

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université BLIDA 1
Faculté des Sciences
Département de Chimie



Mémoire présenté par

EL-AICHI Selma

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Sciences de la matière

Filière : Chimie

Option : Chimie des Substances Naturelles

Titre

**Contribution à l'étude de la bioconversion, biodégradation
et photodégradation de l' α -pinène**

Soutenu publiquement le 28 juin 2016 devant le jury composé de :

N. Bouzidi	MCA	Président	Université de Blida 1
O. Touafak	MCB	Examineur	Université de Blida 1
M. El Hattab	Prof	Promoteur	Université de Blida 1
F.Z Ferradji	MCB	Co-promoteur	Université de Blida 1

Promotion 2015-2016

MA-540-134-1

Remerciements

Que ce soit d'un point de vue scientifique ou humain, la réalisation de cette thèse fut pour moi une expérience d'une valeur immense.

Scientifiquement, ces deux années de Master ont présenté une opportunité précieuse d'apprendre un peu davantage sur la chimie des substances naturelles et de découvrir, avec grande fascination, le domaine de la microbiologie. Humainement, cette période a été marquée par d'énormes leçons d'amitié, de résilience et d'humanité. Ainsi, je ne peux que remercier tous ceux qui étaient à mes côtés au cours de cette expérience.

*Au terme de cette étude, je remercie avant tous **ALLAH** « tout puissant » de m'avoir guidé, et pour le courage, la patience et la santé qu'il m'a accordé durant toutes ces années d'études*

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement Mr M. EL HATTAB, Professeur à l'université Blida 1, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, et qui, durant ces deux années m'a gratifié de son savoir et son aide scientifique avec générosité. Je lui suis profondément reconnaissante pour avoir accepté de m'encadrer, pour m'avoir orienté et prodigué ses précieux conseils et critiques qui m'ont permis de mener à bien ce travail. Je le remercie vivement pour le choix du sujet qui est intéressant et d'actualité.

Mes remerciements vont également au Prof. A. BADIS pour sa gentillesse, son aide et ses précieux conseils pour l'accomplissement de mon travail.

Je remercie M^{me} F.Z. FERRADJI, maître de conférence à l'Université de Blida 1, pour ses conseils et sa disponibilité qui à donner vie à ce travail malgré ses charges professionnelles.

Je tiens à exprimer mes remerciements à N. BOUZIDI, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider le jury de soutenance.

J'adresse mes sincères remerciements à M^{me} O. TOUAFEK, maitre de conférence qui m'a fait l'honneur de juger ce travail.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à tous les professeurs et les enseignants pour leurs efforts et encouragement le long de ce master.

Je remercie chaleureusement M^{elle} Hamiche Sonia, M^{elle} Mebarek Leyrat et M^{elle} Bounaas Karima pour leurs disponibilités et leurs aides précieuses.

J'adresse également mes sincères remerciements au personnel du laboratoire de Microbiologie Département de Génie des Procédés de m'avoir reçue au sein du Laboratoire.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mes chers parents

Maman, Papa merci pour tous les sacrifices que vous faites pour nous. Bravo pour toute la patience qu'il a fallu pendant ces 5 ans d'étude : Maman, merci pour toute l'aide que tu m'as apportée durant ces années et merci pour ton aide dans la réalisation de cette thèse. Papa merci de m'avoir fait confiance depuis ma première année à l'école jusqu'à aujourd'hui merci également d'être toujours présent pour me remonter le moral. Je ne vous remercierai jamais assez de tout le soutien et les encouragements que vous m'apportez. Vous êtes parfaits, je vous aime.

A mes très chères sœurs : Kenza, Souhila, Mounira, Zakia et leur familles

A mon frère Abderahmanne et sa famille

*Merci pour votre soutien et votre tempérament « **no-stress** » dont j'avais bien besoin durant toutes ces années. Merci d'avoir été présent pendant toutes ces années.*

A mes nièces et mes neveux : Walid, Neserine, Abd erraouf, Noussaiba,

Hanane, Mahdi et Abdel Moumen

Je remercie mon mari Abdel Madjid

Et ma belle-famille pour leur soutien

Aux copines de la Fac

Merci pour ces années de pur bonheur,

Merci Madjeda d'avoir toujours penser pareil que moi.

Amina je te remercie pour ta gentillesse pour ton écoute et ton amitié

Merci à Medina pour tes blagues de très bon goût pour ces fous rires interminables en durant ces deux années.

Aussi à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Résumé

Ce travail porte sur l'étude de la bioconversion, la biodégradation de l' α -pinène par deux souches bactériennes isolées localement à savoir, *Streptomyces rochei* AB1 et *Paenibacillus popilliae* 1C. Il porte également sur la photodégradation de l' α -pinène par un rayonnement UV et par un rayonnement haute énergie de Cs-137. La pureté de l' α -pinène a été mise en évidence à travers des analyses préliminaires par IRTF et CG/SM. La détermination des concentrations permettant de délimiter le domaine d'inhibition vis-à-vis le métabolite de l' α -pinène des deux souches a été effectué. Cette concentration a été déterminée comme étant égale à 10 mg/ml.

Quant à la souche *Paenibacillus popilliae* 1C, la bioconversion a été effectuée sur le milieu Luria Bertani riche, par contre, la bioconversion et la biodégradation de l' α -pinène par la souche *Streptomyces rochei* AB1 a été menée en utilisant, respectivement, le milieu ISP9 riche et ISP9 pauvre.

La bioconversion de l' α -pinène par la souche *Paenibacillus popilliae* et *Streptomyces rochei* a permis l'obtention d'autres monoterpènes hydrocarbonés et oxygénés notamment le cis-Verbenol, Thymol, β -fenchol, Myrténol, Verbénone, trans (+) Carvéol, trans (-) Sobrérol, β -Cymène, d-Limonène, 1,8-Cinéole, Δ -3-Carene, cis-Citral, Pinocarvone, Menthol, Camphène et Piperitenone. La biodégradation de l' α -pinène par la souche *Streptomyces rochei* a mené à l'obtention d'autres monoterpènes à l'image le trans-Verbenol, l' α -Terpineol et le trans -Sobrérol.

Par ailleurs, la photodégradation de l' α -pinène par UV et par le CS-137 a permis l'obtention de deux monoterpènes communs qui sont le Camphène et l' α -pinène époxyde.

Mots clés : α -pinène, bioconversion, biodégradation, photodégradation, rayonnement UV, rayonnement haute énergie Cs-137, Paenibacillus popilliae, Streptomyces rochei, CG/SM.

Abstract

This present work focuses on the study of the bioconversion; biodegradation of α -pinene by two bacterial strains isolated locally namely *Streptomyces rochei* AB1 and *Paenibacillus popilliae* 1C. It also includes photo-degradation of the α -pinene by UV radiation and high-energy radiation from Cs-137. The purity of the α -pinene has been demonstrated through preliminary analysis by FTIR and GC/MS. The determination of the concentrations for delimiting the field of inhibition against the metabolite of α -pinene of both strains was performed. This concentration was determined to be equal to 10 mg /ml.

As to the strain *Paenibacillus popilliae* 1C, the bioconversion was carried out on Luria Bertani rich medium, against, the bioconversion and the biodegradation of α -pinene by *Streptomyces rochei* AB1 strain was carried out using, respectively, the medium ISP9 rich and poor.

The bioconversion of α -pinene by the strains *Paenibacillus popilliae* and *Streptomyces rochei* allowed obtaining other hydrocarbon and oxygenated monoterpenes including cis-Verbenol, Thymol, β -fenchol, Myrtenol, Verbénone, trans (+) Carveol , trans (-) Sobrerol, β -Cymene, d-Limonene, 1,8-Cineole, Δ -3-Carene, cis-Citral, Pinocarvone, Menthol, Camphene and Piperitenone. The biodegradation of the α -pinene by the strain *Streptomyces rochei* led to obtaining other monoterpenes to image the trans-verbenol, the α -terpineol and the trans-Sobrerol.

In addition, the photodegradation of α -pinene by UV and by the CS-137 enabled obtaining two common monoterpenes which are camphene and α -pinene epoxyde.

Keywords: Bioconversion, biodegradation, photodegradation, α -pinene, UV radiation, high-energy radiation by Cs-137, Paenibacillus popilliae, Streptomyces rochei, GC/MS.

ملخص

يتمحور هذا العمل حول دراسة التحويل البيولوجي و التفكيك البيولوجي لألفا بينين باستخدام نوعين من السلالات البكتيرية معزولتين محليا هما *Streptomyces rochei* (AB1) و *Peaenibacillus popilliae* (1C)، ويتطرق أيضا إلى التحليل الضوئي لألفا بينين بواسطة الأشعة فوق البنفسجية والأشعة ذات الطاقة العالية بالسيزيوم 137. تم التأكد من نقاء ألفا بينين من خلال التحليل الأولي عن طريق تقنية FTIR و GC/MS.

لقد سمح تحديد تراكيز ألفا بينين بمحصر مجال تثبيط السلالتين بالنسبة للمستقلب وقد حدد هذا التركيز بـ 10 ملغ/مل.

تم إجراء دراسة التحويل البيولوجي باستعمال وسط سائل يدعى *Luria Bertani* أما دراسة التحليل البيولوجي فقد تمت باستعمال وسطين هما ISP9 غني و ISP9 فقير.

أما فيما يخص النتائج المحصل عليها، فقد سمح التفكيك البيولوجي باستخدام السلالتين *Streptomyces* (AB1) و *rochei* و *Peaenibacillus popilliae* (1C) بالحصول على *monoterpenes* هيدروكربونية و أخرى أوكسيجينية بما في ذلك:

Verbenol, Thymol, β -fenchol, Myrténol, Verbénone, Carvéol, Sobrérol, d-Limonène 1,8-Cinéole, delta-3-Carene, cis-Citral, Pinocarvone, Menthol Camphène .Piperitenone, β -Cymène

ومن جهة أخرى، فقد نتج عن التحليل البيولوجي باستخدام السلالة *Streptomyces rochei* (AB1) أنواع أخرى من *monoterpenes* في صورة: *Sobrérol, α -Terpineol, Verbenol*

وقد نتج عن التحليل الضوئي باستعمال الأشعة فوق البنفسجية والأشعة ذات الطاقة العالية بالسيزيوم 137 نوعين مشتركين من *monoterpenes* هما *l' α -pinène époxyde* و *Camphène*.

الكلمات المفتاحية: التحليل البيولوجي، التفكيك البيولوجي، التحويل الضوئي، ألفا بينين، الأشعة فوق البنفسجية، الأشعة ذات الطاقة العالية بالسيزيوم 137، *Streptomyces rochei*، *Peaenibacillus popilliae*، CG/MS.

Liste des abréviations

UV	: Ultra – Violet
Cs	: Césium
IRTF	: Infrarouge à Transformer de Fourier
KBr	: Bromure de Potassium
CG	: Chromatographie en Phase Gazeuse
SM	: Spectrométrie de Masse
°C	: Degré Celsius
ISP	: International <i>Streptomyces</i> Project
LB	: Luria Bertani
NaCl	: Chlorure de Sodium
S	: Seconde
µl	: Microlitre
m	: Mètre
g	: Gramme
min	: Minute
nm	: Nanomètre
pH	: Potentiel Hydrogène
µm	: Micromètre
%	: Pourcent
ATCC	: American Type Culture Collection
Tr	: Temps de rétention

Liste des figures

Figure 1	: Schéma représentant la classification de l'espèce <i>Paenibacillus popilliae</i> et <i>Streptomyces rochei</i>	10
Figure 2	: Bioconversion de 1,4-cinéole par <i>Bacillus cereus</i>	10
Figure 3	: Les voies générales de dégradation de β -pinène et du limonène. Les flèches correspondent à des réactions métaboliques observées en présence des souches bactériennes suivantes : 1. <i>Bacillus</i> ; 2. <i>Bacillus stearothermophilus</i> ; 3. <i>Bacillus pallidus</i> BR425	11
Figure 4	: Classification de l' α -pinène	14
Figure 5	: Principales voies métaboliques de α -pinène décrits dans la littérature	16
Figure 6	: Spectromètre IR à transformée de Fourier	19
Figure 7	: Chromatographe HP 6800 couplé à un spectromètre de masse HP MSD 5973	20
Figure 8	: La souche <i>Paenibacillus popilliae</i>	23
Figure 9	: La souche <i>Streptomyces rochei</i>	23
Figure 10	: Schéma représentant une zone d'inhibition	24
Figure 11	: Schéma représentant les étapes d'extraction des nouveaux métabolites obtenu par la bioconversion	28
Figure 12	: la source radioactive de Cs-137	29
Figure 13	: Spectre IRTF de l' α -pinène	31
Figure 14	: Spectre de CG/SM de l' α -pinène	32
Figure 15	: Tests d'inhibition de l' α -pinène vis-à-vis de la souche <i>Paenibacillus popilliae</i>	33
Figure 16	: (a) - Profil chromatographiques des métabolites secondaires obtenus par la bioconversion de l' α -pinène par <i>Paenibacillus popilliae</i> . (b) - Agrandissement (zoom) du profil chromatographique	34
Figure 17	: Voies de bioconversion de l' α -pinène par <i>Paenibacillus popilliae</i>	36
Figure 18	: (a) - Profil chromatographiques des métabolites secondaires obtenus par la bioconversion de l' α -pinène par <i>Streptomyces rochei</i> . (b) - Agrandissement (zoom) du profil chromatographique	37

Figure 19	: Voies de bioconversion de l' α -pinène par <i>Streptomyces rochei</i>	39
Figure 20	: (a) - Profil chromatographiques des métabolites secondaires obtenus par la biodégradation de l' α -pinène par <i>Streptomyces rochei</i> (b)- Agrandissement (zoom) du profil chromatographique	40
Figure 21	: Voies de biodégradation de l' α -pinène par <i>Streptomyces rochei</i>	41
Figure 22	: Profil chromatographiques des métabolites secondaires obtenus par la photodégradation de l' α -pinène par les rayons UV	43
Figure 23	: Profil chromatographiques des métabolites secondaires obtenus par la photodégradation de l' α -pinène par les rayonnements haute énergie de Cs-137	43
Figure 24	: Voies de photodégradation de l' α -pinène par les rayons UV et les rayonnements hauts énergie Cs -137	44

Liste des tableaux

Tableau 1	: Bioconversion de quelques métabolites secondaires par le genre <i>Streptomyces</i>	12
Tableau 2	: Bioconversion des monoterpènes par différents espèces de bactéries	13
Tableau 3	: Métabolites obtenus par bioconversion de l' α -pinène par <i>Peanibacillus popilliae</i>	35
Tableau 4	: Métabolites secondaires obtenus par la bioconversion de l' α -pinène en utilisant la souche <i>Streptomyces rochei</i>	38
Tableau 5	: Métabolites secondaires obtenus par la biodégradation de l' α -pinène en utilisant la souche <i>Streptomyces rochei</i>	41
Tableau 6	: Métabolites secondaires obtenus par la photodégradation de l' α -pinène par les rayons UV et les rayonnements haute énergie Cs-137	44

SOMMAIRE

Remerciements	II
Dédicace	IV
ملخص.....	V
Résumé	VI
Abstract	VII
Liste des abréviations	VIII
Liste des figures	IX
Liste des tableaux	XI
Introduction.....	1

Partie I : Synthèse bibliographique

I. 1 Introduction	4
I. 2 Bioconversion	4
I. 2.1 définition de la bioconversion	4
I. 2.2 Biocatalyseurs	5
I. 2.3 Avantages de la bioconversion.....	5
I. 2.4 Difficultés liées à la bioconversion	6
I. 3 Biodégradation	7
I. 3.1 Définition de la biodégradation	7
I. 3.2 Types de biodégradation	7
I. 4 Etude de la bioconversion des métabolites secondaires par <i>Bacillus</i> et <i>Streptomyces</i>	8
I. 4.1 Généralités sur les microorganismes.....	8
I. 4.1.1 Le genre <i>Bacillus</i>	8
I. 4.1.2 Le genre <i>Streptomyces</i>	8
I. 4.2 Classification des espèces.....	9
I. 4.2.1 Classification de l'espèce <i>Peanibacillus popilliae</i>	9
I. 4.2.2 Classification de l'espèce <i>Streptomyces rocheistrain</i>	9
I. 4.3 Bioconversion des métabolites secondaires par le genre <i>Bacillus</i>	8
I. 4.3.1 Bioconversion de 1,4- Cinéole.....	8
I. 4.3.2 bioconversion de β -pinène et de limonène	11
I. 4.4 Bioconversion des métabolites secondaires par le genre <i>Streptomyces</i>	12
I. 4.5 Bioconversion des métabolites secondaires par divers microorganismes.....	12

II. 5 Etude de la bioconversion de l' α -pinène.....	14
II. 5.1 Description du métabolite α -pinène	14
II. 5.2 Propriétés biologique de l' α -pinène	15
II. 5.3 Bioconversion de l' α -pinène par divers microorganismes.....	15
II. 1 Introduction	18
II. 2 Matériel et méthodes.....	19
II. 2.1 Analyses préliminaires de l' α -pinène	19
II. 2.1.1 Analyse par Spectrophotométrie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) ..	19
II. 2.1.2 Analyses par Chromatographie sur phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de masse (CG/SM)	20
II. 2.2 Etude de l'activité catabolique de l' α -pinène par <i>Peanibacillus popilliae</i> et <i>Streptomyces rochei</i>	21
II. 2.2.1 Origine des deux souches	21
II. 2.2.2 Milieux de culture	21
II. 2.2.3 Repiquage des souches et préparation des précultures.....	23
II. 2.2.4 Préparation de la solution mère de l' α -pinène	23
II. 2.2.5 Détermination de la gamme de concentration par le test d'inhibition.....	25
II. 2.3 Etude de la bioconversion et la biodégradation de l' α -pinène	26
II. 2.3.1 Bioconversion par <i>Streptomyces rochei</i> AB1	26
II. 2.3.2 Bioconversion par <i>Peanibacillus popilliae</i> 1C	26
II. 2.3.3 Biodégradation par <i>Streptomyces rochei</i> AB1	27
II. 2.3.4 Extraction des métabolites	27
II. 2.4 Etude de la photodégradation	28
II. 2.4.1 Généralités sur la photodégradation par les rayonnements haute énergie Cs-137.	28
II. 2.4.2 Généralités sur la photodégradation par les rayons UV	30
II. 2.5. Analyse par Chromatographie sur Phase Gazeuse couplée à la Spectroscopie de Masse des métabolites obtenus	31
II. 3 Résultats et discussions	31
II. 3.1 Analyses préliminaires de l' α -pinène.....	31
II. 3.1.1 Analyse par Spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier de l' α -pinène .	31
II. 3.1.2 Analyse par Chromatographie sur phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de masse de l' α -pinène.....	31
II. 3.2 Détermination de la gamme de concentration par le test d'inhibition de la souche <i>Peanibacillus popilliae</i>	32

II. 3.3 Bioconversion de l' α -pinène par <i>Peanibacillus popilliae</i> et <i>Streptomyces rochei</i>	33
II. 3.3.1 Bioconversion de l' α -pinène par <i>Peanibacillus popilliae</i>	33
II. 3.3.2 Bioconversion de l' α -pinène par <i>Streptomyces rochei</i>	36
II. 3.4 Biodégradation de l' α -pinène par <i>Streptomyces rochei</i>	39
II. 3.5 Photodégradation de l' α -pinène par les rayons UV et les rayonnements haute énergie Cs-137	42
Conclusion	46
Références bibliographiques	48
Annexes	58

INTRODUCTION

GENERALE

Introduction générale

L'utilisation des processus de bioconversion en synthèse organique connaît un essor important depuis les années 1990 lié à deux raisons principales : la première, les biocatalyseurs (bactéries, levures et moisissures) omniprésents dans notre environnement (sol, air et eaux) et dans quelques aliments que nous consommons, ne cessent d'occuper une place de plus en plus importante dans notre vie et sont actuellement à l'origine du développement du domaine de la biotechnologie [1]. Ils présentent souvent des propriétés uniques de sélectivité vis-à-vis d'un substrat ou d'une classe de substrat donnée. Ainsi, des conversions hautement énantiosélectives ou régiosélectives deviennent plus aisées, permettant la synthèse de nouvelles molécules à structure contrôlée, très difficile voire impossible à obtenir par les voies « classiques » de synthèse organique. Ils sont également des agents de dégradation et leurs propriétés métaboliques et cinétiques peuvent être exploitées pour permettre l'hydrolyse, l'oxydation, la nitrification, la dénitrification et l'élimination des sulfates et des phosphates ainsi que la méthanisation des effluents polluants [2]. La seconde, ces procédés enzymatiques nécessitent, de manière générale, des conditions opérationnelles plus douces que leurs analogues chimiques : température moins élevées, pression ambiante, absence de catalyseurs inorganiques toxiques. Ils répondent donc aux besoins actuels de développement de technologies et de procédés moins agressifs pour l'environnement [1].

En effet, contrairement à l'industrie chimique qui puise traditionnellement ses précurseurs de synthèse dans les ressources pétrolières épuisables, les biotechnologies utilisent des ressources naturelles renouvelables en permanence. Les terpènes font partie de ces précurseurs renouvelables abondamment présents dans la nature. On les trouve notamment en quantité importante dans les huiles essentielles extraites de plantes ou de fruits. En plus de leurs propriétés organoleptiques particulièrement intéressantes, beaucoup d'études mettent en évidence des activités thérapeutiques, antibactérienne, antivirale et anticancéreuse significatives. Ces propriétés sont en général encore plus marquées chez les dérivés oxydés que sont les terpénoïdes. L' α -pinène, extrait de l'essence de térébenthine, constitue la première source naturelle de terpènes présente sur le marché. Il apparaît ainsi, avec ses dérivés, comme un précurseur idéal dans les procédés de production biocatalytique de terpénoïdes, possédant une forte valeur ajoutée [3].

La tendance « chimie verte » et « biotechnologie blanche » est actuellement à la recherche d'alternatives aux solvants polluants. C'est dans ce cadre, le nombre d'articles relatant la bioconversion des terpènes et particulièrement l' α -pinène, en utilisant des bactéries comme biocatalyseurs, s'est multiplié dernièrement. De nouveaux dérivés plus solubles et plus stables, ayant des propriétés biologiques maintenues voir accrues par apport aux molécules naturelles ont pu être synthétisés. Les paramètres réactionnels ont été améliorés pour rendre les procédés économiquement et écologiquement plus performants [4]. Le présent travail s'inscrit dans le cadre de cette large thématique est porte sur la bioconversion et la biodégradation de l' α -pinène en d'autres métabolites secondaires en utilisant deux bactéries aérobies stricts nouvellement isolées à partir des niches écologique de l'Algérie: *Peanibacillus popilliae* (1C) et *Streptomyces rochei* (AB1). Ces souches, ont déjà montré des aptitudes à dégrader une large gamme de composés organiques complexes [5,6].

Les travaux de ce mémoire s'articulent autour de deux parties principales :

- La première partie est consacrée à une étude bibliographique dans laquelle nous introduisant le concept de la bioconversion et la biodégradation, ensuite nous décrivons brièvement les microorganismes utilisés dans cette étude suivi des différents travaux de recherche portant sur l'application de ces deux microorganisme ainsi que d'autres microorganismes dans le domaine de la bioconversion de différents métabolites secondaires. Nous terminons cette partie par exposer les différents travaux de la bioconversion de l' α -pinène effectuée dans la bibliographie.
- La seconde partie est réservée à une étude expérimentale qui a pour objectif principale l'étude de la bioconversion de l' α -pinène par deux souches d'étude *Peanibacillus popilliae* et *Streptomyces rochei* comme alternatives aux solvants massifs. Cette partie comporte entre autre, l'analyse chimique de l' α -pinène, le test de détermination de la gamme de concentration utilisable et non inhibitrice, la méthodologie expérimentale de la bioconversion et l'analyse chimique des produits obtenus.

Enfin, cette étude se termine par une conclusion générale.

PARTIE I

Synthèse bibliographique

I. 1 Introduction

L'étude bibliographique vise à définir la bioconversion et la biodégradation avec ses avantages et ses difficultés et présenter l'action des microorganismes sur les métabolites secondaires et la possibilité de dégradation de ces composés par différents types de microorganismes dans des conditions d'aérobiose. Elle présente aussi quelques données expérimentales sur l' α -pinène comme molécule modèle, les voies métaboliques et les principaux produits formés.

I. 2 Bioconversion

I. 2.1 Définition de la bioconversion

La bioconversion est définie comme étant l'utilisation de systèmes biologiques pour provoquer des changements structuraux dans les composés chimiques, qui ne sont pas leurs substrats naturels. Une certaine molécule est modifiée par la transformation de ses groupes fonctionnels avec ou sans la dégradation de son squelette carboné. Ces modifications conduisent à la formation de composés bioactifs nouveaux et utiles qui ne sont pas aisément préparés par des procédés chimiques [7]. Ceci distingue "**la bioconversion**" de "**la biosynthèse**", qui est préoccupé par la capacité de synthèse des systèmes biologiques dans leur habitat normal [8].

Actuellement, le processus de bioconversion le plus utilisé consiste à convertir un précurseur clairement défini par un microorganisme préalablement sélectionné et dont l'activité est orientée vers la production du composé souhaité [9]. Cette stratégie, est employée dans de nombreux procédés industriels de fabrication d'arômes. Le terme bioconversion implique la notion de conversion incomplète d'un substrat organique métabolisé qui n'aboutit donc pas forcément à son assimilation totale [10]. Il peut s'agir par exemple d'une oxydation partielle du substrat qui se traduit par un rejet de produits intermédiaires (métabolites) dans le milieu.

Deux procédures peuvent alors être utilisées. Dans la première, le précurseur ou le substrat est ajouté directement au milieu de croissance au bout d'un temps déterminé de culture. La deuxième technique conduit à la séparation de la biomasse du milieu de croissance par filtration ou centrifugation suivie d'une remise en suspension dans un nouveau milieu réactionnel, conventionnel ou non, où elle sera utilisée pour bioconvertir le précurseur. Le succès de ces procédés de bioconversion passe par une connaissance accrue des propriétés et

des possibilités métaboliques du microorganisme utilisé. Il est donc primordial de sélectionner ce dernier avec soin [11].

I. 2. 2 Biocatalyseurs

Les microorganismes et leurs enzymes se sont avérés biocatalyseurs polyvalents et sont largement utilisés pour la biotransformation de divers terpénoïdes.

Le biocatalyseur employé peut être une cellule entière d'origine animale, végétale ou microbienne. Dans ce dernier cas, il est possible d'utiliser des microorganismes eucaryotes comme les champignons filamenteux et les levures ou des organismes procaryotes comme les bactéries [12]. Les bactéries, plus que tous les autres organismes, ont la possibilité d'utiliser du matériel biologique comme source de carbone ou de les détoxifier pour leur défense [8]

Le biocatalyseur peut également être une enzyme déterminée, présente au sein d'un extrait cellulaire ou sous forme purifiée.

La grande diversité des microorganismes autorise de nombreuses réactions enzymatiques au sein d'une large diversité de voies métaboliques. Leur utilisation simple, leur rapidité de croissance et leur facilité d'adaptation à des conditions imposées par des contraintes techniques et économiques sont des atouts supplémentaires qui favorisent leur emploi dans des procédés de biotransformation [13, 14].

I. 2. 3 Avantages de la bioconversion

Les bioconversions, lorsqu'on les compare à des réactions chimiques ont l'avantage d'être régio et stéréo sélectives, ce qui conduit à des produits de forme énantiomérique donnée permettant la production des produits chiraux à partir de mélanges racémiques dont la demande dans les domaines pharmaceutique et agroalimentaire est importante. Les conditions de la bioconversion sont douces, elles sont très efficaces en termes d'énergie puisqu'elles peuvent avoir lieu à des températures, une pression et un pH modérés. La production des composés est généralement simplifiée par un nombre d'étapes plus restreint [15]. Les bioconversions sont de plus particulièrement adaptées aux nouvelles normes mondiales relatives au « développement durable » et au label « naturel » actuellement très recherchés par les institutions politiques et les consommateurs car elles permettent la production des produits qui peuvent être étiquetés comme naturel [16]. Parmi ces produits, il y'a beaucoup qui ont des applications de grande envergure, y compris les arômes, les produits agrochimiques, les antibiotiques, les antioxydants et les agents anticancéreux [17].

Pour obtenir un produit naturel, il y'a actuellement le choix entre deux systèmes de production qui sont les procédés classiques d'extraction à partir de matières premières naturelles, et les bioconversions. La mise en œuvre des réactions de bioconversion permet d'éliminer certaines faiblesses inhérentes aux techniques classiques d'extraction. Il est en effet possible de s'affranchir de facteurs incontrôlables (climatiques, géographiques) qui agissent sur la quantité et la qualité d'arômes extraits de matières premières.

Les bioconversions permettent également une autonomie vis-à-vis de l'approvisionnement en matières premières fortement influencé par les saisons notamment dans le cas de végétaux aromatiques. Elles permettent aussi de diminuer les volumes des résidus d'extraction et notamment l'utilisation des microorganismes non proliférants, ce qui est un avantage important lorsque le précurseur employé est toxique pour les cellules.

Enfin, d'un point de vue commercial, certaines biotransformations peuvent être moins chers et plus directes que les analogues chimiques, tandis que les transformations se déroulent dans des conditions qui sont normalement considérés comme respectueux de l'environnement [18].

I. 2. 4 Difficultés liées à la bioconversion

Les biotransformations des monoterpènes sont communément reconnues comme étant très intéressantes économiquement mais difficiles à réaliser par des procédés conventionnels [9]. Ce phénomène est essentiellement lié aux propriétés physico-chimiques de ces molécules.

Ce sont en effet des composés relativement instables, surtout dans les milieux aqueux et/ou oxygénés. Ils peuvent subir facilement un nombre important de réactions chimiques spontanées comme une auto-oxidation, une *cis-trans* isomérisation, une racémisation, une hydratation, une cyclisation ou encore un réarrangement ou une polymérisation [19]. Ces phénomènes abiotiques peuvent d'une part entrer en compétition avec la réaction biologique, entraînant ainsi une diminution du rendement de bioconversion et peuvent d'autre part générer chimiquement les produits de la bioconversion, ce qui brouille l'estimation de son efficacité réelle. Enfin les produits de bioconversion eux-mêmes peuvent être la cible de réactions abiotiques.

Les monoterpènes sont également très peu solubles dans l'eau. Ainsi, la volatilité caractéristique des monoterpènes qui rend ces composés aromatiques si attrayants, peut également poser des problèmes au cours des procédés de bioconversion. En effet, les bioconversions intéressantes sont souvent des réactions oxygène-dépendantes qui nécessitent une agitation et une aération importante provoquant des pertes de substrats et de produits par entraînement [20].

Une autre difficulté rencontrée lors de l'utilisation de terpènes est due à leur toxicité et à leur forte activité antimicrobienne [21].

I. 3 Biodégradation

I. 3.1 Définition de la biodégradation

La définition émergente, proposée par de nombreux auteurs, de la biodégradation ou de la biodégradabilité se traduit par une action de dégradation d'un composé organique par des agents biologiques comme les bactéries, les champignons et les algues [22].

Autrement dit, c'est une dégradation biotique qui met en jeu l'action des microorganismes, qui grâce aux enzymes qu'ils excrètent peuvent utiliser les matières organiques comme sources de carbone et d'énergie conduisant à une décomposition du substrat au niveau moléculaire. La biodégradation acceptable est évoquée lorsque la transformation du composé lui retire ses propriétés toxiques.

Si la biodégradation du substrat organique est totale, c'est-à-dire formation uniquement de produits inorganiques tels H_2O , H_2 , CO_2 , Cl^- ..., on parle de minéralisation [10].

La biodégradation peut avoir lieu en présence ou en absence d'oxygène, en milieu solide ou aqueux. Les facteurs d'environnement (température, humidité,...) ainsi que la structure du substrat (liaisons chimiques, stéréochimie,...) sont des facteurs qui influencent le processus de biodégradation [23].

I. 3.2 Type de biodégradation

La biodégradation primaire est définie comme la dégradation partielle de la structure moléculaire de la substance initiale. Cette dégradation peut conduire soit à la perte de propriétés caractéristiques de la substance telles que son activité biologique, soit à l'apparition de sous-produits de transformation parfois plus toxiques que la substance de départ. La biodégradation totale ou ultime est décrite comme la biodégradation complète de la structure moléculaire de la substance, qui conduit à la formation de dioxyde de carbone, de méthane, d'eau, de dérivés minéraux ou de constituants de micro-organismes [24].

I. 4 Etude de la bioconversion des métabolites secondaires par *Bacillus* et *Streptomyces*

I. 4.1 Généralité sur les microorganismes

I. 4.1.1 Le genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* dont l'espèce type est *B. subtilis* est toujours considéré comme l'un des plus grands genres et comprend plus de 200 espèces [25].

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles rectilignes à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (de 0,5 x 1,2 µm jusqu'à 2,5 x 10 µm), parfois sporulés, à Gram positif ou à Gram variable, généralement mobiles grâce à une ciliature pérित्रique parfois capsulés, aérobies ou aéro/anaérobies facultatif, le plus souvent catalase positive, donnant une réponse variable au test de l'oxydase [26]. Ils sont hétérotrophes, nitrifiants, dénitrifiants, fixateurs d'azote, précepteurs de fer, oxydants le sélénium, oxydants et réduisant le manganèse. Ces microorganismes sont des chimioorganotrophes facultatifs, acidophiles, alcalophiles, psychrophiles, thermophiles, halotolérants, ou halophiles et sont capables de croître et former des endospores résistantes à différentes conditions telles que le pH, la température, les radiations, les désinfections, la dessiccation et des concentrations de sel où peu d'autres organismes peuvent survivre [26].

Le genre *Bacillus* est parmi les microorganismes les plus abondantes et omniprésentes dans la nature, son principale habitat est le sol [27]. Cependant ce genre peut être également isolé à partir des aliments, de l'eau, des organismes eucaryotiques et même à partir des environnements extrêmes comme les déserts, l'antarctique et les habitats hypersalins [28].

I. 4.1.2 Le genre *Streptomyces*

Le mot *Streptomyces* regroupe tous les membres du genre *Streptomyces*, c'est le genre d'actinomycètes le plus abondant et surtout le plus performant dans la production de métabolites secondaires importants. Il contient 1890 espèces et 114 sous espèces. L'espèce type de ce genre est *S. albus* [26] [29-31].

Les *Streptomyces* sont donc des organismes procaryotes qui possèdent une structure filamenteuse ou mycélienne. Cela explique leur dénomination : Du Grec *Strepto*.myces : *Streptos* : tordu ou courbe et *myces* : champignons [32].

Les *Streptomyces* sp. sont des organismes aérobies, à coloration de Gram positive, chimioorganotrophes, catalase positive [33] qui possèdent un métabolisme oxydatif et un taux G+C% compris entre 69 et 78% [34-36].

Ils tendent à croître lentement en formant des filaments ramifiés de 0,5 à 2 µm de diamètre qui fragmentent rarement c'est le mycélium végétatif ou mycélium de substrat. Le mycélium aérien forme par contre à sa maturité des chaînes de spores non mobiles [37].

Leur température optimale se situe entre 25 à 35 °C, à l'exception des espèces qui sont psychrophiles et d'autres thermophiles qui peuvent tolérer une température de 55 °C (l'optimum est à 50 °C) [26] [38].

Le pH optimum est dans l'intervalle de 6,5-8,0, mais il y a des espèces qui sont alcalophiles et se développent à un pH de 11 [39-41].

I. 4.2 Classification des espèces

I. 4.2.1 Classification de l'espèce *Paenibacillus popilliae*

Le genre *Paenibacillus* est créé en 1993 pour former l'ancien «Groupe 3» du genre *Bacillus*. Il comprend plus de 30 espèces anaérobies facultatives et formant des endospores, neutrophiles, hétérotrophes, à flagelles péritriches, bacilles à Gram positif.

Le taxon contient diverses espèces telles que *B. popilliae alvei*, *amylolyticus*, *azotofixans*, *gordonae*, *larvei*, *macerans*, *macquariensis*, *pabuli*, *polymyxa*, *pulvifaciens*, et *validus* [42].

I. 4.2.2 Classification de l'espèce *Streptomyces rochei*

Le nombre d'espèces du genre *Streptomyces* a augmenté de 40 à plus de 3000, mais certaines d'entre elles étaient considérées comme synonymes. En 1964, le projet international des *Streptomyces* (ISP) a essayé de standardiser les critères de détermination de l'espèce [43-46].

Les *Streptomyces* sp. se trouvent dans tous les milieux terrestres et aquatiques ainsi que les environnements symbiotiques et endophytiques [47]. Elles sont très abondantes dans les sols riches en matière organique en décomposition [26].

Elles représentent le genre le plus abondant de la population des actinomycètes dans le sol et elles sont responsables de son odeur d'humus caractéristique [48, 49]. Mais elles sont, aussi, trouvées dans les milieux où les conditions sont extrêmes [50].

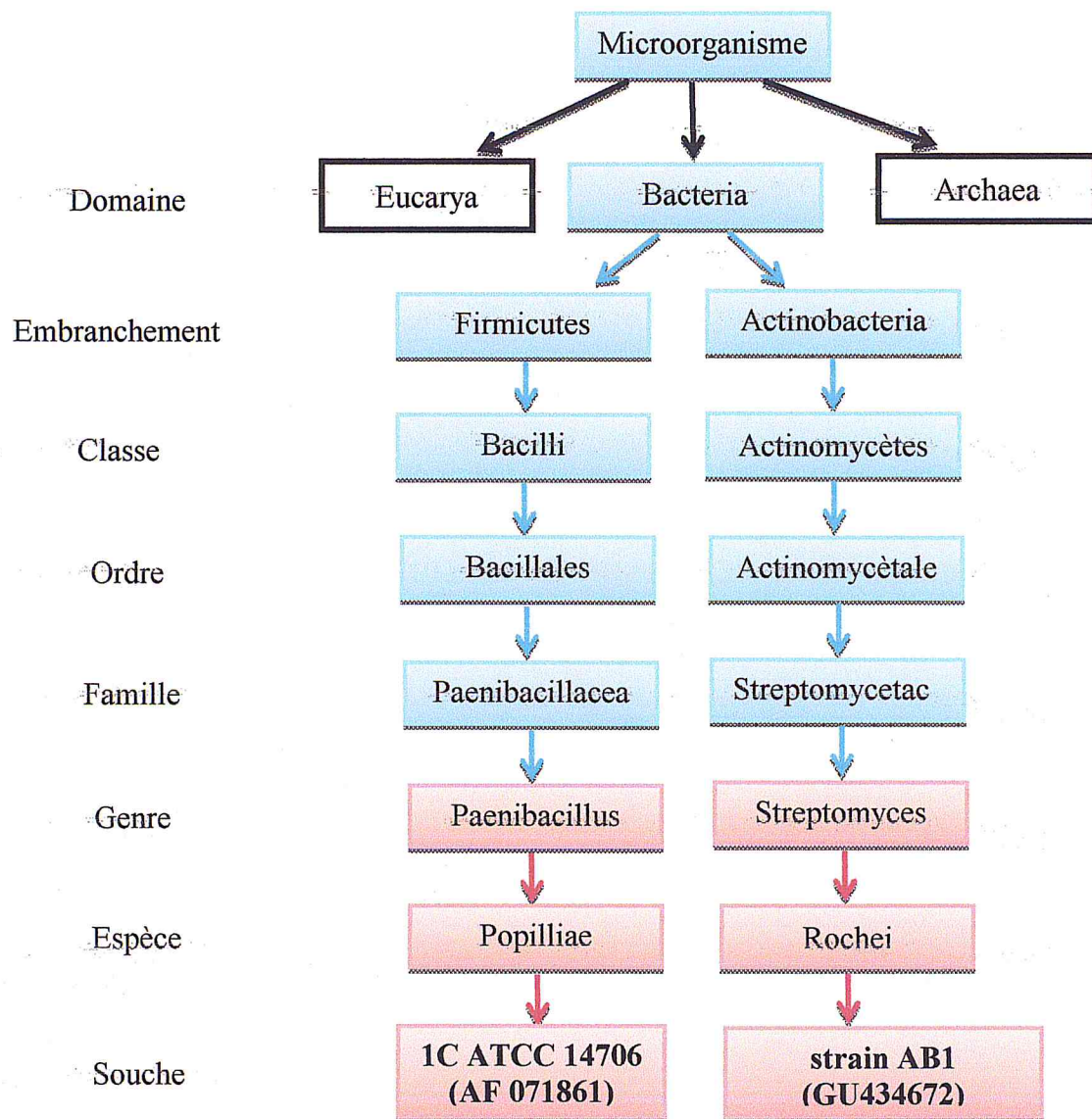


Figure 1: Schéma représentant la classification de l'espèce *Paenibacillus popilliae* et *Streptomyces rochei*

I. 4.3 Bioconversion des métabolites secondaires par le genre *Bacillus*

I. 4.3.1 Bioconversion de 1,4-cinéole

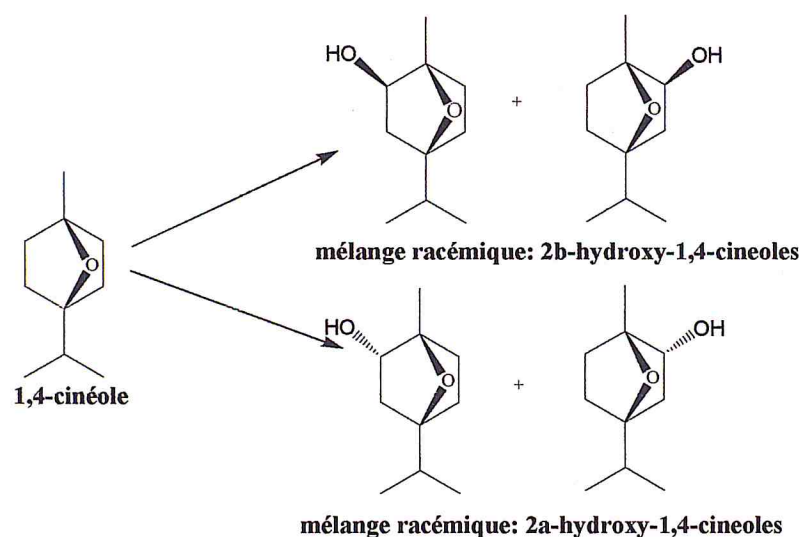


Figure 2: Bioconversion de 1,4-cinéole par *Bacillus cereus* [51]

I. 4.3.2 Bioconversion de β -pinène et de limonène

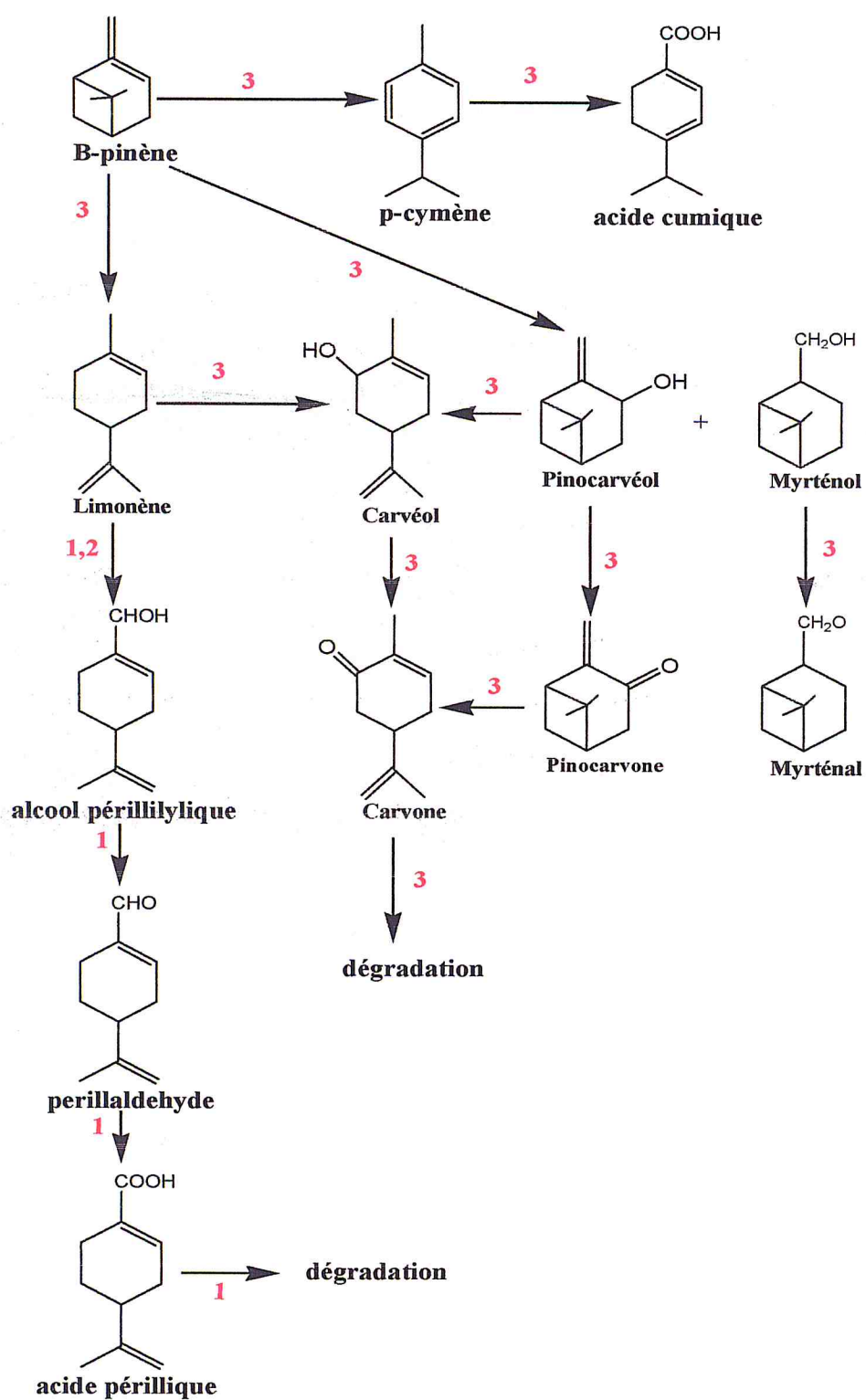


Figure 3 : Les voies générales de dégradation de β -pinène et du limonène. Les flèches correspondent à des réactions métaboliques observées en présence des souches bactériennes suivantes : 1. *Bacillus* [9]; 2. *Bacillus stearothermophilus* [9]; 3. *Bacillus pallidus* [52].

I. 4.4 Bioconversion des métabolites secondaires par le genre *Streptomyces*

Tableau 1 : Bioconversion de quelques métabolites secondaires par le genre *Streptomyces*

Microorganismes	Métabolites	Produits	Références
<i>Streptomyces bottropensis</i> SY-2-1	1,8-cineole	(+)-2a-hydroxy-1,8-cineole	[53] et [54]
<i>Streptomyces ikutamanensis</i> Ya-2-1		(+)-3a-hydroxy-1,8-cineole	[53] et [54]
<i>Streptomyces griseus</i>	1,4-cineole	8-hydroxy-1,4-cineole	[51]
<i>Streptomyces bottropensis</i> , SY-2-1	(+)-carvotanacetone	5b-hydroxy-(+)-neoisocarvomenthol et a-hydroxy-(+)-carvotanacetone	[55]
<i>Streptomyces bottropensis</i> SY-2-1	(-)-carvotanacetone	5b-hydroxy-(-)-carvotanacetone et 8-hydroxy-(-)-carvotanacetone.	[55]
<i>Streptomyces</i> A-5-1	(-)-carvone	(-)-trans carveol	[56-58]
<i>Streptomyces bottropensis</i> .	(+)-carvone	(+)-carvone-8,9-epoxide et (+)-5a-hydroxycarvone	[59]
<i>Streptomyces ikutamanensis</i> Ya-2-1	(-)-Perillyl alcohol	8,9-epoxy-(-)-perillyl alcohol	[60]
<i>Streptomyces humidus</i> Tu-1	Thymol	(1R,2S) et (1R,2R)-2-hydroxy-3-p-menthen-5-one	[61]
<i>Streptomyces ikutamanensis</i> , Ya-2-1	Geranial	Geraniol	[60]
	Neral (+)-, (-)-, et (±)-citronellal	Nerol (+)-, (-)-, and (±)-citronellol	

I. 4.5 Bioconversion des métabolites secondaires par divers microorganismes

Comme nous l'avons vu précédemment, les terpènes constituent la principale source de composés aromatiques que l'on trouve dans les huiles essentielles et les plantes supérieures. Leur bioconversion peut également conduire à l'obtention de composés intéressants pour l'industrie des arômes et/ou pour l'industrie pharmaceutique. Les microorganismes préférés pour ces réactions sont par ordre d'importance, les bactéries, les levures et les champignons.

Le nombre très important de ces bioconversions ainsi que leurs natures diverses constituent un domaine très vaste étudié par de nombreux auteurs (tableau 1).

Tableau 2 : Bioconversion des monoterpènes par différents espèces de microorganismes

Organisme	Substrat	Produit	Référence
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9142	Linalool	<i>cis</i> et <i>trans</i> de furanoïde linalool oxyde et pyranoïde linalool oxyde	[62]
<i>Castellaniella defragrans</i> 65Phen (DSM 12143)	Linalool	Géranol	[63]
<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> (ATCC700278D-5)	Linalool	(6 <i>E</i>)-8-oxolinalool	[64]
<i>Pseudomonas putida</i> (PpG 777)			[65]
<i>Cystoderma carcharias</i>	Citronellol	<i>trans</i> -2-isobutenyl-4-methyltetrahydropyrane	[66]
<i>Pseudomonas citronellolis</i> (ATCC 13674)	Citronellol	Citronellal/ citronellate	[67]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Citral	acide géranique	[68]
<i>Castellaniella defragrans</i> 65Phen (DSM 12143)	β-myrcène	(<i>S</i>)-(+)-linalool	[63]
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DCL 14	(<i>R</i>)-limonene	1,2-epoxy-menth- 8-ene	[69]
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> (ex: <i>Bacillus</i> strain BR388)	(<i>S</i>)-limonene	(-)-alcool périllylique	[70]
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DCL 14	(-)-menthone	(4 <i>R</i> ,7 <i>S</i>)-4-methyl- 7-(propan-2-yl) oxepan-2-one	[69]
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DCL 14	(-)- <i>trans</i> -carveol	(-) carvone	[69]
<i>Rhodococcus opacus</i> PWD4 (DSM44313)	(+)- <i>trans</i> -carveol	(+) carvone	[71]
<i>Citrobacter braakii</i>	1,8- cineole	2-endo-hydroxy- 1,8-cineole	[72]
<i>Pseudomonas flova</i>	1,8- cineole	2-oxocinéole et (<i>R</i>)-5,5-dimethyl-4-(3'-oxobutyl)-4,5-dihydrofuran-2-(3 <i>H</i>)-one	[73]
<i>Castellaniella defragrans</i> 65Phen (DSM 12143)	Geraniol	Geranial	[74]
<i>Pseudomonas putida</i> F1 (ATCC700007)	<i>p</i> -cymene	alcool <i>p</i> -cumique	[75]
<i>Pseudomonas putida</i> (ATCC29607)	(+)(-)-Camphre	5-oxo-hydroxy- camphre	[76]
<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> (ATCC700278D-5)			[64]
<i>Pseudomonas putida</i> (ATCC 55180)	Eugenol/ acid ferulique	Vanilline	[77]

I. 5 Etude de la bioconversion de l' α -pinène

I. 5.1 Description du métabolite α -pinène

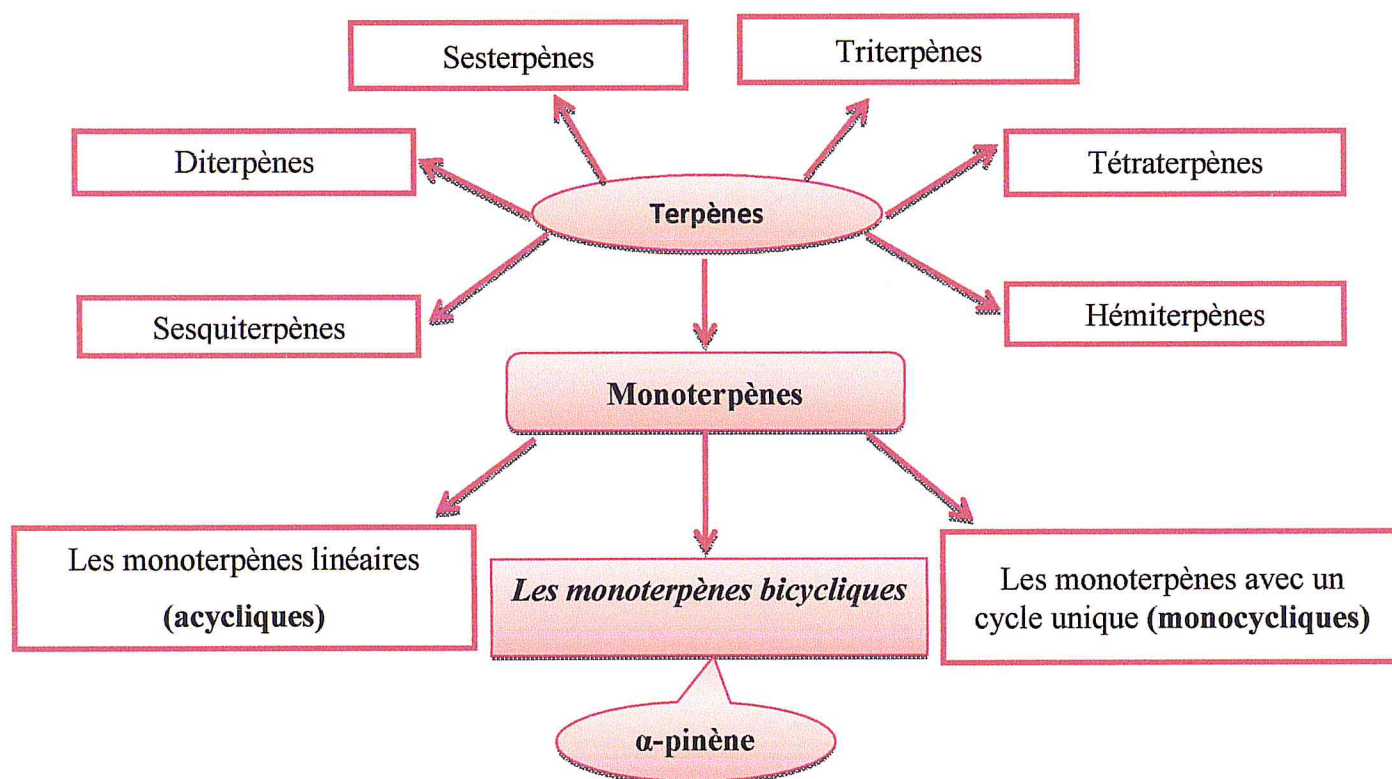
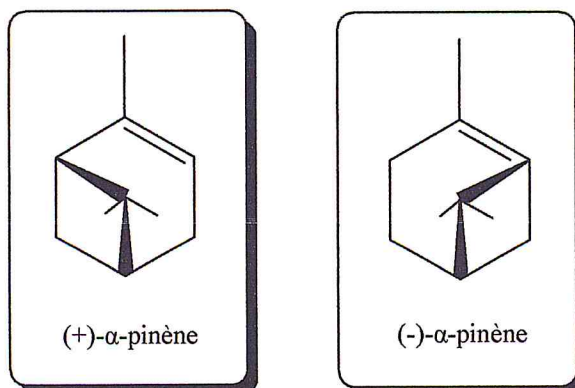


Figure 4: Classification de l' α -pinène

C'est un composé organique, alcène insaturé, hydrophobe et volatile, hautement réactif et qui se prête à une modification par synthèse chimique. L' α -pinène est un sous-produit de l'industrie des pâtes et papiers [78] obtenu industriellement par la distillation fractionnée d'essence de térébenthine [79].

Le (+)- α -pinène est rencontré dans l'huile de *Pinus palustris* à des concentrations allant jusqu'à 65%, et dans l'huile de *Pinus caribaea* à des concentrations de 70%. De plus, l'huile de *Pinus caribaea* contient 70 à 80% du (-)- α -pinène [80].



L' α -pinène est présent en plus faible quantité dans les végétaux comme les *Rosmarinus*, *Salvia meleleuca* [81]. Il est reconnaissable par son parfum boisé, assimilable à l'odeur du pin, et est ainsi fréquemment utilisé dans les désodorisants, les parfums d'intérieurs ou encore les produits d'entretien.

I. 5.2 Propriétés bactériologique de l' α -pinène

La médecine et l'industrie pharmaceutique utilisent les huiles essentielles en raison de leurs diverses propriétés: bactériostatiques, bactéricides, vermicides, fongicides, antiseptiques, insecticides [82-88], etc. C'est le cas par exemple de l'essence de pin, riche en α -pinène qui possède les propriétés biologiques suivantes :

- ✓ Activité bactéricide ;
- ✓ Activité antifongique ;
- ✓ Activité antivirale ;
- ✓ Activité antiseptique atmosphérique ;
- ✓ Activité anti-œdémateuse ;
- ✓ Activité expectorante.

L'industrie pharmaceutique a souvent recours à cette molécule efficace pour le traitement des affections respiratoires (rhume, toux, bronchite).

I. 5.3 Bioconversion de l' α -pinène par divers microorganismes

L' α -pinène est le monoterpène le plus abondant dans la nature. Il est obtenu industriellement par distillation fractionnée de l'essence de térébenthine [79]. Avec plus de 160 000 tonnes d' α -pinène produite par an, il constitue la première source naturelle de terpènes présente sur le marché. De nombreux travaux ont permis de mettre en évidence sa bioconversion en terpénoïdes par différents microorganismes. Les principales voies de dégradation de l' α -pinènes par des souches bactériennes proposées par différents auteurs sont représentées dans les organigrammes illustrés par la figure 5.

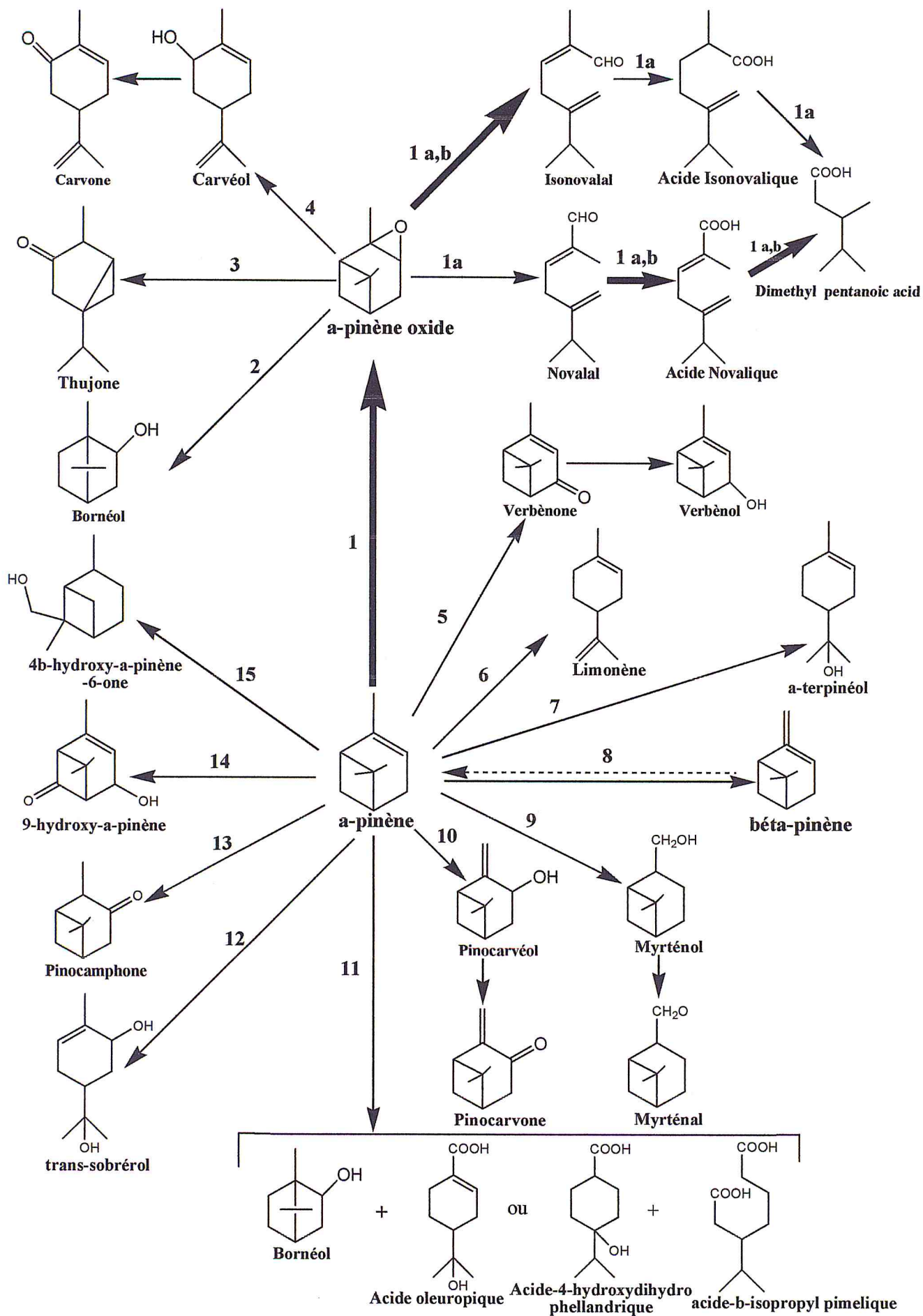


Figure 5 : Principales voies métaboliques de l' α -pinène décrits dans la littérature [89].

PARTIE II

Etude expérimentale

II. 1 Introduction

Notre travail expérimental porte essentiellement sur l'activité catabolique (bioconversion et biodégradation) de l' α -pinène par deux souches bactériennes (*Peanibacillus popilliae* et *Streptomyces rochei*). Un essai de la photodégradation de l' α -pinène par différents types de rayonnements, a été également réalisé.

La partie expérimentale comporte trois grandes parties :

- **La première partie** est consacrée aux analyses préliminaires de l' α -pinène par la Spectrophotométrie Infrarouge à Transformée de Fourier et la Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse.
- **La deuxième partie** a été réservée à la mise en évidence de processus de bioconversion et de biodégradation qui ont été réalisés en quatre étapes :
 - Préparation des différents types de milieux de culture ;
 - Détermination de la gamme de concentration par le test d'inhibition;
 - Protocole de bioconversion et biodégradation ;
 - Analyse des métabolites obtenus.
- **La troisième partie** traite la photodégradation de l' α -pinène qui a été réalisée en deux étapes :
 - Photodégradation par les rayons UV.
 - Photodégradation par les rayonnements haute énergie Cs.
 - Analyse des métabolites obtenus.

La préparation des milieux de cultures et le déroulement des processus de bioconversion et de biodégradation ont été effectuées au sein du laboratoire de microbiologie (Département de génie des procédés, Université de Blida 1) et au laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et Biomolécules (Département de Chimie, Université de Blida 1), respectivement. La procédure de photodégradation par les rayons UV a été réalisée au laboratoire de l'amélioration des plantes (Département de Biotechnologie, Université de Blida 1).

L'analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a été réalisée au laboratoire des plantes médicinales et aromatiques (Département de Biotechnologie, l'Université Blida 1), alors que l'analyse des métabolites par chromatographie en phase Gazeuse Couplée à la Spectrométrie de Masse a été effectuée au Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyse Physico-Chimique à Bousmail.

II. 2 Matériel et méthodes

II. 2.1 Analyses préliminaires de l' α -pinène

II. 2.1.1 Analyse par Spectrophotométrie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)

Une solution de α -pinène à une concentration de 5 mg/ml a été analysée par IRTF. L'analyse a été effectuée sur un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) de marque Bruker type Tensor 27, équipé d'un détecteur sulfate triglicine deutéré DTGS à température ambiante, d'une source infrarouge moyen (4000-400 cm^{-1}), d'un rayonnement laser et un diviseur de faisceau KBr. Le traitement des spectres est réalisé avec le logiciel OPUS 6.5 fonctionnant sous le système d'exploitation Microsoft Windows XP (Figure 6).

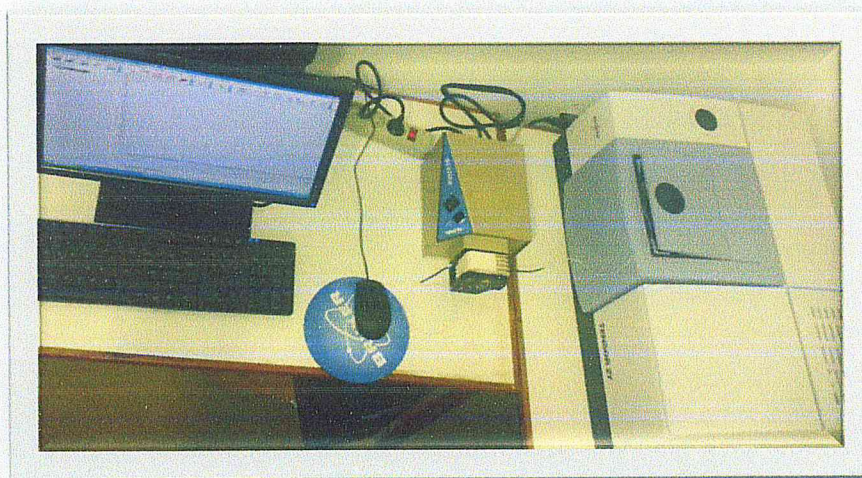


Figure 6 : Spectromètre IR à transformée de Fourier

Les fenêtres utilisées pour l'analyse de la phase liquide sont en Sélénure de Zinc (ZnSe) avec une entretoise en téflon de 1 mm. Les tubes de connections sont en téflon avec un diamètre intérieur de 0.8 mm et le chargement est réalisé en employant des tubes de chlorure de polyvinyle de diamètre intérieur de 2.79 mm.

L'introduction des solutions se fait à l'aide d'un système à écoulement bloqué avec une cellule de flux.

Le système d'écoulement est effectué en utilisant une pompe péristaltique, le flux est stoppé momentanément une fois la cellule est remplie. On obtient le spectre et on rétablit le flux pour rincer la cellule avec le solvant et la remplir à nouveau avec une autre solution.

II. 2.1.2 Analyse par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

La solution de α -pinène ainsi que les extraits obtenus après la culture bactérienne d'une période d'incubation d'une semaine sont soumises à une analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM). L'analyse est réalisée sur un chromatographe de type HP 6800 couplé à un spectromètre de masse de type HP MSD 5973 (Figure 7).

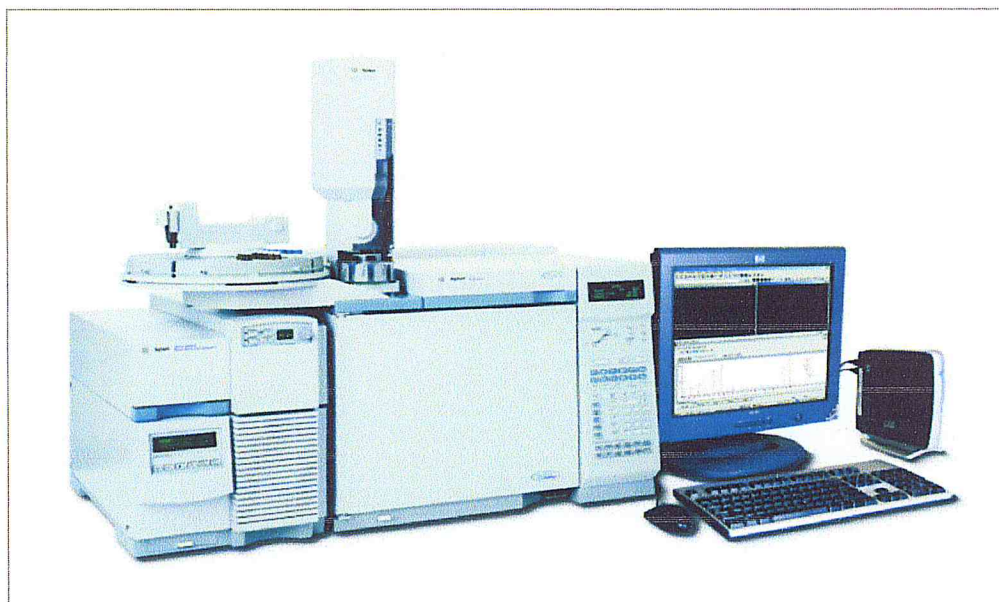


Figure 7 : Chromatographe HP 6800 couplé à un spectromètre de masse HP MSD 5973

Les conditions d'analyses sont les suivantes :

Injecteur

- Température : 250 °C.
- Mode d'injection : Splitless (avec division) = 1/90.
- Volume injecté : 1 μ l.

Colonne

- Type : capillaire de type HP-5MS.
- Dimensions : 30 m (longueur) x 0.25 mm (Diamètre interne) x 0.25 μ m (épaisseur du film).
- Phase stationnaire : (5%-phényl)-méthylpolysiloxane.
- Température du four : 100°C -5°C/min -220°C.
- Gaz vecteur : Hélium pur.
- Débit GV : 5 ml/min.

Détecteur de masse

- Mode d'analyse : Scan (de 34 à 450).
- Solvant utilisé : l' α -pinène est dilué dans 5 ml d'acétate d'éthyle.
- Température de l'interface : 280 °C.
- Type d'ionisation : Impact électronique.
- Energie d'ionisation: 70 eV.
- Type de l'analyseur de masse : Quadripôle.
- Température du quadripôle : 150 °C.
- Température de la source : 230 °C.

Les composés ont été identifiés en se basant sur les banques de données spectrales (Wiley 7n, Nist 02, NBS75 k) ainsi que sur les données de la littérature.

II. 2.2 Etude de l'activité catabolique de l' α -pinène par *Penibacillus popilliae* et *Streptomyces rochei*

II. 2.2.1 Origines des deux souches

→ *Penibacillus popilliae* 1C

La souche bactérienne 1C ATCC 14706 (AF 071861) utilisée dans cette étude a été isolée à partir d'un sol contaminé par le pétrole brut provenant de la région Hassi Messaoud (Algérie), elle a été isolée après enrichissement de la culture dans un milieu minimal avec le pétrole brut comme la seule source de carbone et de l'énergie [5].

→ *Streptomyces rochei* AB1

La souche *Streptomyces rochei* AB1 (GU434672) a été isolée à partir de la surface du sol humide de Boufarik en Mars 2007. Cette région est connue par sa fertilité et une disparition rapide de la matière organique naturelle, par exemple: des acides humiques (HA) [6].

II. 2.2.2 Milieux de culture

- Tous les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage en cycle humide 20 min à 120 °C (Annexe 3) et leur pH est ajusté à 7.2 par les solutions : NaOH (0.1 N) et HCl (0.1N).
- La fiole contenant le milieu doit être fermée avec du coton et du papier aluminium.

a. Milieux de repiquage

Concernant la souche *Peanibacillus popilliae*, le milieu LB (Luria Bertani) est utilisé comme milieu de repiquage avec la composition : 10 g peptone ; 5 g NaCl ; 5 g extrait de levure et 20 g agar dans un litre d'eau distillée.

Pour la souche *Streptomyces rochei*, la souche a été repiquée sur deux milieux:

- **Le milieu ISP2 solide:** 4 g extrait de levure ; 10 g extrait de malte ; 4g glucose et 20 g d'agar dans un litre de l'eau distillée.
- **Le milieu ISP9 solide:** 10 g Glucose ; 2,84 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,38 g KH_2PO_4 ; 5,65 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 20 g agar et 1 ml d'une solution contenant (g /L) : 0,64 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,11g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,79 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,15 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; dans un litre de l'eau distillée.

b. Milieux de préculture

La préculture est réalisée dans des flacons de 250 ml contenant 50 ml des différents milieux. La source de carbone diffère selon les expérimentations. Des repiquages successifs ont été effectués chaque 48H dans un milieu neuf.

→ Préculture de *Peanibacillus popilliae*

Nous avons utilisé le milieu LB liquide (sans agar). Ce milieu a été utilisé pour la bioconversion.

→ Préculture de *Streptomyces rochei* AB1

Nous avons utilisé le milieu ISP₉ pour la biodégradation et la bioconversion successivement :

- **Composition du milieu pour la biodégradation (pauvre):** 0.1 g Glucose; 2,84 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,38 g KH_2PO_4 ; 5,65 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 1 ml d'une solution d'éléments traces métalliques.
- **Composition du milieu pour la bioconversion (riche):** 10 g Glucose; 2,84 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,38 g KH_2PO_4 ; 5,65 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 1 ml d'une solution d'éléments traces métalliques.

Les flacons ont été scellés avec un coton cardé et incubés dans un incubateur statique à 30°C pendant 48H.

c. Milieu de Muller Hinton

Le milieu MH a été utilisé dans le test d'inhibition des bactéries vis-à-vis l' α -pinène en milieu solide, sa composition est la suivante : 300g d'infusion de viande de bœuf déshydraté; 17,5g d'hydrolysate de caséine; 15g d'amidon de maïs; 13g d'agar dans un litre d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7.4.

II. 2.2.3 Repiquage des souches et préparation de précultures

→ Repiquage des souches

Les ensemencements sont faits dans des conditions d'asepsies. Après un bon développement des colonies, on effectue un repiquage de chaque colonie sur les milieux LB solide pour 1C et le milieu ISP2 et ISP9 pour AB1 (Figures 8 et 9).



Figure 8 : La souche *Peanibacillus popilliae*

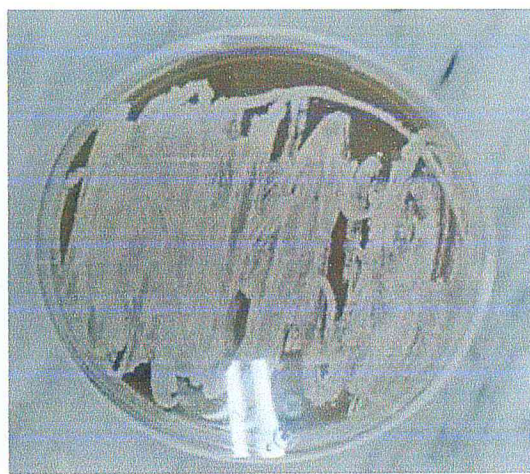


Figure 9 : La souche *Streptomyces rochei*

→ Préparation de préculture

D'après les souches repiquées préalablement et après l'incubation statique, une colonie bien séparée, est ensemencée dans des flacons de 250 ml contenant 50 ml du milieu LB liquide pour 1C et les milieux ISP2 et ISP9 pour AB1.

II. 2.2.4 Préparation de la solution mère de l' α -pinène

L'opération s'effectue dans des conditions aseptiques. Dans un flacon stérile contenant un volume bien déterminé d'eau distillée stérile nous avons ajouté une quantité bien définie de l' α -pinène de façon à avoir une concentration égale à 30 mg /ml. Etant donné que l' α -pinène est non miscible avec l'eau c'est pour cela qu'une quantité de 0.2% (v/v) de tween 80 a été

ajoutée à la solution mère en vue d'obtenir un mélange homogène [90]. La solution mère a été filtrée sous flamme, sur des microfiltres stériles de 0,45 μm de diamètre de pores.

II. 2.2.5 Détermination de la gamme de concentration par le test d'inhibition

La technique consiste à utiliser des disques de papier absorbants stériles (de 9 mm de diamètre) imprégnés d'une quantité d'extrait et déposés à la surface d'une gélose inoculée et uniformémentensemencée par la suspension bactérienne à étudier. La diffusion de l'extrait à partir du disque au sein de la gélose détermine un gradient de concentration.

Les microorganismes poussent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'extrait suffisante pour inhiber leur croissance dont on observe après incubation tout autour des disques une zone circulaire claire indemne de colonies, appelée « **zone d'inhibition** » (Figure 10). La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre d'inhibition en mm.

Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'extrait. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante [91].

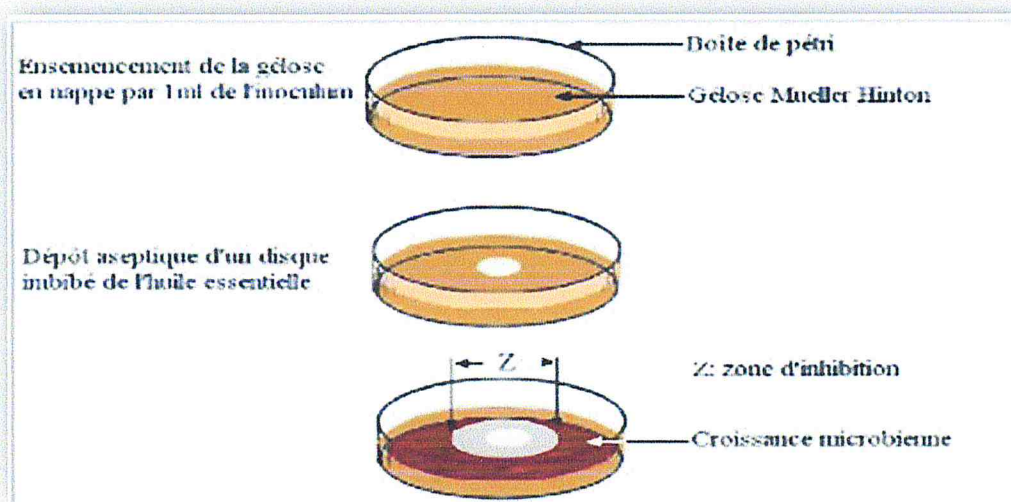


Figure 10 : Schéma représentant une zone d'inhibition

a. Mode opératoire

a. 1 Préparation de la solution physiologique à 0,9 % de NaCl

On dissout 0.9 g de NaCl dans 100 ml d'eau distillée, après quoi on répartit en tube à vis et fond plat à raison de 9 ml par tube. On stérilise à l'autoclave à 121°C pendant 15 min. L'eau physiologique sert comme un diluant des suspensions bactériennes.

a. 2 Préparation de la suspension bactérienne

- A partir d'une culture pure de 18H, racler à l'aide d'une anse de platine une colonie bien isolée,
- Bien décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%,
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne dans des conditions stériles en utilisant un vortex jusqu'à rupture complète de la matière solide, son opacité doit être à 0,5 Mac Farland [92],
- La suspension bactérienne peut être ajustée en ajoutant, soit de la culture si elle est trop faible, ou bien de l'eau physiologique si elle est trop forte.

a. 3 Préparation de la gamme de concentration de l' α -pinène

Une gamme de concentration du α -pinène allant de 0.05 mg/ml jusqu'à 15 mg/ml a été préparée en le dissout dans le méthanol.

a. 4 Ensemencement

La mise en évidence des zones d'inhibition de croissance s'effectue selon les étapes suivantes:

Le milieu MH gélosé en surfusion a été coulé en boîtes de Pétri (20 ml par boîte), et laissé à refroidir préalablement à tout ensemencement.

L'ensemencement des boîtes est effectué selon la méthode d'écouvillonnage, la gélose est frottée en stries serrées à l'aide d'un écouvillon stérile, les boîtes sont séchées sous flamme pendant 15 min. Puis des disques de 8 mm imprégnés par la solution de l' α -pinène qu'on désire tester à différentes concentrations sont déposés délicatement à l'aide d'une pince stérile sur la gélose (2 disques par boîte). Une boîte témoin a été associée, afin de vérifier l'absence de contamination pendant l'ensemencement et deux répétitions pour chaque dilution ont été réalisées.

a. 5 Incubation

Après 4H de pré-diffusion des solutions à 4 °C, les boîtes ensemencées sont portées à l'incubation à l'étuve à une température 45 °C pendant 3 à 5 jours jusqu'à apparition d'une bonne croissance bactérienne.

a. 6 Lecture

La lecture se fait par la mesure avec précision des diamètres de zones d'inhibition produites autour des disques après 48H d'incubation à 45 °C.

II. 2.3 Etude de la bioconversion et la biodégradation de l' α -pinène

II. 2.3.1 Bioconversion par *Streptomyces rochei* AB1

→ Mode opératoire

Un volume de 2 ml de préculture a été inoculé dans un flacon de 250 ml contenant 50 ml d'ISP9 riche. Le milieu de culture a été pré-incubé à l'obscurité dans un incubateur statique à 30 °C pendant une semaine au cours de laquelle une bonne croissance bactérienne a eu lieu.

Après 7 jours, la biotransformation a été initiée par l'addition directe de 10 mg / ml de l' α -pinène dans le flacon de culture dans des conditions stériles (stérilisation par micro-seringue de 0,45 μ m). Ensuite, les flacons ont été scellés avec du coton cardé et placés dans un incubateur statique pendant 6 jours à 30 °C (Annexe 1).

II. 2.3.2 Bioconversion par *Peanibacillus popilliae* 1C

→ Mode opératoire

Un volume de 2 ml de préculture a été inoculé dans un flacon de 250 ml contenant 50 ml de milieu LB liquide. La biotransformation a été initiée par l'addition directe de 10 mg /ml de l' α -pinène dans le flacon de culture dans des conditions stériles (stérilisation par micro-seringue de 0,45 μ m). Ensuite, le flacon a été scellé avec du coton cardé et placé dans un incubateur statique à 45°C pendant une semaine. La durée de l'expérience de la bioconversion était d'une semaine (Annexe 1).

II. 2.3.3 Biodégradation par *Streptomyces rochei* AB1

→ Mode opératoire

L'expérience de la biodégradation par AB1 a été réalisée suivant les mêmes étapes que celles de la bioconversion, la seule différence est dans le milieu de préculture utilisé (le milieu

riche ISP9 utilisé dans la bioconversion a été remplacé par le milieu pauvre ISP2 dans la biodégradation. Le suivi de la cinétique de la biodégradation est assuré pendant une semaine (Annexe 1).

II .2.3.4 Extraction des métabolites

L'extraction des produits de bioconversion et de biodégradation de l' α -pinène a été effectuée après l'élimination du culot bactérien (Annexe 2) par la centrifugation (figure 11) :

✓ **Extraction 1 (Bioconversion par *Streptomyces rochei* AB1) :**

Centrifugation : 12000 tours pendant 60 min

Volume du surnageant : 46 ml

✓ **Extraction 2 (Bioconversion par *Peanibacillus popilliae* 1C) :**

Centrifugation : 12000 tours pendant 60min

Volume du surnageant : 38 ml

✓ **Extraction 3 (Biodégradation par *Streptomyces rochei*)**

Centrifugation : 12000 tours pendant 60min

Volume du surnageant : 40 ml

- Le surnageant a été extrait avec de l'éther diéthylique (2 x 50 ml pour la 1^{ère} extraction, 2 x 45 ml pour la 2^{ème} extraction et 2 x 50 ml pour la 3^{ème} extraction).
- La phase organique biologiquement active a été séchée sur du sulfate de sodium anhydre et filtrée en utilisant du papier filtre Whatman.
- Le solvant a été évaporé par le rotavapeur pour donner des produits réactionnels purs (Annexe 2).
- Quelques microlitres d'acétate d'éthyle ont été ajoutés à l'extrait sec afin de l'analyser directement par GC-MS.

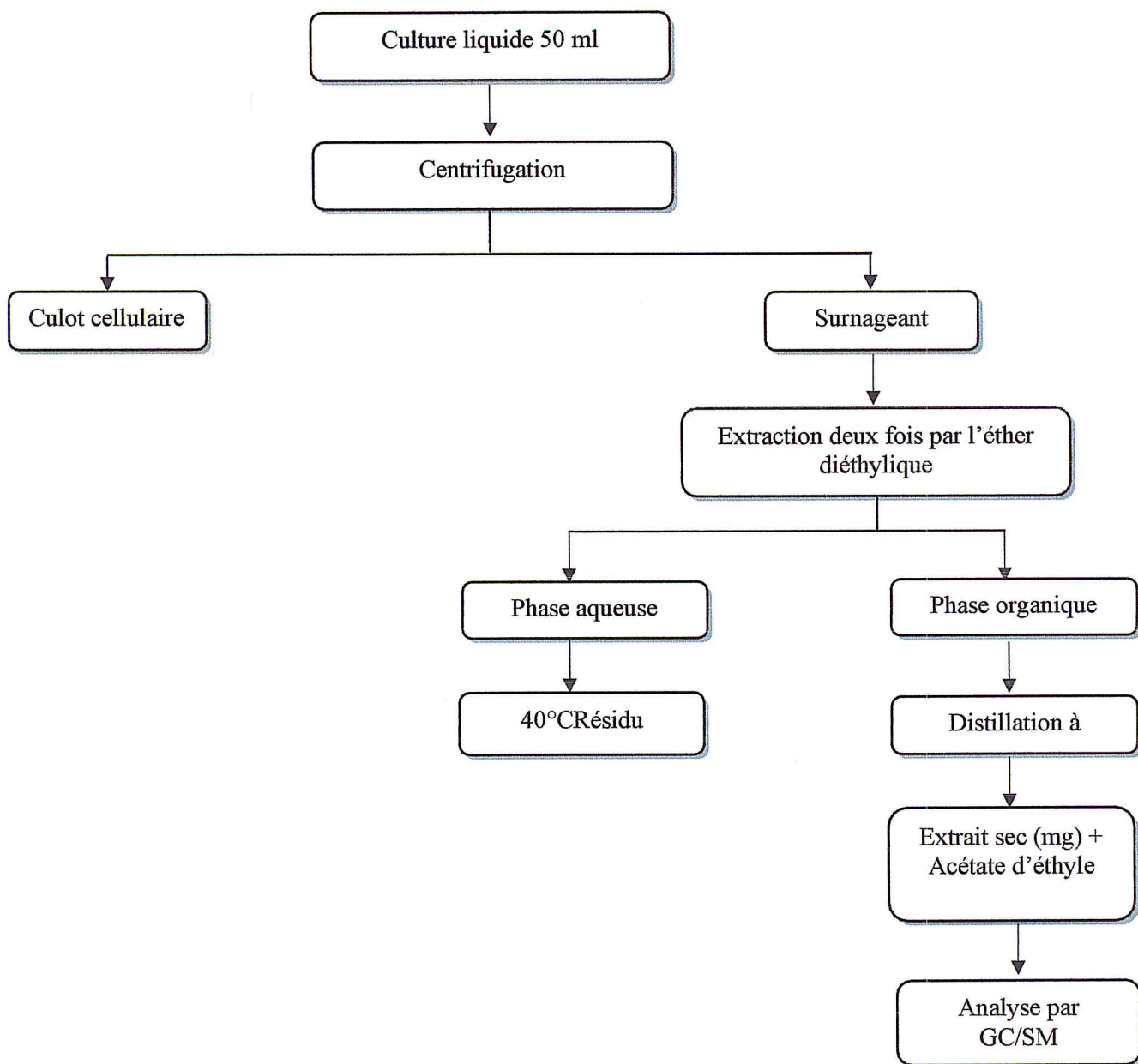


Figure 11 : Schéma représentant les étapes d'extraction des nouveaux métabolites obtenu par la bioconversion et la biodégradation de l' α -pinène

II. 2.4 Etude la photodégradation

II. 2.4.1 Généralités sur la phodégradation par les rayonnements hauts énergie Cs-137

Le traitement ionisant envoie sur la cible des particules de haute énergie : électrons accélérés par des accélérateurs ou particules assimilées à des photons pour le rayonnement gamma. En arrivant en contact des atomes de la cible, les particules éjectent des électrons à partir des couches superficielles. Un effet ionisant a lieu. Ces électrons, dits primaires, ionisent les molécules du milieu, d'où formation d'électrons secondaires ayant une énergie

suffisante pour ioniser d'autres molécules. Ce phénomène appelé effet Compton, se poursuit jusqu'à ce que l'énergie du dernier électron soit équivalente à l'énergie de rupture d'une liaison chimique au sein d'une molécule [93].

Les sources de rayonnements ionisants sont diverses : les électrons accélérés, le rayonnement X, le rayonnement gamma issu d'une source radioactive de Cobalt ^{60}Co ou de Césium ^{137}Cs [94]. Les radionucléides ^{60}Co et ^{137}Cs ont été largement utilisés pour l'irradiation des denrées alimentaires.

Les propriétés radioactives du Césium sont utilisées pour la production de sources à visées industrielles et médicales, en exploitant son rayonnement γ . Dans l'industrie, le Césium est utilisé dans des irradiateurs pour la stérilisation des aliments.

Dans le secteur médical, dans certaines radiothérapies (brachythérapie), une source de Césium radioactif est introduite au plus proche de la tumeur grâce à un cathéter. Le Césium 137 est aussi utilisé pour irradier les produits sanguins, dans le but d'inhiber la division lymphocytaire pour prévenir les risques post-transfusionnels chez des patients receveurs immunodéprimés.

→ Mode opératoire

Dans un tube bien fermé, 20 mg de l' α -pinène pur à l'état liquide est introduit et déposée horizontalement en face la source du rayonnement de Cs-137 pendant 15 min (Figure 12). A la fin de l'opération, la masse d' l' α -pinène est diluée dans l'acétate d'éthyle et soumise à une analyse par CG/SM.

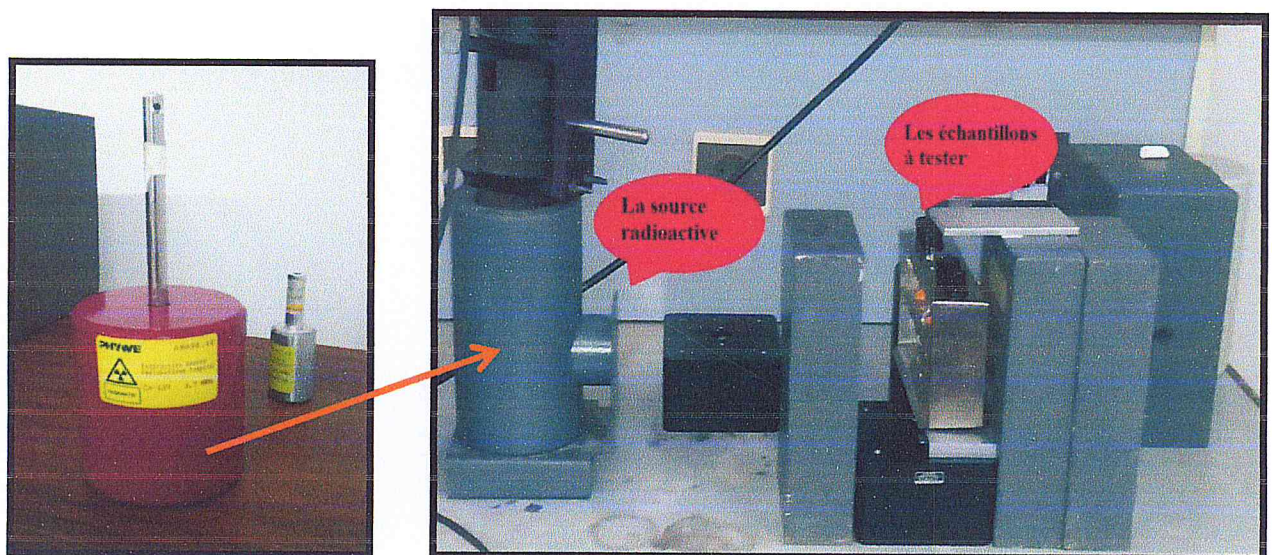


Figure 12 : la source radioactive de Cs-137

II. 2.4.2 Généralités sur la photodégradation par les rayons UV

La photodégradation sous l'effet de rayonnements ultraviolets constitue l'une des voies de dégradation abiotique [95]. Ce processus de dégradation, peut avoir lieu à la surface du sol, dans l'air, ou dans les eaux de surfaces.

La photodégradation a été réalisée à l'aide d'une lampe UV à 254 nm (Annexe) contenu dans un système fermé qui comporte un ventilateur (Annexe 3).

→ Mode opératoire

Dans un bécher, une masse de 50 mg de α -pinène a été introduite et placée verticalement sous la lampe pendant 60 min. Enfin d'opération, la masse d' α -pinène est diluée dans l'acétate d'éthyle et soumis à une analyse CG/SM.

II. 2.5 Analyse par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse des métabolites secondaires obtenus

L'analyse des produits obtenus a été effectuée en utilisant le même appareil (chromatographe de type HP 6800 couplé à un spectromètre de masse de type HP MSD 5973) et dans les mêmes conditions opératoires utilisé lors de l'analyse du α -pinène.

L'identification des composés a été effectuée en se basant sur les banques de données spectrales (Wiley 7n, Nist 02, NBS75 k) ainsi que sur les données de la littérature.

II. 3 Résultats et discussions

II. 3.1 Analyses préliminaire de l' α -pinène

II. 3.1.1 Analyse par Spectrophotométrie Infrarouge à transformée de Fourier de l' α -pinène

Le spectre IRTF de l' α -pinène préparé dans le dichlorométhane avec une concentration de 5 mg.ml⁻¹ est représenté par la figure 13.

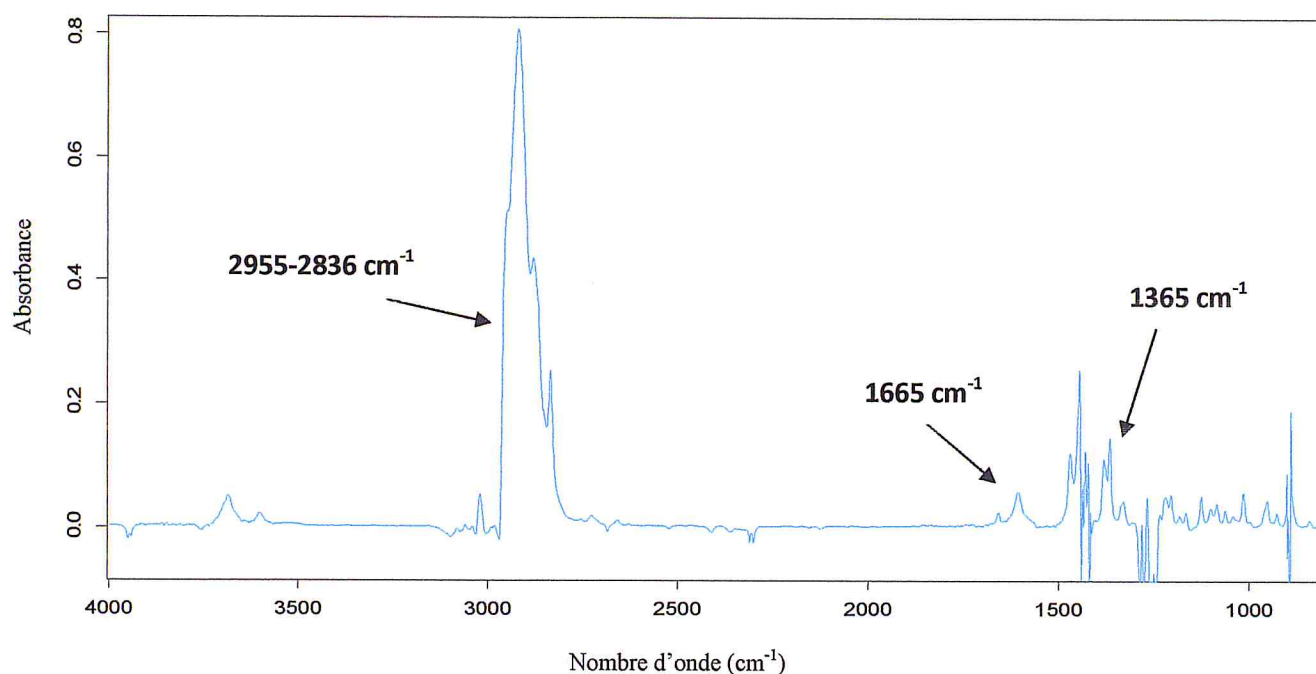


Figure 13 : Spectre IRTF de l' α -pinène

Le spectre de l' α -pinène montre des bandes situées à 2955 et 2836 cm⁻¹ liées aux vibrations des groupements CH₂ et CH₃, et une faible bande à 1656 cm⁻¹ correspondant à la vibration d'allongement des liaisons C=C. On peut constater la présence d'une bande vers 1365 cm⁻¹ caractéristique des groupes CH₂ et CH₃. Donc d'après ce spectre on constate que l' α -pinène utilisé lors du travail est pur.

II. 3.1.2 Analyse par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectroscopie de Masse de l' α -pinène

Le profil chromatographique obtenu par CG/SM (figure 14) montre un seul pic correspond à l' α -pinène avec un temps de rétention de 2,8 min, ce qui indique la pureté de grade analytique de l' α -pinène utilisé lors de nos manipulations.

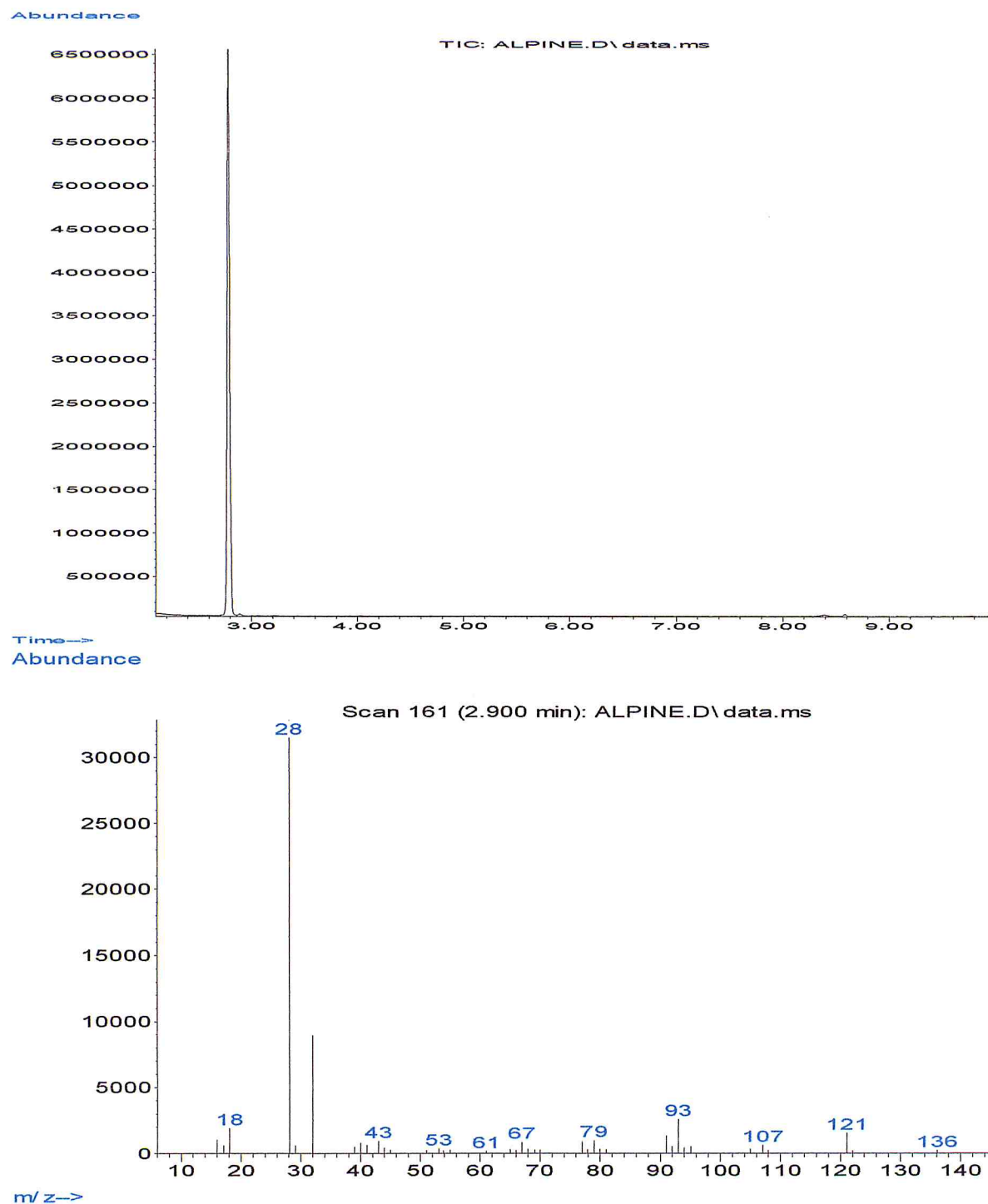


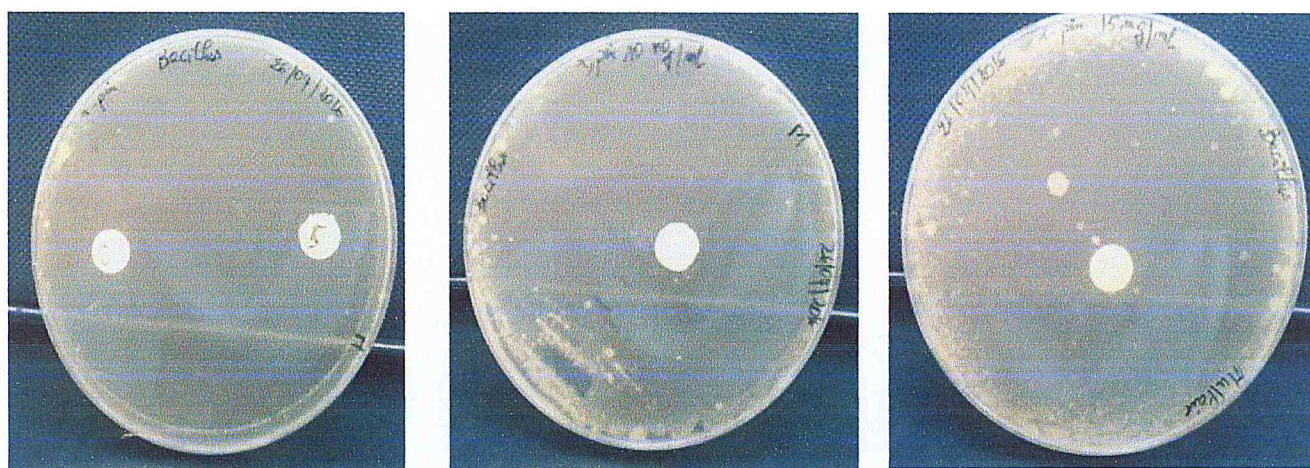
Figure 14: Spectre de CG/SM de l' α -pinène

II. 3.2 Détermination de la gamme de concentration par le test d'inhibition de la souche *Peanibacillus popilliae*

Nous avons utilisé la gamme de concentration en substrat (α -pinène) suivante : 0.05, 0.5, 1, 5, 8, 10 et 15 mg/ml. Nous avons constaté qu'aucune zone d'inhibition n'est apparente (figure 15), ce qui peut être interprété par la résistance de *Peanibacillus popilliae* vis-à-vis de notre substrat qui ne présente aucun effet toxique sur la souche.

L'absence des zones d'inhibition pourraient être également liées à des phénomènes de volatilisation et le révélées dans nos résultats par la volatilisation et le faible degré de diffusion de l' α -pinène sur la gélose.

En se basant sur ces résultats, nous avons choisi la concentration de 10 mg/ml pour la suite du travail. Concernant la souche *Streptomyces rochei*, nous avons choisi fortuitement la même concentration, soit 10 mg/ml, pour réaliser la bioconversion et la biodégradation de l' α -pinène.



Les concentrations 5mg/ml et 8 mg/ml

La concentration 10 mg/ml

La concentration 15 mg/ml

Figure 15 : Tests d'inhibition de l' α -pinène vis-à-vis de la souche *Peanibacillus popilliae*

II. 3.3 Bioconversion de l' α -pinène par *Peanibacillus popilliae* et *Streptomyces rochei*

II. 3.3.1 Bioconversion de l' α -pinène par *Peanibacillus popilliae*

L' α -pinène soumis à des tests de bioconversion par la souche *Peanibacillus popilliae* a permis de récupérer une phase organique (mélange de métabolites). L'analyse par CG/SM de la phase organique a montré le profil chromatographique donné par la figure 16. L'examen du chromatogramme révèle la présence de plusieurs produits, ce qui indique que l' α -pinène a subi une bioconversion. L'identification des différents produits a été faite en se basant sur les banques des données spectrales (Wiley 7n, Nist 02, NBS75 k) ainsi que sur l'examen des spectres de masse des différents produits. Le tableau 3 regroupe les différents métabolites obtenus.

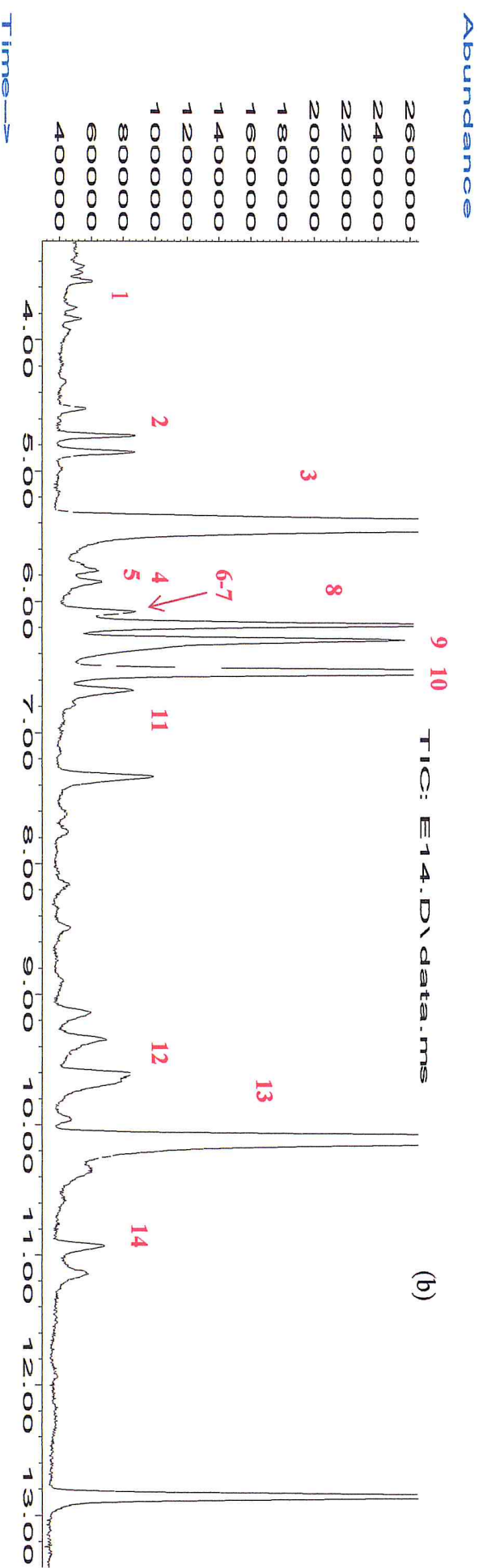
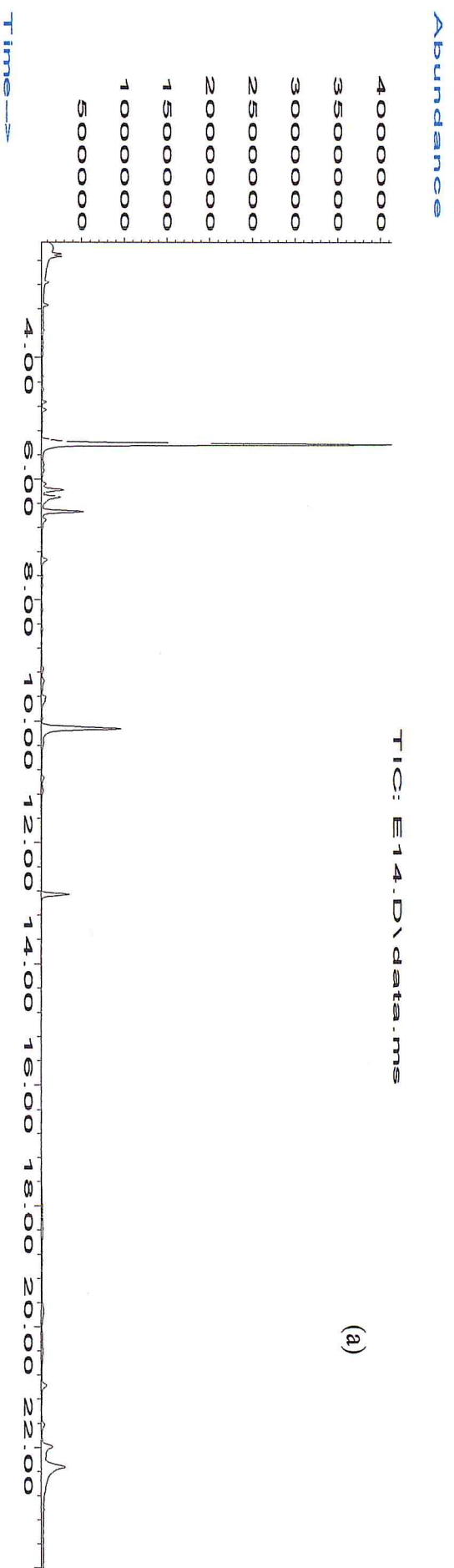


Figure 16 : (a)- Profil chromatographique des métabolites secondaires obtenus par la bioconversion de la-pinène par *Pearibacillus popilliae*
(b)- Agrandissement (zoom) du profil chromatographique

Tableau 3 : Métabolites obtenus par bioconversion de l' α -pinène par *Peanibacillus popilliae*

Numéro de pics	Temps de rétention (min)	Nom Systématique	Nom trivial	Formule
1	3.138	6,6-Dimethyl-4-méthylènebicyclo [3.1.1] hept-2-ène	Verbénène	C ₁₀ H ₁₄
2	4.861	2, 7, 7-Trimethyl- 3-oxatricyclo [4.1.1.0 (2.4)] octane	α - pinène époxyde	C ₁₀ H ₁₆ O
3	5.423	4, 6, 6-trimethyl-bicyclo [3.1.1] hept-3-èn-2-ol	(+)-cis-Verbénol	C ₁₀ H ₁₆ O
4	5.770	p-Mentha-1,5-dièn-8-ol	α -Phellandène-8-ol	C ₁₀ H ₁₆ O
5	5.865	1-methyl-4- (1-méthylethyl)- Cyclohexène	Carvomenthène	C ₁₀ H ₁₈
6	6.076	5-methyl-2-(1-méthylethyl)- phénol	Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O
7	6.081	Methanol, α , α , 4-trimethyl-benzène	p-Cymen-8-ol	C ₁₀ H ₁₄ O
8	6.182	1,3,3-trimethyl-bicyclo (2.2.1) heptan-2-ol,	β -Fenchol	C ₁₀ H ₁₈ O
9	6.292	6,6-dimethyl-bicyclo [3.1.1] hept-2-ène-2-methanol	Myrtenol	C ₁₀ H ₁₆
10	6.538	4,6,6-trimethyl bicycle [3.1.1] hept-3-èn-2-one	Verbénone	C ₁₀ H ₁₄ O
11	6.674	p-Mentha-6,8-dièn-2-ol	Trans (+) carvéol	C ₁₀ H ₁₆ O
12	7.342	1-methyl-4-(1-méthylethényl)-1,3-Cyclohexadiène ou 1,3,8-Mentatriène		C ₁₀ H ₁₄
13	10.129	(1R, 5S) 5-hydroxy- α , α , 4-trimethyl-1-methanol-3-Cyclohexène	Trans (-) Sorbéról	C ₁₀ H ₁₈ O ₂
14	10,932	(1R) 2, 2, 3-trimethyl-3-Cyclopentene-1-acetaldehyde	(+) Campholenic aldehyde	C ₁₀ H ₁₆ O

La figure 17 illustre les voies de bioconversion de l' α -pinène par la souche *Peanibacillus popilliae* :

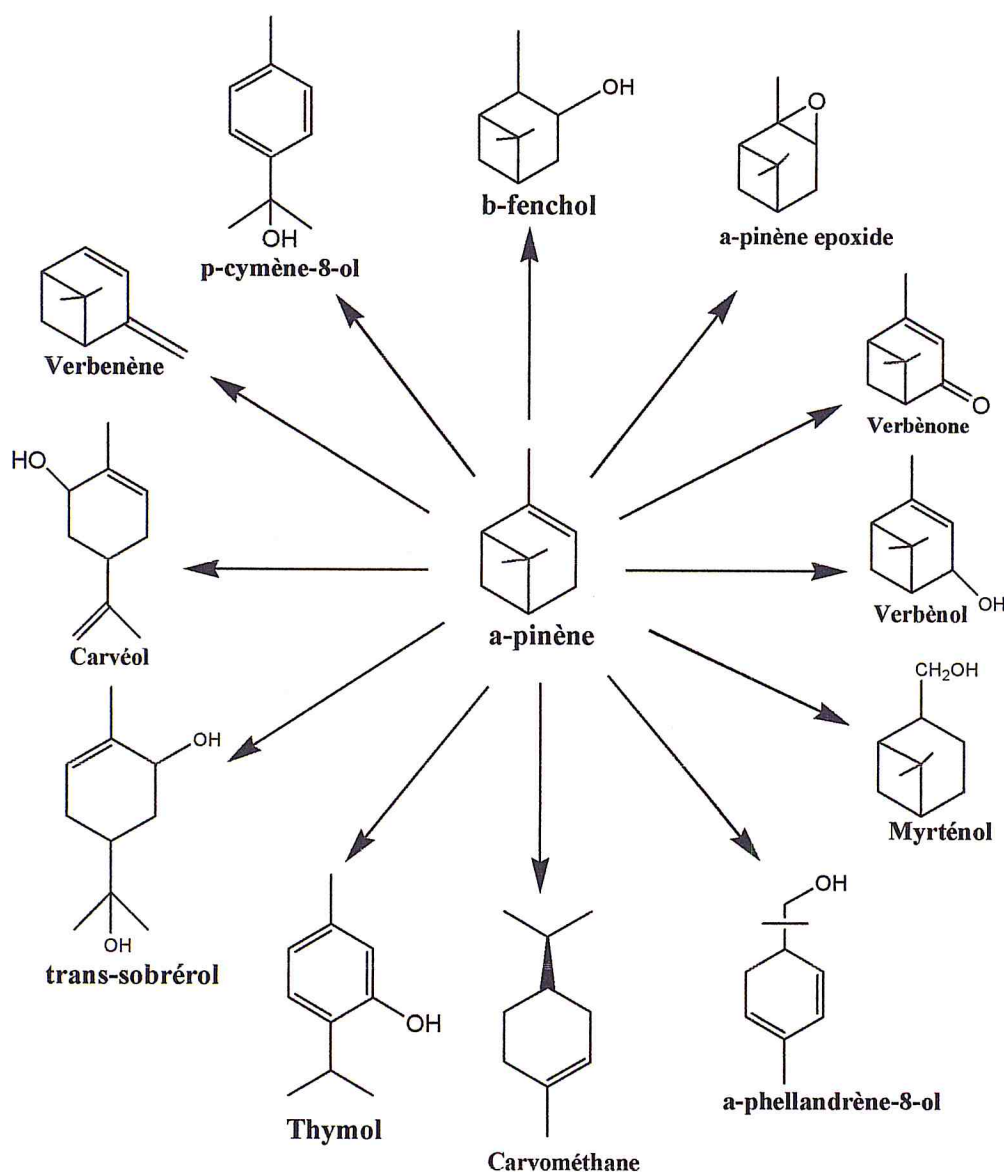


Figure 17 : Voies de bioconversion de l' α -pinène par *Peanibacillus popilliae*

II. 3.3.2 Bioconversion par *Streptomyces rochei*

L' α -pinène soumis à des tests de bioconversion par *Streptomyces rochei* a permis de récupérer une phase organique (mélange de métabolites). L'analyse par CG/SM de la phase organique a montré le profil chromatographique donné par la figure 18, et le tableau 4 regroupe les métabolites secondaires obtenus.

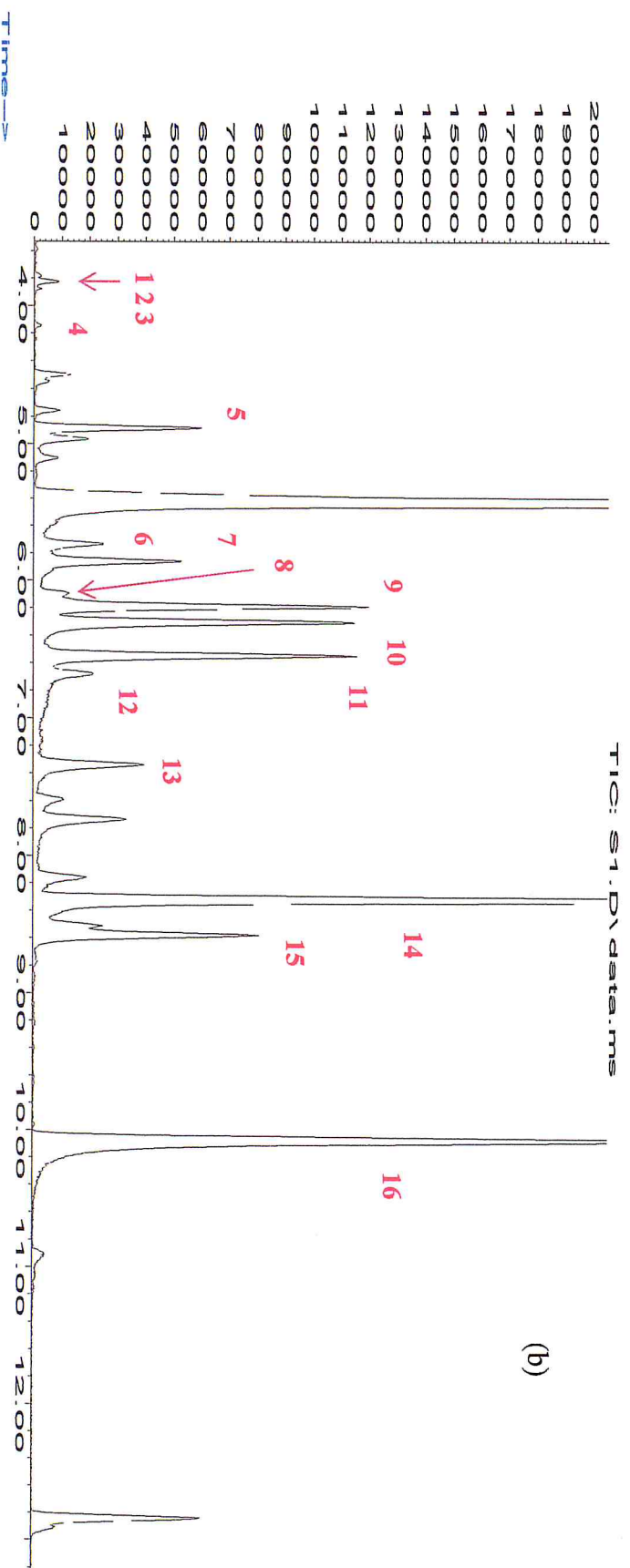
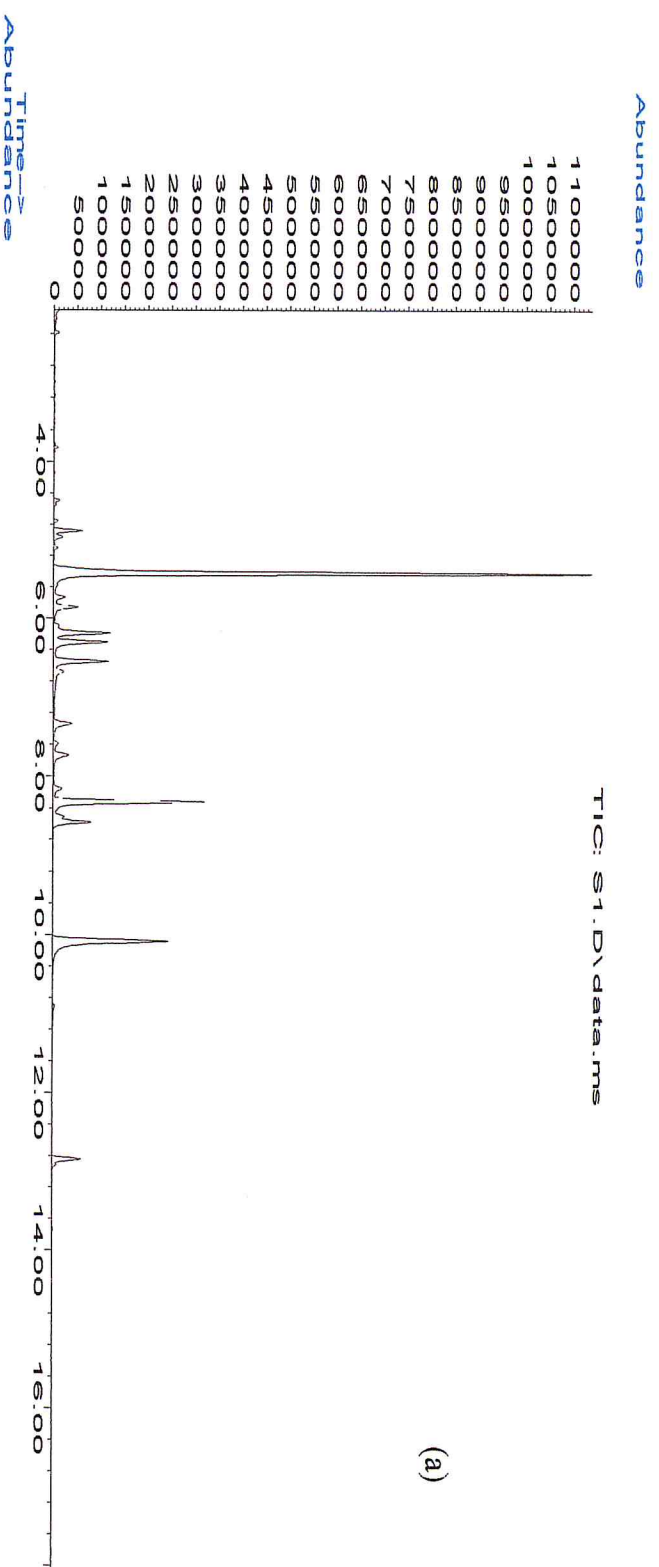


Figure 18 : (a)- Profil chromatographique des métabolites secondaires obtenus par la bioconversion de l' α -pinène par *Streptomyces rochei*
(b)- Agrandissement (zoom) du profil chromatographique

Tableau 4 : Métabolites secondaires obtenus par la bioconversion de l' α -pinène en utilisant la souche *Streptomyces rochei*.

Numéro de pics	Tr (min)	Nom systématique	Nom trivial	Formule
1	3.782	1-methyl-3-(1-methylethyl)-benzène	β -Cymène	C ₁₀ H ₁₄
2	3.825	1-methyl-4-(1-methylethenyl)-Cyclohexène	d-limonène	C ₁₀ H ₁₆
3	3.877	1, 3, 3-trimethyl-oxabicyclo [2.2.2] octane	1,8-cinéole	C ₁₀ H ₁₈ O
4	4.148	3, 7, 7-trimethyl-bicyclo [4.1.0] hept-3-ène	Δ -3-Carene	C ₁₀ H ₁₆
5	4.557	3,7-Dimethyl-2,6-octadienal	(Z) cis-citral	C ₁₀ H ₁₆ O
6	5.736	6,6-dimethyl-2-méthylène-3-oxobicyclo [3.1.1] heptane	Pinocarvone	C ₁₀ H ₁₄ O
7	5.865	(1 α , 2 β , 5 α) -5-methyl-2(1-methylethyl)- Cyclohexanol	Menthol	C ₁₀ H ₂₀
8	6.076	5-methyl-2-(1-methylethyl)- phénol	Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O
9	6.182	1,3,3-trimethyl- bicyclo [2.2.1] heptan-2-ol	β -Fenchol	C ₁₀ H ₁₈ O
10	6.292	6,6-dimethyl-bicyclo [3.1.1] hept-2-ène-2-methanol	Myrténol	C ₁₀ H ₁₆
11	6.538	4,6,6-trimethyl-bicyclo [3.1.1] hept-3-èn-2-one	Verbénone	C ₁₀ H ₁₄ O
12	6.674	p-Mentha-6,8-dien-2-ol	Trans-carveol	C ₁₀ H ₁₆ O
13	7.339	2,3-Epoxycarane		C ₁₀ H ₁₆ O
14	8.328	2,2-Dimethyl-3-méthylènebicyclo [2.2.1] heptane	Camphène	C ₁₀ H ₁₆
15	8.509	3-methyl-6-(1-methylethylidène)- 2-cyclohexèn-1-one	Piperitenone	C ₁₀ H ₁₄ O
16	10.129	(1R,5S) α , α , 4-trimethyl- 5-hydroxy-3-Cyclohexène-1-méthanol	Trans - Sorbétol	C ₁₀ H ₁₈ O ₂

La figure 19 illustre les voies métaboliques de la bioconversion de l' α -pinène par *Streptomyces rochei*

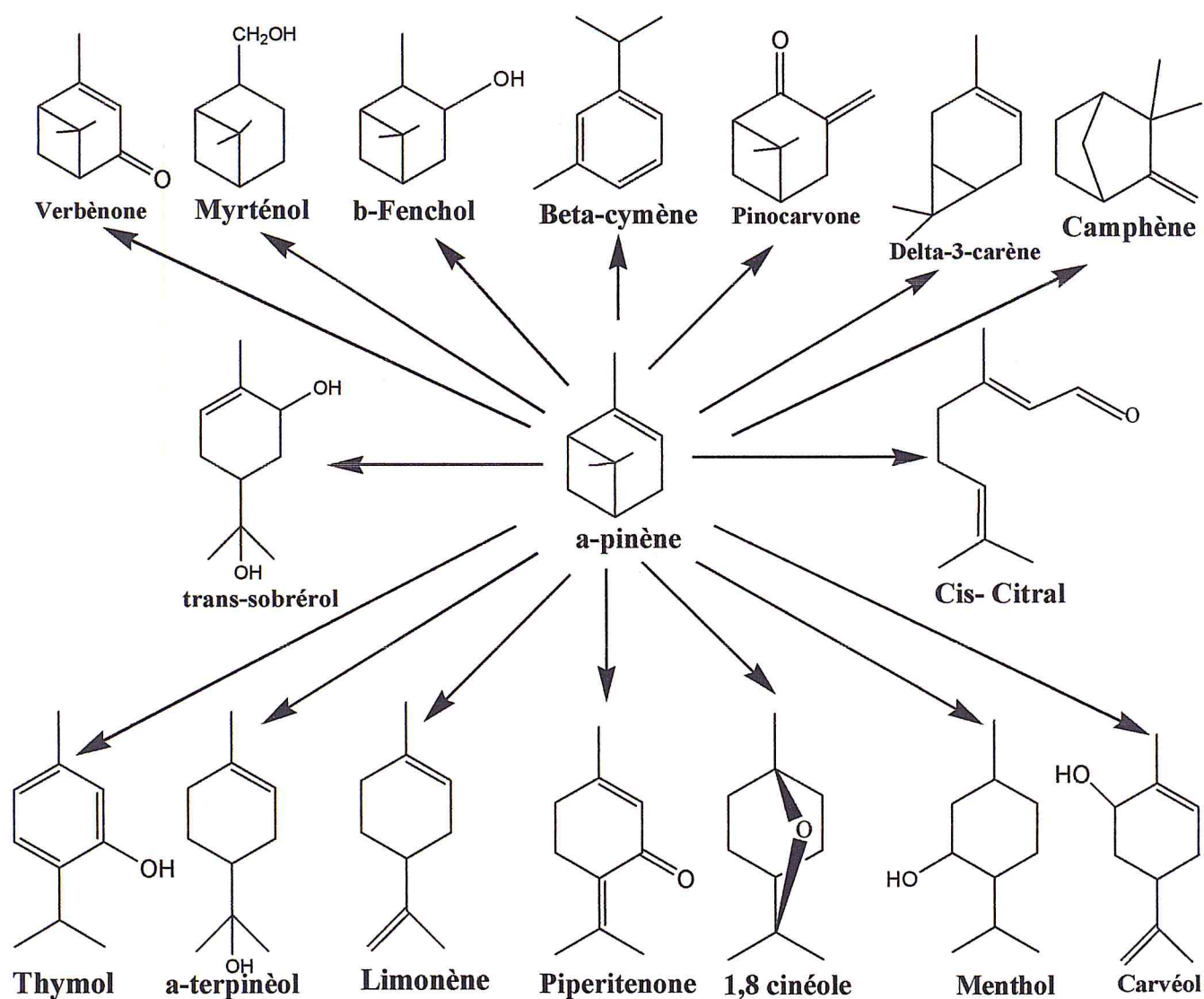


Figure 19 : Voies de bioconversion de l' α -pinène par *Streptomyces rochei*

II. 3.4 Biodégradation par *Streptomyces rochei*

L' α -pinène soumis à un test de biodégradation a permis de récupérer une phase organique (mélange de métabolites).

L'analyse par CG/SM de la phase organique a montré le profil chromatographique donné par la figure 20.

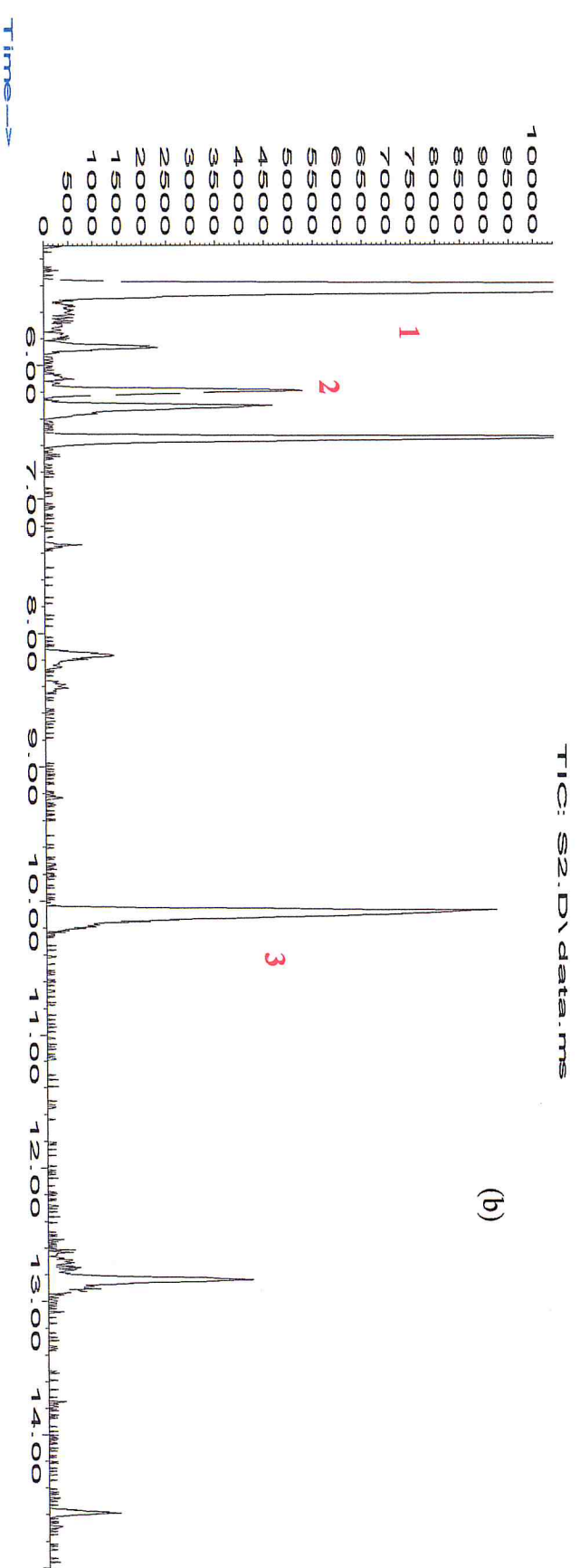
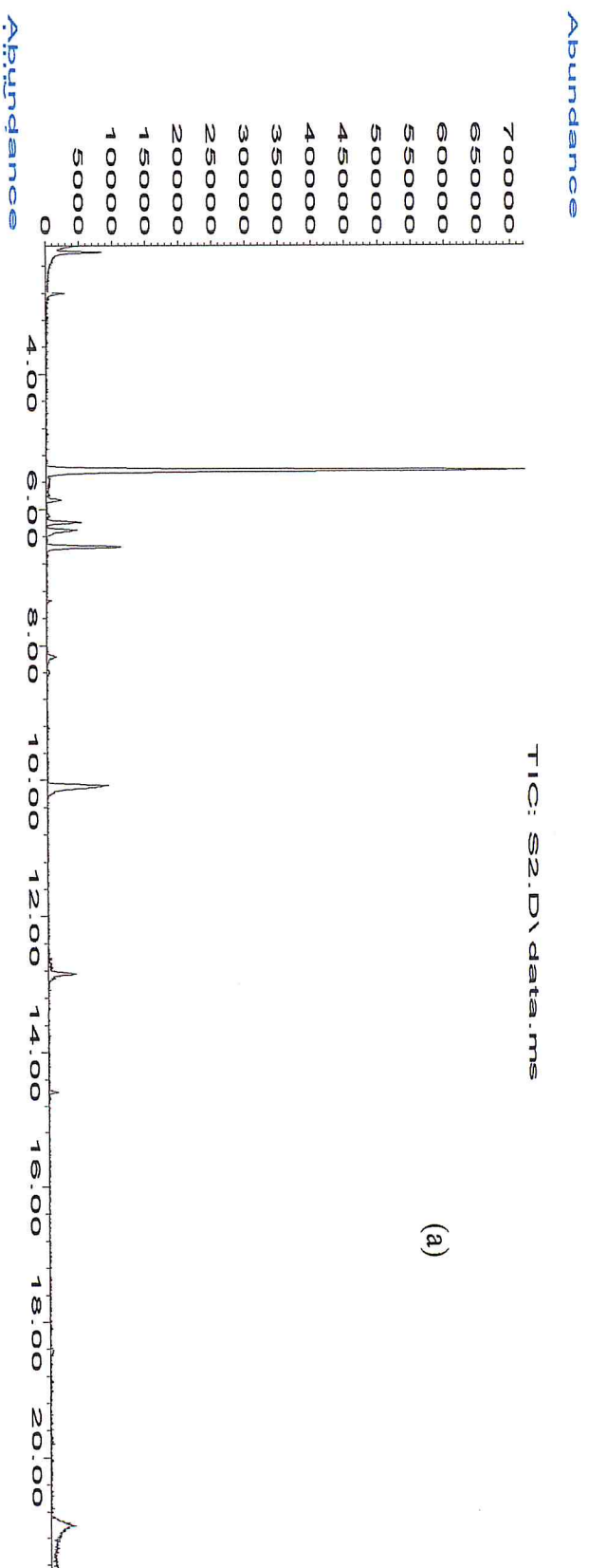


Figure 20: (a)- Profil chromatographiques des métabolites secondaires obtenus par la biodégradation de l' α -pinène par *Streptomyces rochei*
(b)- Agrandissement (zoom) du profil chromatographique

L'identification des différents produits a été faite en se basant sur les banques des données spectrales (Wiley 7n, Nist 02, NBS75 k) ainsi que sur les données de la littérature. Le tableau 5 regroupe les différents métabolites obtenus par la biodégradation de l' α -pinène en utilisant la souche *Streptomyces rochei*.

Tableau 5 : Métabolites secondaires obtenus par la biodégradation de l' α -pinène en utilisant la souche *Streptomyces rochei*.

Numéro de pics	Tr (min)	Noms chimiques	Noms systématique	Formule brute
1	5.433	(1 α , 2 α , 5 α) 4,6,6-trimethyl, bicyclo [3.1.1] hept-3-èn-2-ol	Trans-verbénol	C ₁₀ H ₁₆ O
2	6.189	α , α , 4-trimethyl-1-methanol-3-Cyclohexene	α -terpinéol	C ₁₀ H ₁₈ O
3	10.088	(1R,5S), 5-hydroxy- α , α , 4-trimethyl-1-methanol-3-Cyclohexène	Trans-Sorbérol	C ₁₀ H ₁₈ O ₂

La figure 21 illustre les voies métaboliques de la biodégradation de l' α -pinène

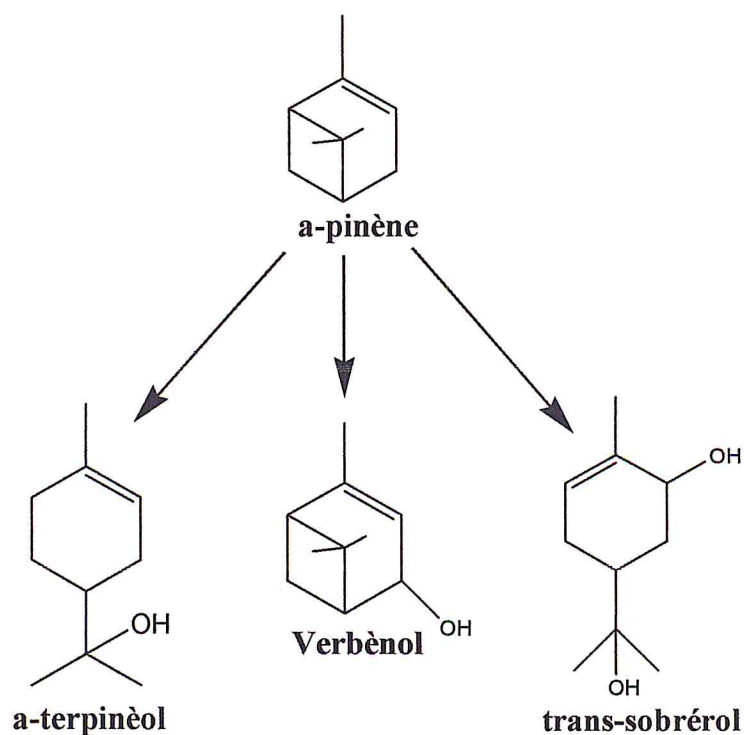


Figure 21 : Voies de biodégradation de l' α -pinène par *Streptomyces rochei*

L'examen des tableaux 3, 4 et 5 ainsi que des figures 16, 18 et 20 révèle que l' α -pinène a subi au cours de la bioconversion et la biodégradation par les deux souches *Peannibacillus popilliae* et *Streptomyces rochei* une dégradation totale. En comparaison par rapports aux données de la littérature on se rend compte que des produits comme le verbénol et le verbénone, obtenus dans le présent travail, ont été également constatés lors de bioconversion de l' α -pinène en utilisant successivement *Aspergillus niger*, *Penicillium Sp* et *Bacidomycètes*. Le pinocarvone et le carvéol ont été relevés dans la bioconversion de l' α -pinène par *Bacillus pallidus*, toutefois, le limonène et le trans sobrerol ont été obtenus par *Pseudomonas PX1* et par *Armillariella mellea*. D'autre part, les données de la bibliographie reportent, comme métabolites de la bioconversion de l' α -pinène, l'obtention de l' α -terpinéol, l' α -pinène oxide et le Myrtenol respectivement par *Nicotiana tabacum*, *Candida tropicalis* et *pseudomonas sp et fluoroscens*. [89] [96]

Il y a lieu de souligner que le Verbenène, α -phellandrène-8-ol, Thymol, β -fenchol, Carvomenthène, β -cymène, 1,8-cinéole, Δ -3-carène, Cis-Citral, Menthol, Camphène et le Piperitenone ont été identifiés pour la première fois, comme produits de bioconversion de pinène, par les deux souches *Peannibacillus popilliae* et *Streptomyces rochei*.

II. 3.5 Photodégradation de l' α -pinène par les rayons UV et les rayonnements haute énergie de Cs-137

L' α -pinène pur à l'état liquide soumis à la photodégradation par les différents types de rayonnement a permis l'obtention de nouveaux métabolites.

L'analyse par CG/SM de l' α -pinène a montré deux profils chromatographiques donnés par les figures 21 et 22.

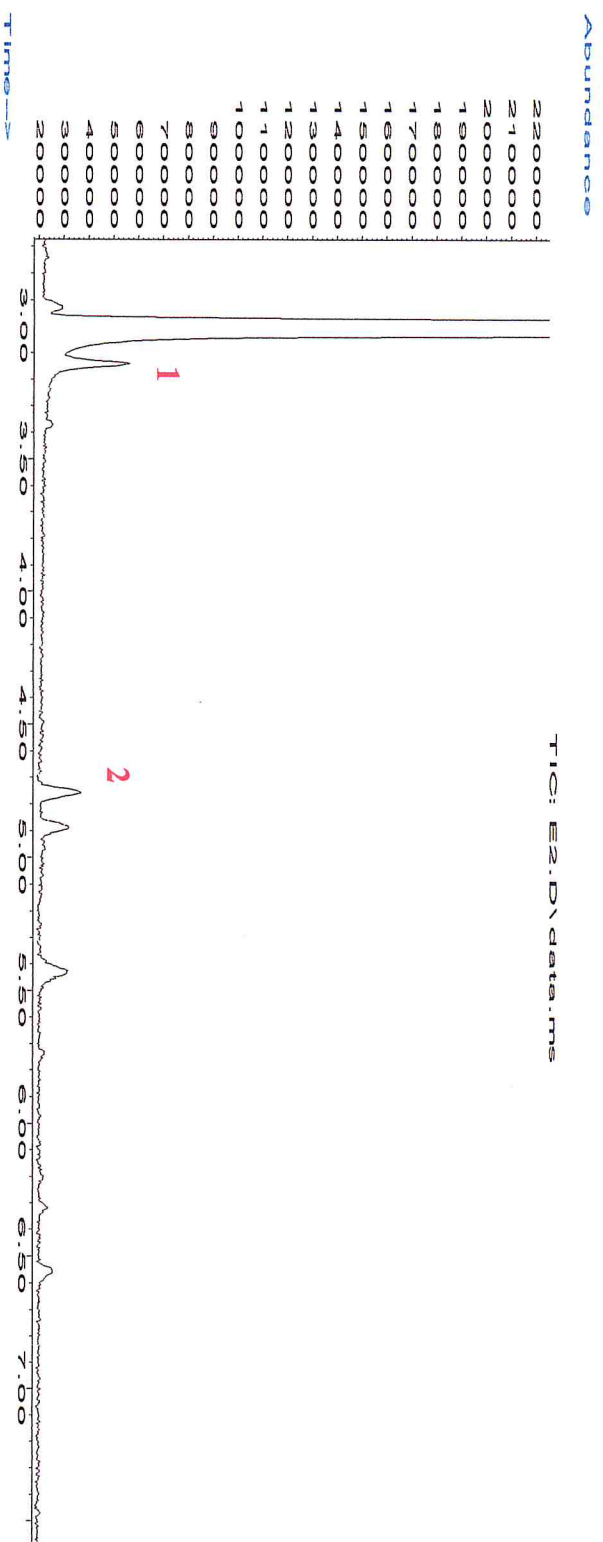


Figure 22 : Profil chromatographiques des métabolites secondaires obtenus par la photodégradation de l α -pinène par les rayons UV

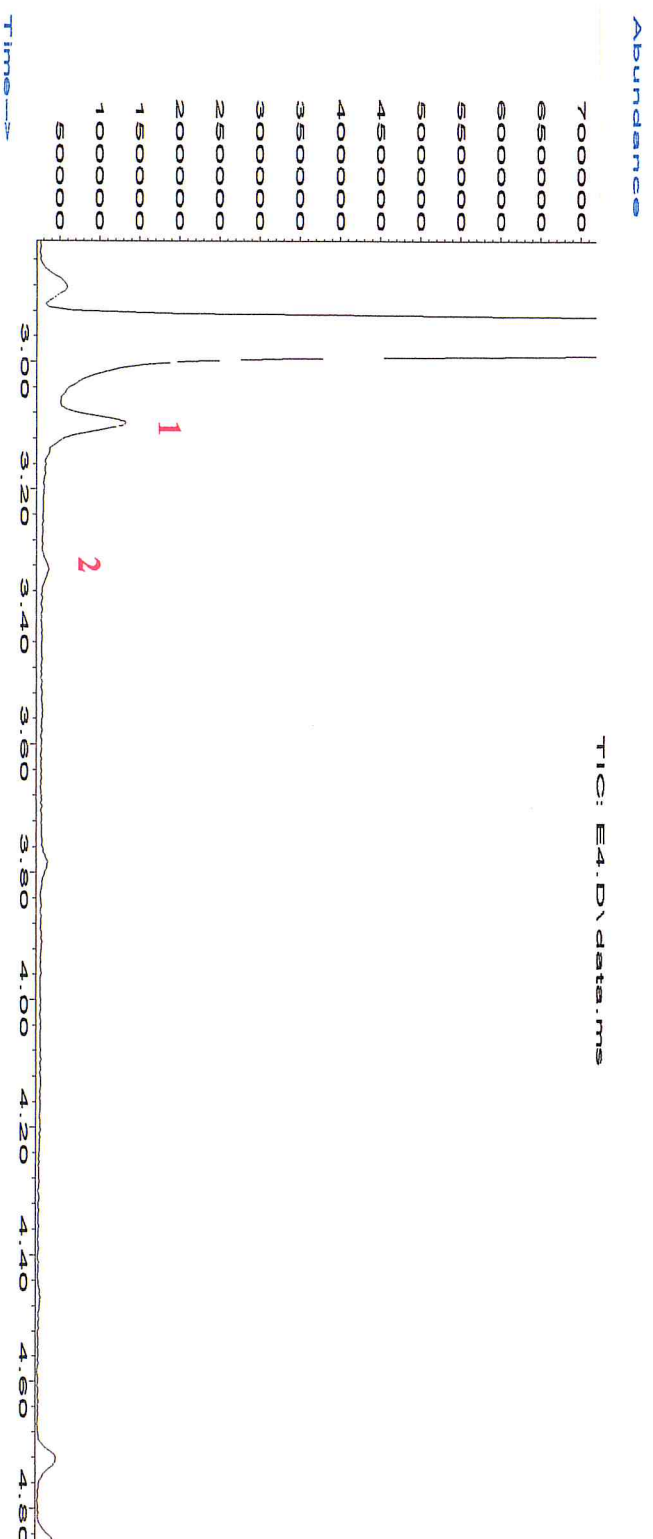


Figure 23 : Profil chromatographiques des métabolites secondaires obtenus par la photodégradation de l α -pinène par les rayonnements haute énergie de Cs-137

L'identification des différents produits a été faite en se basant sur les banques des données spectrales (Wiley 7n, Nist 02, NBS75 k). Nous avons constaté que la photodégradation par UV et par le rayonnement haute énergie mènent aux métabolites, en l'occurrence, le camphène et l' α -pinène époxyde. Le tableau 6 regroupe les métabolites obtenus par photodégradation de l' α -pinène en utilisant les rayons UV Cs-137.

Tableau 6 : Métabolites secondaires obtenus par la photodégradation de l' α -pinène par les rayons UV et les rayonnements haute énergie Cs-137

Numéro de pics	Tr (min)	Nom Systématique	Nom trivial	Formule
1	3.150	2,2-Dimethyl-3-methylenebicyclo [2.2.1] heptane	Camphène	$C_{10}H_{16}$
2	4.762	2, 7, 7-Trimethyl- 3-oxatricyclo [4.1.1.0 (2.4)] octane	α - pinène époxyde	$C_{10}H_{16}O$

La figure 23 illustre la voie de la photodégradation de l' α -pinène par les rayons UV et les Cs-137

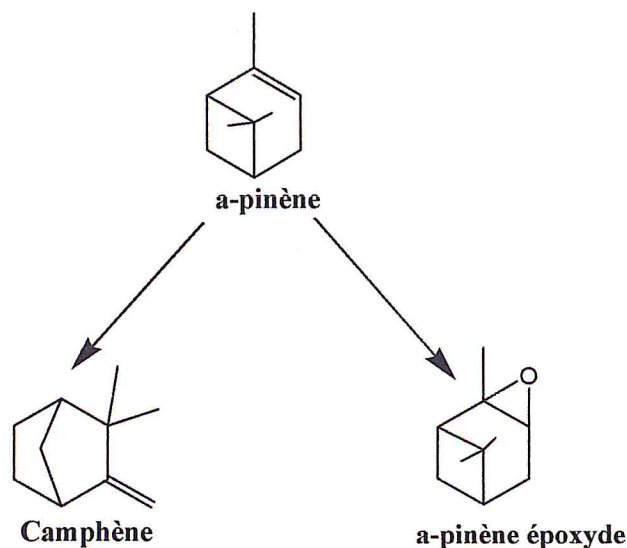


Figure 23 : Voies de photodégradation de l' α -pinène par les rayons UV et les rayonnements hauts énergie Cs -137

L'obtention des métabolites identiques lors de la photodégradation par deux voies différentes, indique que le mécanisme de dégradation chimique de l' α -pinène est similaire dans les deux cas. Autrement dit, les intermédiaires réactionnels sont identiques.

CONCLUSION

GENERALE

Conclusion générale

Le présent travail a été consacré à l'étude de la bioconversion et la biodégradation de l' α -pinène par les deux souches bactériennes *peanibacillus popilliae* et *Streptomyces rochei*. Il a porté également sur la photodégradation de l' α -pinène par un rayonnement UV et par rayonnement haute énergie de Cs-137.

L'analyse préliminaire par la spectrophotométrie Infrarouge à Transformé de Fourier (IRTF) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/MS), a montré la pureté du métabolite utilisé dans nos manipulations.

Afin de déterminer la concentration des réactions de bioconversion et de biodégradation, nous avons réalisé une série de tests d'activité qui nous a permis d'estimer la concentration d'inhibition à 10 mg/ml. La valeur de cette concentration a été utilisée pour la suite de nos expériences sur la bioconversion et la biodégradation. La bioconversion de l' α -pinène par la souche *peanibacillus popilliae*, a permis d'obtenir un mélange de métabolites, notamment des monoterpènes, comme : le β -fenchol ; l' α -pinène époxyde ; le Verbenone ; le Verbenol ; le Myrténol ; l' α -phéllandrène-8-ol ; le Carvométhane ; le Thymol ; le trans-Sobrérol ; le Carvéol et le Verbenène. En utilisant la souche *Streptomyces rochei*, la bioconversion de l' α -pinène a mené à des métabolites relativement identiques à ceux obtenus précédemment, on peut citer : le β -fenchol ; le Menthol ; la Verbenone ; le 1,8-Cinéole ; le Myrténol ; la Pipériténone ; le Limonène ; le Thymol ; le trans-Sobrérol ; le Carvéol ; l' α -Terpineol ; le cis-Citral ; le Camphène ; le Δ -3-carène ; le Pinocarvone et le β -Cymène.

La biodégradation de l' α -pinène par la souche *peanibacillus popilliae* n'a pas mené à des résultats concluants. Toutefois, la biodégradation du métabolite par *Streptomyces rochei* a permis d'obtenir : l' α -Terpineol ; le Verbenol et le trans-Sobrérol.

La photodégradation de l' α -pinène par un rayonnement UV et par un rayonnement haute énergie Cs-137 a révélé la présence de deux métabolites, identiques pour les deux voies de photodégradation, à savoir : l' α -pinène époxyde et le camphène.

Cette étude nous a permis de comprendre, d'estimer et d'évaluer l'importance du choix des souches bactériennes mais aussi l'élaboration des conditions optimales de bioconversion et/ou de biodégradation.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- [1] **E.D. De Oliveira**, « Simulations moléculaires appliquées à l'acétylation de flavonoïdes catalysées par des lipases : influence des structures de la lipase et du flavonoïde sur la régiosélectivité de la bioconversion », thèse de doctorat, université de Nancy, France, 2009.
- [2] **S. Smaoui**, « Purification et caractérisation de Biomolécules à partir des microorganismes nouvellement isolés et identifiés », thèse de doctorat, université de Toulouse, France, 2010.
- [3] **D. Limares**, « Etude sur la voie de dégradation de l' α -pinène chez *Pseudomonas rhodesiae* en milieu biphasique liquide-liquide », thèse de doctorat, université Blaise Pascal, France, 2008.
- [4] **H. Bousaab**, « Bioconversion éco-compatible de triterpénoides par des bactéries immobilisées sur *Luffa cylindrica* », thèse du doctorat, université de Haute Alsacen, France, 2011.
- [5] **F.Z. Mesbaiah**, « Etude de la biodégradabilité d'un hydrocarbure aromatique polycyclique "Naphtalène" et optimisation de la performance bactérienne en milieu PCN », mémoire de magister, université Saad Dahleb Blida, Algérie, 2011.
- [6] **F.Z. Ferradji**, « Etude des voies métaboliques de la biodégradabilité des hydrocarbures de biodepollution des eaux de mer », Thèse de doctorat, université de Blida 1, Algérie, 2014.
- [7] **KB. Borges, WS.Borges, MT. Pupo, PS. Bonato**, "Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine". *Appl Microbiol Biotechnol* 77:669–674, 2007.
- [8] **Z.A. SIDDIKI**, "Biotransformational studies on bioactive secondary metabolites of plant origin", these de doctorat, université de Karachi, Pakistan, 2007.
- [9] **J. SCHRADER.** "Microbial flavour production. Dans : Flavours and fragrances : Chemistry, bioprocessing and sustainability", Berger R.G. (ed), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 508-513, 2007.
- [10] **J. Pelmont**. Bactéries et environnement - Adaptations physiologiques. *Presses Universitaire de Grenoble*. 899, 1993.

- [11] **P. FONTANILLE, J.B. GROS, C. LARROCHE.** "Biotransformations with crude enzymes and whole cells. Dans : Enzyme technology", Pandey A., Webb C., Soccol C.R. et Larroche C. (eds), *Asiatech publisher inc.*, New Delhi, pp: 123-131, 2005.
- [12] **P. SCHREIER.** "Biotechnology and flavour production", *Int.Biotechnol. Symp.*, Vol. 2, Proc. 8th Paris, France, pp 869-883, 1988.
- [13] **A.H. SCRAGG.** "The production of aromas by plant cell cultures", *Adv. Biochem. Eng. Biotech.*, 55 : 239-267, 1997.
- [14] **A. GIRI, V. DHINGRA, C.C. GIRI, A. SINGH, O.P. WARD, M.L. NARASU.** "Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems : Current trends and future prospects". *Biotechnol. Adv.*, 19: 175-199, 2001.
- [15] **J.M.S. CABRAL.** "Biotransformations. Dans : Basic Biotechnology", Ratledge C. & Kristiansen B. (eds), *Cambridge University Press*, Cambridge, pp 471-501, 2001.
- [16] **CCCR. de Carvalho, MMR. da Fonseca,** "Biotransformation of terpenes". *Biotechnol Adv*, 24:134 –142. doi:10.1016/j.biotechadv. 2005.08.004, 2006.
- [17] **G. Molina, MR. Pimentel, TCP. Bertucci, GM. Pastore.** "Application of fungal endophytes in biotechnological processes". *Chem Eng Trans* 27:289–294, 2012.
- [18] **AM. Collins, MJ. Kennedy,** " Biotransformations and bioconversions in New Zealand: past endeavours and future potential", *Austral Biotechnol*, 9(2):86–94, 1999.
- [19] **B.C. CLARK, T.S. CHAMBLEE,** "Acid-catalyzed reactions of citrus oils and other terpene-containing flavors", Dans : Off-flavour in foods and beverages, G. Charalambous (ed), *Elsevier Sciences Publishers*, Amsterdam, pp 229-232, 1992.
- [20] **F. GRIVEL,** « Biotransformation de la b-ionone par *Aspergillus niger* », thèse de Doctorat, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, N°1176, 1999.
- [21] **H. OKAMURA,** "Antimicrobial properties of perfumes", *Kôryô*, 108 : 9-13, 1974.
- [22] **W. Xiu-LI, K. Yang and YZ. Wang,** "Properties of Starch blends with biodegradable Polymers". *J. Macro mol. Sci. Part C – Polymer Reviews*, 43 (3), 385–409, 2003.

- [23] **M. Van der zee, L. sistma, H. Tournois and D. De wit**, “Assessment of the biodegradation of water insoluble polymeric materials on aerobic and anaerobic aquatic environments”, *Chemosphere*. 28, 1757-177, 1994.
- [24] **Jukka Kurola**, “Microbial activities in boreal soils: Biodegradation of organic contaminants at low temperature and ammonia oxidation” Academic Dissertation in Environmental Ecology 2006.
- [25] **L. Zhang, Y. Wang, J. Dai, Y. Tang, Q. Yang, X. Luo and C. Fang**, “*Bacillus korlensis* sp. nov., a moderately halotolerant bacterium isolated from a sand soil sample in China”, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 1787–1792, 2009.
- [26] **J.G. Holt, N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley et S.T. Williams**, “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology”, pp: 518-537. 9th Edn., Williams and Wilkins, Baltimore, 1994.
- [27] **S. Bron, R. Meima, J. M. V.Dijl, A.Wipat et C. R. Harwood**, “Molecular biology and genetics of *Bacillus* spp”, In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology 2nd Edition. Eds. A. L. Demain and J. E. Davies, *ASM Press*. Washington, pp: 392-416, 1999.
- [28] **C. Ash, F.G. Priest, and M.D. Collins**. “Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test: proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*”. *Antonie Leeuwenhoek* 64:253–260, 1993.
- [29] **T.V.K. Reddy, S. Mahmood, M. Mohammed Idris and S. Ciesielski**. “*Streptomyces osmaniensis* sp. nov., isolated from soil”. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 1755–1759, 2010.
- [30] **J. Euzéby**. “List of prokaryotic names with standing in nomenclature”, 2012.
 Disponible sur les sites : <http://www.bacterio.cict.fr/n/nocardia.html>
<http://www.bacterio.cict.fr/m/micromonospora.html>
<http://www.bacterio.cict.fr/c/corynebacterium.html>
<http://www.bacterio.cict.fr/a/actinomycetales.html>
<http://www.bacterio.cict.fr/s/streptomycesc.html>
<http://www.bacterio.cict.fr/ijk/kribbella.html>
<http://www.bacterio.cict.fr/s/saccharothrix.html>

- [31] **W.B. Whitman, M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.-J. Busse, M.E. Trujillo, W. Ludwig, and K.-I. Suzuki**, (Eds.). "Bergey's manual of systematic bacteriology. The Actinobacteria, Part A". Volume 5, 2nd edition, *Spinger New York*, Dordrecht Heidelberg London, 2012.
- [32] **S.T. Williams, M. Goodfellow et G. Alderson**, "Genus *Streptomyces*, dans: S.T. Williams, M.E. Sharpe et J.H. Holt Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", volume 4). *Williams & Wilkins, USA*: 2452-2492, 1989.
- [33] **E. Stackebrandt, F. A. Rainey et N. L. Ward-Rainey**, "Proposal for a new hierarchic classification system *Actinobacteria* classis nov". *Int J Syst Bacteriol.* 47: 479-491, 1997.
- [34] **F. Korn-Wendisch et H. J. Kutzner**, "The family *Streptomycetaceae*, dans: A. Balows, G. Truper, M. Dworkin, W. Harder et K. H. Schleifer The Prokaryotes". *Springer Edition New York*: 921-995, 1992.
- [35] **D.A. Hodgson**, "Primary metabolism and its control in *Streptomyces*: a most unusual group of bacteria", *Adv Microb Physiol.* 42:47-238, 2000.
- [36] **E. Stackebrandt et P. Schumann**, "Introduction to the Taxonomy of Actinobacteria, dans: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer, E. Stackebrandt Prokaryotes". *Springer Science, Business Media, LLC edition New York, USA*: 297-321, 2006.
- [37] **E.B. Shirling and D. Gottlieb**, "Methods for characterization of *Streptomyces* species". *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16(3): 313–340, 1966.
- [38] **F. Boughachiche**, « Etude de molecules antibiotiques secrétées par des souches appartenant au genre *Streptomyces*, isolées de Sebkha », theèse de doctorat, université Mentouri – Constantine, Algérie, 2012.
- [39] **B. Kim, N. Sahin, D.E. Minnikin, J. Zakrzewska-Czerwinska, M. Mordarski and M. Goodfellow** "Classification of thermophilic *Streptomyces*, including the description of *Streptomyces thermoalcalitolerans* sp. nov". *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 7–17, 1999.
- [40] **B.-Y. Kim, R. Brown, D.P. Labeda and M. Goodfellow**, "Reclassification of '*Dactylosporangium variesporum*' as *Saccharothrix variisporea* corrig (ex Tomita et al. 1977) sp. nov., nom. rev", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 310–314, 2011.

- [41] **P. Petrosyan, M. Garcia-Varela, A. Luz-Madrigal, C. Huitron and M.E. Floress**, “*Streptomyces mexicanus* sp. nov., a xylanolytic microorganism isolated from soil”, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 269–273, 2003.
- [42] **S. Soffroy**, “ Etude de métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*”, thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de LORRAINE, France, 2006.
- [43] **E. B. Shirling et D. Gottlieb**, “Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. II. Species descriptions from first study”, *Int J Syst Bacteriol.* 18: 69-189, 1968a.
- [44] **E. B. Shirling et D. Gottlieb**, “Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. III. Additional species descriptions from first and second studies”, *Int J Syst Bacteriol.* 18: 279-392, 1968b.
- [45] **E. B. Shirling et D. Gottlieb**, “ Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. IV. Species descriptions from the second, third and fourth studies”, *Int J Syst Bacteriol.* 19: 391-512, 1969.
- [46] **E. B. Shirling et D. Gottlieb**, “Cooperative description of type strains of *Streptomyces*. V. Additional descriptions”, *Int J Syst Bacteriol.* 22: 265-394, 1972.
- [47] **J. Xiao, Y. Wang, Y. Luo, S.-J. Xie, J.-S. Ruan and J. Xu**. “*Streptomyces avicenniae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a rhizosphere of the mangrove plant *Avicennia mariana*”. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 2624–2628, 2009.
- [48] **E.A. Katsifas, E.P. Giannoutsou and A.D. Karagouni**, “Diversity of *streptomyces* among specific greek terrestrial ecosystems”, *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 48–51, 1999.
- [49] **B. Zaitlin, S.B. Watson, J. Ridal, T. Satchwill and D. Parkinson**, “Actinomycetes in lake Ontario: habitats and geosmin and MIB production”, *Peer-Review J.*, 95(2): 113–118, 2003.
- [50] **X.-Q. Zhao, W.-J. Li, W.-C. Jiao, Y. Li, W.-J. Yuan, Y.-Q. Zhang, H.-P. Klenk, J.-W. Suh and F.-W. Bai**. “*Streptomyces xinghaiensis* sp. nov., isolated from marine sediment”. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 2870–2874, 2009.

- [51] W. Liu, A. Goswami, R.P. Steffek, R.L. Chemman, F.S. Sariaslani, J.J. Steffens, and J.P.N. Rosazza, "Stereochemistry of microbiological hydroxylations of 1,4-cineole", *J. Org. Chem.*, 53: 5700–5704, 1988.
- [52] N. SAVITHIRY, D. GAGE, W. FU, P. ORIEL, "Degradation of Pinene by *Bacillus pallidus* BR425", *Biodegradation*, 9 : 337-341, 1998.
- [53] Y. Noma, and H. Nishimura, "Microbiological transformation of 1, 8-cineole. Oxidative products from 1,8-cineole by *S. bottropensis*, SY-2-1". *Annual Meeting of Agricultural and Biological Chemical Society*, Book of abstracts, p. 28, 1980.
- [54] Y. Noma, and H. Nishimura, "Microbiological transformation of 1,8-cineole. Production of 3b-hydroxy- 1, 8-cineole from 1, 8-cineole by *S. ikutamanensis*, Ya-2-1", *Annual Meeting of Agricultural and Biological Chemical Society*, Book of abstracts, p. 196, 1981.
- [55] Y. Noma, S. Nonomura, and H. Sakai, "Conversion of (-)-carvotanacetone and (+)-carvotanacetone by *Pseudomonas ovalis*, strain 6-1", *Agric. Biol. Chem.*, 38: 1637–1642, 1974a.
- [56] Y. Noma, "Conversion of (-)-carvone by *Nocardia lurida* A-0141 and *Streptosporangium roseum* IFO3776. Biochemical reduction of terpenes, part VIII", *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 53: 35–39, 1979a.
- [57] Y. Noma, "On the pattern of reaction mechanism of (+)-carvone conversion by actinomycetes, Biochemical reduction of terpenes", part X, *Ann., Res. Stud, Osaka Joshigakuen Junior College*, 23: 27–31, 1979b.
- [58] Y. Noma, "Conversion of (-)-carvone by strains of *Streptomyces*, A-5-1 and *Nocaradia*, 1-3-11. *Agric, Biol. Chem.*, 44: 807–812, 1980.
- [59] Y. Noma, and H. Nishimura, "Biotransformation of carvone. 4. Biotransformation of (+)-carvone by *Streptomyces bottropensis*, SY-2-1, *Proc. 26th TEAC*, pp. 156–159, 1982.
- [60] Y. Noma, M. Toyota, and Y. Asakawa, "Reduction of terpene aldehydes and epoxidation of terpene alcohols by *S. ikutamanensis*, Ya-2-1", *Proc. 30th TEAC*, pp. 204–206, 1986.

- [61] **Y. Noma, M. Toyota, and Y. Asakawa**, “Microbial transformation of thymol formation of 2-hydroxy-3-*p*-menthen-5-one by *Streptomyces humidus*, Tu-1”, *Proc. 28th TEAC*, pp. 177–179, 1988a.
- [62] **J.C.R. DEMYTTENAERE, H.M. WILLEMEN**, “Biotransformation of linalool to furanoid and pyranoid linalool oxides by *Aspergillus niger*”, *Phytochem.*, 47 : 1029-1036, 1998.
- [63] **D. Brodkorb, M. Gottschall, R. Marmulla, F. Lueddeke and J. Harder**, “Linalool dehydratase-isomerase, a bifunctional enzyme in the anaerobic degradation of monoterpenes”, *J. Biol.Chem.* 285, pp: 30436–30442, 2010. doi: 10.1074/jbc.M109.084244
- [64] **S.G. Bell, A. Dale, N.H. Rees and L.L. Wong**, “Acytochrome P450 class I electron transfer system from *Novosphingobium aromaticivorans*”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, pp: 163–175, 2010. .doi:10.1007/s00253-009-2234-y
- [65] **A.J.H. Ullah, R.I. Murray, P.K. Bhattacharyya, G.C. Wagner and I. C. Gunsalus**, “Protein components of acytochrome P-450 linalool-8-methyl hydroxylase”, *J. Biol.Chem.* 265, pp: 1345–1351, 1990.
- [66] **J. ONKEN, R.G. BERGER**, “Biotransformation of citronellol by the basidiomycete *Cystoderma carcharias* in a membrane bioreactor”, *Appl. Microb. Biotechnol.*; 51 : 158-163, 1999.
- [67] **K. Förster-Fromme, B. Höschle, C. Mack, M. Bott, W. Armbruster, and D. Jendrosseck**, “Identification of genes and proteins necessary for catabolism of acyclic terpenes and leucine/isovalerate in *Pseudomonasa eruginosa*”, *Appl.Environ. Microbiol*, 72, pp: 4819–4828, 2006. doi:10.1128/AEM.00853-06 .
- [68] **S.S JOGLEKAR and R.S. DHAVALIKAR**, “Microbial transformation of terpenoids, I. Identification of metabolites produced by a pseudomonas from citronellal and citral”, *Applied Microbiology* 18, pp: 108461087, 1969.
- [69] **M.J. van der Werf, H.J. Swarts, and J.A.M. DeBont**, “*Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene”. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, pp: 2092–2102, 1999b.

- [70] **T.K. Cheong, and P.J. Oriel**, “Cloning and expression of the limonene hydroxylase of *Bacillus stearothermophilus*” BR 388 and utilization in two- phase limonene conversions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* pp: 84–86, 903–915, 2000. doi: 10.1385/ABAB:84-86:1-9:903
- [71] **W.A. Duetz, A.H.M. Fjallman, S.Y. Ren, C. Jourdat, and B. Witholt**, “Biotransformation of D-limonene to (+) trans-carveol by toluene-grown *Rhodococcus opacus* PWD4 cells”, *Appl. Environ. Microbiol.* 67, pp: 2829–2832, 2001. doi: 10.1128/AEM.67.6.2829-2832.2001
- [72] **D.B. Hawkes, G.W. Adams, A.L. Burlingame, P.R.O. De Montellano, and J.J. DeVoss**, “Cytochrome P450 *cin* (CYP176A), isolation, expression, and characterization”, *J. Biol. Chem.* 277, pp: 27725–27732, 2002. doi:10.1074/jbc. M203382200
- [73] **I.C. MACRAE, V. ALBERTS, R.M. CARMAN and I.M. SHAW**, “Products of 1,8-cineole oxidation by a *Pseudomonas*”, *Australian Journal of Chemistry*, pp: 917- 922, 1979.
- [74] **F. Lueddeke, A. Wuelfing, M. Timke, F. Germer, J. Weber, A. Dikfidan, et al.** Geraniol and geranial dehydrogenases induced in anaerobic monoterpene degradation by *Castellaniella defragrans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, pp: 2128–2136, 2012. doi:10.1128/AEM.07226-11
- [75] **R.W. Eaton**, “*p*-Cymene catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: cloning and characterization of DNA encoding conversion of *p*-cymene to *p*-cumate”. *J. Bacteriol.* 179, pp: 3171–3180, 1997.
- [76] **T.L. Poulos, B.C. Finzel, I.C. Gunsalus, G.C. Wagner, and J. Kraut**, “The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450”, *J. Biol. Chem.* 260, pp: 6122–6130, 1985.
- [77] **I.M. Labuda, S.K. Goers, K.A. Keon**, “Bioconversion process for the production of vanillin”, US patent 5128253, 1992.
- [78] **S.K. Yoo, D.F. Day**, “Bacterial metabolism of α and β -pinene and related monoterpenes by *Pseudomonas* sp. strain PIN”. *Process Biochem* 37:739–745, 2002.
- [79] **V. Krasnobajew**, “Terpenoids. In: *Biotechnology*”, K. Kieslich, ed., Vol. 6a, pp. 97–125. Weinheim: Verlag Chemie, 1984.

- [80] **K. Bauer, D. Garbe, and H. Surburg** (eds.), "Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses", 2nd revised ed., 218pp, New York : VCH Publishers, Best, D.J. and K.J. Davis, 1988. *Soap, perfumery and Cosmetics* 4: 47, 1990.
- [81] **P. Franchomme, R. Jollois, D. Péroël**, « L'aromathérapie exactement, Edition Roger Jollois », 2001.
- [82] **J. BRUNETON**, « Huiles essentielles, dans Pharmacologie: phytochimie, plantes médicinales », 2ème éd., Éd. Lavoisier, Paris, pp : 406-466, 1993.
- [83] **J.A. MOORE**, « Chimie Organique Moderne », Éd. Hrwltée, Montréal, Canada, pp : 343-345, 1975.
- [84] **P. RIBÉRAU-GAYON**, « Les composés phénoliques des végétaux », Éd. Dunod, Paris, p: 143, 1968.
- [85] **M. NACRO et J. MILLOGO-RASOLODIMBY**, « Plantes tinctoriales et plantes à tanins du Burkina Faso », Éd. Scientifika, Amiens, p : 86, 1993.
- [86] **M. KOUDA-BONAFOS**, « Étude de molécules à propriétés pesticides, tannantes et/ou colorantes », Thèse de Doctorat d'État, Université d'Ouagadougou, p : 141, 1998.
- [87] **R. PARIS et H. MOYSE**, « Précis de matière médicale », tome I, Edition Masson, pp : 196-200, 1976.
- [88] **J. M. OUAMBA**, « Valorisation Chimique des Plantes Aromatiques du Congo: Extraction et analyse des huiles essentielles, Oximation des aldéhydes naturels », Thèse de Doctorat d'État, Université de Montpellier II, p : 340, 1988.
- [89] **J.L. Bicas, P. Fontanille, G.M. Pastore and C. Larroche**, "Characterization of monoterpene biotransformation in two pseudomonads", *Journal of Applied Microbiology*, 105 :1991-2001, 2008.
- [90] **M. Trytek, K. Jedrzejewski, J. Fiedurek**, "Bioconversion of α -pinène by a novel cold-adapted fungus *Chrysosporium pannorum*", *J Ind Microbiol Biotechnol*, 42: 181-188, 2015.
- [91] **J.-L Fauchère, J.-L Avril**, « Bactériologie générale et médicale », Ed. Ellipses, 365 p, 2002.

- [92] **N. Benayad**, « Evaluation de l'activité insecticide et antibactérienne des plantes aromatiques et médicinales Marocaines. Extraction de métabolites secondaires des champignons endophytiques isolés de plantes Marocaines et activité anticancéreuse », thèse de doctorat, université Mohammed V- Agdal, Rabat, 2013.
- [93] **L. Gallien**, « Traitements ionisants et industries alimentaires », Annales du colloque. APRIA, Paris, 1-12, 1987.
- [94] **M.F. Patterson and P. Loaharanu**, "Irradiation", In B.M. Lund, T.C. Baird-Parker, G.W. Gould, *The Microbiological Safety and Quality of Food*, Maryland: Aspers Publishers, pp. 65–99, 2000.
- [95] **E. Pelizzetti, C. Minero**, "Mechanism of the photo-oxidative degradation of organic pollutants over TiO₂ particles", *Electrochimica Acta*, 38 (1): 47-55, 1993.
- [96] **M. Lidmark-Henriksson**, « Biotransformation of Turpentine Constituents: oxygenation and Esterification », thèse de doctorat, Mid Sweden university, Sundsvall, Sweden, 2003.

ANNEXES

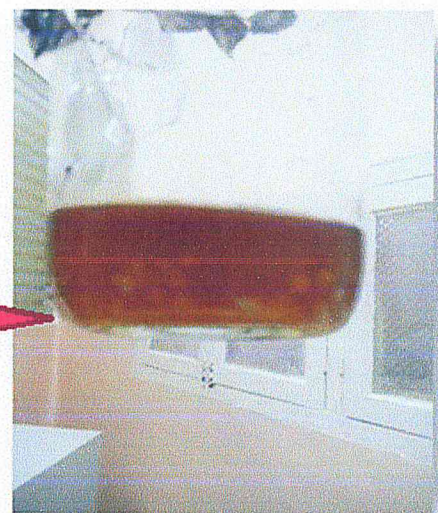
ANNEXE 1



Milieu de bioconversion par
Peanibacillus popilliae



Milieu de biodégradation par
Streptomyces rochei



Milieu de bioconversion par *Streptomyces rochei*

ANNEXE 2

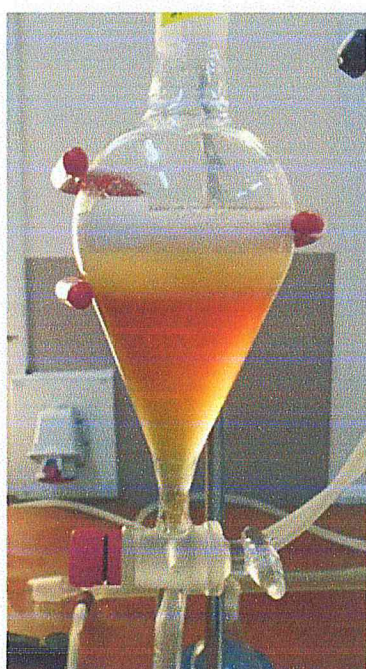
Méthodologie de l'extraction des métabolites secondaires



Centrifugeuse



Culot bactérien



Extraction Liquide-Liquide



Rotavapeur

ANNEXE 3



Système de la lampe UV



Autoclave