes) ainsi que les nutriments et les précurseurs nécessaires.

L'avantage de cette approche est qu'elle limite la contamination par d'autres micro-organismes et permet donc de rester plus longtemps dans des conditions axéniques. En contrepartie les moyens d'action sur de tels systèmes sont limites (aération, température, etc.). Un bioréacteur batch présente donc de fortes contraintes qui laissent peu de latitude pour le contrôle.

Par ailleurs il est mal adapte à un échantillonnage à haute fréquence qui pourrait significativement modifier son volume. Du fait de sa simplicité, c'est néanmoins le système le plus utilise dans l'industrie pour produire un métabolite ou une biomasse, [Bernard (2004)].

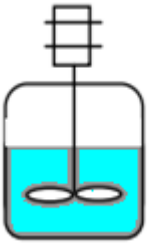


Figure II.4. Réacteur discontinu, [Ammar (2007)].

II.8.2. Le mode semi-continu (ou fed-batch)

Le réacteur semi continu est un dispositif extrêmement utilisé dans l'industrie, en particulier dans les opérations de chimie fine. Certains constituants sont ajoutés, ou soustraits à la charge en cours de réaction.

Ce type de réacteur trouve principalement son application lorsque les réactions sont rapides et très exothermiques. L'utilisation d'un réacteur semi continu permet de régler la vitesse de dégagement de la chaleur, et de maintenir ainsi le régime thermique à l'intérieur des limites prévues. Le grand avantage de ces réacteurs est leur capacité d'adaptation. En particulier, la possibilité de régler la production de la chaleur par la vitesse d'alimentation permet de réaliser des réactions avec des vitesses et des propriétés thermiques différentes dans un même réacteur, [Ammar (2007)].

Le cas le plus fréquent est celui du réacteur alimenté par un flux molaire de F_j.

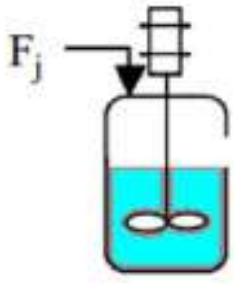


Figure II.5. Réacteur semi continu, [Ammar (2007)].

II.8.3. Le mode continu

Le mode continu: le réacteur est alimenté en substrat avec un flux constant et le milieu réactionnel est soutiré en permanence avec le même flux, le volume est donc constant dans le réacteur.

Le fermenteur est alimenté de façon ininterrompue avec un milieu nutritif stérile, tout en soutirant en continue un volume égal du mélange biomasse-milieu liquide, de façon à maintenir le volume du réacteur constant, [Khaouane (2008)].

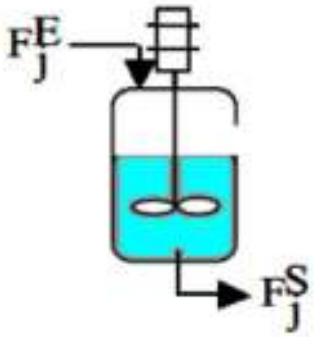


Figure II.6. Réacteur continu, [Ammar (2007)].

F_j^E : Un flux molaire d'entrée ; F_j^S:Un flux molaire de sortie.

II.9. Procédé de fermentation

La fermentation microbienne est un procédé qui a pour finalité de faire croître une population de micro-organismes (levures, bactéries, champignons, etc.) aux dépens de certains substrats carbonés, à l'intérieur d'un bioréacteur soumis à des conditions environnementales (température*, pH*, aération, etc.) variable celon le résultat voulu. Chaque type de micro-organismes

possède des caractéristiques liées à son matériel génétique et à ses mécanismes de régulation interne, [Guenounou (2009)]. Ainsi, la fermentation peut avoir différentes utilisation:

- Production de micro-organismes : l'objectif premier est la croissance de la masse cellulaire elle-même. C'est le cas des cultures visant à produire la levure de boulanger.
- Production métabolique: dans ce cas, c'est la production de substances organiques résultantes de l'activité métabolique qui est favorisée (alcools, antibiotiques, etc.)
- Consommation du substrat : ici, c'est la dégradation du substrat qui est privilégiée, [Guenounou (2009)].

II.10. Croissance microbienne en culture discontinue (batch)

II.10.1. Les étapes de la croissance

La croissance microbienne se traduit par une augmentation en taille ou en nombre des micro-organismes. Pour provoquer une croissance microbienne dans une culture il faut fournir aux cellules initiales les nutriments nécessaires et des conditionnes environnementales favorables. Le schéma de la croissance d'une population microbienne en culture discontinue (c'est-à-dire milieu non renouvelé) établi par Buchanan se décompose alors traditionnellement en sept phases distinctes (figure II.7), [Buchanan (1918)] :

1. **phase de latence:** elle correspond à une phase de transition entre un état physiologique initial et un état de croissance à 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. Par ailleurs, dans certaines conditions, la concentration initiale en cellules est si faible qu'il est difficile de quantifier l'augmentation du nombre d'individus. Ce phénomène est considéré comme une pseudo-latence. La phase de latence peut être limitée en utilisant comme inoculum une préculture prélevée en phase exponentielle.
2. **La phase d'accélération:** elle commence à partir de l'adaptation effective des cellules à leurs nouvelles conditions de culture. Durant cette période, la valeur du taux spécifique de croissance (μ) augmente, jusqu'à atteindre sa valeur maximale (μ_{max}).

3. **La 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}):

   $$\mu_{max} = \frac{y_2 - y_1}{t_3 - t_2} \quad \text{(II.1)}$$

   Dans cette phase le taux de mortalité est nul, l'activité métabolique est maximale et le taux de croissance est constant.
4. **La 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 à croître mais le temps de génération augmente.
5. **La phase stationnaire maximale :** au cours de cette phase, la population microbienne n'évolue plus (μ=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.
6. **La phase de début de décroissance :** elle correspond à un début de disparition des cellules.
7. **La phase de décroissance exponentielle de la population :** cette phase apparaît lorsque le milieu devient fortement défavorable à la multiplication des micro-organismes et entraîne leur mort rapide.

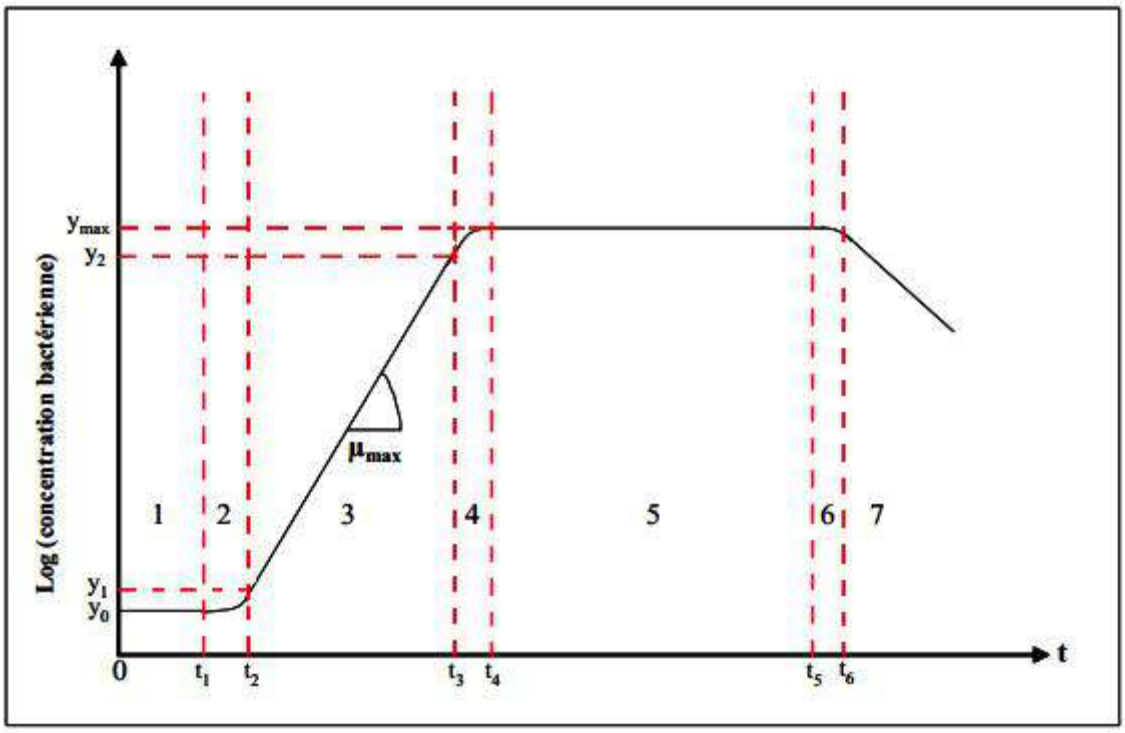


Figure II.7. Différentes phases de la croissance bactérienne en milieu liquide non renouvelé (batch) décrites par Buchanan, [Buchanan (1918)].

II.10.2. Influence des paramètres environnementaux sur la croissance

La croissance microbienne est influencée par les constituants du milieu de culture et par les facteurs physico-chimiques (température, *pH*, oxygène, etc…). Donc la connaissance de ces facteurs environnementaux pour une levure donnée va permettre de connaître sa distribution écologique et de contrôler son développement, [Castro martinez (2007)].

- **Effet de la température**

La température est un facteur qui affecte profondément les micro-organismes, comme tous les êtres vivants. On considère généralement qu'à chaque augmentation de 10°*C* la vitesse de réaction catalysée par une enzyme sera doublée.

Alors, le métabolisme cellulaire sera plus actif aux températures plus élevées et le micro-organisme se développera plus vite. Cependant, au-delà d'un certain point, de nouvelles augmentations diminuent la croissance et des températures trop élevées sont létales, puisqu'elles endommagent les micro-organismes en dénaturant les enzymes, les systèmes de transport et d'autres protéines.

Les membranes microbiennes sont aussi détruites par la chaleur. La température optimale d'activité est toujours plus proche de la température maximale que de la température minimale. Les micro-organismes peuvent se classer selon l'échelle de température caractéristique de leur croissance (Tableau II.2).

Tableau II.2. Classification des micro-organismes par la température, [Prescott *et al.* (1995)].

Classification	**Caractéristiques**
Psychrophiles	Micro-organismes adaptés et capables de survivre à des températures froides. Ces micro-organismes présentent un optimum de température de 15°*C*, mais peuvent se développer entre 0°*C* (température minimale) et 20°*C* (maximale). Les systèmes de transport et les mécanismes de synthèse protéique fonctionnent bien à basse température. Leurs membranes cellulaires possèdent des niveaux élevés d'acides gras insaturés et restent semi-fluides dans le froid. La croissance des micro-organismes psychrophiles est lente en comparaison avec celle des autres groupes.
Mésophiles	La plupart des micro-organismes font partie de cette catégorie. Les températures optimales des mésophiles sont entre 20 et 45°*C* et leur température minimale se situe entre 15 et 20°*C*. L'habitat de ces organismes est très diversifié et cosmopolite : le sol, l'eau douce et l'eau de mer, les eaux usées, les végétaux, les animaux et l'homme
Thermophiles	Micro-organismes qui peuvent se développer à des températures de 55°*C* (optimum) ou plus. Les thermophiles ont des enzymes beaucoup plus stables à la chaleur et des systèmes de synthèse protéique capables de fonctionner à de hautes températures et leurs lipides membranaires sont plus saturés que ceux des micro-organismes mésophiles.

L'étude faite par [Torija *et al.* (2002)] sur l'effet de la température chez Saccharomyces cerevisiae en fermentation alcoolique a montré un allongement de la phase de latence à basse température (15°*C*). Cependant, la population est restée viable tout au long de la fermentation. Par contre, à une température élevée (35°*C*) la fermentation a été plus rapide mais avec une diminution de la viabilité cellulaire dès le début de la fermentation. Par rapport au métabolisme, ces auteurs ont observé à température élevée une augmentation des produits secondaires de la fermentation, tandis qu'aux températures plus faibles la production d'éthanol a été favorisée.

Enfin, il a été observé une diminution de la vitesse de croissance et de la productivité du procédé quand la température est supérieure à la température optimale de croissance. Ce comportement est dû à la dénaturation des enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire,

[Converti *et al.* (1996)]. En général, la température optimale de culture des levures se situe entre 25 et 30°*C*.

- **Effet du *pH***

Le *pH* est un autre facteur important de la croissance des levures, 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, [Martinez *et al.* (1999); Sanchez *et al.* (1997)].

Les *pH* alcalins sont, d'une façon générale, préjudiciables aux micro-organismes, la limite de leur développement se situant pour des valeurs d'ordre de 9 à 9.5. On observe pour les valeurs de *pH* entre 0 et 8 différents types de comportement liés à l'aptitude des microorganismes à tolérer et/ou métaboliser les acides organiques (ou minéraux) présents dans le milieu.

Ainsi, les bactéries, en règle générale, sont neutrophiles, présentant une meilleure croissance pour les *pH* voisins de 7 et sont partiellement inhibées à une valeur de *pH* inférieure à 5. Au contraire, les levures et les moisissures présentent une bonne aptitude à métaboliser les acides organiques et peuvent se développer très bien dans une ample zone de valeurs de *pH* comprises entre 2.5 et 8.5.

Contrairement à la température, le *pH* interne n'est pas nécessairement égal à celui du milieu de culture et sa valeur est proche de la neutralité dans la majorité des microorganismes. Cette différence entre le *pH* interne et externe peut résulter de l'imperméabilité de la membrane plasmique aux protons. La concentration en ions hydrogène intracellulaire et extracellulaire n'est pas équilibrée et un gradient de concentration d'ions peut être créé à travers la membrane.

Ce gradient de concentration, associé au potentiel électrique de la membrane, détermine la force motrice des protons qui contrôle les réactions membranaires.

Le *pH* interne a une influence importante sur l'activité des cellules et des systèmes intracellulaires tels que la synthèse des protéines, les mécanismes de transport, l'activité enzymatique et l'excrétion des métabolites pendant la fermentation [Liu S. *et al.* (2003)]. Le *pH* externe, peut influer sur la vitesse avec laquelle les molécules sont transportées vers l'intérieur de la cellule et des valeurs de *pH* extrêmes peuvent endommager la membrane cellulaire et provoquer la mort cellulaire, [Eddy (1982)].

Le *pH* joue aussi indirectement en agissant sur les équilibres de dissociation de divers constituants du milieu (acides organiques) ou d'adjuvants du procédé de vinification comme l'anhydride sulfureux.

- **Rôle de l'oxygène**

L'oxygène est une molécule nécessaire pour la biosynthèse de molécules indispensables pour la cellule tout particulièrement celle des acides gras insaturés et des stérols qui protègent les levures du stress alcoolique, [Scheffers (1992)]. En fermentation alcoolique chez Saccharomyces cerevisiae, une faible aération est donc indispensable pour assurer la survie des levures et l'épuisement complet des sucres en présence de concentrations élevées en éthanol. De plus dans ces conditions, la vitesse spécifique de production d'éthanol est améliorée, [Sablayrolles (1992)].

II.11. Conclusion

La fermentation des antibiotiques prend un grand espace dans l'industrie pharmaceutique depuis 1940.

Le procédé de fermentation repose énormément sur des bases scientifiques et techniques mais fait appel aussi à beaucoup de constatations empiriques, ce qui fait que le procédé de fermentation pour un même produit change d'une entreprise à une autre et ce en fonction des installations et du personnel.

Afin d'améliorer le processus de fermentation industrielle, on a souvent recours à la modélisation qui reste un problème de challenge et qui va faire l'objet du prochain chapitre.

Chapitre III.

Modélisation

Chapitre IV.
Modélisation multiple de la pénicilline G

IV.1. Procédé de fermentation de l'antibiotique

IV.1.1. Phase de préparation de l'inoculum à l'échelle laboratoire

Cette phase se décompose selon le mode opératoire suivant, [Allchim] :

- Dans 3 flacons de 3 litres contenant le milieu de culture à base de graines de riz dont la composition est donnée en "annexe 1",
- Rajoutez aseptiquement 2 g de la souche conservée sur du quartez,
- Homogénéisez le milieu et incubez-le à 25°C et une humidité relative de [50 ± 5] % pendant 8 à 9 jours,
- Mélangez le milieu de culture au 1er, 2ème, 3ème, 4ème, 8ème et 9ème jour d'incubation,
- En absence d'une fermentation programmée, ce milieu de culture peut être conservé à + 4°C pendant 4 semaines au maximum,

Pour lancer une fermentation rajoutez au milieu de culture au riz, 1 litre du milieu de culture liquide de prégermination dont la composition est donnée en "annexe 2" dans les conditions suivantes, [Allchim]:

- Agitation alternative 85 coups/min 4 cm de profondeur.
- Température 25 °C.
- Temps 12 h.
- Concentration des spores 10^7/ml.

IV.1.2. Phase de prégermination

Cette étape se décompose en trois phases principales, [Allchim]:

IV.1.2.1. 1ère phase

Avec une fiole de graines de riz ensemencez le réacteur contenant 600 litres du milieu de culture stérile dont la composition est donnée dans "l'annexe 3", et sous agitation à 150 rpm.

a. Conditions opératoires

- Température : 25°C ±0,5
- Air : 1 volume/volume / minute
- Pression : 0,7 kg/cm^2
- pH : non contrôlé

b. Conditions du process

- Durée : 44 h ±5
- pH : 5,4 ±0,2
- Biomasse : 16 – 20 %

IV.1.2.2. 2ème phase

Dans un réacteur de 1200 *l* contenant 8000 *l* de milieu de culture stérile dont la composition est donnée dans "l'annexe 4"ajoutez le produit de la 1ère phase soit les 600 litres de culture, sous agitation à 100 rpm.

a. Conditions opératoires

- Température : 25°C ±0,5,
- Air : 1 volume/volume / minute
- Pression : 0,7 kg/cm^2
- pH : non contrôlé.

b. Conditions de process

- Durée : 44 h ±5,
- pH : 5,4 ±0,2,
- Biomasse : 16 – 20 %.

IV.1.3. Phase de fermentation

Travaillez sur un fermenteur contenant 86500 *l* de milieu de culture, dont la composition est donnée en "annexe 5", Inoculez le fermenteur par le milieu de culture de la 2ème phase de la prégermination,

a. Caractéristiques physiques du fermenteur

- Volume : 130 m^3,
- Diamètre 3800 mm,
- Hauteur totale : 12400 mm,
- Hauteur du cylindre : 10400 mm.

b. Conditions opératoires

- Température : 25 °C,
- Air : de 0 – 15 h : 0,3 v/v/minute,
  - 16 à 22 h : 0,5 v/v/minute,
  - 23 – 40 h : 0,7 v/v/minute,
  - 41 h au déchargement : 0,8 v/v/minute.
- Pression : 0,4 – 0,7 Kg/cm^2.
- pH à 24 h du déchargement "harvest" : 6,6.
- Durée : 216 – 228 heures,
- Agitation : de 0 – 15 h : 80 – 90 rpm,
- de 16 h au déchargement : 110 – 120 rpm.

IV.2. Les ajouts au cours de la fermentation

IV.2.1. Huile de soja "ou huile de lard"

L'ajout d'huile de soja démarre à la 12ème heure de fermentation, à l'aide de la pompe d'alimentation automatique, comme suit :

- 12 à 24 h : 7 l/h,
- 25 à 48 h : 10 l/h,
- 49 à 72 h : 14 l/h,
- 73 au déchargement : 17 – 25 l /h «selon la mousse».

IV.2.2. Saccharose 50 % & sulfate de sodium anhydre à 2,3 %

L'ajout du sucre démarre à la 12ème heure de fermentation par la pompe d'alimentation comme suit:

- 12 à 24 h : 110 - 140 l/h,
- 24 à 28 h : 260 – 300 l/h,
- 29 – 52 h : 210 - 260 l/h,
- 61 au déchargement : 240 – 280 l/h.

NB : L'ajout du saccharose peut être réduit à 20 l/h, si la valeur de l'oxygène dissout est proche du taux critique qu'est 30%.

Si le taux de l'oxygène dissous est < 30% :

- Augmentez la vitesse d'agitation,
- Augmentez la pression au-dessus de 0,6 – 0,7 Kg/cm^2

IV.2.3. Solution de phénylacétate de potassium à 30% "précurseur de la pénicilline G"

L'ajout de ce précurseur démarre à la $13^{ème}$ heures de fermentation comme suit :

- 13 à 40 h : 16 – 18 l/h, jusqu'à ce que la concentration résiduelle de 0,5 – 0,7 g/l soit atteinte.
- 41 h au déchargement : rajoutez de telle façon à maintenir un taux de phénylacétate de potassium de 0,9 – 1,2 g/l. arrêtez l'ajout 8 h avant le déchargement.

IV.2.4. Ammonium sulfate en solution à 25%

A rajouter quant le taux du NH_4^+ soit stabilisé entre 0,5et 0,7 g/l, commencez par 50 l/h, puis ajustez les quantités ajoutées de telle façon à avoir une concentration constante du NH_4^+dans le milieu de culture.

IV.2.5. Solution du polypropylène glycol

L'ajout de ce produit est conditionné par la quantité de mousse formée, sans pour autant dépasser la quantité totale de 350 litres.

IV.2.6. Contrôle du pH

- Le pH du milieu de culture descend au début de la fermentation, lorsqu'il atteint un pH = 5,7. Commencez l'ajout du NH_4^+ pour atteindre un pH de 6,0 – 6,1.
- A la fin du process ajuster le pH mètre automatique pour atteindre un pH de 6,6.
- Si le pH dépasse la valeur de 6,6 ajustez par l'ajout du saccharose en solution jusqu'à avoir un pH de 6,6.

IV.2.7. Drainage du milieu de culture

Au log 70 "70 h" le milieu de fermentation atteint un volume compris entre 105 – 108 m^3, alors il faut commencer le drainage comme suit :

- *Log 70 : 4600 l,*

- *Log 82 : 4600 l,*
- *Log 94 : 4600 l,*
- *Log 106 : 4600 l,*
- *Log 118 : 4600 l,*
- *Log 130 : 4600 l,*
- *Log 142 : 4600 l,*
- *Log 154 : 4600 l,*
- *Log 166 : 4600 l,*
- *Log 178 : 4600 l,*
- *Log 190 : 4600 l,*
- *Log 202 : 4600 l,*
- *Log 214 : 4600l,*

IV.3. Contrôle in process

Cette étape comporte les points suivants :

- Réduction des sucres : au démarrage de la fermentation,
- PAK : Toutes les 8 h, à commencer après 24 h de fermentation,
- Titre (UI/ml) : Toutes les 8 h, à commencer après 23 h de fermentation,
- Ammoniac : 0, 22 et 30 h, puis chaque 4 h jusqu'au déchargement,
- Poids sec : chaque 24 h,
- Volume de sédimentation : chaque 8 h,
- Stérilité : chaque 24 h.

IV.4. Stockage du bouillon de culture

Les bouillons du drainage et du harvest doivent être conservés dans un réacteur propre et additionné de 30 % de formaldéhyde en solution au moins égale à 0,5 % (v/v), La température de stockage doit être comprise entre +5 et +8 °C, Ne pas conserver le bouillon plus de 30 h avant le traitement.

IV.5. Procédure de modélisation

La procédure de modélisation par les réseaux de neurones de la production de pénicilline est illustrée sur l'organigramme de la figure IV.1.

Dans le but de constituer une base de données fiable et représentative, nous avons suivi une méthodologie, inspirée d'études bibliographiques [Hinton (1989); De et al. (2007); Lolas et Olatunbosun (2008)] qui revêt les étapes suivantes :

- Collecte des données ;
- Sélection des entrées et des sorties du modèle neuronal ;
- Préparation de la base de données ;
- Mise en forme des données.

IV.5.1. Collecte des données

On a regroupé toutes les années de production de la pénicilline de 1986 à 2002. Ce choix se justifie d'une part afin de trouver des expressions moyennes et générales et d'autre part ces résultats peuvent être considérés comme un lot standard pour les fermentations futures au sein des entreprises produisant cet antibiotique.

IV.5.2. Sélection des entrées et des sorties du modèle neuronal

D'une manière générale, lorsqu'on modélise un processus physique ou chimique, on détermine, par une analyse préalable du problème, les variables qui ont une influence sur le phénomène étudié. La sélection des entrées consiste à déterminer les variables pertinentes par rapport à la grandeur à modéliser. Elle vise deux points essentiels, [Hinton (1989)] :

- Réduction de la dimension de l'espace de représentation des variables du modèle ;
- Elimination des entrées qui n'ont pas ou peu d'influence sur la sortie.

Il est important de mentionner que chaque ajout d'une variable encombre le modèle et entraîne une multiplication des paramètres du réseau. Raison pour laquelle, la représentation des entrées doit contenir tous les facteurs pertinents par rapport à la grandeur à modéliser, mais seulement ceux-ci. Dans notre cas, on a choisi comme :

- **Entrées** : ***t*** : temps de fermentation (heure) ;
  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. Une acidification anormale peut indiquer la présence d'une contamination ou un manque d'aération ;
  PAK : phénylacétate de potassium qui est un précurseur de la fermentation (g/L);
  Azote : en mg/ml.
- **Sorties :** ***Produit*** : en γ/cc.

IV.5.3. Préparation de la base de données

La base de données collectée est représentée par une matrice rectangulaire de 3366 lignes qui peut être divisé en :

- Base de données d'entrées réalisées par une matrice rectangulaire de dimension [3366,4] ;
- Base de données de sorties réalisées par une matrice rectangulaire de dimension [3366,1].

IV.5.4. Mise en forme des données

Dans cette étape, les données sont subdivisées aléatoirement en trois sous ensembles en réservant :

- 60% pour l'ensemble d'apprentissage ;
- 20% pour l'ensemble de test;
- 20% pour l'ensemble de validation.

La base de données d'apprentissage à été subdivisé en 30 sous bases d'apprentissage ayant la même dimension que la base d'apprentissage.

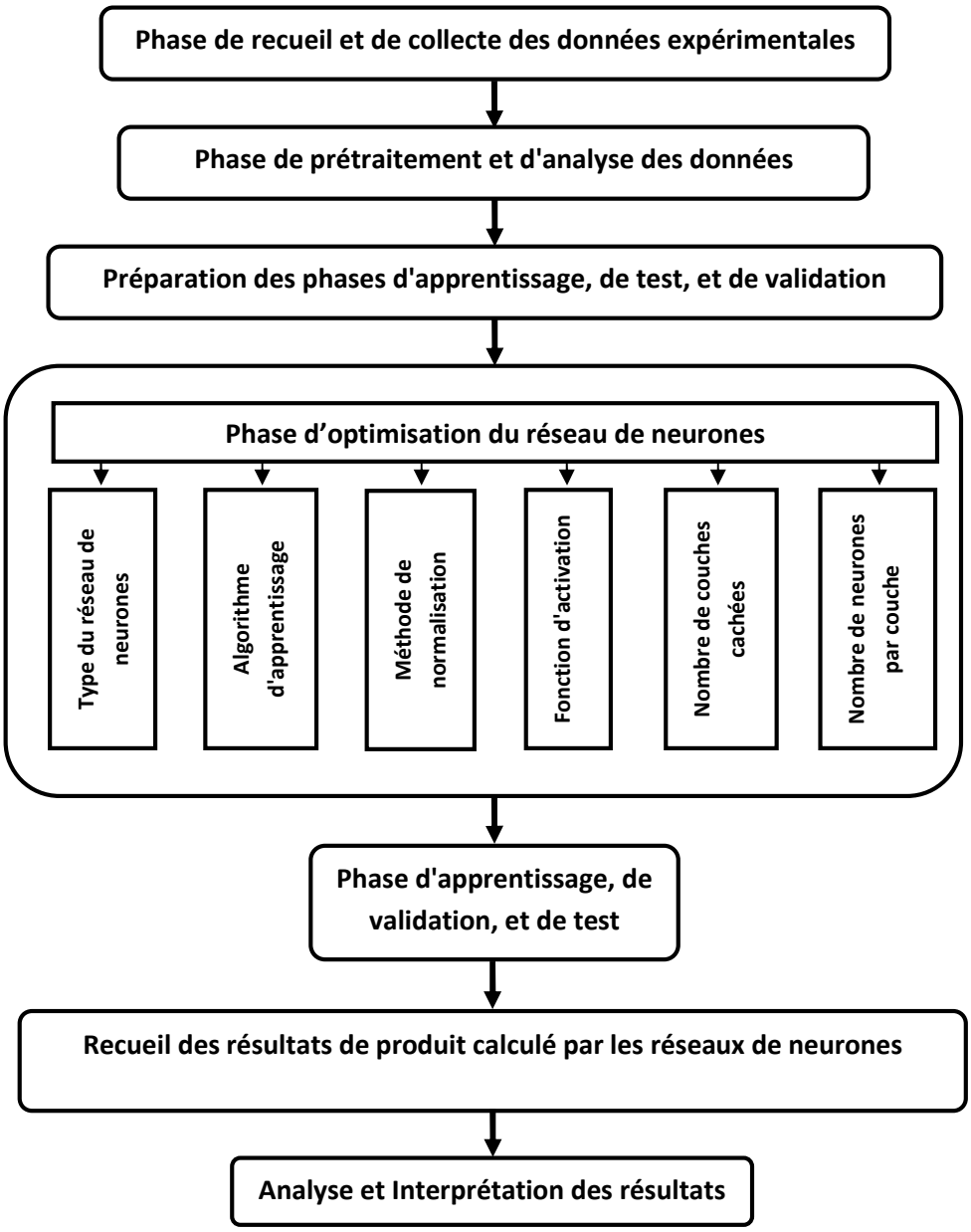


Figure IV.1. Méthodologie de modélisation par les réseaux de neurones artificiels.

IV.5.5. Conception et optimisation de chaque réseau de neurones

L'objectif principal des travaux décrits dans cette section a été réalisé pour trouver l'architecture du réseau de neurones optimale permettant de prédire la production de la pénicilline.

Un réseau de neurones tel que décrit dans le troisième chapitre est un cadre de calcul qui est inspiré par les systèmes neuronaux biologiques. Il se compose d'un certain nombre d'unités de traitement simple interconnectés appelés neurones artificiels. L'un des paradigmes les plus populaires des réseaux de neurones appliqués à la modélisation d'un large éventail de systèmes non

linéaires, en particulier des processus d'ingénieries chimiques, biologiques et environnementales, est le réseau de neurones de type feedforward (RNFF) qui est utilisé dans le présent chapitre avec un apprentissage supervisé et pour un horizon de prévision.

Un RNFF comportant une couche d'entrée avec quatre neurones (t, pH, PAK, N_2), une couche cachée avec un nombre de neurones optimisé au cours du processus d'apprentissage, et une couche de sortie avec un neurone a été conçu pour prédire production de la pénicilline.

L'algorithme d'apprentissage utilisée est l'algorithme BFGS (du nom de ses inventeurs : Broyden, Fletcher, Goldfarb et Shanno) prend implicitement en compte les dérivées secondes et s'avère donc nettement plus performante que la méthode de rétropropagation. Le nombre d'itérations est nettement plus faible et les temps de calcul réduits d'autant. Cette algorithme est très utilisée dans l'apprentissage des RNFF.

La conception et optimisation de chaque réseau de neurones a été faite par le logiciel STATISTICA, [Statistica version 8 statsoft].

IV.6. Structure des RNSO obtenus

La structure de base retenue est un perceptron multicouche à trois couches : une couche d'entrée, une couche cachée, une couche de sortie. Le tableau IV.1 récapitule les différents éléments structurels des réseaux de neurones optimaux utilisé dans la modélisation de la production de la pénicilline dont l'optimisation a durée sept jours.

Tableau IV.1. Structure des RNSO utilisés dans la modélisation.

Type du réseau	**Couche d'entrée**	**Couche cachée**		**Couche de sortie**		**Algorithme d'apprentissage**
	Nombre de neurones	**Nombre de neurones**	**Fonction d'activation**	**Nombre de neurones**	**Fonction d'activation**	
RN1	4	7	Tansig	1	Purelin	**BFGS**
RN2	4	5	Logsig	1	Purelin	**BFGS**
RN3	4	4	Logsig	1	Purelin	**BFGS**
RN4	4	5	Tansig	1	Purelin	**BFGS**
RN5	4	7	Logsig	1	Purelin	**BFGS**

RN6	4	4	Logsig	1	Purelin	**BFGS**
RN7	4	6	Logsig	1	Purelin	**BFGS**
RN8	4	6	Tansig	1	Purelin	**BFGS**
RN9	4	15	Tansig	1	Purelin	**BFGS**
RN10	4	12	Logsig	1	Purelin	**BFGS**
RN11	4	13	Logsig	1	Purelin	**BFGS**
RN12	4	7	Logsig	1	Purelin	**BFGS**
RN13	4	14	Logsig	1	Purelin	**BFGS**
RN14	4	14	Logsig	1	Purelin	**BFGS**
RN15	4	17	Logsig	1	Purelin	**BFGS**
RN16	4	16	Tansig	1	Purelin	**BFGS**
RN17	4	20	Logsig	1	Purelin	**BFGS**
RN18	4	12	Logsig	1	Purelin	**BFGS**
RN19	4	13	Expo	1	Purelin	**BFGS**
RN20	4	8	Logsig	1	Purelin	**BFGS**
RN21	4	7	Logsig	1	Purelin	**BFGS**
RN22	4	11	Tansig	1	Purelin	**BFGS**
RN23	4	13	Logsig	1	Purelin	**BFGS**
RN24	4	11	Expo	1	Purelin	**BFGS**
RN25	4	6	Logsig	1	Purelin	**BFGS**
RN26	4	13	Tansig	1	Purelin	**BFGS**
RN27	4	6	Logsig	1	Purelin	**BFGS**
RN28	4	11	Logsig	1	Purelin	**BFGS**
RN29	4	6	Tansig	1	Purelin	**BFGS**
RN30	4	8	Logsig	1	Purelin	**BFGS**

IV.7. Regroupement des réseaux de neurones

Un diagramme de réseaux neuronaux multiples est représenté sur la Figure IV.2, où plusieurs modèles de réseau neuronal ont été développés pour modéliser la même relation. Au lieu de sélectionner un seul modèle "meilleure", les réseaux neuronaux individuels sont combinés ensemble pour améliorer la précision et la robustesse du modèle. La sortie globale du réseau neuronal combiné (RNC) est une moyenne des sorties des réseaux neuronaux individuels. Ceci peut être représenté par l'équation suivante:

$$f(X) = \frac{1}{30}\sum_{i=1}^{30} f_i(X) \qquad \text{(IV.1)}$$

Où $f(X)$ est la prédiction globale et $f_i(X)$ est la prédiction du i^{ème} réseau de neurones.

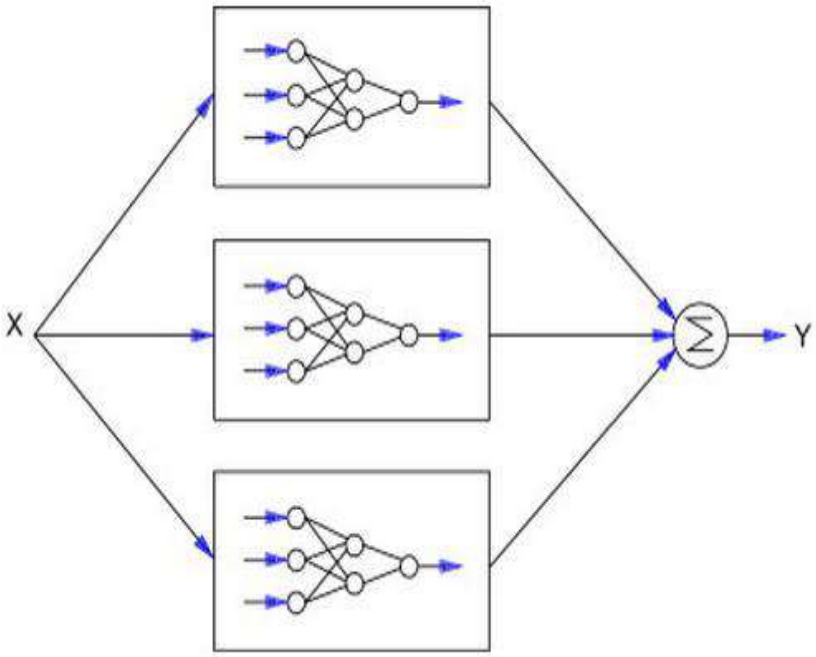
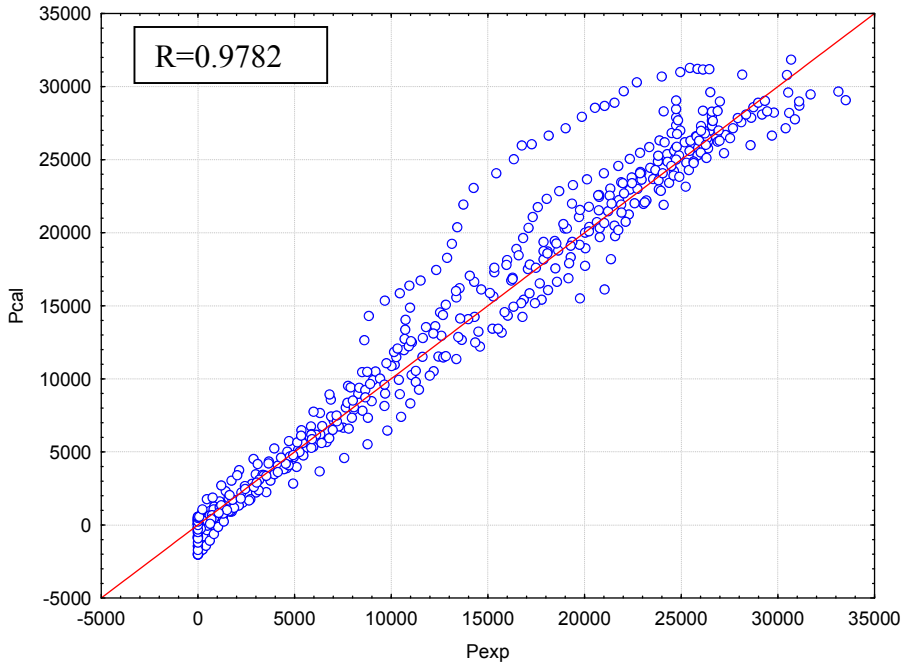


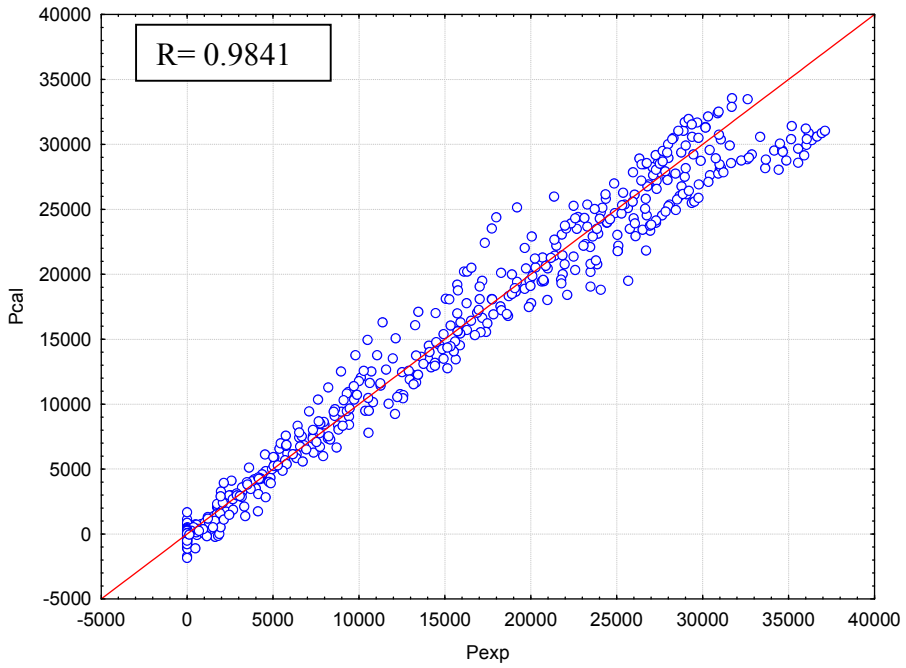
Figure IV.2. Regroupage des RN.

La figure IV.3 montre la comparaison entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées obtenues par combinaison des 30 modèles neuronaux optimisés (RNC) pour la base test et de validation. La figure IV.4 montre la comparaison entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées obtenues par le modèle neuronal singulier (RNS) pour la base test et de validation. Le tableau IV.2 rassemble les vecteurs de régression linéaire pour les deux modèles (RNC, RNS), ce tableau montre que les paramètres de régression les moins favorables sont ceux obtenus pour RNS.

Il a été prouvé que l'approche combinatoire ou multiple proposée donne des résultats satisfaisants avec des valeurs des vecteurs de régression approchant à l'idéal.

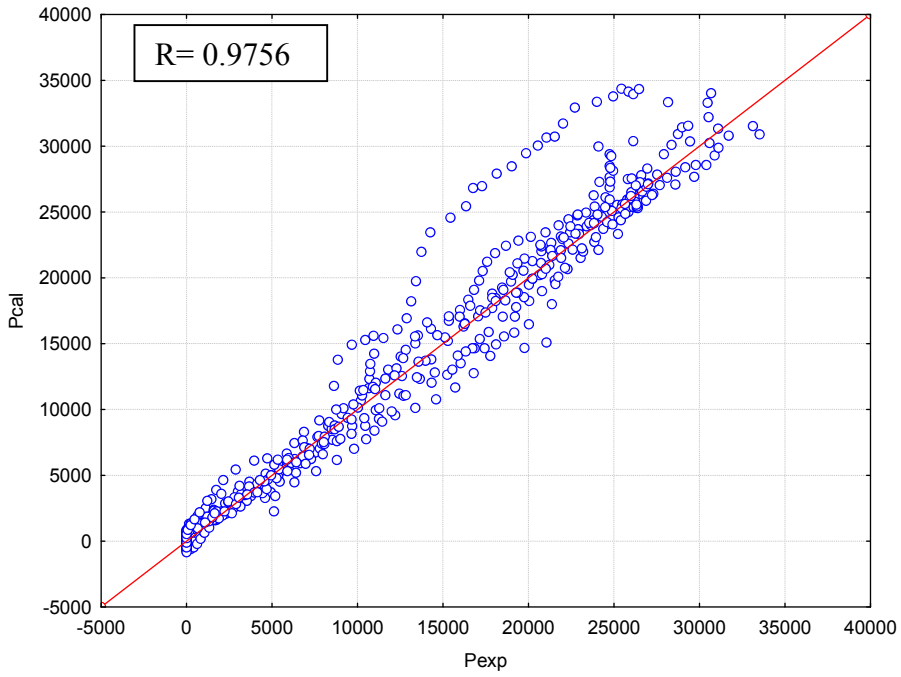


(a)

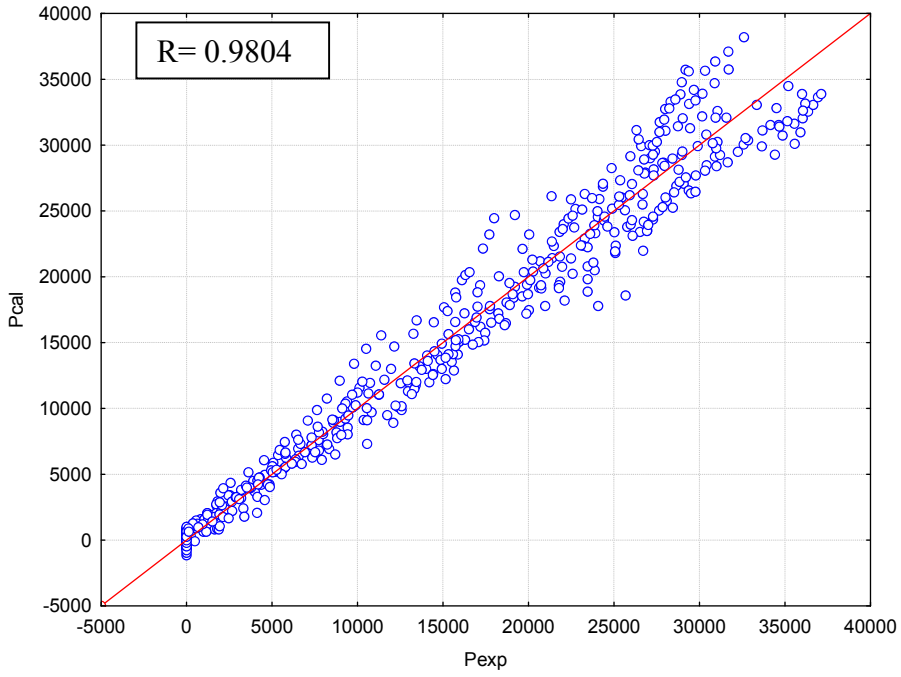


(b)

Figure IV.3. Comparaison entre les valeurs expérimentales et calculées par le RNC : **(a)** Test, **(b)** Validation.



(a)



(b)

Figure IV.4. Comparaison entre les valeurs expérimentales et calculées par le RNS : **(a)** Test, **(b)** Validation.

Tableau IV.2. Vecteurs de régression linéaire issue de l'équation linéaire : $y^{cal} = \alpha y^{exp} + \beta$, [$\alpha$ (pente), β (ordonnée à l'origine), R (coefficient de corrélation)].

		Base de test	**Base de validation**
α	**RNC**	0.93	1
	RNS	0.91	0.98
β	**RNC**	$5.1\ 10^2$	-11
	RNS	$6.9\ 10^2$	$3.6\ 10^2$
R	**RNC**	0.9782	0.9841
	RNS	0.9756	0.9804

Afin d'évaluer l'aptitude et la précision de prédiction des modèles neuronaux (multiple et singulier), la racine de l'erreur quadratique moyenne (*REQM*), l'erreur standard de prédiction (*ESP*) et le coefficient de régression (R) sont utilisées.

$$REQM = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(Y_{i,\exp} - Y_{i,pred}\right)^2}{n}} \qquad \text{(IV.2)}$$

$$ESP(\%) = \frac{REQM}{Y_e} \times 100 \qquad \text{(IV.3)}$$

$$Y_e = \frac{\sum_{i=1}^{n} Y_{i,\exp}}{n} \qquad \text{(IV.4)}$$

Où $Y_{i,exp}$ est la valeur expérimentale ; Y_e est la moyenne des données expérimentales ; n est le nombre de points expérimentaux.

Les figures IV.5 et IV.6 montrent les histogrammes des erreurs standard de prédictions (*ESP*) et des coefficients de régressions (*R*) pour la phase de validation et de test et ceux pour :

- Le réseau de neurones singulier (RNS) ;
- Le réseau de neurones combiné (RNC).

On remarque que la combinaison des RN à fait nettement diminuer les erreurs de la phase de validation et de test et à fait augmenter les coefficients de régressions. Ce même résultats à été observés dans (Zhang (2008); Ahmad et Zhang (2009); Furtuna *et al.* (2012); Tan *et al.* (2014)].

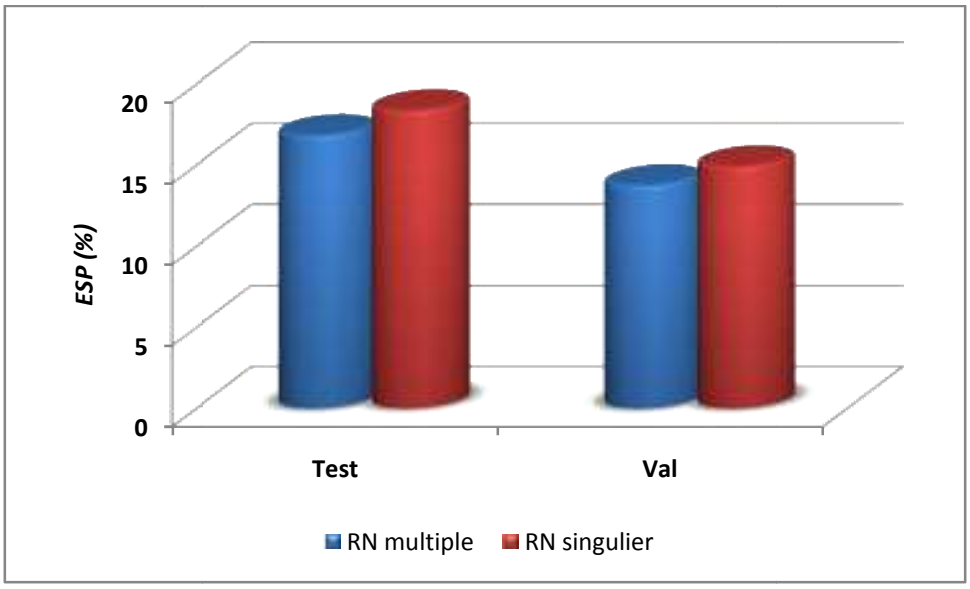


Figure IV.5. Représentation de l'*ESP*.

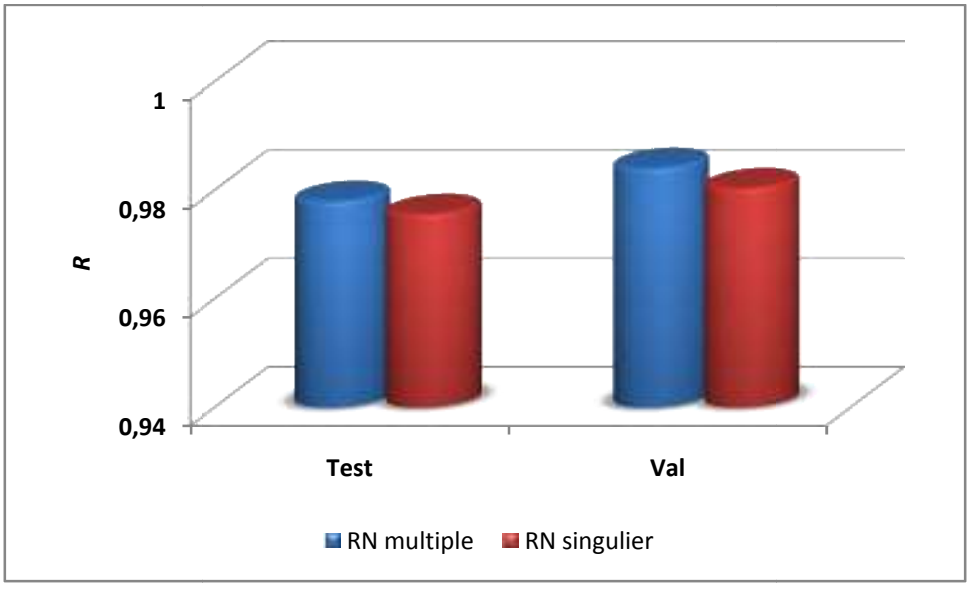


Figure IV.6. Représentation de *R*.

Conclusion générale

Conclusion générale et perspective

L'objectif de cette étude est la modélisation multiple de la biosynthèse de la pénicilline G produite par *Penicillium notatum* en mode fed-batch et en utilisons des réseaux de neurones (RN).

Notre première contribution a porté sur le développement de 30 réseaux de neurones (RN) individuels pour modéliser la production de pénicilline en fonction du temps de fermentation, *pH*, PAK et Azote. Ces modèles se caractérisent par une structure similaire : quatre neurones dans la couche d'entrée (temps de fermentation, *pH*, PAK, Azote), une couche cachée avec un nombre de neurones optimisé au cours du processus d'apprentissage et un neurone dans la couche de sortie (formation du produit).

Notre deuxième contribution à porté sur la combinaison des 30 RN individuels en prenant la moyenne des prédictions résultantes des 30 RN. La combinaison des 30 RN individuels a amélioré la précision et la robustesse de prédiction.

Les conclusions fondamentales à retenir lors de cette étude, peuvent être récapitulées comme suit :

- Les réseaux de neurones fonctionnent comme une boite noire et les paramètres du réseau (poids et biais) n'ont pas de signification physique. L'application des réseaux neuronaux ne développe pas directement la théorie de description du système, mais rend faisable la modélisation ;
- Les réseaux de neurones sont des outils statistiques, qui permettent d'ajuster des fonctions non linéaires très générales à des ensembles de points comme toute méthode statistique;
- La combinaison de plusieurs RN individuels augment la précision et la robustesse de prédiction.

En perspectives, tout en estimant avoir atteint notre objectif tracé pour cette étude, il serait intéressant de modéliser d'autres antibiotiques par les RN multiples.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

-A-

Acar J (1998). *La recherche*, 314,50.

Ahmad Z. et Zhang J. (2009). "Selective combination of multiple neural networks for improving model prediction in nonlinear systems modelling through forward selection and backward elimination." *Neurocomputing* **72**(4–6): 1198-1204.

Allchim Tech, industrial production process for potassium penicillin G (fermentation).

Aliturki S., et Yahoum M. (2005). "Etude cinétique de la fermentation de la pleuromutiline : effet de la source de carbone". Thèse de Magister, Université Dr. Yahia FARES.

Ammar M. (2007). "Mise en œuvre de réseaux de neurones pour la modélisation de cinétiques réactionnelles en vue de la transposition batch/continu ". Thèse de doctorat, Université de Toulouse.

Anonyme b (1997) La structure moléculaire de la pénicilline http://www.mendeleiev.cyberscol.qc.ca ; (consulter le 15/12/2007).

-B-

Baumgartner J. D, (1989) généralité sur les antibiotiques de type bêtalactame, pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques, ed. OPU : 665 – 674.

Bely, M., et Sablayrolles, J.IM., Barre, P., (1990). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. Journal of Fermentation and Bioengineering 70,246–252.

Benkortbi O., Hanini S. et Bentahar F. (2007). "Batch kinetics and modelling of pleuromutilin production by *Pleurotus mutilis*." *Biochemical Engineering Journal* **36**(1): 14-18.

Bergogne-Bérézin. E et Dellamonica. P (1999) – "Antibiothérapie en pratique clinique", Édition Masson : 2-13.

Bernard O. (2004). "La modélisation des systèmes biologiques : Aller-retour le long des fleuves qui circulent entre l'océan du réel et le lac des modèles ". Université de Nice-Sophia-Antipolis.

Blateyron, L., et Sablayrolles, J.M., (2001). 'Stuck and slow fermentations in enology: Statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and Diammonium phosphate. Journal of Bioscience and Bioengineering 91, 184–189.

Bideaux C. (2000). Modélisation stoechiométrique des productions microbiennes par descripteur métabolique au moyen du calcul formel. Validation sur le modèle Kluyveromyces marxianus. Thèse de doctorat, I.N.S.A. Toulouse.

Bishop C. (1995) – "Neural networks for pattern recognition", Oxford University Press.

.

Boissier Z.R, et Asselimean J, Zalta J.P (1993) – " Les antibiotiques, structures et exemples de mode D'action'' *Herman.Paris.*

Buchanan R.E. (1918) – " Life's phases in a bacterial culture". Journal of Infection Diseases. 23, 109-125.

-C-

Castro M.C. (2007). "Brettanomycesbruxellensis : Etude Métabolique, Cinétique et Modélisation. Influence des facteurs environnementaux". Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse.

Chandrashekar K., Felse A.P. et Panda T. (1999) – "Optimization of temperature and initial pH and kinetic analysis of tartaric acid production by Gluconobacter suboxydans". Bioprocess Engineering. 20, 203-207.

Chin-Han S. et Shang-Tian Y. (1990) – "Kinetic and modelling of temperature effects on batch xanthan gum fermentation". Biotechnology and Bioengineering. 37, 567-574.

Cohen Y (1990). Antibiotiques. Abrég. Pharmacol., 3eme Edition : 353-395.

Converti, A., et Bargagliotti, C., Cavanna, C., Nicolella, C., Del Borghi, M. (1996). Evaluation of kinetic parameters and thermodynamic quantities of starch hydrolyse fermentation by Saccharomyces cerevisiae. Bioprocess Engineering.

Cruz A. J. G., Silva A. S., Araujo M. L. G. C., Giordano R. C. et Hokka C. O. (1999). "Modelling and optimization of the cephalosporin C production bioprocess in a fed-batch bioreactor with invert sugar as substrate." *Chemical Engineering Science* **54**(15-16): 3137-3142.

-D-

Dames M. (2005) –"Gestion de procédés discontinus : méthodologie de modélisation et d'optimisation d'opérations de dispersion liquide-liquide en cuve agitée". Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse (France).

Delafosse A. (2008). "Analyse et étude numérique des effets de mélange dans un bioréacteur". Thèse de doctorat, Université de Toulouse.

Delaunay S, Rondags E. et Germain P. (2007) – "Production d'antibiotiques par biotechnologies". Technique de l'ingénieur, traiter génie des procédés**.**

Demeyer A., Jacob F., Jay M., Menguy G. et Perier J., (1982) – "La conversion bioénergétique du rayonnement solaire et les biotechnologies". Technique et Documentation, Lavoisier.

Derety E J. *Mol* (1999). *Structr. (Theochem)*, 459, 273.

Desai K. M., Survase S. A., Saudagar P. S., Lele S. S. et Singhal R. S. (2008). "Comparison of artificial neural network (ANN) and response surface methodology (RSM) in fermentation media optimization: Case study of fermentative production of scleroglucan." *Biochemical Engineering Journal* **41**(3): 266-273.

Doucet J F. (1998) – "Traduction de l'introduction de la première publication de Fleming sur la pénicilline", Edition Landbruksforlaget, Oslo, p. 80-82.

Dragoi E. N., Curteanu S., Galaction A. I. et Cascaval D. (2013). "Optimization methodology based on neural networks and self-adaptive differential evolution algorithm applied to an aerobic fermentation process." *Applied Soft Computing* **13**(1): 222-238.

Duval J (1989) .*classification et mécanisme d'action des agents antibactérien*, L. Le Minor, M.Véron, 2ème édition, Médecine-Science Flammarion, pp : 273 - 296.

-E-

Eddy A.A. (1982) – "Mechanisms of solute transport in selected acterial microorganisms". Adv. Microbiology and Physiology. 23, 1-78.

Edwards J.S., et Palsson B.O. (1998). How will bioinformatic influence metabolic engineering. Biotechnology and Bioengineering, 58:162 – 169.

Encyclopédie Microsoft (2008).

-F-

Feyo de Azevedo S., Dahm B. et Oliveira F. R. (1997). "Hybrid modelling of biochemical processes: A comparison with the conventional approach." *Computers & Chemical Engineering* **21, Supplement**(0): S751-S756.

Furtuna R., Curteanu S. et Leon F. (2012). "Multi-objective optimization of a stacked neural network using an evolutionary hyper-heuristic." *Applied Soft Computing* **12**(1): 133-144.

-G-

Garcia-Ochoa F., Garcia-Leon M.A. et Romero A. (1990) – "Kinetic modeling of xanthan production from sucrose". Chemical and Biochemical Engineering. 4, 15-20.

Ghasem D.N. (2007) –"Biochemical Engineering and Biotechnology"**.** Elsevier.

Gherib A (1983), ''Chimie Thérapeutique'', Office de Publication Universitaire, Alger, 1.

Guenounou O. (2009). "Méthodologie de conception de contrôleurs intelligents par l'approche génétique- application à un bioprocédé ". Thèse de doctorat, Université de Toulouse.

Guindo Amadou Yaya (2007-2008) – " Thèse : Etude prospective de la prescription et de la consommation des antibiotiques dans le centre de santé de Référence de la commune III du district de bamako ".

-H-

Hellali A. (1999) – "Pharmacologie" ; ENAG / Editions – Distribution, Alger

Hess J. (2007). "Modélisation de la qualité du biogaz produit par un fermenteur méthanogène et stratégie de régulation en vue de sa valorisation"**.** Thèse de doctorat, Université de Nice - Sophia Antipolis.

Hornik K. (1991) – "Approximation capabilities of multilayer feedforward networks". Neural Networks, Vol. 4, 251-257.

Hornik K., Stinchcombe M. et White H. (1989) – "Multilayer feedforward networks are universal approximators", Neural Networks, Vol. 2, 359-366.

Hornik K., Stinchcombe M., White H. et Auer P. (1994) – "Degree of approximation results of feedforward networks approximating unknown mapping and their derivatives", Neural Computation, Vol.6, 1262-1275.).

Hubert P. (1996). Définition du modèle. Dictionnaire français d'hydrologie, ed. Comité national français des sciences hydrologiques commission de terminologie.

http : //www.microbe-educ-org/etudiant/antibio1.html ; (consulter le 11/03/2014)

http//www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/penicilline/penicilline.htm. ; (consulter le 27/02/2014).

http://www.u444.jussieu.fr/flahault/PCEM2 Penicilline0903.pdf ;(consulter le 03 /04 /2014).

-J-

Jawatz E, Melnick L J, et Adelberz A E. (1973) – "Microbiologie Médicale ",les pressses de l'université Laval ,canada :147.

-K-

Khaouane L. (2008). "Détermination et modélisation du comportement de quelques souches productrices d'antibiotiques au niveau de la filiale antibiotical de Saidal". Thèse de Magister, Université Dr. Yahia FARES.

Khaouane L., Benkortbi O., Hanini S. et Si-Moussa C. (2013). "Modeling of an industrial process of pleuromutilin fermentation using feed-forward neural networks." *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **30**(1): 105-116.

Khaouane L., Si-Moussa C., Hanini S. et Benkortbi O. (2012). "Optimization of culture conditions for the production of pleuromutilin from *Pleurotus mutilus* using a hybrid method based on central composite design, neural network, and particle swarm optimization." *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **17**(5): 1048-1054.

-L-

Labayle D. (2001) ‘’Guide Pharmaco’’, édition lamare, Paris, 568.

Larpent-Gourgaud M. et Sanglier J.J. (1991) – "Biotechnologies, Principes et méthodes", Doin (Eds), Collection Biosciences et Techniques, Paris, 668.

Liu, S., Lin, C., Xie, L., et Cao, Z. (2003). Intrecellular pH and Metabolic Activity of long-chain dicarboxylic acid-producing yeast Candida tropicalis. Journal of Bioscience and Bioengineering. 96-4, 349-353.

-M-

Makhlouf A. (2006). "Méthodologie pour l'optimisation dynamique multicritère d'un procédé discontinu alimenté : application à la production bactérienne d'aromes laitiers». école national supérieur d'agronomie et des industries alimentaires.

Martin I., Wendt D., et Heberer M. (2004). 'The role of bioreactors in tissue engineering,' Trends in biotechnology, vol. 22, pp. 80-86.

Martinez, E. A. (1999). Estudo de parámetros do sistema contínuo de produção de xylitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Master's Thesis, FAENQUIL, Lorena-SP. Brazil.

Mcculloch W.S. et Pitts W. (1943) – "A logical Calculus for the Ideas Immanent in Nervous Activity", Bulletin of Mathematical Biophysics, 5, 115-133.

Monod J. (1942) – "Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Dir. J. Bordet. Actualités Scientifiques et industrielles". Hermann et Cie. Paris.

Milhauld. G, Pinault. L, Person. J.M, Bodin. G, Puyt. J. D, Enriquez. B et Euzeby. J (1982). Les antibiotiques École nationale vétérinaire d'Al Fort et de Nantes : 2-135.

Minsky M. et Papert S. (1988). Perceptrons : an introduction to computational geometry, MIT Press, expanded edition.

-N-

Nasr N., Hafez H., El Naggar M. H. et Nakhla G. (2013). "Application of artificial neural networks for modeling of biohydrogen production." *International Journal of Hydrogen Energy* **38**(8): 3189-3195.

Newman DJ, et Cragg GM, Snader KM (2003) Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. J. Nat. Prod. 66: 1022-1037.

-P-

Paul G. C. et Thomas C. R. (1996). "A structured model for hyphal differentiation and penicillin production using *Penicillium chrysogenum*." *Biotechnology and Bioengineering* **51**(5): 558-72.

Prescott, L., Harley, J., et Klein, D. (2003). Le métabolisme: la libération et la conservation de l'énergie. In: Boeck, d, and Larcier (Eds). Microbiologie. Bruxelles, Belgium. pp 172-203.

Prescott M., Harley J.P. et Klein D. (1995) – "Microbiologie", De Boeck Université(Eds), Bruxelles, 1014.

-R-

Raffi f., et Caillion J (1992). Réflexions sur la validité et les applications des méthodes de détermination de la sensibilité bactérienne aux antibiotiques. *La lettre de l'infectiologue, VII* (1), *Janv.*: 3-4.

Rahal S. (2005). "Approches neuronales pour l'estimation de la biomasse, le sucre et le produit durant le cycle de la fermentation des antibiotiques : la pénicilline G, le pleuromutiline et l'oxytétracyline". Thèse de Magister, Université Dr. Yahia FARES.

Ramon-Portugal F. (1995) – "Interaction de type killer entre levures : analyse cinétique, co-culture et modélisation". Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse (France).

Ravaz N. (1992) – "Croissance de populations levuriennes mixtes. Effet Killer: analyse et modélisation". Thèse de doctorat de l'institut National Polytechnique de Toulouse, France.

-S-

Sablayrolles, J. M. (1992). Importance de l'azote assimilable et de l'oxygène sur le déroulement de la fermentation alcoolique. Biologia Oggi VI (1-2). 155-160.

Sanchez, S., Bravo, V., Castro, E., Moya, A. J., et Camacho, F. (1997). The influence of pH and aeration rate on the fermentation of D-xylose by Candida shehatae. Enzyme and Microbiology Technology. 21, 355-360.

Saraceno A., Curcio S., Calabro V. et Iorio G. (2009). "A hybrid neural approach to model batch fermentation of "ricotta cheese whey" to ethanol." *Computers & Chemical Engineering* **34**(10): 1590-1596.

Savinell J.M., et Palsson B.O. (1992). Network analysis of intermediary metabolism using linear optimisation. Journal of theoritical biology, 154 :421 -454.

Scheffers, W. A. (1992). Contaminants in Baker's yeast, proceeding of the COMMET course on Microbial Contaminants. Helsinki 1991 and 1992. Ed. By M. Korhola and V. Bacstrom. Research. 7, 19-36.

Soto-Cruz O., Favela-Torres E. et Saucedo-Castaneda G. (2002) – "Modeling of growth, lactate consumption, and volatile fatty acid production by Megasphaera elsdenii cultivated in minimal and complex media". Biotechnology Prog. 18, 193-200.

Silva J. A., Costa Neto E. H., Adriano W. S., Ferreira A. L. O. et Gonçalves L. R. B. (2008). "Use of neural networks in the mathematical modelling of the enzymic synthesis of amoxicillin catalysed by penicillin G acylase immobilized in chitosan." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **24**(9): 1761-1767.

Singh A., Majumder A. et Goyal A. (2008). "Artificial intelligence based optimization of exocellular glucansucrase production from *Leuconostoc dextranicum* NRRL B-1146." *Bioresource Technology* **99**(17): 8201-8206.

Singh SB, Barrett JF (2006) Empirical antibacterial drug discovery foundation in natural products. Biochem. Pharmacol. 71: 1006-1015.

-T-

Tan C. J., Lim C. P. et Cheah Y. N. (2014). "A multi-objective evolutionary algorithm-based ensemble optimizer for feature selection and classification with neural network models." *Neurocomputing* **125**(0): 217-228.

Tompos A., Margitfalvi J. L., Tfirst E. et Heberger K. (2007). "Predictive performance of "highly complex" artificial neural networks." *Applied Catalysis, A: General* **324**(0): 90-93.

Torija, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., et MAS, A. (2002). Effects of fermentation temperature on the strain population of Saccharomyces cerevisiae. International of Food Microbiology.80, 47-53.

Touzet C. (1992) – "Les réseaux de neurones artificiels : introduction au connexionisme". Cours, exercices et travaux pratiques.

Touati M. (2004-2005). "Contribution a l'étude et a la modélisation de la cinétique de fermentation de la pénicilline gk". thèse de magister, Université de la Formation Continue de Médéa.

-V-

Venkata, R.K., Charyulu, N.C.L.N. et Karanth N.G. (1991) – "A mathematical model for the production of biosurfactants by Pseudomonas aeroginosa CFTR-6: production of biomass". Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 51, 525-538.

Verhulst P.F. (1838) – "Recherches mathématiques sur la loi d'accroissement de la population". Nouv. Mém. de l'Academie Royale des Sci. et Belles-Lettres de Bruxelles.18, 1-41.

-W-

Weiss, N., Busse, M., et Kandler, O. (1968). The origin of fermentation by-products in the lactic acid fermentation of Lactobacillus acidophilus. Arch Mikrobiol .62: 85-93.

-Y-

Yala D, et Merad A.S, Mohamedi D, Ouar Korich M.N. (2001) Classification et Mode d'action des Antibiotiques Médecine du Maghreb n°91.

-Z-

Zhang J. (2008). "Batch-to-batch optimal control of a batch polymerisation process based on stacked neural network models." *Chemical Engineering Science* **63**(5): 1273-1281.

Zhang Y., Xu J., Yuan Z., Xu H. et Yu Q. (2010). "Artificial neural network-genetic algorithm based optimization for the immobilization of cellulase on the smart polymer Eudragit L-100." *Bioresource Technology* **101**(9): 3153-3158.

Zangirolami T. C., Johansen C. L., Nielsen J. et Jorgensen S. B. (1997). "Simulation of penicillin production in fed-batch cultivations using a morphologically structured model." *Biotechnology and Bioengineering* **56**: 593-604.

Annexes

ANNEXES

Annexe 1. Composition du milieu de culture a base de riz

Dans une fiole de 3000 ml,

1.1. Composition

Riz	100 g
Solution de corne steep à 10 %	28 ml

1.2. Préparation

- Stérilisez pendant 45 min. à 121°C ;
- Incubez à 37°C pendant 24 h ;
- Stérilisez pendant 45 min. à 121°C ;
- Incubez à 37°C pendant 12 h.

Annexe 2. Composition du milieu liquide de prégermination

2.1. Composition

Liqueur de corne steep	20 g
Glucose monohydrate	12,5g
Sulfate de magnésium $7H_2O$	0,125 g
Phosphate monopotassique	0,250 g
Sulfate de sodium anhydre	1,5 g
Carbonate de calcium	2,5 g
Eau distillée q.s.p	1000 ml

2.2. Préparation

- Répartissez 1 l de la préparation dans des fioles de 3 l ;
- Bouchez avec du coton ;
- Stérilisez pendant 45 min à 121°C ;
- Ajustez le pH à 5,3.

Annexe 3. Composition du milieu de culture pré-végétative

3.1. Composition

Liqueur de corne steep à 50 %	36,00 kg
Saccharose	12,00 kg
Carbonate de calcium (très léger)	3,0 kg
Huile de soja « ou huile de lard pure »	8,1 kg
Antimousse	0,12 kg
Eau q.s.p	600 l

3.2. Préparation

- Chargez dans le réacteur 400 litres d'eau ;
- Ajoutez les produits dans l'ordre suivant : corne steep, saccharose, carbonate de calcium, huile de soja et en fin l'antimousse ;
- Complétez le volume du réacteur à 600 litres ;
- Ajustez le pH entre 6,4 – 6,5 avec 25 % (m/v) d'hydroxyde de sodium ;
- Stérilisez à 122°C pendant 20 min avec de la vapeur directe ;
- Refroidissez à 25°C ;
- Le milieu doit avoir un pH de 6,1 ± 0,1.

Annexe 4. Composition du milieu de culture de la 2ème phase

4.1. Composition

Liqueur de corne steep	516,00 kg,
Saccharose	172,00 kg
Carbonate de calcium	43,00
Huile de soja (peut être remplacée par l'huile de lard pure Z6)	116,00 l
Antimousse	1,6 l
Eau purifiée q.s.p	6800 L

4.2. Préparation

Remplissez le germinateur avec 5000 l d'eau purifiée sous agitation, ajoutez dans cet ordre :

- Liqueur de corne steep ;
- Carbonate de calcium ;
- Saccharose ;
- Huile de soja ;
- Antimousse ;
- Eau purifiée q.s.p 6800 l ;
- Le pH de la solution doit être à 4,9 ± 0,2 ;
- Ajustez le pH entre 6,4 - 6,5 avec le NaOH à 25 % (m/v) en solution aqueuse ;
- Stérilisez à 122 °C pendant 20 minutes, avec de la vapeur directement dans le
- réacteur ;
- Refroidissez à 25 ° ;
- Le milieu doit avoir un pH final de 6,1± 0,2.

Annexe 5. Composition du milieu de culture de la fermentation

5.1. Composition

Produits	g/L	Kg
Liqueur de corne steep	7	6650
Phosphate monosodique	*0,45*	*427*
Saccharose 0,88 836	*0,88*	*836*
Sulfate de sodium anhydre	0,024	23
Sulfate d'ammonium	0,488	464
PAK "solution aqueuse à 64 % p/p"	0,012	12
Hydrate de calcium	0,12	114
Carbonate de calcium	0,075	71
Antimousse	0,012	12
Eau purifiée q.s.p	1 l	95000 l

5.2. Préparation

- Stérilisez le réacteur pendant 60 minutes à 122 °C ;
- Remplissez dans le fermenteur 30 000 L d'eau purifiée, puis ajoutez les produits dans cet ordre :
- liqueur de corne steep ;
- phosphate monosodique ;
- sulfate d'ammonium ;
- hydrate de calcium ;
- glucose liquide ;
- PA K.
- Complétez le volume à 45 000 l avec de l'eau ;
- Ajoutez de l'antimousse sous agitation ;
- Complétez le volume à 73 400 l avec de l'eau ;
- Le pH normal de la solution est de 4,5 – 5,0 ;
- Ajustez le pH à 6,5 avec une solution à 25% « p/v » de NaOH.