

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

Université Constantine 1



Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Microbiologie

Mémoire présenté

En Vue de l'Obtention de Diplôme de Master en Microbiologie

Option : Biotechnologie des Mycètes.

Thème

Production de la pénicilline V et G *in vitro*
par *Penicillium chrysogenum*

Présenté par : Boukhedenna Naoual.

Merouane Ilham.

Jury de soutenance :

Présidente : Mihoubi I. (Professeur)

Université Constantine 1.

Encadreur : Lahlah F. Zohra (M.A.A)

Université Constantine 1.

Examineur : Meziani M. (M.A.B)

Université Constantine 1.

Année universitaire 2013- 2014

Remerciements

Avant toute chose, nous tient à remercier « Allah » qui nous 'a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.

Nous remercions chaleureusement notre encadreur,

*M^{elle} **Lahlah Fatima Zohra** (M.A.A). Université Constantine1, d'avoir assuré l'encadrement de notre mémoire, et de nous avoir profité de ses connaissances scientifiques .On la remercie également pour sa patience, sa disponibilité et pour ses conseils précieux.*

On tient également à témoigner nos gratitudeux aux membres de jury,

*Mme **Mihoubi I.** (Prof). Université Constantine1, d'avoir accepté de présider ce jury, qu'il trouve ici l'expression de nos profondes reconnaissances.*

*M^{elle} **Meziani M.** (M.A.B). Université Constantine1, d'avoir examiner notre mémoire, qu'elle trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.*

Nous exprimons nos vifs remerciements à tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Ce modeste travail est dédié :

À mes chers parents qui m'ont comblé d'amour et d'affection, qui m'ont toujours encouragés pour achever mes études tout en espérant voir le fruit de leurs sacrifices, que dieu les garde pour moi sains.

À mon marie qui m'a toujours encouragé.

À mes frères et mes sœurs : Ahlem, Chahra, Ahmed , Mohamed el Amine et Mour el Kouda .

À tout individus de la famille : Boukhedenna ; Boucheraf ; bezziou .

À mes très chères amies, en particulier : Siham, Ilham, Imen , Sara, Amina.

Boukhedenna Naoual

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

À mes très chers parents, qui m'ont toujours enseigné la persévérance dans mes études et qui m'ont toujours soutenu et encouragé, que dieu les protèges.

À mes frères et mes sœurs : Mouloud, Mourad, Yassin ,AbdAlkadar, Hayat, Salma, Salima, Samira et a mes nièces : Nasrin et Ayoub .

À tous les membres de la famille Merouane .

À mes très chères amies, en particulier : Abla , Siham, Amina, Radia, Kadjar, Sara, Lila et Anaba.

Ilham Merouane

Sommaire

Introduction	1
--------------------	---

Partie théorique

Chapitre I : les champignons

Introduction.....	2
1. Définition	2
2. Morphologie et organisation cellulaire.....	3
3. Écologie des champignons.....	3
4. Cycle de vie des champignons.....	4
5. Classification des champignons.....	5
5.1. Zygomycotina	5
5.2. Ascomycotina.....	5
5.3. Basidiomycotina.....	5
5.4. Deuteromycotina	5

Sous-chapitre *Penicillium*

Genre <i>Penicillium</i>	7
1. Définition.....	7
2. Caractères cultureux généraux.....	8
3. Morphologie microscopique.....	8
4. Importance du genre <i>Penicillium</i>	9
4.1. Potentiel toxigène.....	9
4.2. Pouvoir pathogène.....	9
4.3. Espèces utiles.....	10

5. <i>Penicillium chrysogenum</i>	10
5.1 Définition	10
5.2 Morphologie	11
5.3. Classification.....	12
5.4 Habitat et répartition.....	12
5.5 Intérêt industriel de <i>Physoygenum</i>	12

Chapitre II : Antibiotiques

1. Définition	13
2. Classification.....	13
3. modes d'action des antibiotiques.....	15
4. Résistance aux antibiotiques.....	16
4.1. Résistance naturel.....	16
4.2.Résistanceacquise.....	17
5. Principaux producteurs d'antibiotiques	17
6. La famille des Pénicillines.....	17
6.1.Définition.....	17
5.2. Structure chimique.....	18
5.3. Mode d'action.....	19
5. Classification de pénicilline.....	19
5.1. Pénicillines du groupe G.....	19
5.2. Pénicillines du groupe M.....	19
5.3. Pénicillines du groupe A.....	20
5.4.La phénoxy méthylpenicilline (pénicilline V).....	20

Partie pratique

1. prélèvement de la souche.....	21
2. Isolement de <i>P. chrysogenum</i>	21
3. Purification de la souche.....	21
4 .Méthodes d'identification.....	22
4.1. Aspect macroscopique.....	22
4.2. Aspect microscopique.....	22
4.2.1. Technique de coloration au bleu de lactophénoï (spores).....	22
4.2.2. Technique de scotch test (mycélium).....	23
4.2.3. Etat frais (Mycélium).....	23
5. Conservation.....	23
6. Production d'antibiotique.....	23
6.1. Préparation de l'inoculum.....	23
6.2. Mise en culture.....	24
6.3. Filtration.....	24
7. Séparation et identification.....	26
7.1. Chromatographie sur couche mince.....	26
7.2. <u>Chromatographie en phase liquide à haute performance(HPLC)</u>	27
8. Test d'antibièse.....	29
Résultat et discussion	
1. Isolement et purification.....	30
2. Identification de la souche de <i>Penicillium chrysogenum</i>	31
2.1. Aspect macroscopique.....	31
2.2 Aspect microscopique.....	31
3.Production d'antibiotique.....	33

3.1. Mise en culture.....	33
3.2. Filtration	33
4. Séparation et identification.....	34
4.1. Chromatographie sur couche mince.....	34
4.2. HPLC.....	36
5. Test d'antibiose	37
Conclusion	38

Références bibliographiques

Annexes

Summary

ملخص

Résumés

Liste des abréviations

BN :Bouillon nutritif.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

E : Echantillon.

HPLC :Chromatographie en phase liquide à haute performance.

M : Mélange entre échantillon, pénicilline G et pénicilline V.

PDA:Potato dextrose agar.

Rf: Rapport frontal.

V : Volume.

T₁ : Témoin (Pénicilline V).

T₂ : Témoin (pénicilline G).

UV: Ultra-violet.

μl : Microlitre.

μm : Micromètre.

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Les *Penicillium* producteurs des mycotoxines.

Tableau 2 : Classification de *Penicillium chrysogenum*.

Tableau 3: Principale classe des antibiotiques.

Tableau4 : Caractéristique culturaux de *P. chrysogenum*.

Tableau5: Observation microscopique de la souche *P. chrysogenum*.

Tableau6 :Résultat de la chromatographie sur couche mince.

Tableau 7 : Activité antibactérienne développée par pénicilline (G, V) sur les bactéries.

Liste des Figures

Figure 1 : Thalle filamenteux.

Figure 2 : Thalle unicellulaire.

Figure 3 : Cycle de vie des champignons.

Figure 4:Caractères du thalle de genre *Penicillium*.

Figure 5: Caractères morphologiques des *Penicillium*.

Figure 6: Morphologie macro microscopique de *Penicillium chrysogenum*.

Figure 7: Principaux sites d'action des antibiotiques.

Figure 8: Structure générale des pénicillines.

Figure 9: Protocole d'isolement de la souche et production d'antibiotique.

Figure 10: Schéma de principe d'un appareillage CCM.

Figure 11: Profile HPLC de filtrat issu de la culture liquide de *P. chrysogenum*.

Liste des Photographies

Photographie 1 : Fruit d'orange contaminé.

Photographie 2 : Filtration par filtre de silice.

Photographie 3: Souches isolées de la peau d'orange contaminée

Photographie 4 : Souches isolées sur milieu sabouraud.

Photographie 5 : Mise en culture de la souche.

Photographie 6: Filtrat contenant les molécules sécrétées dans le milieu.

Photographie 7: Chromatogramme des molécules sur la plaque CCM.

Photographie 8: Effet de pénicilline (G, V) sur *E.coli*.

Photographie 9: Effet de pénicilline (G, V) sur *Staphylococcus spp.*

Introduction

Introduction

Le terme de moisissure regroupe les champignons microscopiques filamenteux, dont quelques espèces ont un grand intérêt économique et environnemental (Diekman et *al.*, 1992 ; Diaz et *al.*, 1994).

Certaines moisissures peuvent avoir des effets bénéfiques: transformation de matières premières alimentaires, production d'antibiotiques, d'enzymes ou d'agents de flaveur, etc.

D'autres sont, par contre, nuisibles : altération des denrées alimentaires, responsables de mycoses et d'allergies et de la biosynthèse de mycotoxines. (Jayant et *al.*, 1999).

Les infections bactériennes étaient depuis l'antiquité la cause principale des mortalités (choléra, peste, tuberculose....), mais depuis 1928 le monde a changé, enfin on a une arme contre ces bactéries, un antibiotique sécrété par *Penicilliumnotatum* et *Penicillium chrysogenum* nommé la pénicilline. (Lombard, 2005).

Depuis 1940, la fabrication des antibiotiques a pris une part prédominante dans l'industrie pharmaceutique représentant près de 25 % de son chiffre d'affaires. La production de la pénicilline et de la streptomycine et de leurs dérivés constitue 60 % des antibiotiques, ces derniers sont produits généralement par les microorganismes, surtout par les actinomycètes du genre *Streptomyces*, et par les mycètes filamenteux.

Notre travail est porté sur la production de pénicilline G et V par *Penicillium chrysogenum*, et comporte les étapes suivantes :

- Isolement et purification de la souche *penicillium chrysogenum*.
- Identification macroscopique et microscopique de la souche.
- La mise en culture sur milieu liquide.
- Séparation et identification des molécules sécrétées dans le filtrat par CCM et HPLC.
- Test de l'activité antibactérienne sur les bactéries (*E. coli* et *Staphylococcus spp*).

Partie Theorique

Chapitre I : Les Champignons

I. Les Champignons

Introduction

D'après les estimations, il y a environ 1,5 millions d'espèces fongiques, le nombre de champignons dans le monde représente, après les insectes, et probablement les bactéries, des grands nombres de ressources utilisées. Parmi environ 72 000 espèces de champignons ont été décrites, approximativement 5 % des champignons du monde ont été étudiés (Hawksworth, 1991 ; Hammond, 1992 ; Rossman, 1994 ; Heywood, 1995).

Les champignons sont d'une grande importance, pas seulement en ce qui concerne la santé et l'industrie mais aussi du point de vue économique, grâce à leurs propriétés métaboliques. Ainsi, la capacité à produire des acides organiques, tels que l'acide citrique et itaconique, quelques enzymes, pigments et antibiotiques par les champignons a été exploitée (Topal, 1984).

Les champignons levuriformes sont des protistes eucaryotes qui sont dépourvus de chlorophylle. Ce sont des hétérotrophes saprophytes ou parasites essentiellement classés dans trois familles de l'embranchement des thallophytes (Girard *et al.*, 1967).

1. Définition

Les champignons sont des organismes vivants constitués en grande partie des filaments de cellules de structure simple et de quelques cellules plus spécialisées qui donneront naissance à des spores. Les champignons ont un matériel génétique confiné dans un noyau au même titre que les plantes et les animaux. Ils possèdent toutefois un certain nombre de caractéristiques qui en font un groupe à part : parois contenant de la cellulose et de la chitine, absence de chlorophylle et de mobilité (Kendrick, 1999 ; Malloch, 1997).

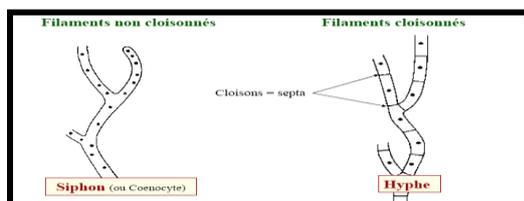


Figure 1 : Thalle filamenteux (Boiron, 1996)



Figure 2 : Thalle unicellulaire (Boiron, 1996)

2. Morphologie et organisation cellulaire

L'organisation cellulaire de base des champignons est le thalle qui constitue l'appareil végétatif. Celui-ci se caractérise par une grande variété de structure, qui va d'une forme unicellulaire (levure) possédant un seul noyau par cellule (Boiron, 1996), au plus souvent, une forme filamenteuse, constitué d'hyphes ou cellules allongées en forme de filaments tubulaires de 2 à 10 μm de diamètre.

Ces hyphes comprennent les organites classiques d'une cellule : noyau, mitochondrie, cytoplasme, vésicules. Ils peuvent être cloisonnés ou non et leur association forme le mycélium (Chabasse *et al.*, 2002) (figure 1,2).

3. Écologie des champignons

Les champignons ont développés des adaptations très diverses, de telle sorte qu'on les trouve dans pratiquement tous les milieux du monde. Les plus répandues sont les *Penicillium* et les *Aspergillus*. On les trouve sous tous les climats et sous toutes les altitudes (Florent, 1993 ; Tachenon, 1999).

Quelques espèces sont adaptées à la sécheresse, d'autres vivent au contraire dans l'eau (eaux douces, océans, ou eaux usées). Certaines supportent bien des pressions osmotiques élevées (dans les milieux très salés, ou très sucrés, par exemple) et arrivent à contaminer les salaisons, le miel, ou les confitures. Des champignons aimant la chaleur se trouvent dans les composts (à 70-75 °C) Mais on trouve aussi des champignons dans les toundras arctiques ; en haute montagne, l'hygrophore printanier se récolte à la fonte des neiges (2 °C) ; et certains champignons peuvent encore pousser dans les chambres réfrigérées (*Sporotrichum carnis*) peut altérer des viandes pourtant conservées à (- 5 °C).

Dans des conditions défavorables (froid ou chaleur intense, manque d'eau), ce sont des spores particulières qui constituent les formes de résistance (pouvant régénérer un mycélium plusieurs dizaines d'années après sa formation). Étant donné leur mode de nutrition, les champignons peuvent, à la différence des autres végétaux, pousser dans une obscurité complète (grotte). Ils peuvent aussi vivre à des profondeurs de 3200 m dans le sol (Locquin, 1984 ; Tachenon, 1999).

4. Cycle de vie des champignons

Le cycle de vie des champignons comprend deux types de reproduction :

- une reproduction asexuée, au cours de laquelle une spore ou un fragment de mycélium croît et se développe sur un substrat. Le mycélium émet des conidiophores à l'extrémité desquels des conidies sont émises puis disséminées.

- la reproduction sexuée, implique la rencontre de deux mycéliums de signes sexuels opposés. Un mycélium à n chromosomes va rencontrer un autre mycélium à polarité complémentaire pour donner lieu à la fusion des cytoplasmes, ce qui engendre un nouveau mycélium à $2n$ chromosomes. Les cycles de vie diffèrent d'un champignon à un autre selon leur type de spores (Roquebert, 2002) (Figure 3).

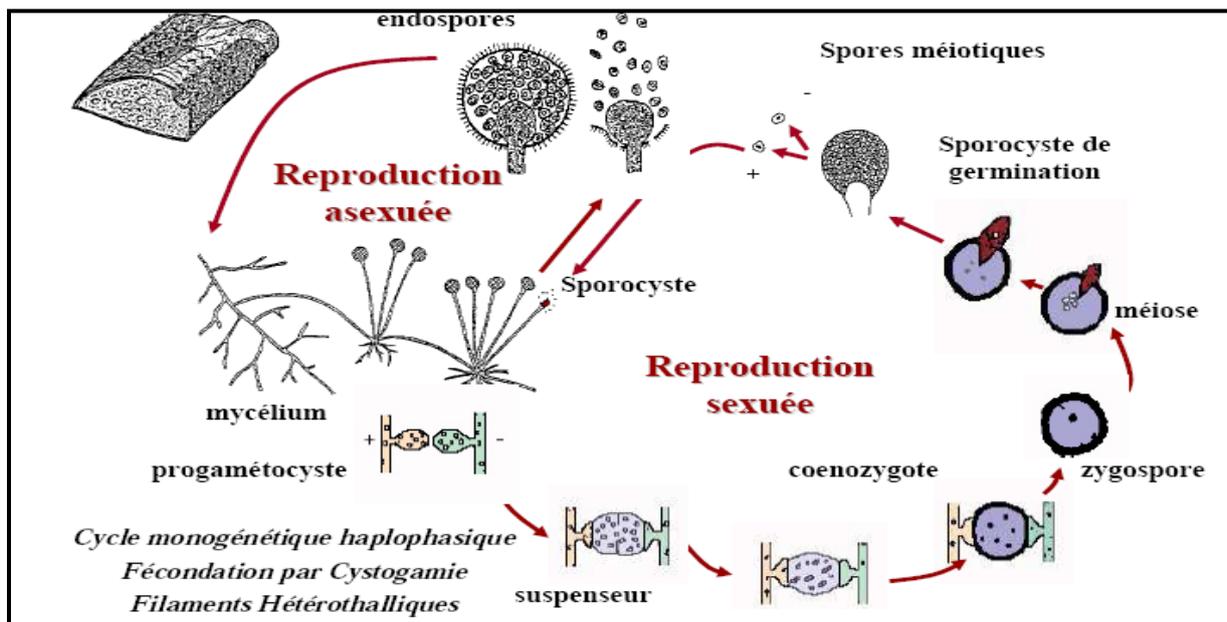


Figure 3 : Cycle de vie des champignons

5. Classification des champignons

Les champignons ont fait l'objet de classifications complexes (Barnett et al., 1972 ; Botton et al., 1990 ; Bouchet et al., 1999 ; Boiron, 2005).

Elle est divisée en quatre Sous embranchement :

5.1. Zygomycotina

Elle est présentée essentiellement par les zygomycètes, elles comprennent environ 200 espèces, rassemblent des champignons saprophytes, ainsi que des champignons parasites d'insectes (Entomophthorales), de Nématodes et d'Amibes (Zoopagales), et de plantes.

Les Zygomycètes : Ils sont caractérisés par un mycélium siphonné ou coenocytique, reproduction asexuée le plus souvent par sporocystospore, reproduction sexuée par fusion de gamétocyste.

5.2. Ascomycotina ou Ascomycète

Les Ascomycètes comprennent environ 15.000 espèces, auxquelles il faut ajouter un nombre à peu près équivalent d'espèces lichénisantes. Ils sont caractérisés par un mycélium cloisonné ou unicellulaire (levure), reproduction asexuée par des conidies, reproduction sexuée par formation de spore méiotique (ascospores) dans des asques.

5.3. Basidiomycotina ou Basidiomycète

Il existe environ 20.000 espèces, sont les champignons que l'on peut considérer comme les plus perfectionnés. Ils sont caractérisés par un mycélium cloisonné ou unicellulaire (levure), reproduction asexuée par des conidies, reproduction sexuée par formation de basidiospore dans des basides.

5.4. Deuteromycotina (Deutéromycètes)

Encore appelés Adélomycètes, ne constituent pas un groupe naturel, mais un ensemble artificiel regroupant environ 15.000 espèces (plus du quart des champignons actuellement connus).

Thalle en général cloisonné ou unicellulaire. Ne présentant jamais, ou très exceptionnellement, de forme de reproduction sexuée. La plupart présentent, néanmoins, des affinités d'Ascomycètes. Ils se reproduisent uniquement par voie végétative au moyen de spores asexuées (conidie) ou par simple fragmentation du mycélium (arthroconidie).

Les Deutéromycètes se divisent en trois classes :

- ✓ Les Blastomycètes : Levures avec ou sans pseudomycélien.
- ✓ Les Hyphomycètes : Champignons filamenteux, stériles (Agonomycétales) ou produisant leurs spores directement sur les hyphes ou sur des conidiophores simple ou agrégés (Moniliales).
- ✓ Les Coelomycètes : Conidies produites dans des pycnides (Sphaeropsidiales) ou dans des acervules (Mélanconiales).

Sous-chapitre : Penicillium

Genre *Penicillium*

1. Définition

Ce genre réunit des champignons filamenteux, appartenant au phylum des *Ascomycètes*. Ce genre comprend environ 227 espèces définies essentiellement d'après les caractères du thalle, des pénicilles et des spores (Pitt, 1988). Les *Penicillium* sont des champignons pour la plupart très communs dans l'environnement, polyphages, pouvant être responsables de nombreuses dégradations. Ils ont pour habitat naturel le sol, les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition, le compost, les céréales.

Les espèces du genre *Penicillium* se développent normalement dans des milieux où l'activité de l'eau est plus élevée que celle permettant la croissance des *Aspergillus*, à des températures plus basses. Il s'agit de contaminants fréquents des régions tempérées.

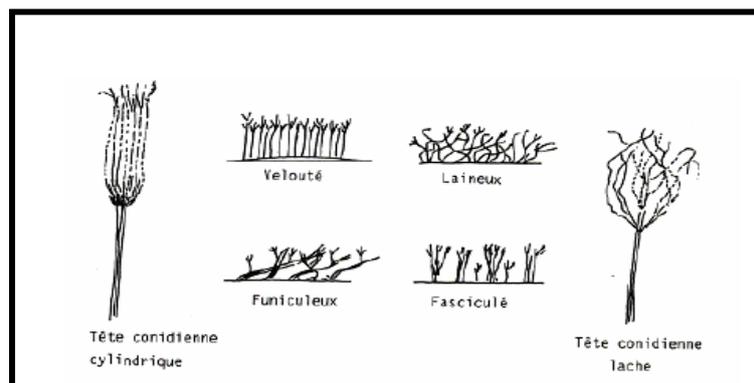


Figure 4: Caractères du thalle de genre *Penicillium* (Botton *et al.*, 1990).

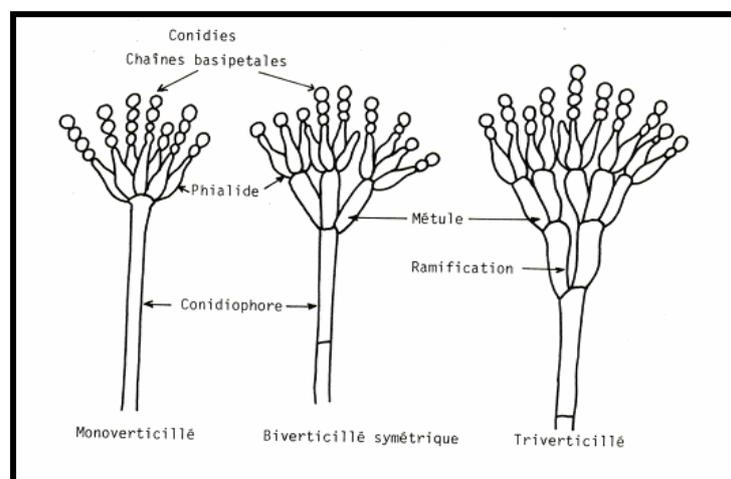


Figure 5: Caractères morphologiques des *Penicillium* (Botton *et al.*, 1990)

2. Caractères cultureux généraux

Les *Penicillium* se développent rapidement et facilement sur les milieux de culture utilisés en routine (géloses au malt, Sabouraud). Ils se développent à des températures modérées de l'ordre de 20-27°C. Après 2 jours d'incubation, on observe des petites colonies plates, formées de courts filaments aériens, habituellement blancs. Après 3-4 jours d'incubation, la sporulation va conférer aux colonies leur teinte, le plus souvent dans les tons vert, vert bleu, vert-gris, vert-jaune, gris-bleu mais aussi, pour certaines espèces, jaune, orange, chamois, rose, ou rouge. Cette couleur permet une première orientation dans l'identification d'espèces : vert-gris pour *P. citrinum*, *P. cyclopium*, *P. italicum*, vert-jaune pour *P. chrysogenum*, vert sombre pour *P. roquefortii*, *P. fellutatum*, jaune pâle, chamois pour *P. nalgiovense*, jaune vif à rouge pour *P. purpurogenum*, mélange d'orange et verdâtre pour *P. islandicum*, et blanche pour *P. camembertii*. Le revers de colonies peut être incolore, jaune, rouge, brun ou noir et parfois le pigment diffuse dans le milieu de culture (Chermette et al., 1993). Les *Penicillium* peuvent former des colonies floconneuses (*P. camembertii*, *P. nalgiovense*), funiculeuses (*P. funiculosum*), granuleuses (*P. expansum*, *P. griseofulvum*), veloutées (*P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. roquefortii*...). (Figure 4).

3. Morphologie microscopique

Au point de vue morphologique les *Penicillium* se distinguent par leur organisation en pinceau. Le thalle, formé de filaments mycéliens septés et hyalins, porte des conidiophores lisses ou granuleux, simples ou ramifiés qui se terminent par un pénicille. Les conidiophores peuvent être isolés, groupés en faisceaux lâches ou agrégés en corémies bien individualisés (Figure 5) (Botton et al., 1990).

Les phialides sont disposées en verticilles à l'extrémité des conidiophores. Les phialides peuvent être insérées directement (*Penicillium* monoverticillé) ou par l'intermédiaire d'une rangée de métules (*Penicillium* biverticillé) ; de deux rangées successives de métules (*Penicillium* triverticillé) ; parfois de trois rangées de métules (*Penicillium* quadriverticillé) sur les conidiophores. Les phialides, ampulliformes ou lancéolées, sont serrées les unes contre les autres donnant à l'ensemble un aspect de pinceau. Les phialides (cellules conidiogènes) donnent naissance à des conidies disposées en longues chaînes. Les conidies sont des spores unicellulaires, globuleuses, elliptiques, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses, hyalines, grisâtres ou verdâtres. Les caractères des pénicilles servent à la différenciation des

groupes et des espèces. Certaines espèces peuvent présenter une reproduction sexuée avec la formation d'ascocarpes (Botton *et al.*, 1990).

4. Importance du genre *Penicillium*

4.1. Potentiel toxigène

La majorité d'espèces du genre *Penicillium* (Tableau 1) sont capables de produire des mycotoxines : l'acide cyclopiazonique (*Penicillium chrysogenum*), l'acide pénicillique (*Penicillium cyclopium*) ; la patuline ou la clavacine (*Penicillium expansum*, *Penicillium griseofulvum*), la citrinine (*Penicillium expansum*), l'ochratoxine A (*Penicillium verrucosum*) (Pitt, 2000).

Tableau 1. Les *Penicillium* producteurs des mycotoxines.

Espèces de <i>Penicillium</i>	Mycotoxines produites
<i>Penicillium chrysogenum</i>	acide cyclopiazonique, roquefortine C,
<i>Penicillium citreonigrum</i>	citréoviridine
<i>Penicillium crustosum</i>	pénitrem A, roquefortine C,
<i>Penicillium expansum</i>	citrinine, patuline, roquefortine C
<i>Penicillium griseofulvum</i>	acide cyclopiazonique, griséofulvine, patuline, roquefortine C
<i>Penicillium nalgiovense</i> (<i>sin. jensenii</i>)	pénicilline
<i>Penicillium oxalicum</i>	roquefortine C, acide sécalonique D
<i>Penicillium puberulum</i> (<i>sin. lanosum</i>)	griséofulvine, acide kojique
<i>Penicillium roquefortii</i>	acide pénicillique, roquefortine C, PR toxine
<i>Penicillium rubrum</i>	rubratoxine
<i>Penicillium rugulosum</i>	rugulosine, skirine
<i>Penicillium simplicissimum</i>	acide pénicillique, verrucologène
<i>Penicillium vatiabile</i>	rugulosine
<i>Penicillium verrucosum</i>	citrinine, ochratoxine A

4.2. Pouvoir pathogène

Ces champignons sont des contaminants fréquemment isolés au laboratoire. Par contre les *Penicillium* sont très rarement incriminés en pathologie animale et humaine, parce que la température de croissance de la plupart des espèces est inférieure à 30°C (Hennequin *et al.*, 1998).

Les infections sont habituellement provoquées par l'inhalation des spores. Les premiers signes sont souvent pulmonaires. Des espèces de *Penicillium* sont responsables de kératomyose (inflammation de la cornée), d'otomyose (infection de l'oreille externe), d'onchomyose (infection des ongles) et parfois d'infections profondes (Hennequin *et al.*, 1998).

Une seule espèce, *Penicillium marneffei*, rencontrée exclusivement en Asie du Sud-Est (Chine, Thaïlande, Laos, Birmanie) a pu être isolée chez des personnes immunodéprimées, notamment les patients infectés par le HIV; cette espèce est alors responsable d'infections systémiques touchant la peau et les organes profonds (foie, rate, ganglions, os,...)(Rosenthal *et al.*, 2000).

4.3. Espèces utiles

De nombreuses espèces des *Penicillium* sont utilisées au niveau industriel pour la fabrication de fromages et salaisons ou pour la production des différents métabolites d'intérêt:

- *Penicillium camembertii* est utilisé dans la fromagerie pour la fabrication des fromages à pâte molle et croûte fleurie .
- *Penicillium roquefortii* pour l'affinage des fromages à pâte persillée ;
- *Penicillium nalgiovense* pour l'amélioration des qualités organoleptiques des saucissons ;
- *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium notatum*, *Penicillium jensenii* (*P. nalgiovense*), sont utilisés pour l'obtention de différentes substances antibiotiques (Botton *et al.*, 1990).

5. *Penicillium chrysogenum*

5.1 Définition

Les *Penicillium chrysogenum* sont des champignons filamenteux, de type moisissure. Le conidiophore ramifié possède une forme ressemblant à celle d'un pinceau. Les conidies sont disposées en longues chaînes. Le thalle est vert/blanc (www.wikipedia.org/wiki/Penicillium)

5.2. Morphologie

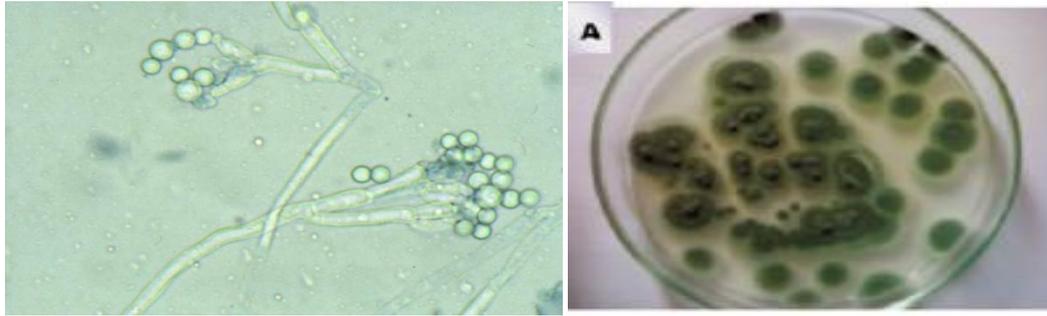


Figure 6 : Morphologie macro microscopique de *Penicillium chrysogenum*

(www.mycota-crcc.mnhn.fr)

Comme de nombreuses autres espèces du genre *Penicillium*, *P.chrysogenum* reproduit généralement en formant des chaînes sèches de spores (ou conidies) de forme de brosse conidiophores. Les conidies sont généralement portés par les courants d'air à de nouveaux sites de colonisation. Dans *P.chrysogenum* les conidies sont en bleu au bleu-vert, et le moule dégage parfois un pigment jaune.(Figure6) Cependant, *P.chrysogenum* ne peuvent être identifié sur la base de la couleur. Observations de la morphologie et des caractéristiques microscopiques sont nécessaires pour confirmer son identité et le séquençage de l'ADN est essentiel pour le distinguer d'espèces étroitement liées telles que *Penicillium rubens*. Le stade sexuel de *P.chrysogenum* a été découvert en 2013 par l'accouplement des cultures dans l'obscurité sur gélose de flocons d'avoine complété avec de la biotine, après les types d'accouplement (MAT1-1 ou MAT1-2) des souches ont été déterminées en utilisant une amplification PCR (Böhm,2013).

5.3. Classification

Tableau 2 : Classification de *Penicillium chrysogenum*

Règne	Fungi
Division	Ascomycota
Classe	Eurotiomycetes
Ordre	Eurotiales
Famille	Trichocomaceae
Genre	<i>Penicillium</i>
Espèce	<i>Penicillium chrysogenum</i>

(www.en.wikipedia.org/wiki/Penicillium_chrysogenum)

5.4. Habita et répartition

Penicillium chrysogenum est une espèce très commune dans les sols, sur les matières organiques et les denrées alimentaires. Cette espèce peut provoquer la détérioration des textiles, papiers et des produits alimentaires.

Penicillium chrysogenum est un champignon commun dans les régions tempérées et subtropicales et peut être trouvé sur les produits alimentaires salés, (Samson,2010) mais il se trouve principalement dans les environnements intérieurs, en particulier dans les bâtiments humides(Andersen,2011).(www.wikipedia.org/wiki/Penicillium_chrysogenum).

5.5. Intérêt industriel de *P. chrysogenum*

P. chrysogenum a été utilisé industriellement pour la production de pénicilline et xanthocilline X, pour le traitement des infections et la production des enzymes : polyamine oxydase,phospho-gluconate dehydrogenase, et la glucose oxydase (Raper et al., 1949 ; Hoog et al., 2000).

Chapitre II : les antibiotiques

Antibiotiques

2. Définition

Les antibiotiques se définissent comme des molécules capables d'inhiber la croissance ou même de tuer des bactéries, sans affecter l'hôte (cellules eucaryotes).

le terme antibiotique dérive de « antibiose », utilisées en 1889 par Vuillemin pour désigner les phénomènes d'antagonisme entre organismes vivants, par opposition à symbiose, et c'est Waksman qui, après 1940 a développé l'usage du nom « antibiotique », se sont des composés chimique naturels produits par les microorganismes qui ont la propriété d'inhibes la croissance, et même de détruire d'autre microorganisme et ceci à de faible concentration(Jeau et *al.*, 1973).

3. Classification

Les antibiotiques sont classés selon plusieurs critères en différent catégories :

- Origine : élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique).
- Mode d'action : paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques.
- Nature chimique : très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle β lactame) sur laquelle il y a héli synthèse.

La classification selon la nature chimique nous permet de classer les antibiotiques en familles (β - lactamines, aminosides, tétracyclines.....etc(François et *al.*, 2003)

- .Spectre d'activité :les antibiotiques peuvent spectre très large (ampicilline, céphalosporine et tétracycline), spectre moyen à prédominance sur les microorganismes gram positif (pénicilline) et à spectre étroit sur les microorganismes gram négatif (polymyxine) (Dobréva et *al.*,1990).

Famille	Antibiotiques (DCI)	Spécificité d'activité	Mode d'action
Aminosides Les aminosides sont souvent utilisés en association avec d'autres antibiotiques (β lactamines)	-Streptomycine, dihydrostreptomycine -Néomycine, Paromomycine Framycétine (voie locale). -Kanamycine, Tobramycine Dibékacine, Amikacine -Gentamicine, Sisomycine, Nétilmicine - Spectinomycine	- Cocci et bacilles à Gram+. - Cocci et bacilles à Gram-, - Mycobactéries (streptomycine, kanamycine). Les anaérobies et les streptocoques sont résistants. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Sous unité 30S du ribosome. Erreur de lecture du code génétique lors de la traduction des protéines.
Macrolides-Lincosamides-Streptogramins (MLS)	Macrolides vrais : 14atomes: Erythromycine, Oléandomycine Roxithromycine, Clarithromycine, Dirithromycine 15atomes: Azithromycine 16atomes: Josamycine, Spiramycine Midécamycine	Cocci à Gram + : Staphylocoque MRSA-, Streptocoque Cocci à Gram-: Neisseria, Moraxelles Bacilles à Gram+: <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Bacillus</i> Certains bacilles à Gram- : Campylobacter, Helicobacter, Legionella Certains anaérobies: Eubacterium, Propionibacterium Autres bactéries: <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydia</i> , <i>Borrelia</i> .	Les MLS sont des inhibiteurs de la synthèse des protéines, ils agissent au niveau de la s/unité 50S du ribosome. Ils inhibent la croissance de la chaîne polypeptidique en formation
	Lincosamides : -Lincomycine, Clindamycine (c'est le	Staphylocoque, Streptocoque. les lincosamides sont inactifs sur les entérocoques.	
	Streptogramins : Pristinamycine, Virginiamycine Quinupristine-Dalfopristine	Staphylocoque et autres Cocci à Gram+	
	Tetracyclines -Oxytétracycline ,Chlortétracycline. -Doxycycline, Minocycline -Glycylcyclines	-Bactéries à multiplication intracellulaire : Chlamydia, Brucella, Rickettsia, Mycoplasma, Borrelia, Leptospira, Pasteurella... -Bactéries à Gram+ et - : <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Francisella tularensis</i> , <i>Yersinia pestis</i>	
Phénicolés	-Chloramphénicol -Thiamphénicol	Bactéries à Gram+ et - En Algérie ils sont réservés au traitement de la fièvre typho-paratyphoïdique.	Sous unité 50S du ribosome. inhibition de la polymérase.
Oxazolidinones:	- Linézolide	Bactéries à Gram+ résistantes aux traitements habituels y compris les multi résistantes.	Ils interagissent avec l'unité ribosomale 50S et ont un mécanisme d'action non encore complètement élucidé.

Tableau 3 : Principale classe des antibiotiques.

3. Modes d'action des antibiotiques

A la différence des antiseptiques et des désinfectants, les antibiotiques agissent en général de façon très spécifique sur certaines structures de la cellule bactérienne ; cette grande spécificité d'action explique pourquoi les antibiotiques sont actifs à très faible concentration. Cette action s'exerce selon les molécules sur des sites variés (figure7) (Mevius et *al.*, 1999 ; Oxoby, 2002 ; Cuq, 2008)

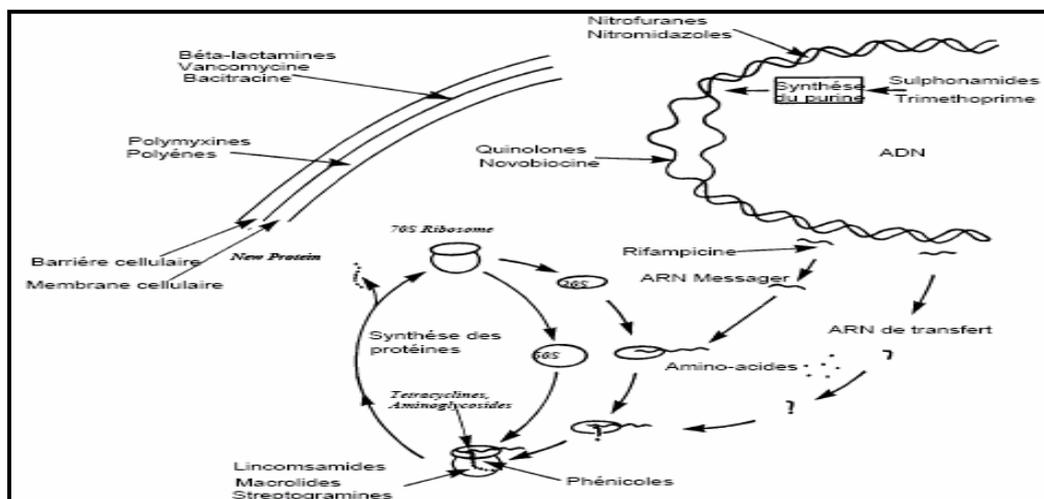
Sur la paroi bactérienne : en inhibant la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane (muréine composant essentiel de la paroi bactérienne, qui confère à la bactérie sa forme et sa rigidité ce qui lui permet de résister à la forte pression osmotique intracytoplasmique) au cours de la multiplication cellulaire, la nouvelle bactérie n'est plus protégée entraînant ainsi une lyse bactérienne.

Sur la membrane cellulaire : en désorganisant sa structure et son fonctionnement, ce qui produit des graves troubles d'échanges électrolytiques avec le milieu extérieur.

Sur les ribosomes : ce qui entraîne l'arrêt de la biosynthèse des protéines ou la formation de protéines anormales.

Sur l'ADN : en empêchant sa réplication et en inhibant la biosynthèse protéique.

Autres: en agissant tant qu'anti métabolites bactériens (c'est à dire au niveau des étapes du métabolisme intermédiaire des bactéries).



Figure

7: Principaux sites d'action des antibiotiques, (Mevius et *al.*, 1999) ;
 (Oxoby, 2002). (Puyt et *al.*, 2006). (Errecalde, 2007). (Cuq, 2008).

4. Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est un phénomène aussi ancien que l'apparition des antibiotiques. Les antibiotiques sont au départ des substances naturelles générées par des champignons mais aussi par certaines bactéries pour se défendre contre les autres bactéries.

4.1. Résistance naturelle

Les bactéries n'étant pas suicidaires, les premières qui ont appris à synthétiser des antibiotiques ont développé dans le même temps, les moyens de s'en protéger. Il s'agit de la résistance naturelle aux antibiotiques (Lozniewski *et al.*, 2010).

La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce, elle fait partie du patrimoine génétique normale du germe (Yala et *al.*, 2001). *Klebsiella* spp produit naturellement des bêta-lactamases, et les bactéries anaérobies sont naturellement résistantes aux aminosides (Smaoui, 2010 ; Lozniewski *et al.*, 2010).

4.2. Résistance acquise

A côté de la résistance naturelle, existe aussi des résistances acquises, c'est l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotiques. Ces nouveaux gènes peuvent être obtenus soit par mutation au niveau du chromosome, soit par transfert d'ADN des plasmides conjugatifs ou de transposons (Yala *et al.*, 2001 ; Summers, 2006 ; Wright, 2007).

5. Principaux producteurs d'antibiotiques

Depuis, la quête de nouveaux antibiotiques se poursuit de plus belle. Quelque 10 000 antibiotiques d'origine naturelle sont connus à ce jour, dont la majorité est issue de « simples » micro-organismes, tel que les champignons. Tous ne sont pas employés, les effets toxiques de certains d'entre eux empêchent leur utilisation en médecine humaine et vétérinaire (Gauthier, 1993 ; Lombard, 2005).

Il s'en suit que très peu d'antibiotique provient des champignons appartenant aux *Basidiomycotina* ; par contre environ (20 %) provient des champignons imparfaits *Deutromycotina* (*Penicillium*, *Cephalosporium* et *Aspergillus*) (Turner, 1975). (Demaind, 1981 ; Breton *et al.*, 1989 ; Bouchet *et al.*, 1999). En revanche, le développement de deux seulement de ces antibiotiques (la pénicilline G et la céphalosporine), notamment par le biais de leurs dérivés d'hémi-synthèse, a été tel qu'ils représentent aujourd'hui environ 60 % du marché mondial des antibiotiques (Florent, 1993).

6. Famille des Pénicillines

6.1. Définition

Les pénicillines sont des antibiotiques B-lactamines. À la base, la pénicilline est une toxine synthétisée par certaines espèces de moisissures du genre *Penicillium* et qui est inoffensive pour l'homme.

Elles n'ont été introduites pour des thérapies qu'à partir de 1941 ou 1943, treize ans après la découverte de la pénicilline G. La pharmacie allemande avait préféré pour sa part s'orienter dans la voie des sulfamidés.

Les pénicillines sont utilisées dans le traitement d'infections bactériennes, principalement contre des bactéries à Gram positif. La pénicilline (pénicilline G) fut découverte le 3 septembre 1928, concentrée et surtout nommée par le britannique Alexander Fleming.

En 1940, une équipe de recherche britannique, composée notamment du médecin et pharmacologue australien Howard Florey, du chimiste né allemand Ernst Chain et du biologiste britannique Norman Heatley, a découvert comment produire suffisamment de pénicilline pour tuer les bactéries qui infectent un organisme vivant.

(www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/florey-bio.html)

6.2. Structure chimique

Les pénicillines dérivent de l'acide 6-aminopénicillanique (6-APA). Celui-ci est constitué d'un noyau 7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0] heptane, c'est-à-dire un cycle à 4 atomes bêta-lactame fusionné avec un hétérocyclique à cinq atomes (thiazolidine). Sur ce cycle à 5 sont liés deux groupes méthyles et un groupe carboxyle. Quant au cycle à 4, il est porteur d'une fonction amine. C'est sur cette fonction amine que se lient les diverses chaînes latérales des pénicillines (par une liaison amide) (Doyle 1960)(figure 8) .

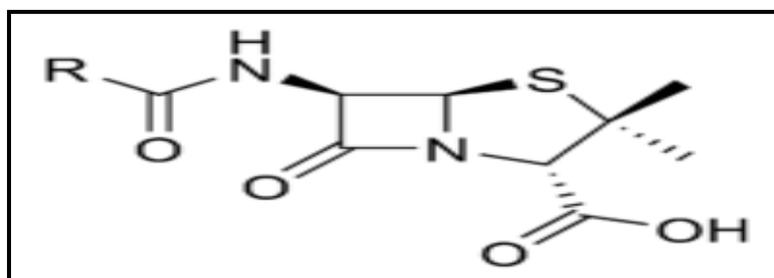


Figure 8: Structure générale des pénicillines.

(www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/florey-bio.html)

6.3. Mode d'action

Les pénicillines et les autres antibiotiques β -lactames agissent par inhibition de la formation des liens inter-peptidoglycanes dans la paroi cellulaire bactérienne. La copule bêta-lactame des pénicillines se lie à (et ce faisant inactive) une transpeptidase, laquelle enzyme devrait lier entre elles des molécules de peptidoglycane de la paroi bactérienne : ainsi la pénicilline a inhibé la synthèse de la paroi, ce qui empêche la multiplication des bactéries.

Les pénicillines tuent les bactéries contre les quelles elles sont actives (les Gram +, et quelques Gram -). Du fait de l'inhibition de la synthèse de la paroi pendant la division cellulaire des bactéries, les cellules ne sont pas complètement formées en fin de division. Les pénicillines sont donc actives sur des bactéries en multiplication (Rossi, 2004).

6.4. Classification de pénicilline

6.4.1. Pénicillines du groupe G

Spectre d'activité : bactéries à Gram positif. Sensibles aux β -lactamases.

- Benzylpénicilline (pénicilline G), action immédiate : sel sodique ; action semi retard : sel de procaïne ; action retard : sel de benzathine.
- Pénéthacilline (ester basique et lipophile dérivé de la pénicilline G qui favorise la distribution intracellulaire et l'élimination mammaire).

6.4.2. Pénicillines du groupe M

Spectre d'activité identique à celui de la benzylpénicilline mais étendu aux staphylocoques producteurs de β -lactamases.

Résistantes aux pénicillinases staphylococciques.

Sel sodique d'action brève réservée au traitement des mammites en cours de lactation, sel de benzathine à action prolongée réservée au traitement des mammites hors lactation) :

- Oxacilline et Cloxacilline (sels sodique ou de benzathine),
- Dicloxacilline et Nafcilline (sels sodique).

6.4.3. Pénicillines du groupe A

Spectre d'activité élargi aux bactéries à Gram négatif. Résistantes aux pénicillinases des bactéries à Gram négatif mais sensibles aux pénicillinases staphylococciques : Ampicilline, Amoxicilline.

6.4.4. La phénoxy méthyl pénicilline (pénicilline V)

La pénicilline V est la forme orale de la pénicilline. Sa molécule diffère de celle de la pénicilline G par le remplacement du groupe benzyle par un groupe phénoxy méthyle.

Elle se fixe sur les PLP1 (protéines de liaisons aux pénicillines)
Son élimination est urinaire.

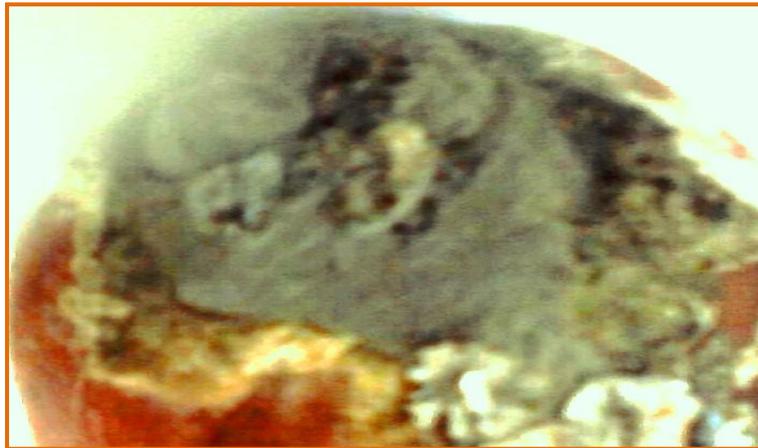
Elle n'est plus le traitement de référence de l'angine à Streptocoque bêta-hémolytique du groupe A depuis les recommandations de 2005, la pénicilline A lui étant désormais préférée en raison d'une plus grande fréquence de pénicillinases bactériennes rendant la pénicilline V inefficace dans cette indication (Gogny et *al.*, 2001)

Partie Pratique

Cadre de travail

Ce travail a été initié et réalisé dans les laboratoires de la Faculté des Sciences de la nature et de la vie de l'Université Constantine1.

1. Prélèvement de la souche



Photographie 1 : Fruit d'orange contaminé.

Prélèvement de la souche est effectuée à partir des fruits d'oranges contaminés dans un sac en plastique bien fermé pour un duré de 20 jours à température ambiante (25°C).

2. Isolement de *P. chrysogenum*

Un inoculum est prélevé de la peau des fruits d'orange contaminés à l'aide d'une anse de platine stérile, puis transféré sur milieu solide PDA (Potato dextrose agar) dans des boites de pétri par la méthode des stries. Les boites sont incubées à 30°C Pendant 15 jours.

3. Purification de la souche

Les colonies développées sur le premier milieu (PDA) sont repiquées sur milieu sélectif sabouraud, puis incubées à 30°C pendant 15 jours.

Après l'incubation les souches pures sont ensuite transférées sur bouillon nutritif (BN) spécifique dans des tubes à essai, puis incubées à 30°C pendant 7 jours, les tubes sont conservés à 4°C selon la méthode de Sansonette (1930).

4. Méthodes d'identification

L'identification des moisissures fait essentiellement appel aux caractères cultureux (Identification macroscopique) et à la morphologie (identification microscopique), rarement à des propriétés biochimiques (Botton et *al.*, 1999).

4.1. Aspect macroscopique

L'observation macroscopique permet de déterminer les caractères cultureux suivants : la vitesse de croissance, la texture et la couleur du thalle, la couleur du revers de la culture et l'odeur et l'aspect (Harrigan et *al.*, 1976 ; Rinaldi et *al.*, 1998 ; Botton et *al.*, 1999).

4.2. Aspect microscopique

Les moisissures isolées sont soumises à une identification morphologique réalisée par une étude microscopique. Ce type d'identification est fondé essentiellement sur l'étude morphologique de mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation,...) et des spores (forme, couleur, texture des parois,...) (Harrigan et *al.*, 1976 ; Oteng-Gyang, 1984 ; Guiraud, 1998).

Ce dernier est étudié par différents techniques :

- Coloration au bleu de lactophénol (spores).
- Technique de scotch test (mycélium).
- Etat frais (Mycélium).

4.2.1. Technique de coloration au bleu de lactophénol (spores)

Cette technique est effectuée par un prélèvement d'un petit fragment de souche à l'aide d'une anse de platine stérile. Ce fragment est ensuite transféré sur une lame, en lui ajoutant comme diluant du lactophénol-bleu puis recouvert avec une lamelle, flambé rapidement la lame, et on ajoute une goutte de huile de vaseline, l'observation microscopique est réalisée au grossissement (x10, x40, x100) (Jean, 2013).

4.2.2. Technique de scotch test (mycélium)

Couper un morceau de ruban adhésif transparent de 1,5 cm de long en évitant absolument de laisser ses empreintes sur la face adhésive. Utiliser la pince pour le manipuler, appliquer la face adhésive sur la colonie de moisissures, Poser le morceau de ruban sur la lameet examinée au microscope optique a différents grossissements x10, x40, x100 (www.microbiologie-medicale.fr).

4.2.3. Etat frais (Mycélium)

Déposer une petite goutte d'eau stérile sur la lame, prélever une petite goutte de bouillon contenant un fragment mycélien à l'aide d'un pipete pasteur stérile, Faire une suspension homogène dans la goutte d'eau, recouvrir d'une lamelle en évitant d'enfermer des bulles d'air, Observer rapidement à l'objectif (40et 100).

5. Conservation

Les moisissures sont conservées par la méthode la plus simple et la plus communément Utilisée au laboratoire qui consiste à repiquer ces souches à L'aide de l'anse de platine stérile à la fin de leur croissance en tubessur gélose inclinée (Botton et *al.*,1999), en utilisant comme milieu de conservation le sabouraud. Après une semaine d'incubation à 30°C, les cultures sont conservées à 4°C(Botton et *al.*, 1999).

6. Productiond'antibiotique

6.1. Préparation de l'inoculum

On prélève une aliquote de colonie de *P. chrysogenum*, et on le fait transféré dans des tubes à essais de 5mlcontenant le bouillon spécifique.

L'incubation se fait à 30°C, pendant 7jours.

6.2. Mise en culture

Le contenu d'un tube à essais contenant la suspension microbienne est transférée vers un flacon de 500 ml contenant 250 ml de bouillon nutritif, puis incubé à 30 °C pendant 7 jours.

6.3. Filtration

La filtration est une technique qui consiste à faire passer un liquide à travers un filtre dont les pores ont un diamètre de 0,2 μm . Les micro-organismes sont trop gros et sont donc retenus par le filtre.

Cette technique est intéressante lors d'utilisation des produits thermolabiles comme certains antibiotiques(www.biotechno.fr/IMG/pdf/4986249-Manuel-de-travaux-pratiques-de-microbiologie.pdf).



Photographie 2 : Filtration par filtre de silice.

Après 7 jours d'incubation le contenu des flacons est homogénéisé à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 20 minutes à la vitesse maximale en présence de barreau magnétique, et filtré sur papier filtre N°1, puis sur filtre de silice. Après cette étape le filtrat est conservé à 4°C.

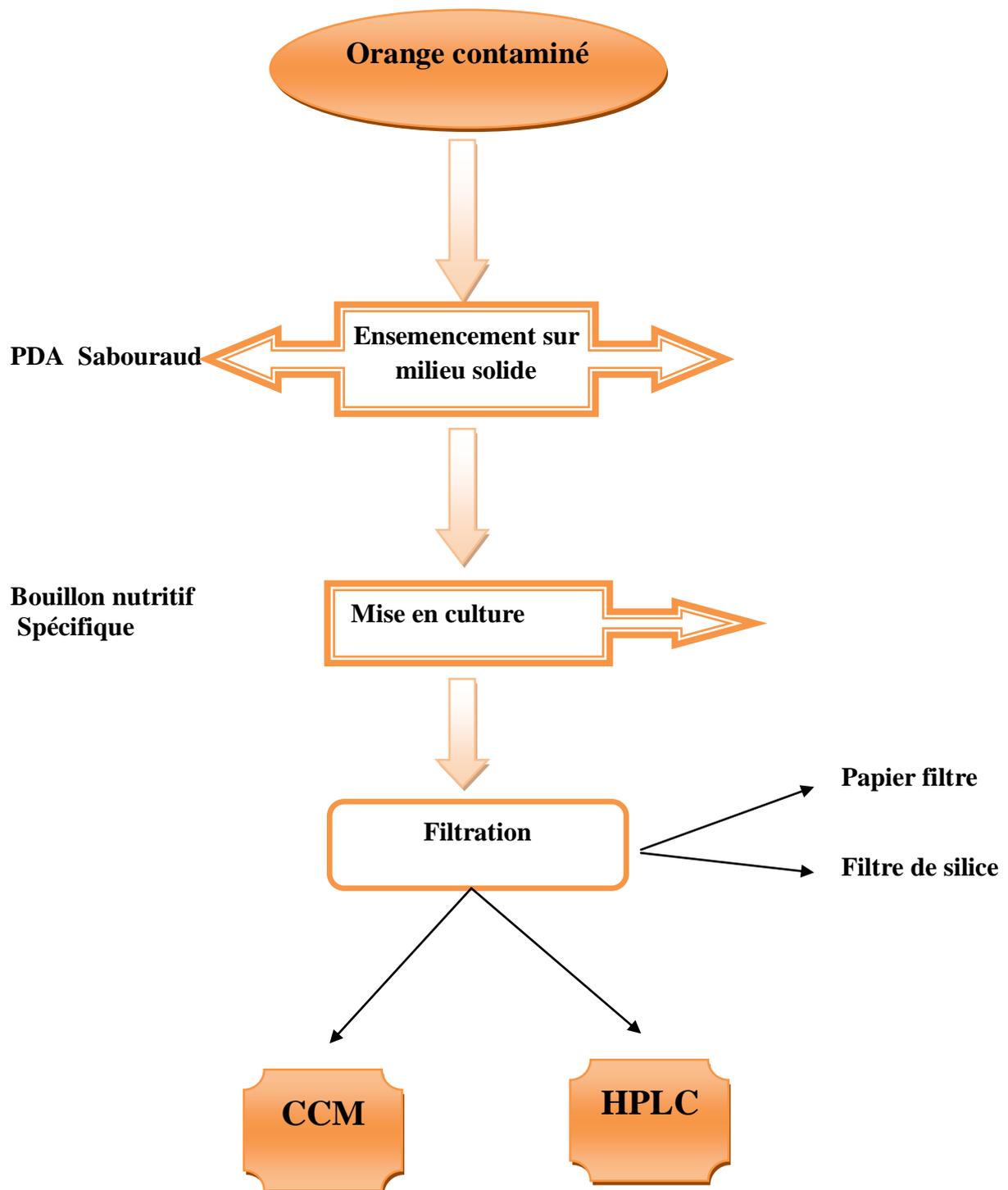


Figure9 : Protocole d'isolement de la souche et production d'antibiotique.

7. Séparation et identification

7.1. Chromatographie sur couche mince

La Chromatographie sur Couche Mince ou CCM est une méthode analytique couramment utilisée dans les laboratoires pour la séparation et l'identification rapide des constituants d'un extrait donné.

Pour réaliser une chromatographie, on utilise:

- un solvant ou un mélange de solvants appelé éluant ou phase mobile

Les systèmes de solvants utilisés sont :

Méthanol/chloroforme/acide acétique (60 /10 /30).

Chloroforme/ méthanol (96 /4).

Butanol/acide acétique/eau (1 /1 /1).

- Un support solide fixe appelé phase fixe:

Une bande de papier Whatman N°1.

Une plaque de CCM.

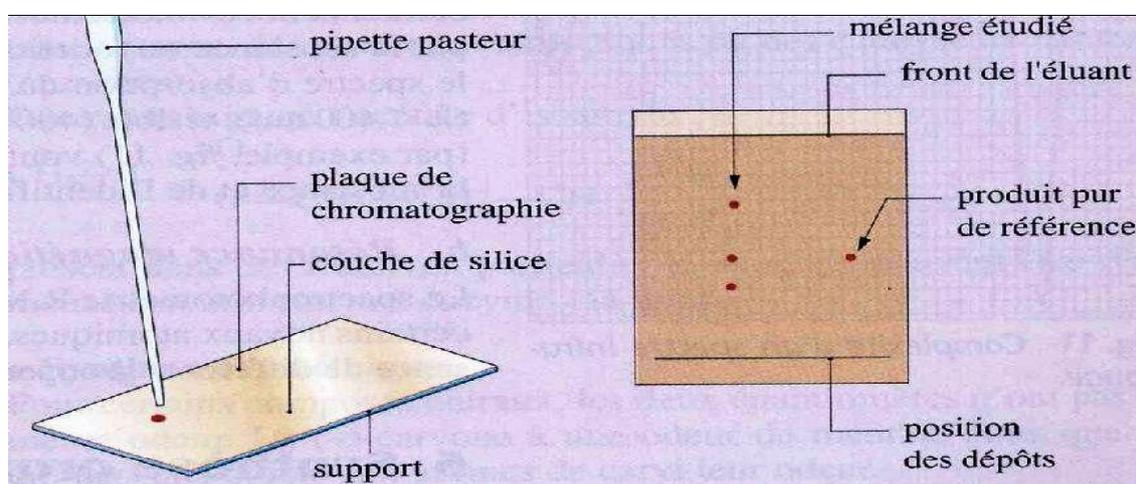


Figure 10: Schéma de principe d'un appareillage CCM.

Etapes à suivre :

- ❖ Tracer avec un crayon de papier un trait horizontal : c'est la ligne de dépôt. Ce trait ne doit pas tremper dans le solvant contenu dans la cuve. Tracer sur cette ligne des croix régulièrement espacées. Inscrire sous chaque croix un code pour se souvenir de l'espèce déposée. Exemple : E (échantillon), T₁ (pénicilline V dilué en méthanol), T₂ (pénicilline G dilué en méthanol), M (mélange de échantillon, pénicilline V, pénicilline G).
- ❖ A l'aide de pipette pasteur, déposer une microgoutte des produits à analyser, ensuite, tremper verticalement le plaqué dans l'éluant, en faisant bien attention à ce que la ligne de dépôt soit au dessus du niveau de l'éluant, fermer la cuve et observer attentivement .
- ❖ Quant l'éluant a fini de migrer, après la migration et séchage, la plaqué est pulvérisée par la ninhydrine (est également utilisée comme révélateur pour la [chromatographie sur couche mince](#) (CCM) dans le cas d'une analyse protéique). Puis séché à l'étuve quelques minutes.

7.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie en phase liquide à haute performance le plus fréquemment nommée par l'abréviation anglaise HPLC (High performance liquid chromatography) depuis les années 1990, est une technique de séparation analytique en fonction de l'hydrophobicité et préparative des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés.

L'échantillon à analyser est poussé par un liquide (appelée phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie (« grains » sont de très petite taille). Le débit d'écoulement de la phase mobile est élevé ce qui entraîne une augmentation de la pression dans le système. Ce débit élevé diminue le temps nécessaire pour séparer les composants le long de la phase stationnaire. La fine granulométrie de la phase stationnaire permet une meilleure séparation des composants. En effet, pour un même volume de phase stationnaire la surface d'échange augmente si les « grains » qui la composent sont de diamètre

Plus petit. Les pics obtenus via un détecteur à UV, les protéines absorbent à (275-280nm) relié à un système d'intégration et de calcul) sont plus étroits donc la résolution est améliorée (les pics sont bien séparés, on peut donc bien les différencier), le seuil de détection est également plus bas(Cuq, 2007).

En à réalisé les études quantitatives et qualitatives par méthode HPLC selon les conditions deVydac (1998):

- Colonne: C18.
- Éluant:eau/acétonitrile/ acide acétique glacial(64.425/35/0,575) v /v /v.
- Débit:1,0 ml/min.
- Échantillons:
 - * Mélange de standards de pénicillineGetla pénicillineV(2,5mg /ml).
 - * Standard 1 : pénicillineV (Orapen) dilué dans le méthanol.
 - *Standard 2 : pénicillineG (Gectapen) dilué dans le méthanol.
 - *Echantillon : filtrat de la culture liquide de *P. chrysogenum*.
- Volume d'injection: 10µl.
- Détection:absorbance UV à254 nm.

8. Test d'antibiose

L'activité antibactérienne est recherchée dans le filtrat suivant la technique des puits. Des boîtes de pétri contenant une couche de gélose nutritive d'une épaisseur de 4mm, est préparée avec les bactéries tests : *E. coli*, *Staphylococcus spp*, après un séchage de 5 min, la gélose est perforée avec un cylindre en cuivre stérile de 4mm de diamètre. Les puits préparés sont prêts pour recevoir un volume de (0.5 ml) du filtrat. Les boîtes sont, ensuite, incubées à 37 °C.

La mesure des zones d'inhibition autour des puits est effectuée après 17 h à 24 h d'incubation (Tortorano *et al.*, 1979).

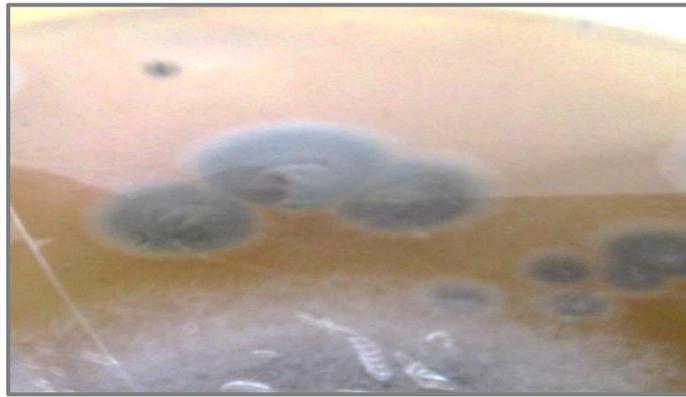
Selon Pereira. (2006), la zone d'inhibition doit être égale ou supérieure à 10 mm, pour Seokwon *et coll.*(2006), elle est supérieure à 6 mm.

Résultat et discussion

Résultat et discussion

1. Isolement et purification

Afin d'atteindre notre objectif (isolement des champignons producteurs d'antibiotique), on a limité notre étude sur le genre *penicillium* responsable de la contamination des fruits de citron et d'orange.



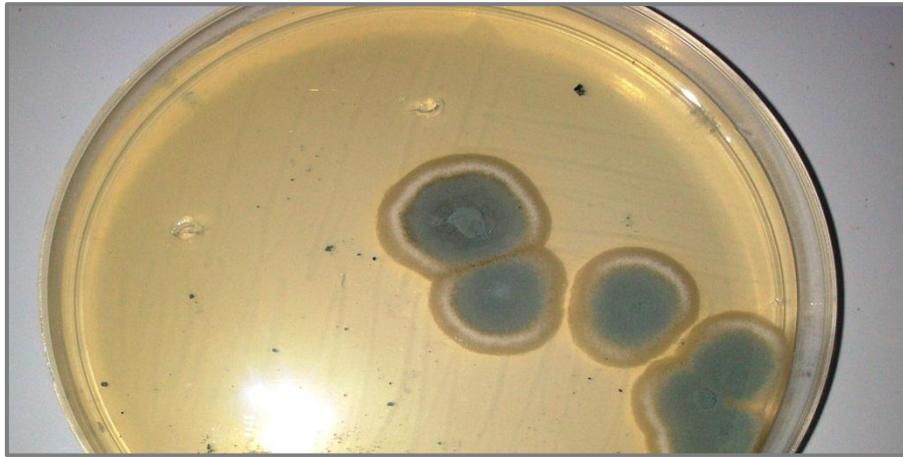
Photographie 3: Souches isolées de la peau d'orange contaminée.

Selon Botton et coll. en(1999) l'isolement par méthode des stries sur milieu PDA traité à la gentamycine réduit considérablement l'apparition des bactéries dont principalement (*Staphylococcus sp*, *E. coli*), et des colonies levuriennes, et on a obtenu comme résultats le développement de deux souches fongiques l'une d'une couleur vert bleuté et l'autre d'une couleur blanchâtre.

Les petites colonies filamenteuses de couleur vert apparues ont été prélevées de l'Agar blanc et repiquées sur le milieu sabouraud. Le développement des colonies sur ce milieu reflète sa richesse en éléments nutritifs indispensables. Cette opération est suivie par des repiquages successifs sur milieu sabouraud a permis d'obtenir la souche de *Penicillium* à l'état pur.

2. Identification de la souche de *Penicillium chrysogenum*

2.1.Aspect macroscopique



Photographie4 : Souches isolées sur milieu sabouraud.

Tableau4 : Caractéristique culturaux de *P. chrysogenum*

Souche	Couleur	Forme	Conteur	Consistance	Opacité	Diamètre
<i>P. chrysogenum</i>	Vert bleuté	circulaire	Blanc et irrégulier	Sèche	opaque	17-27 (mm)

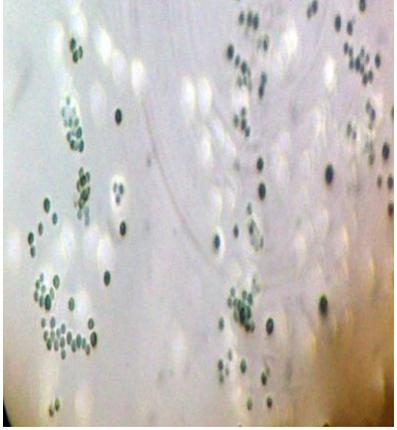
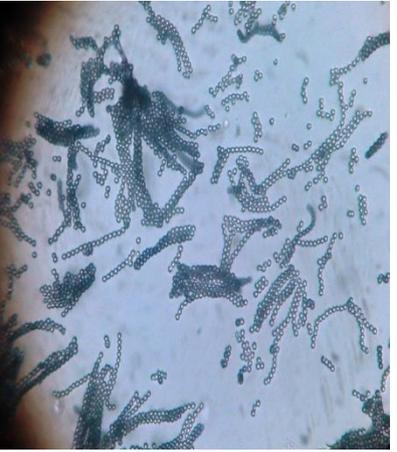
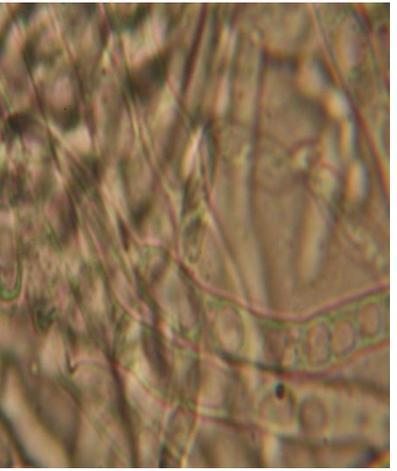
Les *Penicillium* se développent rapidement et facilement sur les milieux de culture utilisés en routine (PDA, Sabouraud), on observe des petites colonies de couleur vert bleuté, circulaires, avec un contour blanc, selon Prakashet Coll.(2011), tous les *Penicillium spp* ont une couleur vert bleuté avec un contour blanc, il s'agit dans notre cas de *P. chrysogenum*.(photo 4).

La colonie atteint un diamètre de 17-27 mm après 7 jours d'incubation donc la vitesse de croissance est lente.

2.2 Aspect microscopique

L'identification de la souche comme étant *P. chrysogenum* repose sur l'observation microscopique qui révèle que *P. chrysogenum* se reproduit généralement en formant des chaînes sèches de spores (ou conidies) sous forme de brosse conidiophores, il se caractérise par un thalle clair à croissance rapide.(Bohm ,2013).

Tableau5: Observation microscopique de la souche *P. chrysogenum*.

Technique	Aspect microscopique obtenu (x100)	Caractéristiques microscopiques
Technique de coloration au bleu de lactophénol		-les conidies unicellulaires disposées en chaines basipètes, rondes, vertes, lisses.
Technique de scotch test (mycélium+spore)		<p>-les hyphes septés, portent des conidiophores simples et les phialides sont disposés en verticilles à l'extrémité des conidiophores.</p> <p>-les conidies unicellulaires disposées en chaines basipètes, rondes ou ovoïdes, vertes, lisses.</p>
l'état frais(mycélium)		- les filaments mycéliens septés

3. Production d'antibiotique

3.1. Mise en culture



Photographie 5 : Mise en culture de la souche.

La culture en mode clôt a donné après 7 jours d'incubation, une production importante qui se traduit par l'apparition d'un trouble intense dans le récipient d'incubation indiquant le développement de la souche et sécrétion d'antibiotiques. (Photo 5).

3.2. Filtration

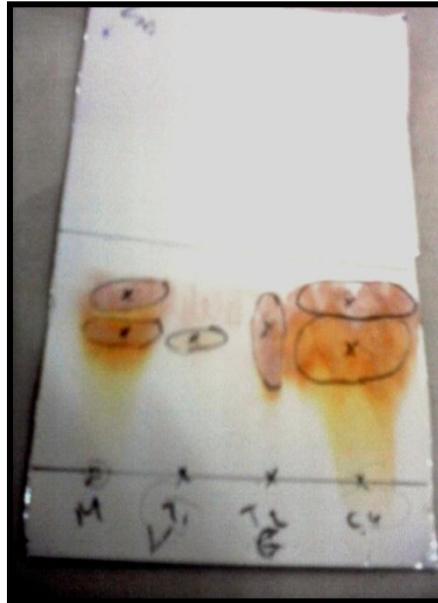


Photographie 6 : Filtrat contenant les molécules sécrété dans le milieu

Après la filtration on à obtenu un filtrat qui contient sauf les molécules sécrétées dans le bouillon et un culot contenant des impuretés. Le filtrat est ensuite conservé au frigo à 4 °C. (Photo6).

4. Séparation et identification

4.1. Chromatographie sur couche mince



Photographie 7 : Chromatogramme des molécules sur la plaque CCM.

Tableau 6 : Résultat de la chromatographie sur couche mince

	Echantillon		T ₁ (pénicilline V)	T ₂ (pénicilline G)	Mélange	
	orange	violet	orange	violet	orange	violet
Couleur des taches						
Distance (cm)	1.9	2.7	1.9	2.42	1.9	2.5
Rf	0.43	0.61	0.43	0.55	0.43	0.56

On a choisi le système 3 qui a donné une bonne séparation :

- Système : butanol/acide acétique/eau (1 / 1 / 1).

On a observé l'apparition de deux taches : Une tache violette on parallèle à la T₂ (pénicilline G) et une tache orange on parallèle à la T₁ (pénicilline V).

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Pohland et coll. (1970) qui ont montré que les mycètes sont, en premier, des producteurs des substances antibactériennes (antibiotiques). De même le système solvant utilisé dans l'extraction et l'élution s'avérait efficace d'autre part(photo7).

Le tableau montre que l'échantillon à contenu les même types des molécules que les témoins Avec des Rf égal à 0.43 et 0.55 cm,qui sont presque les mêmes Rf des témoins (T₁ et T₂). Donc notre échantillon contient la pénicilline V et la pénicilline G, les produits de *P.chrysogenum*. Selon Fierro et coll. (1995),*P.chrysogenum* produit plusieurs types de la pénicilline y compris la pénicilline G et V.

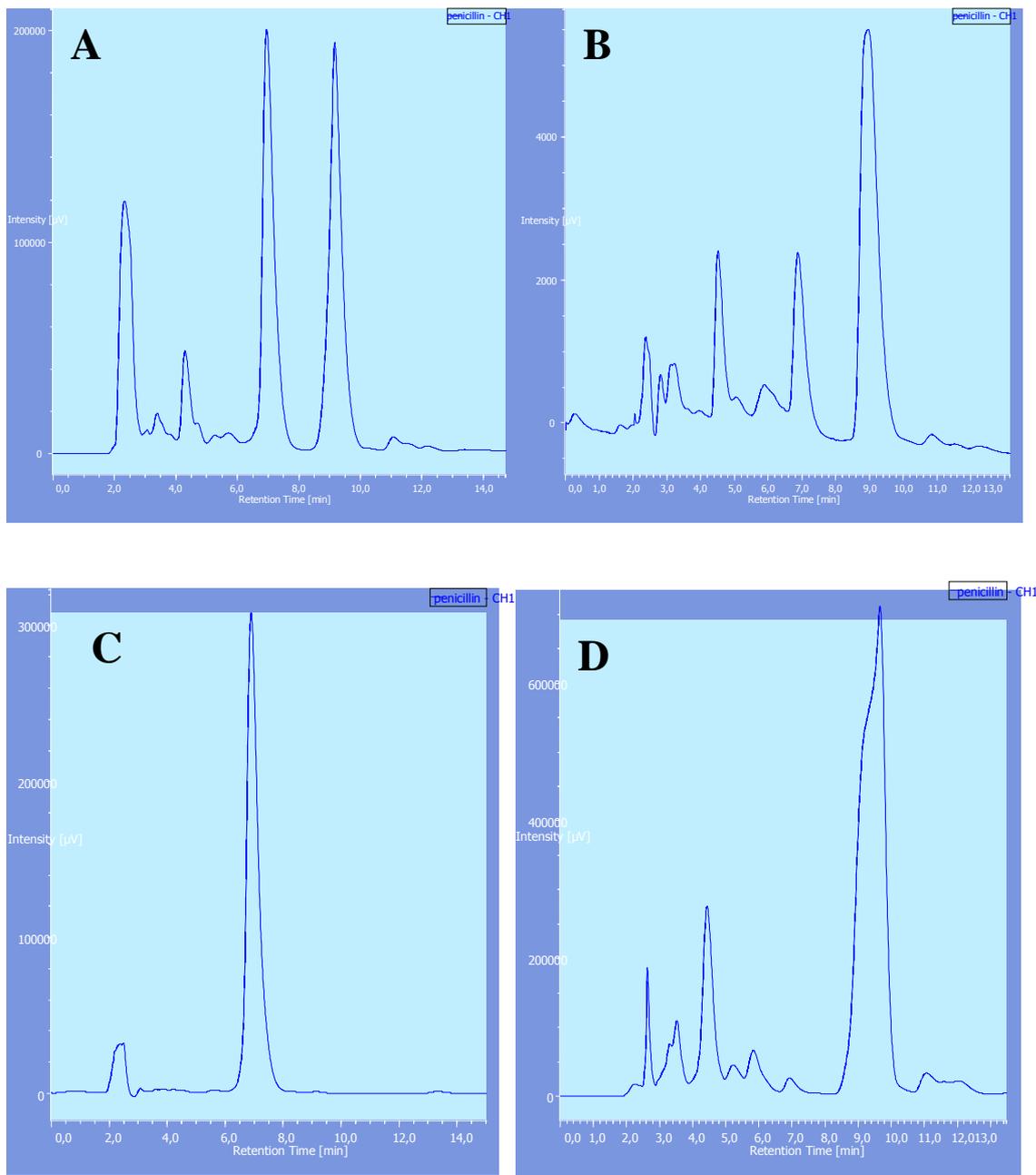


Figure11: Profile HPLC de filtrat issu de la culture liquide de *P. chrysogenum*.

4.2. Analyse par HPLC

L'analyse qualitative par HPLC a conduit à l'obtention des chromatogrammes : A, B, C, D :

Chromatogramme A (Echantillon) on distingue 2 pics :

Pic1 apparu entre 6 - 8 minutes et pic2 entre 8.5 - 10 minutes, d'après les travaux de Prakash et Coll. (2011) sur la production d'antibiotique par culture de *Penicillium chrysogenum* appliquant l'analyse par HPLC, ces pics correspondent à la pénicilline G et V. Ce même résultat est obtenu en faisant un mélange des deux standards de pénicilline G et V (chromatogramme B).

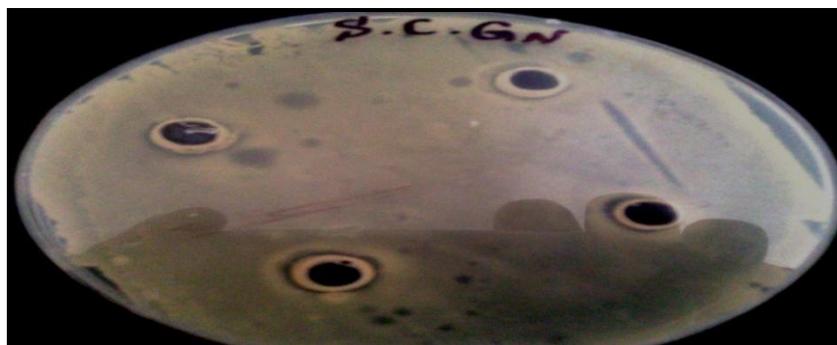
Le chromatogramme C présente le standard de la pénicilline G confirme que le pic 1 correspond à la pénicilline G, car le temps de rétention est le même (entre 6- 8 minutes).

Le chromatogramme D présente le standard de la pénicilline V confirme que le pic 2 correspond à la pénicilline V, car le temps de rétention est le même (entre 8.5- 10 minutes).

Donc notre échantillon contient la pénicilline V et la pénicilline G produites par *P.chrysogenum*.



Photographie 8 : Effet de pénicilline (G, V) sur *E. coli*.



Photographie 9: Effet de pénicilline (G, V) sur *Staphylococcus* spp.

5. Test d'antibiogramme

Tableau 7 : Activité antibactérienne développée par pénicilline (G, V) sur les bactéries.

Souches test	Diamètres (mm)
<i>E. coli</i>	19.75
<i>Staphylococcus spp</i>	15

Les résultats de l'activité antibactérienne montrent que les antibiotiques contenus dans le filtrat de la souche *Penicillium chrysogenum* exercent une activité antibactérienne importante vis-à-vis des bactéries (*E. coli*, *Staphylococcus spp*).

Dans notre travail les diamètres d'inhibition sont de 19.75 mm pour *E. Coli*, et de 15 mm pour *Staphylococcus spp*, selon (Pereira, 2006) et Seokwon et coll. (2006), nos résultats sont significatifs. (Photo 8 et 9).

Conclusion

Conclusion

Notre étude vise à cultiver la souche de *Penicillium chrysogenum* sur milieu liquide et extraire les produits actifs par des méthodes classiques.

L'étude macroscopique et microscopique a montré que *Penicillium chrysogenum* se développe sous forme de filaments septés à une couleur verte bleuté et un contour blanc.

Après culture sur milieu liquide spécifique le filtrat obtenu a une couleur jaune pâle.

L'analyse qualitative par chromatographie sur couche mince et [Chromatographie en phase liquide à haute performance](#) permet de distinguer deux molécules correspondant à pénicilline G et pénicilline V.

L'activité antibactérienne de ces molécules bioactives est significative vis-à-vis des souches tests : *E. coli*, *Staphylococcus spp* avec des diamètres atteignant 20 mm.

Annexes

ANNEXES

Annexe 1

Milieux de culture

Milieu PDA

L'extrait Pomme de terre.....	200g.
Agar	20g.
Glucose.....	20g.
Eau distillé.....	1000ml.

Milieu Sabouraud

Peptone.....	10 g.
Glucose.....	20 g.
Gélose.....	20 g.
Eau distillé	1000 ml.

Milieu gélose nutritif

L'extrait de levure	3g.
Peptone.....	5g.
Agar	15g.
Eau distillé.....	1000ml.

Bouillon nutritif

Peptone.....	20g.
Saccharose.....	50g.
Glycérine.....	30%.
Eau distillé	1000ml.

Annexe 2

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par les molécules bioactives}}{\text{Distance parcourue par le front du solvant}}$$

Annexe 3

Produits utilisés dans la partie pratique

Pour l'observation microscopique

Lactophéno- bleu.

Huile de vaseline.

Pour CCM

Méthanol.

Chloroforme.

Acide acétique.

Butanol.

Eau distillé.

Pour HPLC

Eau ultra-pure.

Acétonitrile.

Acide acétique glacial.

Références bibliographiques

Andersen ; Frisvad , JC ; Søndergaard; Rasmussen; Larsen , LS .(2011). Associations entre les espèces fongiques et les matériaux de construction endommagés par l'eau. Applied and Environmental Microbiology. In Press.

Barnett, HL; Barry, B; Hunter. (1972). Illustrated genera of Imperfect Fungi.3^{eme}Ed .Burgess publishing compary:**P160.**

Berdy, J. (1981). Screening classification and identification of microbiolproducts. in :microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industrielle , (Floret .J). Ed. lavoisier Tec et Doc : **P 612.**

Böhm , J; Hoff , B; O'Gorman, C; Wolfers, S ; Klix, V; Binger, B ; Zadra, j ;

Kürnsteiner, H ;Pöggeler, S ; Dyer, P ; Kückde, U. (2013).La reproduction sexuée et le développement de souche accouplement de type médiation dans le champignon Penicillium chrysogenum pénicilline-production. Proc. Natl. Acad. Sci. Etats-Unis, PNAS Early Edition, doi : 10.1073/pnas.1217943110.

Boiron, P. (1996). Organisation et biologie des champignons :**P 36-38.** ISBN 2 .09.190443.0.

Boiron, P. (2005). Mycologie. Thèse Doctorat.

Botton, B ; Breton, A ; Fevre, M ; Gauthier, S ; Guy, P ; Larpent, J ; Reymond, P ; Sanglier, J ; Vayssier, Y ; Veau, P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. 2eme Ed. Masson : **P426.**

Bouchet, PH ; Guignard, JL ; Vilard, J. (1999). Les champignons, mycologie fondamentale et appliquee.Ed. Masson. Paris : **P 194.**

Breton, A ; Theilleut, J ; Sanlier, G ; Vobis, G. (1989). Organismes producteurs : biologie, taxonomie et écologie .in : microbiologies industrielle. Les microorganismes d'intérêt industriel, (Floret .J). Ed. lavoisier Tec et Doc :**P 612.**

Chabasse, D ; Bouchara, JP; De gentile, L; Brun, S; Cimmon, B; Penn, P. (2002).Cahier de formation les moisissures d'intérêt médicale.

Chermette , R ; Bussieras, J. (1993). Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort.

Cuq, JL. (2008). Microbiologie alimentaire. Chapitre les agents antimicrobiens : **P125-130.**

Cuq, JL. (2007), La Chromatographie Liquide. Université Montpellier 2 :**P13-14.**

Demain, A. (1981).Industrial microbiology. Science in : microbiologie industrielles (florent.J). Ed. Lavoisier Tec et Doc :**P612.**

Dobréva, N; Nihfi, S. (1990). manuel de formation « vrac »,chiminvest ,bulgarie,ppl.

Doyle, F; Nayler, G; Rolinson, B. (1960). Recovery of solid 6-aminopenicillanic acid. 2,941,995

Errecalde, J. (2007). Uso de antimicrobianos en animales de consumo.

Incidenciadeldesarrollo de resistencias en saludpública. Facultad de CienciasVeterinarias. UniversidadNacional de La Plata, Argentina : **P 1-67.**

Fierro, F ; Barredo, J ; Díez, B ; Gutierrez, S ; Fernández, F ; Martín, J. (1995). "The penicillin gene cluster is amplified in tandem repeats linked by conserved hexanucleotide sequences". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **92** (13): 6200–6204. doi:10.1073/pnas.92.13.6200. PMC 41670. PMID 7597101.

Florent, j. (1993). Microbiologie industrielle. Les Microorganismes intérêts industrielles. Ed .Lavoisier Tec et Doc : **P612.**

Francois, J; Chomarar, M; Weber, M ; Gerard, A. (2003). De l'antibiogramme à la prescription. Biomerieux, 2^{ème} édition :**P8-22.**

Gauthier. (1993). Les antibiotiques. Miracle. Agora. Vol.1.N.3.

Girard, H; Rougieux, R. (1967). Techniques de microbiologie agricole. 2^{ème} édition. Ed. Dunod. Paris.

Gogny, M ; Puyt, J. (2001). Classification des principes actifs. Editions le point vétérinaire. : **P2-6.**

Guarro, J. Figueras, F. (2000). Atlas des champignons clinique. 2e édition. Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht).

Guiraud, J. (1998). Microbiologie alimentaire. Dunod. Paris: **P 7-330.**

Hammond, P. (1992). In Global Diversity. Status of the Earth's Living Resources (B. Groombridge, ed). Chapman and Hall, London: **P17-39.**

Harrigan, W; McCance, M. (1976). Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic press. London: **P 21-277.**

Hawksworth, D. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, conservation. MycolRes 95 : **P 641-655.**

Hennequin, C; Lavarde, V. (1998). Infections à *Penicillium*. Encycl. Med. Chir. Elsevier. Paris. Heritage Series.

Heywood, V. (1995). Global Biodiversity Assessment. Cambridge University Press, Cambridge.

Hoog, G; Guarro, J; Gené, J; Figueras, F. (2000). Atlas of Clinical Fungi. 2^{ème} édition. Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht).

Jean-noel, J. (2013). Les technique de laboratoire utilisé en mycologie.

Jeau, A; Jeau, P. (1973). Les antibiotiques. Paris. P1-5.

Kendrick, B. (1999). The fifth kingdom. 2^{ème} édition. Mycologue Publications. Lavoisier. Paris : **P 26-42.**

Locquin, M. (1984). Mycologie générale et structural. Ed. Masson : **P551**.

Lombard, F. (2005). La louse de vitesse entre les antibiotiques et les bactéries pathogène résistantes : analyse et discussion de quelques pistes.

Lozniewski, A; Rabaud, C. (2010). Résistance bactérienne aux antibiotiques. Fiche conseil pour la prevention du risqué inféctieux. Centre de Coordination de lute contre les infections.

Malloch, D. (1997). Moulds: their isolation, cultivation and identification. Department of Botany. University of Toronto.

Mevius, D; Rutter, J; Hart, C; Imberechts, H; Kempf, G ; Lafont, JP; Luthman, J;

Moreno, M; Pantosti, A; Pohl, P; Willadsen, C. (1999). Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines. Report and qualitative risk assessment by the committee for veterinary medicinal products: **P1-57**. Editions Le point vétérinaire 2001.

Oteng-Gyang, K. (1984). Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chaud.

Oxoby, M. (2002). Etudes sur la synthèse totale des antibiotiques naturels de la famille des angucyclinones. Thèse de docteur en chimie organique de l'université Bordeaux I, école doctorale des sciences chimiques : **P3-12**.

Pereira, S. (2006) .Antimicrobiol activity of inbugoserasussruticesa.

Pitt, J. (1988). Laboratory guide to common *Penicillium* species, Academia Press editor, London.

Pitt, J. (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins, Br. Med. Bull., 56 (1), 184 - 192., Maladies.

Pohland, A; Yin, L; Dantzaman, J. (1970). Rapid chemical confirmation methode for aflatoxine BI. I. Developpment of the method .J.Ass.Offic.Anal.Chem. 53: **P 101-102**.

- Prakash, S. (2011).** *Comparative study on production, purification of penicillin by *Penicillium chrysogenum* isolated from soil and citrus samples*: **P 6.**
- Prescott, S. (1949).** *Industrial microbiology*. 2^{ème} édition. Ed. McGraw Hill Book CO. New York/London.
- Puyt, J ; Guérin-Faubleé, V. (2006).** *Médicaments anti-infectieux en médecine vétérinaire. Bases de l'antibiothérapie*: **P 1-27.**
- Raper, K; Thom, C. (1949).** *A manual of the *Penicillia**, Williams & Wilkin Company (Baltimore).
- Rinaldi, C; Sutton, A; Fothergill, S. (1998).** *The morphology of fungi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** : **P123-129.**
- Roquebert, M. (2002).** *Moisissures contaminant les biens culturels*. Collection Patrimoine.
- Rosenthal, E ; Marty, P ; Ferrero, C ;Fichoux, Y ;Cassuto, J.(2000).** *Infection à *Penicillium marneffe* chez un patient infecté par le HIV*. *Presse Med.* **29**. Infectieuses. **850-A-11: P363-364.**
- Rossi, S. (2004).** [Australian Medicines Handbook](#). [ISBN 0-9578521-4-2](#).
- Rossmann, A. (1994).** In *Biodiversity and Terrestrial Ecosystems* (C.-I Peng and C.H. Chou, ed.): **P169-194**. Institute of Botany, Academia Sinica Monograph Series No. 14, Taipei.
- Samson, R ; Hadlok, R; Stolk, A. (1977).** "Une étude taxonomique de la série *chrysogenum Penicillium*" *Antonie van Leeuwenhoek* **43 (2)**:169-175 doi : 10.1007/BF00395671 . PMID413477.
- Sansonette, F. (1930).** *Etude systématique des moisissures et des bactéries du camembert*. Docteur en Pharmacie : **P 784.**
- Seokwon , K. (2006).** *Antibacterial and antisugal activity of sulfur containing compounds from *Petizenia alliaceae**.

Smaoui , S. (2010).Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement.Université de Toulouse. France: P **251**.

Summers, A. (2006). Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotics multi resistance problem. *Animal Biotechnology*. 17 :**P125-135**.

Tachenon, A. (1999).La science des champignons.

Topal, S. (1984).Gida maddelerinden ayrilan (izole edilen) vitamins (identifiye edilen) kufler uzerinde arastirmalar. *Gida* 9 :**P 253-264**.

Tortorano, A; Cabrini, E; Viviani, M. (1979). Sensibilité in vitro des levures à cinq antibiotiques. Comparaison de deux méthodes. *CMI*. En gélose et méthode des disques. *Bull.Soc.Fr. Myco.Med*.8 :**P 69-74**.

Turner, W. (1975). Commercially important secondary metabolite. In : microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industrielle (Florent. J) Ed . Lavoisier Tec et doc: P **612**.

Vydac.(1998).The Separations Group, Inc.17434 Mojave Street Hesperia, CA 92345 USA

Wright, G. (2007). The antibiotic resistance: the nexus of chemical and genetic diversity.*Nature Rev.Microbial*. 5: **P 175-186**.

Yala, D; Merad, A; Mohamed, D; OuarKorich, M. (2001).Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine de Maghreb*. N° 91.

Site Web

www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/florey-bio.html. (consulté le 2014)

www.mycota-crcc.mnhn.fr.(consulté *le 2014*).

www.wikipedia.org/wiki/Penicillium.(consulté le 2014).

www.en.wikipedia.org/wiki/Penicillium_chrysogenum.(consulté le 2014).

www.mycolog.com/fifhtoc.html.(consulté le 2014).

www.biotechno.fr/IMG/pdf/4986249-Manuel-de-travaux-pratiques-de-microbiologie.pdf
.(consulté le 2014).

www.microbiologie-medicale.fr.(consulté *le 2014*).

Résumé

Résumé

Cette étude se fait pour l'isolement et l'identification des champignons producteurs d'antibiotique, notre étude est limitée sur le genre *penicillium* responsable de la contamination des fruits d'orange.

L'étude macroscopique et microscopique a montré que *penicillium chrysogenum* se développe rapidement sur milieu PDA et sabouraud sous forme de filaments septés à une couleur verte bleuté et un contour blanc.

Penicillium chrysogenum est mise en culture dans un bouillon contenant 25 mg saccharose, 10 g peptone, 15% glycérine et 500 ml l'eau distillée, ce milieu permet à la souche d'atteindre sa meilleure sécrétion d'antibiotique après 7 jours d'incubation.

La technique de chromatographie sur couche mince a révélé la présence de deux spots après l'élution de l'extrait actif par un mélange de butanol / acide acétique / eau (1 /1/1) V/V/V, ces spots correspondent à la pénicilline V et la pénicilline G dont le Rf égale à 0.43 et 0.55.

L'analyse qualitative et quantitative par HPLC a révélé la présence de deux pics correspondant à la pénicilline V et la pénicilline G, en utilisant l'éluant :

Eau/ acétonitrile /acide acétique glacial(64.425 /35/0,575) V/V/V.

L'activité antibactérienne est effectuée vis-à-vis de deux bactéries test : *E. coli*, *Staphylococcus spp*, par la technique des puits, on a trouvé une activité antibactérienne très considérable (zone d'inhibition ≥ 6 mm).

Mot clés :

Penicillium chrysogenum, production d'antibiotique, CCM, HPLC, test d'antibiose.

Summary

The present study deals with the isolation and identification of fungi producers of antibiotics our investigation is limited to the type *Penicillium* responsible for contaminating orange fruits.

The macroscopic as well as microscopic analysis demonstrate that *P. chrysogenum* develops quickly in PDA environment and sabouraud in the form of septets filaments with a bleu green color and mold surrounded by white mycelium.

P. chrysogenum is put in the media containing: 25g saccharos, 10g peptone, 15% glycerin and 500ml of distilled water, this environment allows the strain to reach its best secretion of antibiotic after 7 days of incubation.

The method of chromatography (TLC) displayed the presence of two spots after eluting the active extract through a mix of Butanol/Acetic acid /Water (1/1/1) v/v/v these spots correspond to penicillin v and to penicillin G set Rf equal to 0.43, 0.55.

The qualitative and quantitative analysis using HPLC revealed, the presence of two peaks corresponded to penicillin V and G, using the following separation system: Water/ Acetonitril/Acetic acid (v/v/v).

The antibacterial activity was performed vis-à-vis two bacterial strains: *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus* spp which realized through deep method, the antimicrobial activity founded was very considerable (zone of inhibition \geq 6 mm).

Keys-words: *Penicillium chrysogenum*; production of antibiotics; TLC; HPLC; Antimicrobial activity.

ملخص

تتم هذه الدراسة لعزل وتحديد الفطريات المنتجة للمضادات الحيوية إذ تقتصر دراستنا على جنس البنسليوم (*Penicillium*) المسؤول عن تعفن ثمار البرتقال .

الدراسة العينية و المجهرية تبين ان فطر *penicillium chrysogenum* يتطور بسرعة علي وسط Sabouraud، PDA علي شكل خيوط ذات لون اخضر مزرق و محيط ابيض .

قمنا بوضع *P.chrysogenum* في وسط سائل مغذي يحتوي علي : 25 ملغ السكروز، 10 غ بيتون، 15٪ الجلسرين و 500 مل من الماء المقطر ، هذا الوسط يسمح للعينة بالحصول علي أفضل إفرار للمضادات الحيوية بعد 7 أيام من الحضانة.

تقنية الكروماتوغرافيا علي طبقة رقيقة تكشف علي وجود بقعتين وذلك باستعمال نظام الفصل يتكون من بوتانول / حمض الخليك / الماء (1/1/1) ح / ح / ح ، هاتين البقعتين توافقان بنسليين V، G حيث Rf تساوي 0.43، 0.55.

التحليل النوعي والكمي باستخدام HPLC كشف وجود قمتين يتفق مع البنسلين V و G ، وذلك باستخدام نظام الفصل التالي : الماء / اسيتونزويل / حمض الخليك ح / ح .

قمنا باختبار نشاط المضاد الحيوي علي نوعين من البكتيريا *E.Coli , staphylococcus spp*: فوجدنا النشاط المضاد للبكتيريا كبير جدا (وجود مساحة ≤ 6 مم).

الكلمات المفتاحية: *Penicilliumchrysogenum* انتاج المضادات الحيوية . الكروماتوغرافيا علي طبقة رقيقة . HPLC. نشاط المضاد الحيوي.

Nom / Prénom : BoukhedennaNaoual	Date de soutenance :24/06/2014
Nom / Prénom : Merouane Ilham	
Thème :Production de la pénicilline V et G <i>in vitro</i> par <i>Penicillium chrysogenum</i>	
<p>Résumé : Cette étude a comme but l'isolement et l'identification des champignons producteurs d'antibiotique. Notre étude est limitée sur le genre <i>Penicillium</i> responsable de la contamination des fruits d'orange. L'étude macroscopique et microscopique a montré que <i>Penicillium chrysogenum</i> se développe rapidement sur milieu PDA et sabouraud sous forme de filaments septés à une couleur verte bleuté et un contour blanc.</p> <p><i>Penicillium chrysogenum</i> est mise en culture dans un bouillon contenant 25 mg saccharose, 10 g peptone, 15% glycérine et 500 ml l'eau distillée, ce milieu permet à la souche d'atteindre sa meilleure sécrétion d'antibiotique après 7 jours d'incubation.</p> <p>La technique de chromatographie sur couche mince a révélé la présence de deux spots après l'élution de l'extrait actif par un mélange de butanol / acide acétique / eau (1 /1/1) V/V/V, ces spots correspondent à la pénicilline V et la pénicilline G dont le Rf égale à 0.43, 0.55.</p> <p>L'analyse qualitative et quantitative par HPLC a révélé la présence de deux pics correspondant à la pénicilline V et la pénicilline G, en a utilisé l'éluant : Eau/ acétonitrile /acide acétique glacial(64.425 /35/0,575) V/V/V.</p> <p>L'activité antibactérienne est testée vis-à-vis de deux bactéries test : <i>E. coli</i>, <i>Staphylococcus spp</i>, par la technique des puits, on a trouvé une activité antibactérienne très considérable (zone d'inhibition ≥ 6 mm).</p>	
<p>Mot clés :</p> <p><i>Penicillium chrysogenum</i> ; Production d'antibiotique ; CCM ; HPLC ; Test d'antibiose.</p>	
<p>Laboratoire : Zoologie. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université constantine1</p>	
<p>Jury de soutenance :</p> <p>Présidente : Mihoubi I. (Professeur) Université Constantine 1.</p> <p>Encadreur : Lahlah F. Zohra (M.A.A) Université Constantine 1.</p> <p>Examineur : Meziani M. (M.A.B) Université Constantine 1.</p>	