

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

SAIDANI Fatiha

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière

Filière : Chimie

Option : Chimie des Substances Naturelles

Titre

**Contribution à l'étude de la bioconversion, biodégradation
et photodégradation du menthol**

Soutenu publiquement le 27 juin 2016 devant le jury composé de

Y. Daghbouche	Pr	Présidente	Université de Blida 1
K. Boutemek	MCB	Examinatrice	Université de Blida 1
A. Badis	Pr	Promoteur	Université de Blida 1
F.Z. Ferradji	MCB	Co/Promotrice	Université de Blida 1

Promotion 2015-2016

Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord à ALLAH tout puissant pour m'avoir donné la volonté, la patience et le courage nécessaire pour mener à bien ce modeste Travail.

Je tiens à remercier très sincèrement mon promoteur Pr. BADIS Abdelmalek d'avoir accepté de m'encadrer. Je le remercie pour son aide, ses conseils et ses orientations, sa disponibilité et sa patience. Je le remercie vivement pour le choix du sujet qui est intéressant et d'actualité.

J'adresse mes sincères remerciements à Pr. EL HATTAB Mohamed, Je tiens à lui témoigner ma gratitude pour ses encouragements, sa disponibilité, sa patience avec moi, sa gentillesse et ces qualités scientifiques et humaines et aussi Je le remercie vivement pour le choix du sujet qui est intéressant et d'actualité.

J'adresse mes remerciements particuliers à ma co/promotrice Mme Fatima Zohra FERRADJI, maitre de conférences à l'Université de Blida 1, pour son aide, sa gentillesse, sa patience, ses conseils précieux, sa disponibilité qui a donné vie à ce travail malgré ses charges professionnelles à qui j'exprime ici mon profond respectMerci.

Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à Mme Yasmina DAGHBOUCHE Professeur à l'Université de Blida 1, de m'avoir fait honneur de présider ce jury.

J'adresse mes sincères remerciements à Mme Boutemak, maitre de conférences qui m'a fait l'honneur de juger ce travail.

Je remercie également tous les membres de jury pour l'honneur qu'ils me font d'avoir acceptés de juger ce travail.

J'adresse aussi mes sincères remerciements à tous les professeurs et les enseignants pour leurs efforts et encouragement le long de ce master.

Un grand merci au l'ingénieur du laboratoire de recherche « Chimie de Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSN-BioM) » de l'Université de Blida 1 Melle MEBAREK Leyrat, pour sa disponibilité et son aide précieux dans la réalisation de mon travail expérimentale.

J'adresse également mes sincères remerciements aux deux doctorantes du laboratoire de chimie des substances naturelles et de biomolécule (LCSN-BioM) Melle HAMICHE SONIA et Melle BOUNAAS Karima pour leur gentillesse et leur aide dans la réalisation de ce modeste travail.

J'adresse également mes sincères remerciements au personnel du laboratoire de Microbiologie du Département de Chimie industrielle, et tout particulièrement à Mme KHELOWIA Lamia.

Mes remerciements s'adressent aussi aux membres du laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules, qui ont mis à ma disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de ce travail.

De même je remercie infiniment Mr Toufahi Djamel de nous avoir ouvert les portes de son laboratoire. Avec ses qualités humaines et son expérience, il a su nous faire aimer le monde merveilleux des bactéries

Je n'oublie surement pas mes collègues et amies qui ont contribué par leur soutien et amitié.

Je ne pouvais finir sans remercier très fortement mes parents, pour leurs aides, leur soutien moral et leurs encouragements. Je leurs exprime toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude

Au risque de me répéter, encore MERCI à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin et pardon à ceux que j'aurais maladroitement oublié.

Dédicaces

Je dédie ce travail à tout les gens qui m'entourent un par un, à ceux qui ont souffert pour moi, ces personnes qui m'entouré et m'entourent, par leur amour, leur sacrifice ; ces gens qui sont la source du bonheur dans ma vie, ces gens qui sont mon refuge dans les moments difficiles, sans eux je ne serais jamais ce que je suis aujourd'hui.

Le premier mérite revient à mes chers parents pour leur grande patience compréhension et leur soutien indéfectible et encouragement durant toute ma vie.

A mes très chère sœurs Asmaa et Malek et mon cher frère Anes pour leur encouragement.

A mon grand père qui n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager: Que le dieu nous le garde.

A toute ma famille

A toutes mes amies

Ainsi qu'à tous ceux qui me sont cher

A toutes les personnes à qui je réserve une place dans mon cœur et qui ont su être patientes, je leurs dédie ce modeste travail.

Fatiha

ملخص

يركز هذا العمل على دراسة التحول البيولوجي و التحلل او التفكك البيولوجي للمنتول باستخدام نوعين من السلالات البكتيرية و هما: *Streptomyces rochei* AB1 و *Paenibacillus popiliae* 1C. ويتطرق أيضا إلى التحليل الضوئي عن طريق الأشعة فوق البنفسجية و الأشعة ذات الطاقة العالية لسيزيوم 137.

تم توضيح نقاء المنتول عن طريق اختبارات أولية ب CCM و IRTF و CG/SM. لقد سمح لنا تحديد التركيزات بترسيم تثبيط المنتول التي أجريت على مجال اثنين من السلالات. تم تحديد هذا التركيز بأنه يساوي 3 ملغ/ملل.

تم إجراء التحول البيولوجي على سلالة *Paenibacillus popiliae* 1C في الوسط الغني لوغيا بارتني، على العكس التحلل البيولوجي تم باستخدام الحد الأدنى من المتوسط.

أجري التحول البيولوجي و التحلل البيولوجي للمنتول من طرق السلالة *Streptomyces rochei* AB1 باستخدام على التوالي الوسط ISP9 الغني و ISP9 الفقير.

تم تنفيذ التحلل الضوئي باستخدام الأشعة فوق البنفسجية الكهرومغناطيسية و الطاقة العالية لسيزيوم 137.

إن شروط العمل على التحويل البيولوجي و التحلل البيولوجي للمنتول بالسلالة *Paenibacillus popiliae* 1C لم تسمح بالتحويل الأحيائي و لا بالتحلل البيولوجي.

فيما يتعلق بالسلالة *Streptomyces rochei* AB1 سمح لنا التحول البيولوجي بالحصول على الليمونان كمنتج رئيسي. أما التحلل البيولوجي أعطى خليط من Monoterpene لاسيما الأوكاليتول.

سمح لنا التحلل الضوئي بواسطة الأشعة ذات الطاقة العالية لسيزيوم 137 بأكسدة المنتول إلى المتون. إن شروط العمل بواسطة التحلل الضوئي للمنتول بواسطة الأشعة فوق البنفسجية لم يعطي أي نتائج حاسمة.

الكلمات المفتاحية: المنتول، التحول الأحيائي، التحلل البيولوجي، التحلل الضوئي، *Paenibacillus popiliae* 1C، *Streptomyces rochei* AB1، UV، CG/SM، Cesium CS137.

Résumé

Le présent travail porte sur l'étude de la bioconversion et la biodégradation du menthol par deux souches bactériennes isolées localement à savoir, *Paenibacillus popiliae* 1C et *Streptomyces rochei* AB1. A titre comparatif, la photodégradation par un rayonnement UV et par un rayonnement haute énergie de Cs137 a également été envisagée. La pureté du menthol a été élucidée par des analyses préliminaires comportant la CCM, IRTF et la CG/SM.

La détermination des concentrations permettant de délimiter le domaine d'inhibition vis-à-vis du menthol a été effectué sur les deux souches. Cette concentration a été déterminée comme étant égale à 3 mg/mL.

Quant à la souche *Paenibacillus popiliae* 1C, la bioconversion a été effectuée sur le milieu Luria-Bertani riche, par contre, la biodégradation a été réalisée en utilisant le milieu minimum. La bioconversion et la biodégradation du menthol par la souche *Streptomyces rochei* AB1 a été menée en utilisant, respectivement, le milieu ISP9 riche et ISP9 pauvre.

Les conditions opératoires de bioconversion et de biodégradation du menthol par la souche *Paenibacillus popiliae* 1C, n'ont pas permis sa biotransformation ni même sa biodégradation. Concernant la souche *Streptomyces rochei*, la bioconversion a permis notamment l'obtention du **Limonène** comme produit majoritaire. La biodégradation a mené vers un mélange de **monoterpènes** comportant notamment l'**Eucalyptol**.

Par ailleurs, la photodégradation par le rayonnement haute énergie du Cs137 a permis l'oxydation du menthol en **menthone**. Les conditions opératoires de la photodégradation du menthol par le rayonnement UV n'ont pas abouti à des résultats concluants.

Mots clés : Menthol, bioconversion, biodégradation, photodégradation, *Paenibacillus popiliae* 1C, *Streptomyces rochei* AB1, Césium Cs 137, UV, CG/ SM

Abstract

This work focuses on the study of bioconversion and biodegradation of menthol by two strains, *Paenibacillus popilliae* 1C and *Streptomyces rochei* AB1. For comparison the Photodegradation by UV radiation and high-energy radiation from Cs137 also considered. The purity of the menthol has been elucidated by preliminary tests with the CCM, IRTF and GC / MS.

Determining of concentrations for delineating the area of inhibition vis-a-vis menthol was performed on the two strains. This concentration was determined to be equal to 3 mg / mL.

On strain *Paenibacillus Popilliae* 1C, the bioconversion was performed on the Luria-Bertani rich medium, on the contrary biodegradation was performed by using the minimum medium.

The bioconversion and biodegradation of menthol by the strain *Streptomyces rochei* AB1 was conducted using, respectively, the ISP9 medium rich and poor.

The implementation of Photodegradation was performed using electromagnetic energy UV radiation and high-energy radiation of Cs137.

The operating conditions for bioconversion and biodegradation of menthol by the strain *Paenibacillus popilliae* 1C, did not allow biotransformation nor its biodegradation. Regarding *Streptomyces rochei*, the bioconversion allows us to obtain including obtaining **Limonene** as the major product. The biodegradation gave a mixture of monoterpenes in particular comprising **Eucalyptol**.

In addition, the photodegradation by high-energy radiation from Cs137 allowed the oxidation of menthol to **menthone**. The operating conditions of the photodégradation of menthol by UV radiation did not lead to conclusive results.

Keywords: Menthol, biotransformation, biodegradation, photodegradation, *Paenibacillus popilliae* 1C, *Streptomyces rochei* AB1, Cesium Cs 137, UV, GC / MS

Liste des abréviations

- ATCC** : American Type Culture Collection
- °C** : Degré Celsius
- pH** : Potentiel Hydrogène
- S** : *Streptomyces*
- [C]** : Concentration
- CCM** : Chromatographie sur Couche Mince
- Rf** : Rapport frontal
- IRTF** : Infrarouge à Transformer de Fourier
- KBr** : Bromure de potassium
- CG/SM** : Chromatographie en phase Gazeuse associée à la Spectrométrie de Masse
- LB** : Milieu Luria Bertani
- MM** : Milieu Minimum
- ISP9** : International Streptomyces Project 9
- tr.min⁻¹** : tourne par minute

Liste des tableaux

Tableau 1 : Bioconversion des monoterpènes par divers microorganismes	11-14
Tableau 2 : Composition chimique des milieux de culture	29-30
Tableau 3 : Condition de la photodégradation par les rayons de Cs 137 à haute énergie	35
Tableau 4 : Les principaux produits de la biodégradation du menthol par <i>Streptomyces rochei</i> AB1	43
Tableau 5 : Les différents produits de la bioconversion du menthol par <i>Streptomyces rochei</i> AB1	48

Liste des planches

Planche 1 :	(1 <i>R</i> , 2 <i>S</i> , 5 <i>R</i>)-2-isopropyl-5-méthylcyclohexanol	15
Planche 2 :	Les voies métaboliques de (-) menthol par <i>Aspergillus niger</i>	17
Planche 3 :	Bioconversion du (-) menthol par <i>Cephalosporium aphidicola</i>	18
Planche 4 :	Bioconversion de (-) menthol par <i>Mucor ramannianus</i> (PTCC5074)	18-19
Planche 5 :	Bioconversion du (-) menthol par <i>Chlorella vulgaris</i>	20
Planche 6 :	Voie possible de la bioconversion du (-) menthol par <i>Penicillium sp</i>	21
Planche 7 :	Les voies métaboliques de la biodégradation du menthol par <i>Streptomyces rochei</i> AB1	44
Planche 8 :	Les voies métaboliques possibles de la bioconversion du menthol par <i>Streptomyces rochei</i> AB1	49
Planche 9 :	La voie de la photodégradation du menthol par les rayons de Cs137 à haute énergie	54

Liste des figures

Figure 1 :	Principe de la bioconversion	5
Figure 2 :	Classification du genre <i>Bacillus</i>	9
Figure 3 :	Classification du genre <i>Streptomyces</i>	10
Figure 4 :	Méthodologie expérimentale du travail	25
Figure 5 :	<i>Paenibacillus popiliae</i> 1 C	28
Figure 6 :	<i>Streptomyces rochei</i> AB1	28
Figure 7 :	Centrifugation de l'extrait de culture bactérienne	33
Figure 8 :	Extraction du surnageant	34
Figure 9 :	Source des rayons Césium	35
Figure 10:	Montage de la photodégradation	35
Figure 11:	Chromatographie sur couche mince du menthol	36
Figure 12:	Spectre IRTF d'absorbance du menthol	37
Figure 13 :	A : Profil chromatographique d'analyse du menthol B : Spectre de masse du menthol	38
Figure 14 :	Effet de concentration du menthol sur la croissance de <i>Paenibacillus popiliae</i> 1C	39
Figura 15 :	Effet de concentration du menthol sur la croissance de <i>Streptomyces rochei</i> AB1	40
Figure 16 :	L'analyse chromatographique sur couche mince CCM de 1 : Solution témoin 2 : La phase organique de bioconversion	41

Figure 17 : Profil chromatographique d'analyse de la bioconversion et la biodégradation du menthol par <i>Paenibacillus popilliae</i> 1C	42
Figure 18 : Profil chromatographique d'analyse de la biodégradation du menthol par <i>Streptomyces rochei</i> AB1	45
Figure 19 : Profil chromatographique d'analyse de la bioconversion du menthol par <i>Streptomyces rochei</i> AB1	50
Figure 20 : profil chromatographique de la photodégradation du menthol par la lumière UV	53
Figure 21 : Profil chromatographique de la photodégradation du menthol par les rayons de Cs137 à haute énergie	55
Figure 22 : Spectre de masse du menthone	57

SOMMAIRE

Remerciements	I
Dédicaces	lii
ملخص	lv
Résumé	v
Abstract	vi
Liste des abréviations	vii
Liste des tableaux	viii
Liste des planches	ix
Liste des figures	x
Introduction général	1

Partie I : Synthèse bibliographique

I. 1 Introduction	4
I. 2 Bioconversion (Biotransformation)	4
I. 2.1 Définition de bioconversion	4
I. 2.2 Classification des voies de bioconversion	5
I. 2.3 Avantage des bioconversions	5
I. 2.4 Inconvénient de la bioconversion	6
I. 2.5 Facteurs affectant la bioconversion	6
I. 2.6 Biocatalyseurs	6
I. 2.7 Optimisation des procédés de bioconversion	7
I. 3 Etude de la bioconversion des terpènes par <i>Bacillus</i> , <i>Streptomyces</i> et d'autres microorganismes	8
I. 3.1 Généralités sur la famille des <i>Bacillaceae</i>	8
I. 3.1.1 Caractéristiques bactériologiques du genre <i>Bacillus</i>	8
I. 3.1.2 Classification du genre <i>Bacillus</i>	9
I. 3.2 Généralités sur la famille des <i>Streptomycetaceae</i>	10
I. 3.2.1 Définition et caractéristiques principales	10
I. 3.2.2 Classification du genre <i>Streptomyces</i>	10
I. 3.3 Travaux antérieurs de la bioconversion des terpènes par différents microorganismes	11

I. 4 Etude de la bioconversion du Menthol	15
I. 4.1 Description chimique et utilisation du menthol	15
I. 4.2 Propriétés physiques et chimiques	16
I. 4.3 Bioconversion du menthol par divers microorganismes	16
I. 5 Biodégradation	22
I. 5.1 Généralité sur la biodégradation	22
I. 5.2 Type de biodégradation	22
Partie II : Etude expérimentale	
II. 1 Introduction	24
II. 2 Matériel et méthodologie expérimentale	25
II. 2.1 Analyses préliminaires du menthol	26
II. 2.1.1 Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)	26
II. 2.1.2 Analyse par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)	26
II. 2.1.3 Analyse par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM)	27
II. 2.2 Dégradation du menthol par voie microbiologique	27
II. 2.2.1 Origine des souches utilisées	27
II. 2.2.2 Préparation et composition des milieux de culture	29
II. 2.2.3 Repiquage des souches	30
II. 2.2.4 Détermination de la concentration assimilable non inhibitrice pour la bioconversion et la biodégradation	30
II. 2.2.4.1 Détermination de la gamme des concentrations par le test d'inhibition en milieu solide	30
II. 2.2.5 Etude de la Bioconversion et la Biodégradation du menthol	32
II. 2.2.5.1 Procédure de bioconversion et biodégradation	32
II. 2.2.5.2 Centrifugation de l'extrait de culture bactérienne	33
II. 2.2.5.3 Extraction liquide- liquide du surnageant obtenu	33
II. 2.3 Dégradation du menthol par l'énergie lumineuse électromagnétique	34
II. 2.3.1 La photodégradation par lumière UV	34
II. 2.3.2 La photodégradation par les rayons de Césium 137 à haute énergie	34

II. 2.4 Analyse par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM)	35
II. 3 Résultat et discussion	36
II. 3.1 Analyses préliminaires du menthol	36
II. 3.1.1 Analyse par Chromatographie sur couche mince (CCM)	36
II. 3.1.2 Analyse par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)	36
II.3.1.3 Analyse par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/MS)	37
II. 3.2 Détermination de la concentration assimilable non inhibitrice pour la bioconversion et la biodégradation	39
II. 3.2.1 Détermination de la gamme de concentration par le test d'inhibition	39
II. 3.3 La Bioconversion et la Biodégradation du menthol	41
II. 3.3.1 La souche <i>Paenibacillus popilliae</i> 1C	41
II. 3.3.2 La souche de <i>Streptomyces rochei</i> AB1	43
II. 3.4 Dégradation du menthol par l'énergie lumineuse électromagnétique	53
II. 3.4.1 La photodégradation par la lumière UV	53
II. 3.4.2 La photodégradation par les rayons de Césium Cs137	54
Conclusion générale	59
Références bibliographiques	61
Annexes	

INTRODUCTION

GENERALE

Introduction générale

La bioconversion est un moyen efficace pour la modification structurale des composés bioactifs, naturels et synthétiques afin d'obtenir de nouveaux composés. La procédure consiste à utiliser des enzymes et des cellules entières comme biocatalyseurs pour la conversion de ces composés organiques. Ce processus peut également être utilisé pour améliorer la productivité d'un produit souhaité, surmonter les problèmes associés à la synthèse chimique et fournir des informations de base qui peuvent être utilisées pour élucider les voies métaboliques [1, 2].

L'utilisation des biocatalyseurs pour la fonctionnalisation des substances naturelles est une thématique suscitant un grand intérêt. En comparaison aux méthodes de synthèse chimique classiques, les voies de bioconversion présentent l'intérêt de l'utilisation accrue des matières premières renouvelables, de la nécessité de favoriser les procédés éco-compatibles et du respect des contraintes de l'environnement [3].

La synthèse chimique classique présente plusieurs inconvénients : nombreuses étapes, des catalyseurs souvent écotoxiques, rendements faibles, un temps de préparation long et une non-spécificité des certaines réactions [3,4]. Par conséquent, au cours de ces dernières années, la recherche dans ce domaine ne cesse de croître pour trouver ou inventer de nouveaux procédés, et des processus écologiques plus efficaces en terme de qualité du produit, d'efficacité de production et de réduction du temps et d'énergie.

Par ailleurs, les réactions de bioconversion ont lieu dans des conditions de pH et de température modérées. L'avantage principal des voies de bioconversion par rapport à la synthèse chimique classique est l'obtention d'excès énantiomériques importants. Cet aspect est primordial, vu que l'activité biologique dépend souvent d'un seul énantiomère [5].

La bioconversion a été appliquée à la transformation enzymatique des métabolites secondaires de diverses classes chimiques. Les terpénoïdes sont des hydrocarbures insaturés dérivés d'unités isoprène ont fait l'objet de plusieurs travaux de bioconversion, notamment les monoterpénoïdes. Divers souches microbiennes ont été utilisées dans ce cadre. Des résultats très intéressants ont été obtenus à travers les voies de bioconversion, notamment en termes de sélectivité et de rendement de réaction.

Le menthol, un monoterpène oxygéné de grande valeur commerciale, produit majoritaire de plusieurs huiles essentielles a fait l'objet de plusieurs travaux de bioconversion.

Le présent travail est une partie intégrante de cette grande thématique et porte sur la dégradation du menthol par deux procédés, microbiologique et par l'énergie lumineuse électromagnétique à savoir, le procédé de bioconversion et de biodégradation par deux souches bactériennes *Paenibacillus popilliae* et *Streptomyces rochei*, et le procédé de la photodégradation par des rayons de Césium à haut énergie. Il s'articule autour de deux parties principales :

1. La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique dans laquelle nous présentons les concepts de la bioconversion (biotransformation) et la biodégradation des terpènes (monoterpène) par différents microorganismes.
2. La seconde partie est réservée à une étude expérimentale qui a pour objectif de tester l'efficacité des deux souches bactériennes *Paenibacillus popilliae* et *Streptomyces rochei* dans la bioconversion et la biodégradation du menthol. Aussi bien que la photodégradation par l'énergie lumineuse électromagnétique UV et par rayon de césium Cs137 à haute énergie a été envisagée.

PARTIE I

Synthèse bibliographique

I. 1 Introduction

La bioconversion des composés bioactifs est une alternative intéressante permettant d'empêcher l'utilisation des composés toxiques tels que les solvants organiques dans l'extraction. Dans ces procédés, les composés bioactifs sont obtenus à partir des sources naturelles par des microorganismes à travers leur métabolisme secondaire ou par action enzymatique exogène [6].

L'idée de la bioconversion est ancienne, elle a été appliquée pour la première fois par Nickel en 1951. Elle n'a été développée qu'une quinzaine d'années plus tard. En 1980, deux mises au point sur les voies de bioconversion alors étudiées, ont été réalisées indépendamment par Staba et par Reinhard et Alferman. Depuis 1980, les travaux se sont poursuivis dans différents domaines [7] :

- Bioconversion des terpènes ;
- Bioconversion des alcaloïdes ;
- Bioconversion des composés phénoliques.

La présente revue bibliographique regroupe l'ensemble des connaissances associées aux bioconversions (biotransformation) et biodégradation des terpènes par différents microorganismes en particulier par le genre *Bacillus* et *Streptomyces*.

I. 2 Bioconversions (Biotransformations)

I. 2.1 Définition de la bioconversion

La bioconversion peut être définie comme l'utilisation des systèmes biologiques (biocatalyseur) comme les microorganismes, pour convertir ou produire des modifications chimiques d'un substrat ou précurseur en un produit donné selon un nombre limité d'étapes enzymatiques [8]. Une certaine molécule est modifiée par la transformation de ses groupes fonctionnels avec ou sans dégradation de son squelette carboné. Ces modifications conduisent à la formation des composés bioactifs nouveaux et utiles qui ne sont pas aisément préparés par des procédés chimiques. Parmi ces produits, beaucoup ont des applications de grande envergure, comprenant les arômes, les produits agrochimiques, des antibiotiques, des antioxydants et des agents anticancéreux [1]. Le principe global du processus de bioconversion est résumé dans la figure 1 :

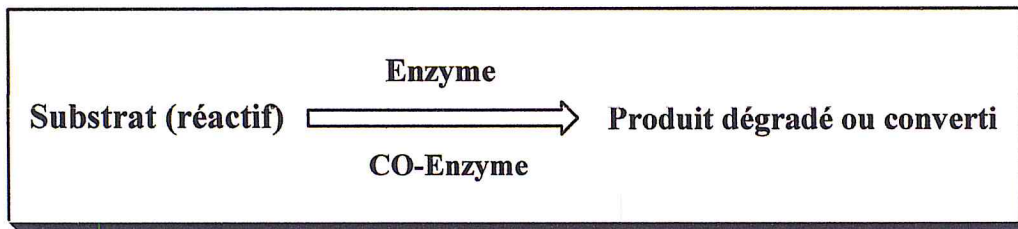


Figure 1: Principe de la bioconversion [9].

I. 2.2 Classification des voix de bioconversion

La bioconversion peut être classée en deux catégories différentes :

Le premier type de transformation est la transformation des xénobiotiques dans lequel le substrat est complètement étranger aux microorganismes.

Le second type de transformation est génétiquement ciblé, également connu comme analogue de la biosynthèse, dans lequel le substrat est un analogue structurel d'un intermédiaire biosynthétique. Cette biotransformation repose sur la flexibilité du substrat de la voie enzymatique existante, responsable de la biosynthèse du métabolisme secondaire [10,11].

I. 2.3 Avantage des bioconversions

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 dont la demande dans les domaines pharmaceutique et agroalimentaire est importante. Elles sont également 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 [12, 13, 14]. 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 [12, 13].

Pour obtenir un arôme naturel, les industries ont donc actuellement le choix entre deux systèmes de production que 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 des 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 des végétaux aromatiques. Elles permettent aussi de diminuer les volumes des résidus d'extraction [12].

I. 2.4 Inconvénient de la bioconversion

La principale difficulté liée à l'utilisation des transformations microbiennes est associée au faible rendement obtenu dans la réaction, ainsi que la nécessité d'un équipement de laboratoire spécifique et la formation sur les techniques microbiennes [13].

L'utilisation des biocatalyseurs pour réaliser des produits biotransformés est souvent difficile car elle implique les défis de toxicité réactif ou produit ou inhibition. En outre, si le substrat utilisé est toxique, il peut tuer le microorganisme empêchant toute la biotransformation de se produire. D'autre part, si le microorganisme utilise le substrat en tant que source d'énergie, aucun produit désiré n'est susceptible d'être récupéré [13].

I. 2.5 Facteurs affectant la bioconversion

La bioconversion dépend de divers facteurs comme : aspects physiologiques, biochimiques et les conditions environnementales de la culture cellulaire telle que [15]:

- Composition chimique des milieux de culture ;
- Les régulateurs de croissance ;
- La source de carbone dans le milieu ;
- Température ;
- pH ;
- Le temps d'incubation ;
- Intensité de la lumière.

I. 2.6 Biocatalyseurs

La biocatalyse est un grand type de bioconversion qui implique l'action d'enzymes dans la conversion d'un composé à l'autre [9].

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 [12,16]. 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 des 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 bioconversion. L'utilisation des cellules végétales, même si elle comporte plus d'inconvénients que celle d'enzymes ou des microorganismes, peut néanmoins être avantageuse pour la production des métabolites secondaires complexes. Avec les enzymes, les microorganismes représentent les principaux biocatalyseurs actuellement utilisés et étudiés [12, 17, 18].

D'une façon générale, la sélection initiale des souches est effectuée par rapport à plusieurs critères qui sont à retenir dans toute stratégie de bioconversion : il faut obtenir un haut rendement de conversion, une réaction rapide, un seul produit obtenu à haute valeur ajoutée accompagné d'un coût relativement bas du substrat. Les souches excréant le produit recherché ou même effectuant la réaction dans le milieu de culture seront plus particulièrement intéressantes [12].

I. 2.7 Optimisation des procédés de bioconversion

Les principaux critères permettant d'évaluer la performance d'un procédé de bioconversion sont au nombre de trois. Il s'agit de la productivité en métabolites (ou vitesse de synthèse), de la concentration finale obtenue et du rendement de production. Ces critères vont être optimisés par une démarche comprenant deux grandes étapes. La première étape consiste à choisir le biocatalyseur le plus adapté à la réalisation de la réaction voulue. Les méthodes employées pour sélectionner les microorganismes ont été décrites dans le paragraphe précédent (I.2.6). La seconde étape consiste à choisir les paramètres physicochimiques et technologiques permettant de favoriser la réaction de bioconversion. Cette dernière met en jeu trois acteurs principaux, le précurseur ou substrat de bioconversion, le biocatalyseur (enzyme seule ou microorganisme entier) et le produit d'intérêt [12].

I. 3 Etude de la bioconversions des terpènes par *Bacillus*, *Streptomyces* et d'autres microorganismes

Ce chapitre comporte deux parties : la première porte des généralités sur les familles des *Bacillaceae* et *Streptomycetaceae*, puis l'action des microorganismes sur les terpènes et la possibilité de conversion ou dégradation de ces composés par différents types des microorganismes en particulier par le genre *Bacillus* et le genre du *Streptomyces* dans des conditions d'aérobiose. La seconde partie présente quelques données expérimentales sur la bioconversion des terpènes par ces différents microorganismes [19]. Des recherches approfondies ont été consacrées aux travaux antérieurs sur la production biotechnologique de saveurs et de parfums en utilisant les terpènes comme substrats. Environ 2/3 des manuscrits publiés sur la production et/ou la biotransformation des terpènes au cours des dernières années décrivent des bactéries ou des champignons comme les principaux biocatalyseurs en raison de leur potentiel élevé en bioprocédés [5].

I. 3.1 Généralités sur la famille des *Bacillaceae*

I. 3.1.1 Caractéristiques bactériologiques du genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* représente un groupe hétérogène des bactéries en forme des bâtonnets droit ou légèrement incurvés, à gram positif avec des extrémités arrondies, à l'exception des membres du *Bacillus cereus* qui possède des extrémités carrées, d'une longueur de 0.9 à 10.0 µm. Ces bactéries sont immobiles ou mobiles par des flagelles péritriches, aérobies ou anaérobies facultatives, mais certaines espèces peuvent être anaérobies strictes. Elles sont capables de former des endospores résistantes à différentes conditions telles que la température, les radiations, les désinfections et la dessiccation [20].

Ces bactéries se présentent isolées, en paires ou en chainettes. Elles sont catalase positive, capable de croître sur des milieux ordinaires comme exemple la gélose nutritive. La morphologie de leurs colonies est très variables entre et au sein des espèces. La composition du milieu de culture et les conditions d'incubations influent sur cette morphologie. Mais, malgré cette diversité, les colonies du genre *Bacillus* ne sont pas difficiles à identifier [20].

Les espèces du genre de *Bacillus* possèdent une diversité physiologique et métabolique importante et des capacités étonnantes qui leur permettent de survivre dans des habitats extrêmes, elles peuvent être thermophiles, psychrophiles, acidophiles, alcalophiles, halotolérants ou halophiles [21]. Elles sont chimio-organotrophes ou chimio-lithotrophes,

certaines espèces sont prototrophes et d'autres auxotrophes exigent des facteurs de croissance [20].

I. 3.1.2 Classification du genre *Bacillus*

La classification taxonomique des bactéries du genre *Bacillus* a été auparavant basée sur leurs caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques ainsi que leur capacité à sporuler, alors qu'aujourd'hui, la classification se base sur l'analyse comparative des séquences de base de l'ARNr 16S [20,22].

Le genre *Bacillus* est omniprésent dans la nature, il est classé comme décrit par la figure 2 [23]:

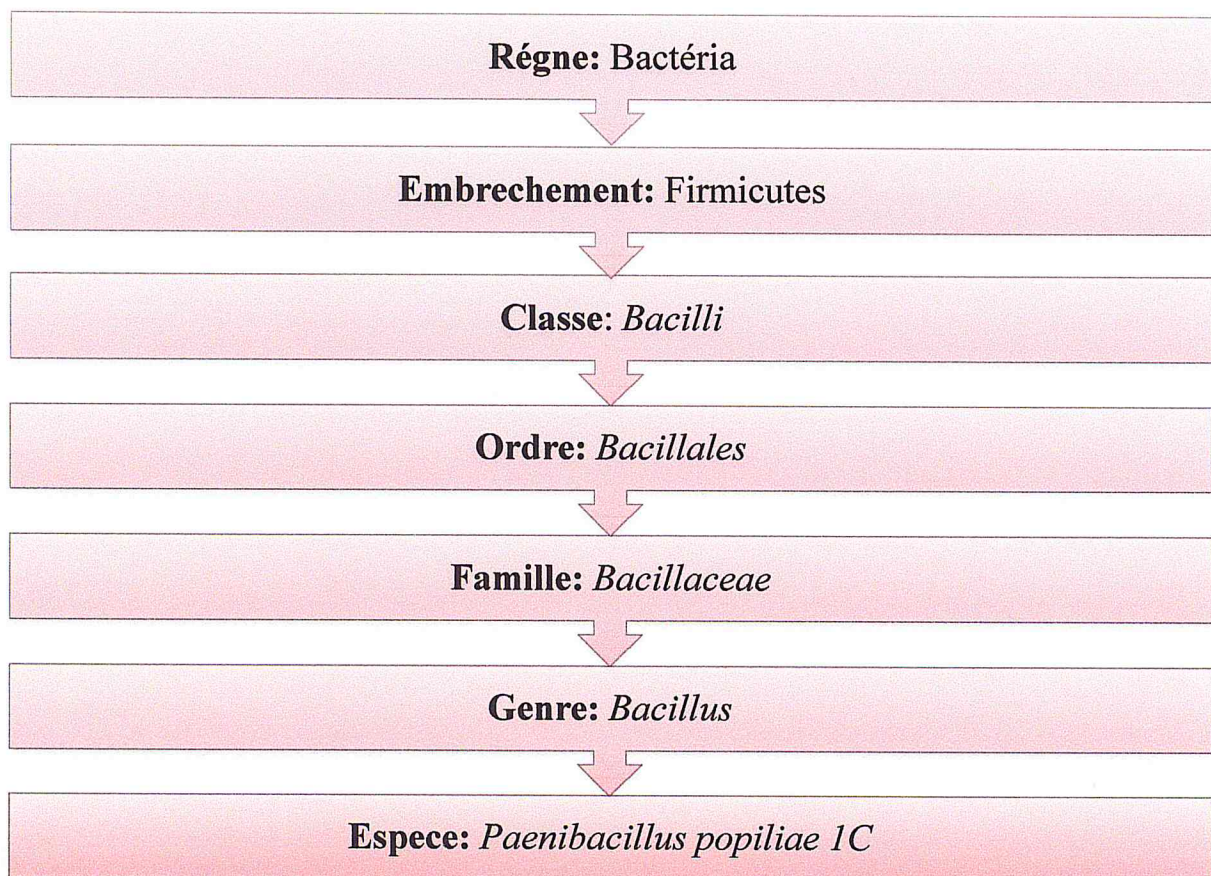


Figure 2 : Classification du genre *Bacillus* [23].

I. 3.2 Généralité sur la famille des *Streptomycetaceae*

I. 3.2.1 Définition et caractéristiques principales

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 (surtout les antibiotiques). Les *Streptomycètes* 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 [24]. A cause de leur structure filamenteuse, les actinomycètes y compris les *Streptomyces* ont longtemps été sujets à controverse a propos de leur nature, certains les considèrent comme des bactéries filamenteuses, d'autres comme des champignons. Aujourd'hui, ce problème est résolu et ce groupe est définitivement classé parmi les bactéries. Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de l'acide diaminopimelique [24,25]. Les *Streptomyces* sont des organismes aérobies, à coloration de Gram positive, chimioorganotrophes. Leur température optimale est située entre 25 °C et 35 °C (à l'exception des espèces thermophiles ou psychrophiles) et leur pH optimum entre 6,5 et 8. La famille de *Streptomycetaceae* contient actuellement trois genres (*Streptomyces*, *Kitasatospora* et *Streptacidiphilus*) [24,26].

I. 3.2.2 Classification du genre *Streptomyces*

La classification taxonomique du genre *Streptomyces* est donnée par la figure 3 :

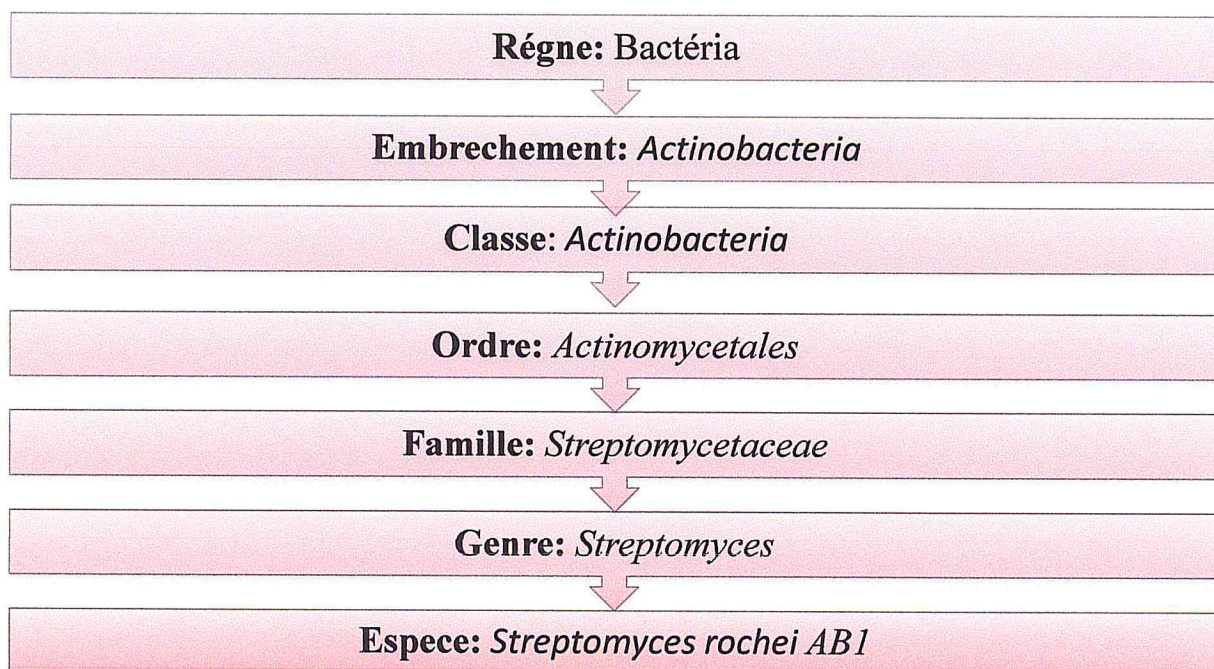


Figure 3 : Classification du genre *Streptomyces* [24,27].

I. 3.3 Travaux antérieurs de la bioconversion des terpènes par différents microorganismes

La majorité des transformations microbiennes des terpénoïdes ont été effectuées sur les monoterpénoïdes, qui sont les principaux constituants de nombreuses huiles essentielles. Les différents travaux sont regroupés dans le tableau 1 :

Tableaux 1 : Bioconversion des monoterpènes par divers microorganismes.

	Substrat	Microorganisme	Produit	Référence
Travaux sur <i>Bacillus</i>	1,4-cineole	<i>Bacillus cereus</i>	2 α -hydroxy-1,4-cineole (3.8%) 2 β -hydroxy-1,4-cineole (21.3%).	[28,29]
	α -pinène et β -pinène	<i>Bacillus pallidus</i> BR 425.	formation de nombreux monoterpènes oxydés identifiés comme étant des dérivés du carveol. <ul style="list-style-type: none"> • Carvone ; • Pinocarvone ; • Myrtenal. 	[30,29]
	D-limonène	<i>Bacillus stearothermophilus</i> BR388	<ul style="list-style-type: none"> • Carveol ; • Alcool perillyl ; • Aldéhyde perillyl ; • α-terpinéol. 	[31,29]
	1,8-cineole	<i>Bacillus cereus</i> UI-1477 (cytochrome P450 monooxygénase)	2R-endo-hydroxy-1,8-cinéole, Ou 2R-exo-hydroxy-1,8-cinéole.	[32,29]
	Isoeugenol	<i>Bacillus subtilis</i> HS8	vanilline	[33]

	Isoeugenol	<i>Bacillus pumilus</i> S1	Vanilline	[34]
Travaux sur les <i>Streptomyces</i>	Thymol	<i>Streptomyces humidus</i> Tu-1	(1R, 2S) et (1R, 2R)-2-hydroxy-3-p-menthen-5-one (14%).	[35,29]
	1,8-cineole	<i>Streptomyces ikutamanensis</i> Ya-2-1	(+)-3 α -hydroxy-1, 8-cineole (46%). (+)-3 β -hydroxy-1, 8-cineole (29%).	[36,29]
	Cuminaldéhyde [4-isopropylbenzaldéhyde]	<i>Streptomyces ikutamanensis</i>	Acide 4-isopropylbenzoïque (Acide cuminique) et cuminol	[37,29]
	<ul style="list-style-type: none"> • Geranial • Neral • (+)-, (-)-, et (\pm)-Citronellal 	<i>Streptomyces ikutamanensis</i> , Ya-2-1	Geraniol \rightarrow 6,7-epoxygeraniol Nerol \rightarrow 6,7-epoxynерol (+), (-), et (\pm)-Citronellol \rightarrow 2,3-epoxycitronellol	[37,29]
	linalol racémique	<i>Streptomyces albus</i> NRRL B1865, <i>Streptomyces griseus</i> ATCC 10137	oxydes de cis- et trans-linalol	[38,29]
	(+) ou (-)-Cis-carveol	<i>Streptomyces bottropensis</i> SY-2-1 <i>S. ikutamanensis</i> Ya-2-1	(-) ou (+)-bottrospicatol [(4R, 6R, 8R)-(-) ou (+)-6, 8-oxidomenth-1-en-9-ol] et (-) ou (+) -isobottrospicatol [(4R, 6R, 8S) - (-) ou (+) -6,8-oxidomenth-1-en-9-ol]	[39,29]

Streptomyces	(-)-Carvone	<i>Streptomyces, A-5-1</i>	(-) trans-Carvéol. (-) cis- carvéol. (+) dihydrocarvone, (+) isodihydrocarvone, (+) neodihydrocarveol, (+) isodihydrocarveol (+) neoisodihydrocarveol	[40]
	1,4-cineole	<i>Streptomyces griseus</i>	8-hydroxy-1,4-cineole	[28,29]
Divers microorganismes	α -terpineol	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	8,9-epoxy-p-menthan-1-ol	[41,29]
	Cis-p-menthane	<i>Pseudomonas mendocina</i> SF	Cis-p-menthan-1-ol	[42]
	isoeugenol	<i>Pseudomonas</i> sp. ISPC2	vanilline	[43]
	1,8-Cineol	<i>Rhodococcus</i> sp.	2-oxo-1, 8-Cineole (17%). 2-endo-hydroxy-1, 8-Cineole (56 %). 2-oxo-1, 8-Cineole (25%).	[44]
	(4R)-(+)-limonene	<i>Penicillium digitalum</i>	(4R)-(+)- α -terpineol	[45]
Divers	Myrcène	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 1074)	dihydrolinalol (79,5%) et le 2,6-diméthyl-octane (9,3%) pendent 1,5 jour. tandis qu'une incubation de 3 jours accumulée 2,6-diméthyl-octane (90,0%) et α -terpinéol (7,7%).	[46]

Divers microorganismes	isoeugenol	<i>Pseudomonas</i> <i>sp. ISPC2</i>	vanillin	[43]
	Thymol	<i>Oocystis pusilla</i> (Microalgue) (Période d'incubation de 24h)	Thymoquinone 2%	[47]
	(+)-Limonene		trans-Carveol 10%	
	(+)-Carvone		Carvone 5%	
	(-)-Menthone		Oxyde trans-limonène 3%	
	(L)Citronellal		trans-Dihydrocarvone 30%	
			cis-Dihydrocarvone 6%	
			Menthol 11%	
		Citronellol 75%		
	<i>Chrysosporium</i> <i>pannorum A-1</i> (2-3 jours)	Verbenol verbenone	[48]	
R-(+)-limonene	<i>Fusarium</i> <i>oxysporum 152b</i> (72 h)	R-(+)- α -terpineol	[49]	
limonene	<i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> (MTCC 1072) (120h)	Alcool périllylique (36%) p-menth-1-ène-6,8-diol (44%)	[50]	
Citronellal	<i>Penicillium</i> <i>digitatum</i>	Menthol	[29]	
(-) β -pinène	<i>Aspergillus Niger</i> ATCC 9642	α -terpinéol (4%)	[51]	

I. 4 Etude de la bioconversion du menthol

I. 4.1 Description chimique et utilisation du menthol

Le menthol est un alcool terpénique monocyclique constitué d'un cycle de cyclohexane substitué par un groupe méthyle et un groupe isopropyle en position para par rapport à un groupe OH (Planche 1), il est le constituant majeur de l'huile essentielle de menthe poivrée (*Mentha piperita*) et de l'huile de menthe des champs (*Mentha arvensis*) [52,53]. Des études plus récentes de J. Read, W. Hüchel, H. Schmidt, W. Treibs et V. Prelog étaient principalement consacrées à démêler les structures stéréochimiques du menthol. Menthol a trois atomes de carbone asymétriques dans le cycle cyclohexane, et se trouve donc sous forme de huit stéréo-isomères de quatre paires d'énantiomères : (-) et (+) Menthol, (-) et (+) Néomenthol, (-) et (+) Isomenthol, et le (-) et (+) Neoisomenthol. Le (-) menthol (également appelé menthol ou (1R, 2S, 5R) menthol) est la principale forme du menthol se produisant dans la nature et l'un des plus importants produits aromatisants [54], en raison de son odeur de menthe Poivrée et les effets rafraîchissants [29]. La source principale d'origine naturelle du (-) menthol est obtenue par congélation, de l'huile de menthe des champs pour cristalliser le menthol présent [52, 54, 55].

Le menthol est largement utilisé dans de nombreux produits commerciaux (produits pharmaceutiques, cosmétiques, dentifrices, la gomme à mâcher, et d'autres produits de toilettes, ainsi que dans les cigarettes) et les aliments [55], et possède plusieurs propriétés biologiques, comme sédatif, anesthésique, antiseptique, antibactérienne et antivirale très efficaces contre les germes microbiennes. Ses bienfaits antioxydants ainsi que ses effets antispasmodiques facilitent la digestion. Enfin, le menthol se caractérise par des fonctions relaxantes, et paradoxalement, certaines préparations de ce composé ont pour but de stimuler et tonifier le corps [54, 55, 56].

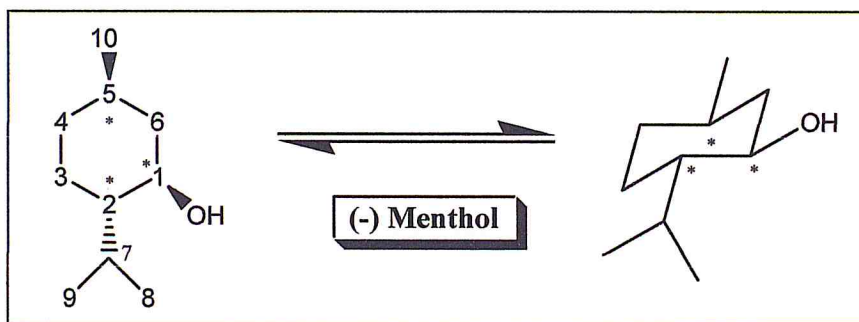


Planche 1: (1R, 2S, 5R)-2-isopropyl-5-methylcyclohexanol [56]

I. 4.2 Propriétés physiques et chimiques [54,55, 56]

- L'état physique : Cristaux ou granules (À température ambiante (20 à 25 °C), il se trouve sous forme solide, de couleur blanc cireux, Il fond si l'on augmente légèrement la température) ;
- Poids moléculaire : 156.27 g /mol ;
- Point de fusion : 41-43 ° C (106-109 ° F). D, L-menthol existe dans deux polymorphes fondant à 28 °C et 38 °C, respectivement ;
- Point d'ébullition : 216 °C ;
- Densité : 0,890 g / cm³;
- Pression de vapeur : 8,5 Pa (0,064 mm Hg) à 25 ° C (L-menthol, Isomère non spécifié); 30 Pa (0,975 mm Hg) à 55 ° C, (D / L menthol) ;
- Solubilités : Légèrement soluble dans l'eau; très soluble dans l'alcool, le chloroforme, l'éther, l'éther de pétrole acétone, le benzène.

I. 4.3 Bioconversion du menthol par divers microorganismes

La bioconversion du menthol par différents microorganismes conduit à la formation de plusieurs produits intermédiaires et finaux, bien que les voies métaboliques soient relativement similaires pour la plupart des microorganismes [57].

La littérature fournit plusieurs exemples pour exploiter le potentiel de biotransformation pour la bioconversion sélective des alcools monoterpénique comme le menthol par différents microorganismes sachant que la gamme des microorganismes qui participe à la biotransformation du Menthol est large [57]. La plupart de ces microorganismes sont des champignons. Parmi eux on retrouve *Aspergillus niger* et *Aspergillus cellulosa*, *Penicillium sp*, *Rhizopus stolonifer*, *Macrophomina phaseolina*, *Cunninghamilla elegans*....

La synthèse des différents travaux publiés sur la bioconversion du menthol est décrite dans ce qui suit :

- 1) La bioconversion fongique de (-) et (+) menthol par *Aspergillus niger* et *Aspergillus cellulosa* a été décrit par Asakawa et al. *Aspergillus niger* converti (-) menthol en 1-hydroxymenthol (1), 2- hydroxymenthol (2), 6- hydroxymenthol (3), 7- hydroxymenthol (4) enfin en 9-hydroxymenthol (5) et un anti-moustique très actif le 8-hydroxymenthol (6). La bioconversion de (+) et (-) Néomenthol et (+) Isomenthol par *Aspergillus niger* a été étudié ultérieurement par Takahashi et al. Il est même converti principalement à des

produits hydroxylés. Pour un aperçu schématique très détaillée de ces réactions [58], est donnée par la planche 2.

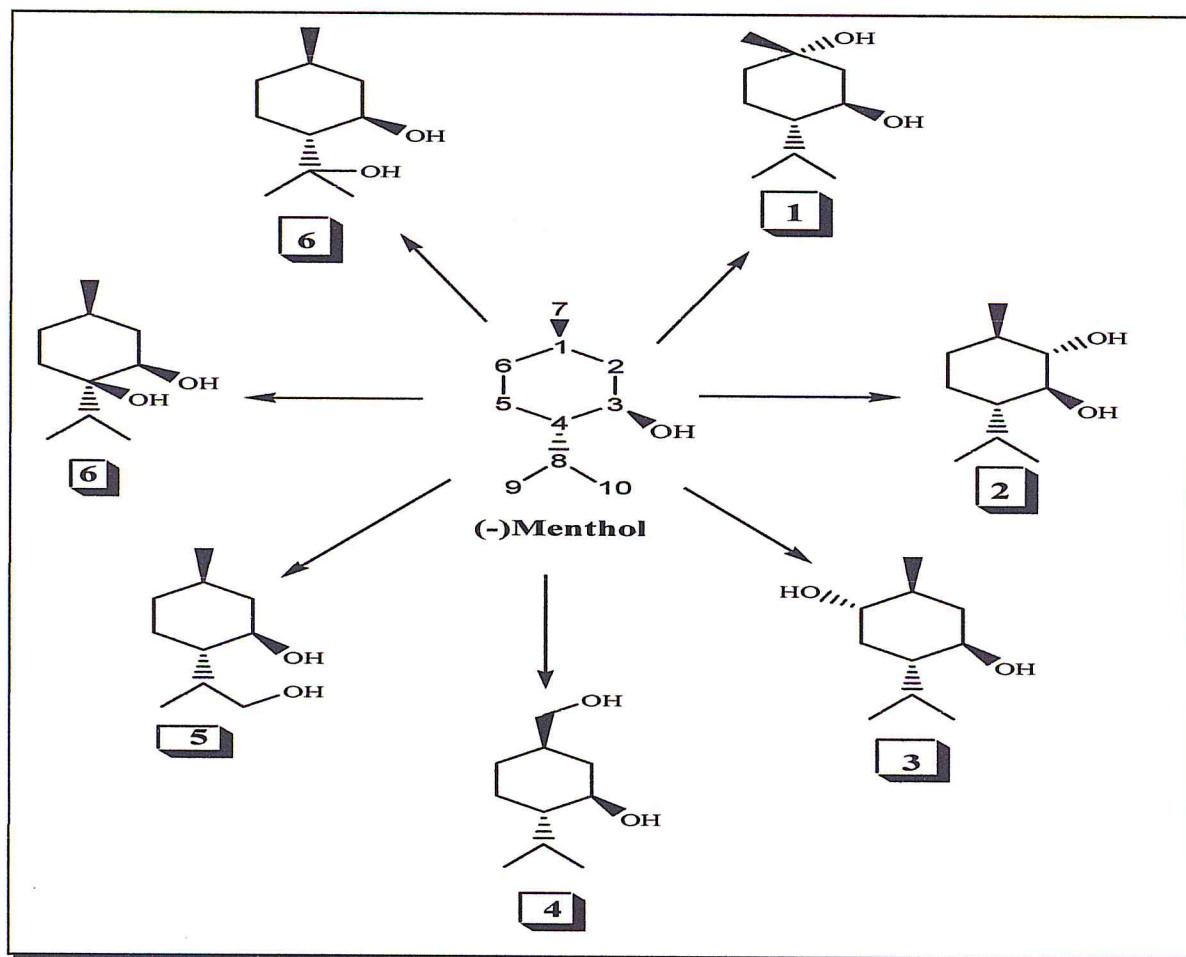


Planche 2 : Les voies métaboliques de (-) menthol par *Aspergillus niger* [58]

- 2) Plus récemment, la transformation fongique du (-) menthol par *Cephalosporium aphidicola* a été rapporté par Atta-ur-Rahman et al. L'incubation du (-) menthol avec ce champignon pendant 12 jours a donné quatre nouveaux métabolites, 10- acetoxymenthol (1), 1 α -hydroxymenthol (2), 6 α -hydroxymenthol (3) et 10- hydroxymenthol (4) et deux composés connus identifiés comme 7- hydroxymenthol (5) et 9-hydroxymenthol (6) (Planche 3) [59].

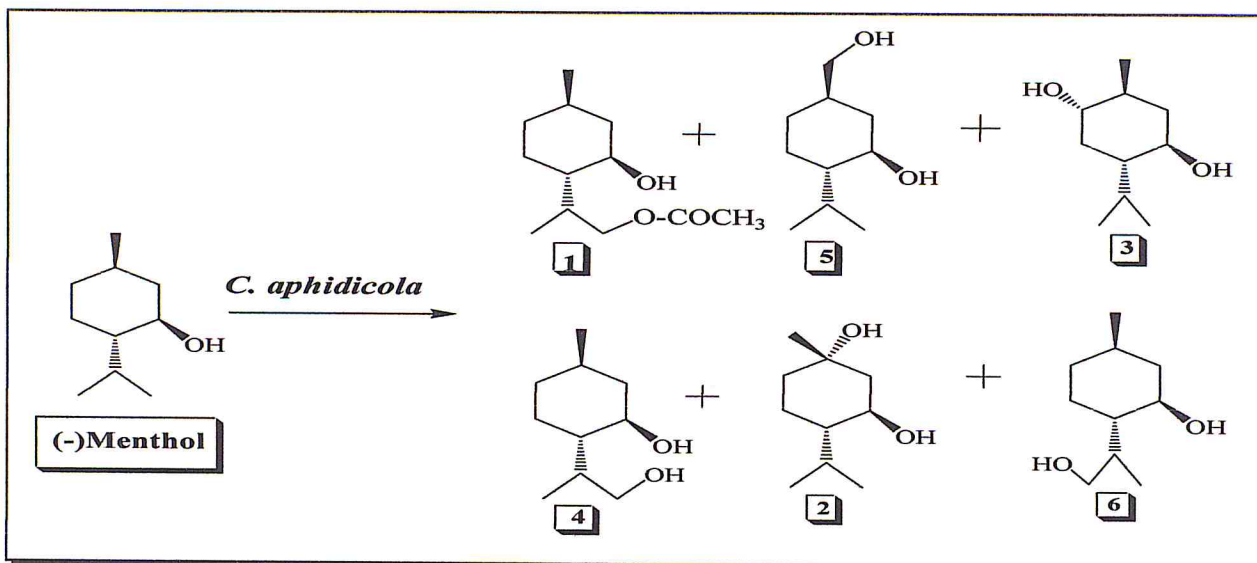


Planche 3: Bioconversion du (-) menthol par *Cephalosporium aphidicola* [59]

3) La bioconversion du (-) menthol par *Mucor ramannianus* (PTCC5074) a été étudiée par Akbar Esmaeili et al. Elle a été réalisée avec des cultures sporulées de surface de *Mucor ramannianus*. Les principaux produits obtenus (Planche 4) à partir de bioconversion du (-) menthol pendant 7 jours d'incubation sont : trans-p-menthane-8-ol, le trans-menth-2-ène-1-ol, le sabinane, p-menthane-3,8-diol, l'isomenthol, et le 1,8 cinéole, les rendements obtenus sont élevés [60,46].

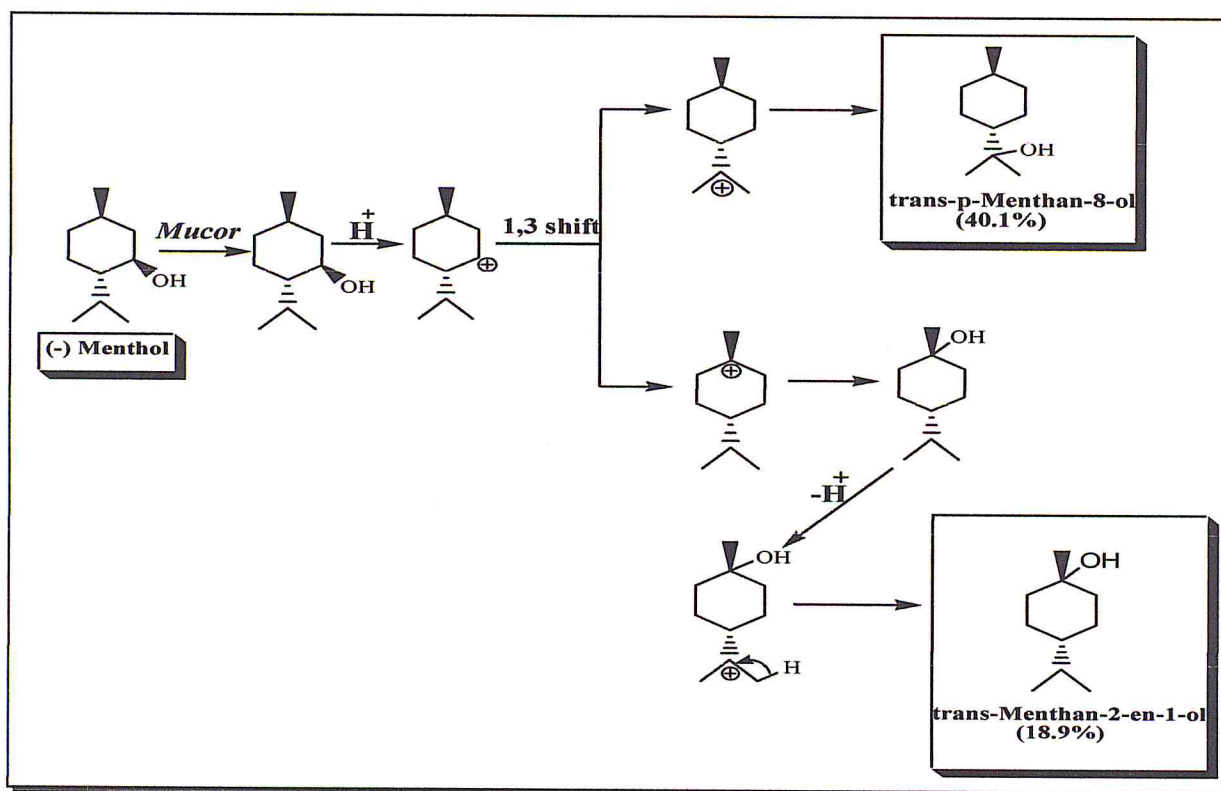


Planche 4: Bioconversion du (-) menthol par *Mucor ramannianus* (PTCC5074) [60]

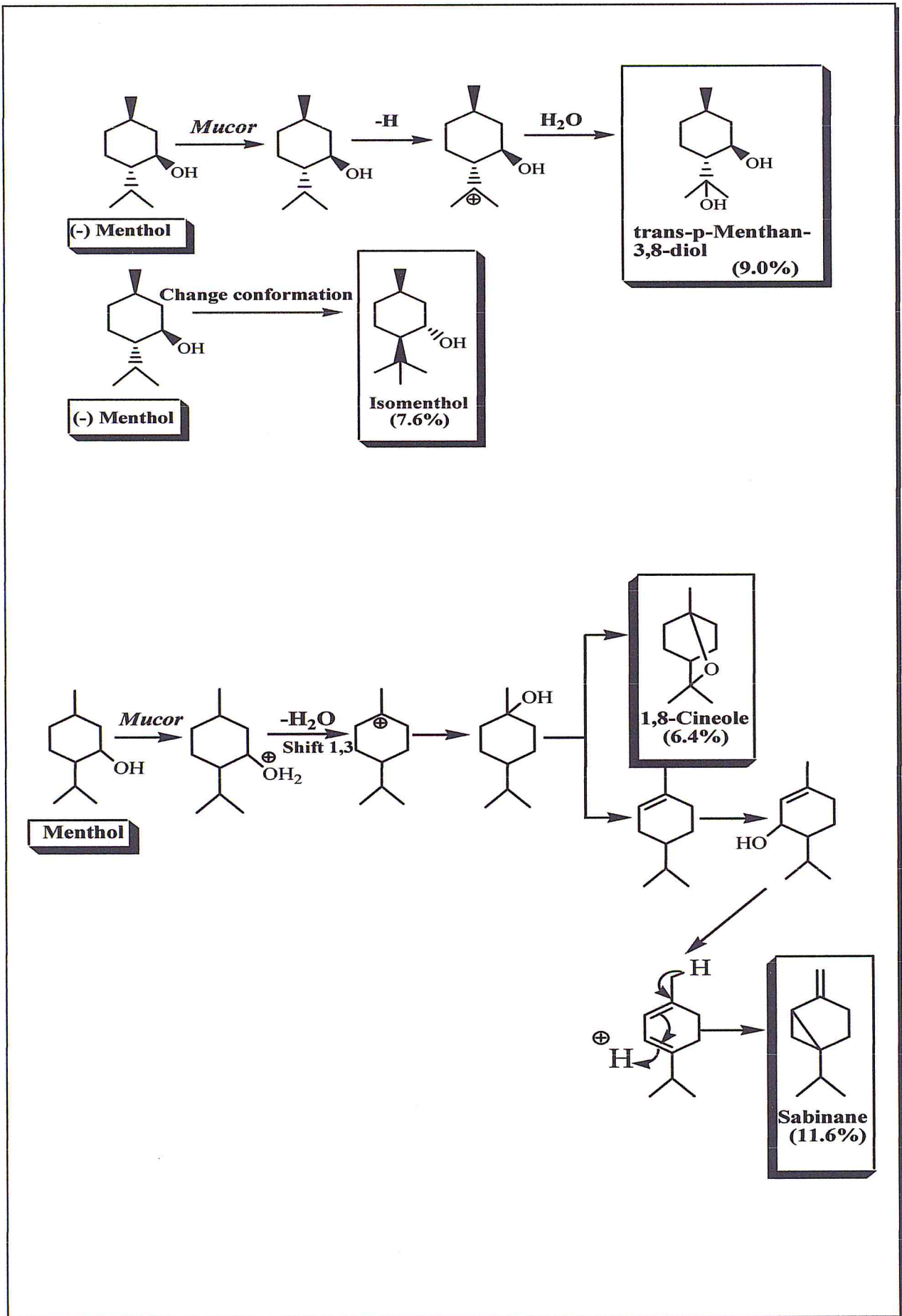


Planche 4: Bioconversion du (-) menthol par *Mucor ramannianus* (PTCC5074) [60]

D'autres études de la bioconversion du menthol réalisé par Akbar Esmaili et al, en utilisant un autre champignon de type *Chlorella vulgaris* avec l'utilisation des périodes d'incubation de 72, 92 et 120 h, pour étudier l'influence du temps sur le procédé de bioconversion.

Le menthol (1) est converti avec *C. vulgaris* pendant 72 h en dihydroterpinéol (3) à (3, 48,8%) et l'isomenthol (4) à (4, 20,2%). Lorsqu'on utilise un temps d'incubation de 92 h, le produit principal est l'isomenthol (92,3%). À 120 heures d'incubation, on obtient le cis-menth-1-en-3-ol (2) à (2, 46,0%) et le dihydroterpineol (49,2%) (Planche 5) [61].

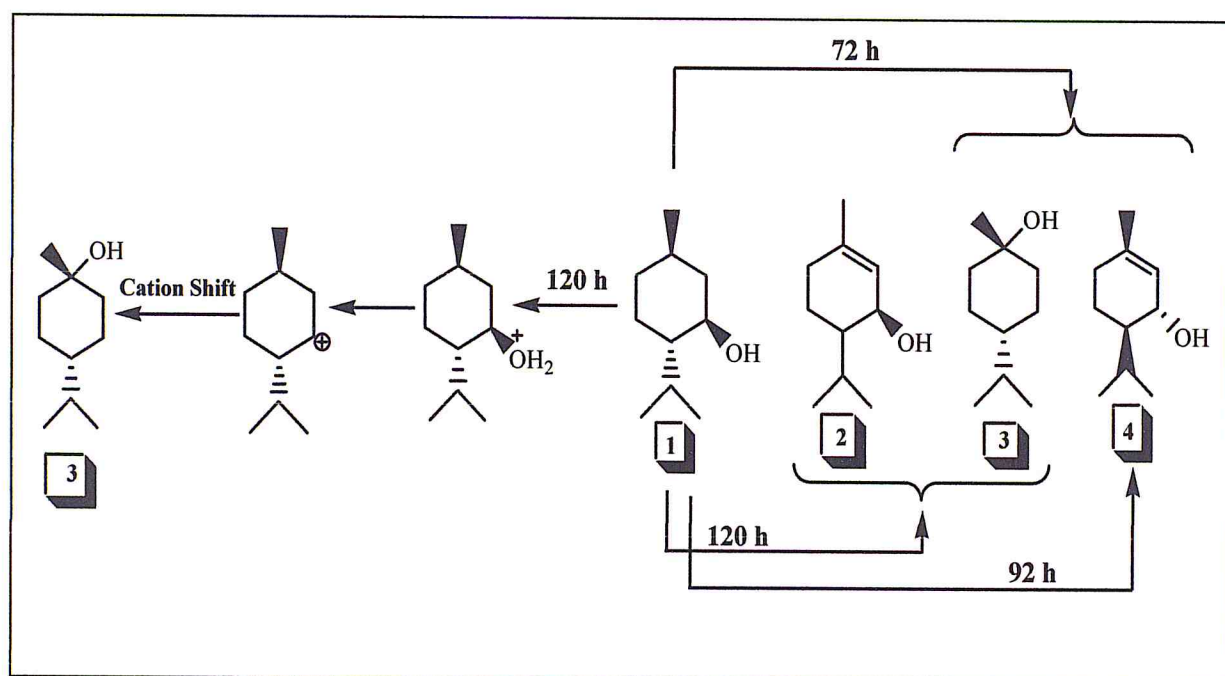


Planche 5: Bioconversion du (-) menthol par *Chlorella vulgaris* [61]

Un troisième schéma métabolique est mis en évidence par Akbar Esmaili et al, avec l'utilisation de la culture de surface sporulés de *Penicillium sp* (PTCC 5074) isolée à partir du sol. Les principaux produits bioconverti obtenus à partir du menthol après 7 jours sont : α -pinène (18,0%), sabinène (11,6%), trans-p-menthane-1-ol (10,6%), le p-menth-1-ène (5,8%), 1, 8-cinéole (6,4%) et le limonène (3,2%) (Planche 6)[62].

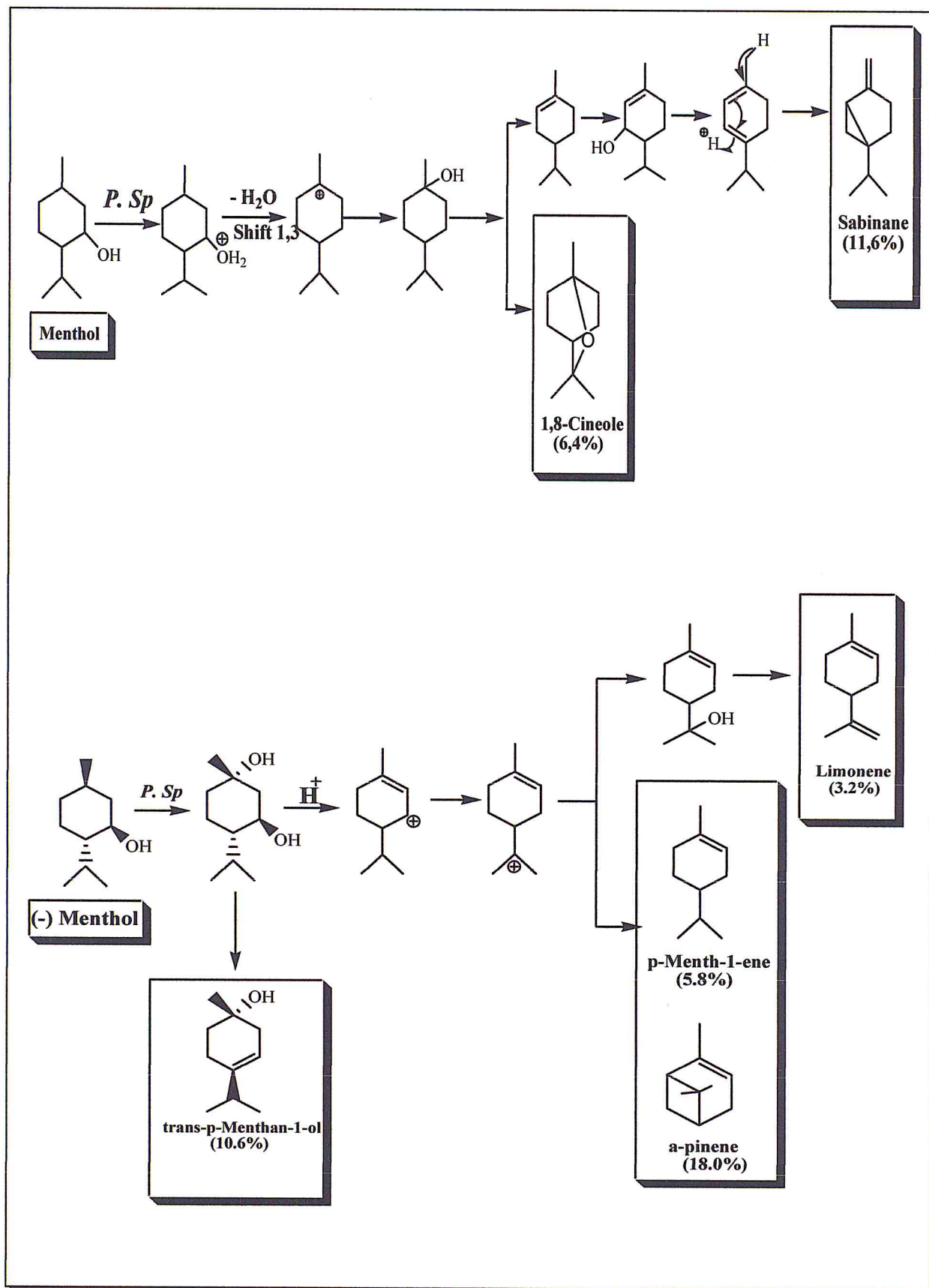


Planche 6 : Voie possible de bioconversion du (-) menthol par *Penicillium sp* [62]

I. 5 Biodégradation

I. 5.1 Généralité sur la biodégradation

Le terme biodégradation est généralement retenu dans la littérature scientifique correspond à une action de dégradation d'un composé organique par des agents biologiques (généralement microbiens) avec comme seuls rejets, des produits simples tels que H_2O , CO_2 , CH_4 , H_2 , Cl^- , mais encore des produits organiques simples (métabolites) tels que des acides organiques etc [63].

D'une manière plus spécifique, la notion de « biodégradation » est définie comme étant « un type de dégradation engendrée par une activité biologique, particulièrement des attaques enzymatiques, entraînant un changement significatif dans la structure chimique du matériau » [64].

Le processus complet de dégradation est également appelé minéralisation, biodégradation ultime. D'autres termes ont été également proposés pour définir d'autres situations mettant en jeu les microorganismes. La biodégradation acceptable est évoquée lorsque la transformation du composé lui retire ses propriétés toxiques. La voie de dégradation la plus directe (voie métabolique) est l'utilisation par le microorganisme de la substance organique comme source d'énergie et de carbone. Le métabolisme microbien implique que l'équipement enzymatique des microorganismes utilise le substrat comme source de carbone et d'énergie et autorise la croissance cellulaire [63,65].

I. 5.2 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 microorganismes. La biodégradation est dite facile si la substance se dégrade rapidement dans les conditions environnementales. Par opposition, la biodégradabilité est dite intrinsèque si la substance est dégradée dans des conditions optimales (forte quantité de microorganismes) [63, 66].

PARTIE II

Etude expérimentale

II. 1 Introduction

La partie expérimentale est consacrée à l'étude de la dégradation d'un monoterpène oxygéné monocyclique, en l'occurrence le menthol par deux voies, microbiologique et par l'énergie lumineuse électromagnétique. La première voie consiste en la bioconversion et la biodégradation du menthol en utilisant comme biocatalyseurs deux souches bactériennes à savoir *Paenibacillus popilliae* 1C ATCC 14706 (AF071861), et *Streptomyces rochei* AB1 (GU434672). La seconde voie consiste en la photodégradation du menthol par des rayons radioactifs de césium (Cs137) à haute énergie et par la lumière UV.

La méthodologie du travail est récapitulée dans l'organigramme représenté par la figure 4. Elle s'articule autour des quatre grandes parties suivantes :

- Analyse préliminaire du menthol par CCM, IRTF et CG/SM ;
- Détermination de la concentration assimilable non inhibitrice pour la bioconversion et la biodégradation;
- Etude de la bioconversion et la biodégradation du menthol par deux différentes souches bactériennes du genre *Bacillus* et *Streptomyces* ;
- Etude de la photodégradation du menthol par des rayons césium Cs 137 à haute énergie et par la lumière UV;
- Analyse et identification par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM) des produits ou métabolites obtenus.

Les différentes manipulations ont été effectuées au niveau du Laboratoire de recherche « Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSN-BioM) », Laboratoire de « Microbiologie » du département de Génie des Procédés, et au Laboratoire des plantes médicinales et aromatiques du département d'agronomie, Université de Blida 1.

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.

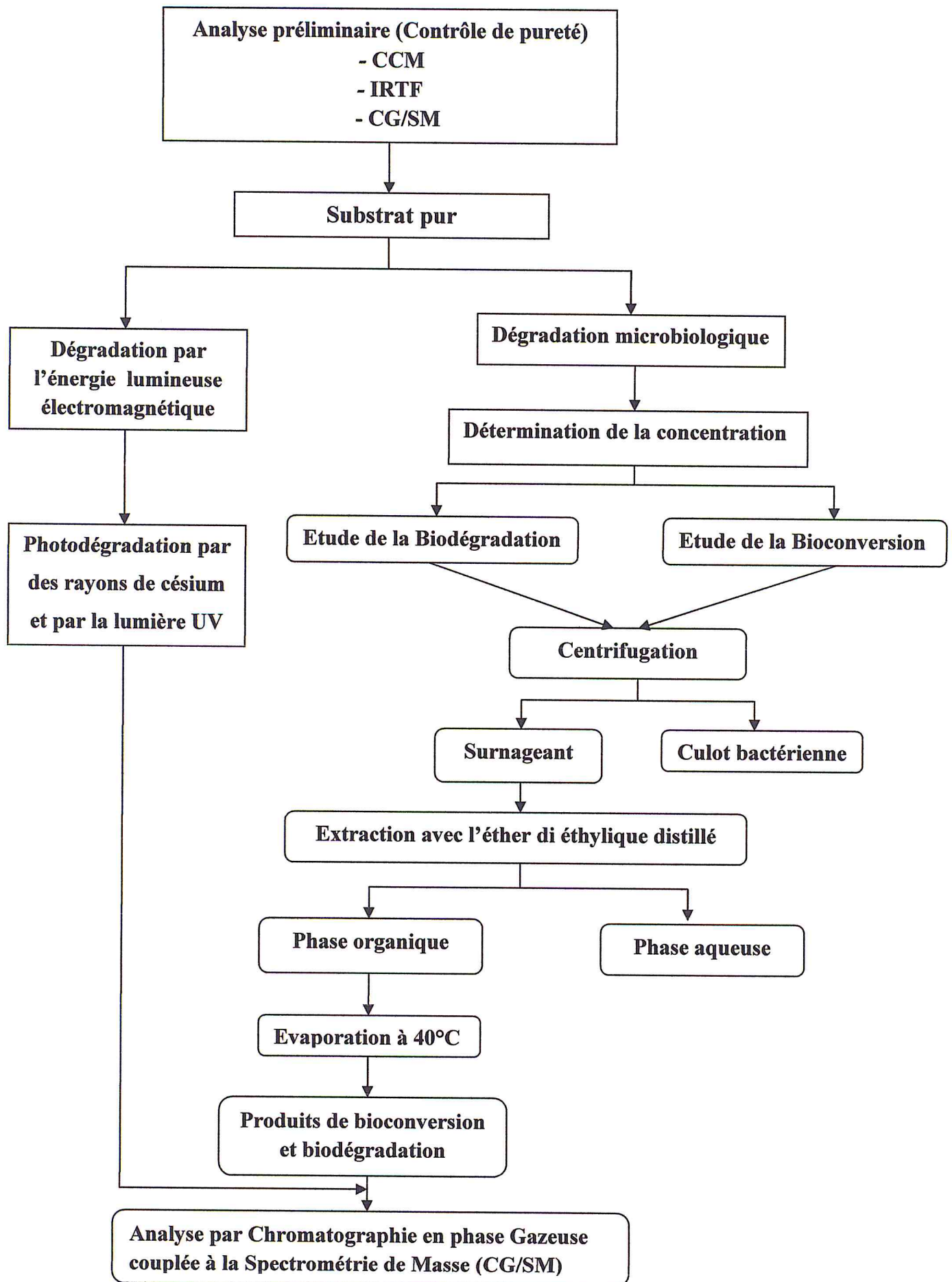


Figure 4 : Méthodologie expérimentale du travail

II. 2 Matériel et méthodologie expérimentale

II. 2.1 Analyses préliminaires du menthol

Des analyses préliminaires ont été réalisées afin d'évaluer la pureté chimique du métabolite étudié.

II.2.1.1 Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

L'analyse par chromatographie sur couche mince a été réalisée en phase normale sur une plaque d'aluminium recouverte de gel de silice Si 60 Mesh/F254 de type Merck. L'échantillon (menthol) a été analysé à une concentration de 5 mg/mL dans le dichlorométhane. L'analyse a été effectuée par élution avec le système binaire Hexane / Acétate d'éthyle (70/30 : v/v), et la révélation a été réalisée par exposition de la plaque CCM aux vapeurs de l'acide sulfurique suivie d'une oxydation par chauffage de la plaque.

II. 2.1.2 Analyse par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (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-deutéié DTGS à température ambiante, d'une source infrarouge moyenne ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$), d'un rayonnement de laser, un diviseur de faisceau KBr a été utilisé et une fente type global. Le traitement des spectres est réalisé avec le logiciel OPUS 6.5 sous le système d'exploitation Microsoft Windows XP. L'acquisition des spectres a été effectuée avec une résolution de 4 cm^{-1} et un nombre de scan de 5 scans.

L'analyse de l'échantillon a été réalisée en phase solide, à l'aide d'une pastille en bromure de potassium (KBr), obtenue en mélangeant 4% d'analyte (menthol) avec la poudre de KBr.

La mesure du bruit de fond de l'appareillage a été effectuée par une pastille KBr préparé par dépôt d'une poudre du bromure de potassium en couche mince entre deux mâchoires polies, sous l'action d'une pression de 5 bars pendant deux minutes.

II. 2.1.3 Analyse par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM)

a. Description de l'appareil

L'analyse qualitative du menthol a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse « CG-SM » (Figure 6). L'identification des différents composés est effectuée en se basant sur les banques de données spectrales Wiley 7n et NBS 75k.l. (comprenant, respectivement, des spectres de masse de 250000 et 75000 molécules), avec un taux de similitude supérieure ou égal à 90%.

b. Conditions opératoires

L'échantillon analysé est injecté à une concentration de 3 mg/mL dans l'acétate d'éthyle. L'analyse est effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse HP 6800 couplée à un spectromètre de masse de type HP MSD 5973, dans les conditions suivantes :

Injection : T injecteur = 250 °C, Mode d'injection : Splitless (avec division) = 1/90, Volume injecté = 1 µl.

Colonne : HP5- MS30 m x 0.25 mm (Diamètre interne) x 0.25 µm (épaisseur du film). T four : 100°C – 5°C– 220°C, Débit du gaz vecteur = 5 ml/min.

Détecteur de masse : Mode d'analyse : Scan (34 à 450 amu), T interface = 280 °C, Type d'ionisation = Impact électronique (IE), Type d'analyseur : Quadripôle, T Quadripôle = 250 °C, T Source = 230°C.

II. 2.2 Dégradation du menthol par voie microbiologique

II. 2.2.1 Origine des souches utilisées

La souche *Paenibacillus popilliae* 1 C ATCC 14706 (AF071861) (Figure 7) du genre *Bacillus* a été isolée et identifiée dans le cadre des travaux de recherche du Laboratoire « Chimie de Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSN-BioM) » de l'Université de Blida 1 et le Laboratoire de Bioprocédés Environnementaux du centre de Biotechnologie Sfax (Tunisie). La souche 1 C a été isolée en mai 2008 à partir d'un sol contaminé par le pétrole brut, de la région de Hassi-Messaoud [63].



Figure 5 : *Paenibacillus popilliae* 1 C

La souche *Streptomyces rochei* AB1 (GU434672) (Figure 8) appartenant au genre *Streptomycètes* a été isolée et identifiée dans le cadre des travaux de recherche du Laboratoire « Chimie de Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSN-BioM) » de l'Université de Blida 1 et le Laboratoire de Bioprocédés Environnementaux du centre de Biotechnologie Sfax (Tunisie). La souche AB1 a été isolée à partir d'un sol humide de la région de Boufarik (Mitidja) en mars 2007 [67].

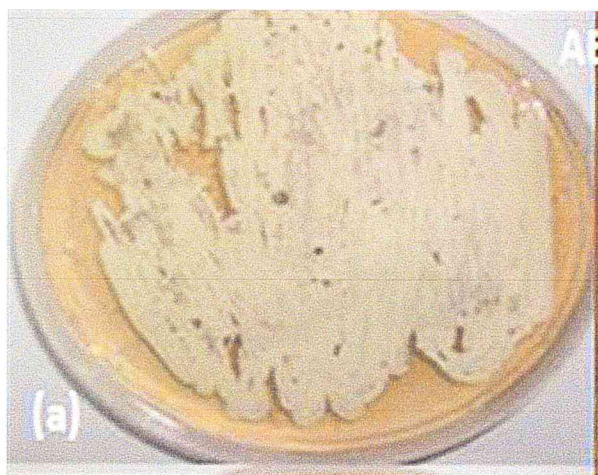


Figure 6 : *Streptomyces rochei* AB1

II. 2.2.2 Préparation et composition des milieux de culture

Le milieu de culture est un support qui permet la croissance des bactéries, champignons et levures. Il se compose d'un mélange des substances qui favorisent la multiplication des microorganismes. Il peut se présenter sous forme liquide ou solide, par addition d'agar (solidifiant). Le milieu doit assurer les conditions optimales pour le métabolisme bactérien :

- contenir tous les éléments nécessaires en quantité suffisante et en proportion relative convenable, le milieu doit être nutritif et équilibré.
- Avoir des caractéristiques physicochimiques (pH, Température,...) compatibles avec la vie microbienne.

Le choix de tels milieux repose sur la connaissance de l'habitat naturel et de la physiologie alimentaire du groupe de germes que l'on désire cultiver.

Cinq milieux de culture, de bioconversion et de biodégradation ont été utilisés (Annexe 2). Les constituants des cinq milieux ont été pesés et dissous dans de l'eau distillée. Le pH des milieux a été ajusté entre 7 et 7,2 avant autoclavage avec de la soude à (1N) et le HCl (1N). Les milieux ont été répartis dans des flacons de 250 mL de volume total. Le volume utile sera toujours de 50 mL. La stérilisation des milieux a été effectuée par autoclavage (Annex3) à 120°C pendant 20 min. La composition chimique des milieux utilisés dans notre étude est regroupée dans le tableau 2 :

Tableau 2 : Composition chimique des milieux de culture

Microorganismes	Désignation	Composition
<i>Streptomyces rochei</i> strain	ISP9 (Riche)	10g de glucose, 2,84g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2,38g KH ₂ PO ₄ , 5,65g K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O, 1g MgSO ₄ 7H ₂ O et 1mL d'une solution d'oligoéléments (ETM).
	ISP9 (Pauvre)	0.1g de glucose, 2,84g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2,38g KH ₂ PO ₄ , 5,65g K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O, 1g MgSO ₄ 7H ₂ O et 1mL d'une solution d'oligoéléments (ETM).
	ISP2 (Solide)	4g d'extrait de levure, 10g d'extrait de malte, 4g du glucose, et 20g d'agar bactériologie, dans 1L d'eau distille.

<i>Paenibacillus Popiliae</i>	Milieu Luria Bertani (LB)	Sa composition est : 10 g peptone, 5 g d'extrait de levure et 10 g NaCl. Et pour LB solide, on ajoute 20g Agar dans 1L d'eau distillé.
	Milieu Minimum (MM)	Ce milieu est à base de sels minéraux, sa composition (g/l) est : NH ₄ Cl (0,4), K ₂ HPO ₄ (0,3), KH ₂ PO ₄ (0,3), NaCl (10), MgCl ₂ (0,33), CaCl ₂ (0,05), extrait de levure (0,1) et 1 mL de la solution d'oligoéléments.

- ❖ La composition de la solution d'oligoéléments ETM est: 0,64 g CuSO₄5H₂O ; 0,11g FeSO₄ 7H₂O ; 0,79g MgCl₂ 4H₂O et 0,15 g ZnSO₄7H₂O dans 1L d'eau distillé.

II. 2.2.3 Repiquage des souches

Les milieux de culture solide (LB, ISP2, ISP9) ont été coulés aseptiquement dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre à raison de 15 mL par boîte, puis laissés refroidir et solidifier sous la haute (Annexe 2). Les souches bactériennes *Paenibacillus popiliae* et *Streptomyces rochei* ont étéensemencés à l'aide d'une pipette pasteur sur des boîtes de Pétri contenant respectivement le milieu LB et milieu ISP2 ou ISP9 solides. Ces boîtes ont été incubées à 45°C pendant 48 h pour *Paenibacillus popiliae* et à 30 °C pendant 72 h pour *Streptomyces rochei*. Le repiquage des souches a été effectué régulièrement 24 h avant chaque préculture.

II. 2.2.4 Détermination de la concentration assimilable non inhibitrice pour la bioconversion et la biodégradation

L'optimisation des concentrations se fait dans le but de déterminer la gamme de concentration assimilable non inhibitrice du substrat utilisé dans la bioconversion et la biodégradation, et par conséquent vérifier la tolérance des deux souches bactériennes testées vis-à-vis de l'effet toxique du substrat.

II. 2.2.4.1 Détermination de la gamme des concentrations par le test d'inhibition en milieu solide

Ce test consiste à déterminer l'effet inhibiteur des différentes concentrations du menthol à savoir 0,05, 0,5, 1, 5, 10, 20 et 30 mg/mL sur *Paenibacillus popiliae* et *Streptomyces rochei*.

Le principe de cette méthode consiste à déposer un disque de papier buvard préalablement imprégné de l'échantillon sur un milieu solide ensemencé avec l'inoculum bactérien. Les molécules actives diffusent à partir des disques formant une zone d'inhibition dans laquelle il n'y a pas eu de croissance, indique l'effet toxique du substrat à l'égard des deux bactéries testées. Plus la zone d'inhibition est grande plus la souche bactérienne est sensible au substrat.

La procédure générale de la détermination de la gamme des concentrations par le test d'inhibition comprend les étapes suivantes:

→ **Préparation de l'inoculum (préculture)**

- Cette étape consiste à préparer une suspension bactérienne en prélevant 2 à 3 colonies bien isolées et identiques à partir d'une culture bactérienne de 18-24 h et les introduire dans des tubes à essais de 9 ml d'eau physiologique (9 g de NaCl dans 100 ml d'eau distillée) stérilisé dans l'autoclave à 120 °C pendant 20 min, puis agiter au vortex pendant quelques secondes.

→ **Préparation du milieu de culture**

- Faire fondre le milieu solide LB pour *Paenibacillus popilliae* et ISP2 ou ISP9 pour *Streptomyces rochei* dans un bain marie réglé à 95°C ou dans un four microonde.
- Couler aseptiquement le milieu de culture dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre à raison de 15 mL par boîte.
- Laisser refroidir et solidifier sur la paille.

→ **Ensemencement**

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface du milieu solide, sèche, de haut en bas, en stries séries.
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur la périphérie du milieu, pour s'assurer que toute la boîte est bien ensemencée.

→ **Séchage**

- Laisser sécher les boîtes de Pétri pendant quelques minutes à température ambiante. Les couvercles des boîtes doivent être fermés.

→ Déposition des disques

- Une fois les milieux sont solidifiés, prélever aseptiquement à l'aide d'une pince un disque buvard imprégné dans différentes concentrations du substrat, ensuite le déposer à la surface des milieux de culture préalablement coulés. Appuyer doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu.
- Laisser les boîtes pendant 4 h à 4 °C pour permettre une bonne diffusion des produits étudiés.

→ Incubation

- Incuber les boîtes de Pétri à 30 °C pendant 72 h pour *Streptomyces rochei* et à 45°C pendant 48 h pour *Paenibacillus popilliae*.

→ Lecture des résultats

- La lecture des résultats a été faite à l'aide d'un lecteur de diamètre des zones d'inhibitions, plus le diamètre de zone d'inhibition est grand, plus la souche bactérienne est sensible au substrat et plus le diamètre de la zone est petit plus la souche est résistante.

II. 2.2.5 Etude de la Bioconversion et la Biodégradation du menthol

Le protocole général utilisé dans notre étude pour la bioconversion du menthol est le même que celui utilisé pour la biodégradation à l'exception des milieux de culture. En effet, la bioconversion du menthol par *Paenibacillus popilliae* a été effectuée dans un milieu LB riche, et la biodégradation réalisée dans un milieu minimum MM pauvre. Pour *Streptomyces rochei*, le procédé de la bioconversion s'est réalisé dans un milieu ISP9 riche, et la biodégradation dans un milieu ISP9 pauvre. Les échantillons sont incubés en mode statique.

II. 2.2.5.1 Procédure de la bioconversion et la biodégradation

→ Bioconversion et biodégradation du menthol par *Paenibacillus popilliae* 1C

Une quantité bien définie de la suspension bactérienne a été ajoutée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile à 50 mL du milieu de culture et introduit dans un flacon de 250 mL. L'incubation a été réalisée à 45°C pendant 7 jours (Annexe 2).

Le 7^{ème} jour d'incubation, un volume de 5 mL du milieu a été remplacé par 5 mL d'une solution mère du menthol à une concentration de 30 mg/mL (préparée par dissolution de 1,5g du menthol dans 50 mL du mélange tween/eau à 0,2%). La solution mère a été stérilisée par filtration sur des filtres poreux stériles de 0,45 µm de diamètre) (Annexe 2), pour obtenir un

volume final de 50 mL à une concentration de 3 mg/mL. La culture est incubée de nouveau dans les mêmes conditions pendant 7 jours.

→ Bioconversion et biodégradation du menthol par *Streptomyces rochei* AB1

La première étape consiste à la préparation de la préculture (suspension bactérienne) dans un milieu ISP9 liquide (Annexe 2). Après 7 jours d'incubation, 1mL de la suspension bactérienne est incorporé dans 45 mL du milieu, 5 mL de la solution mère du menthol à la concentration de 30 mg/mL ont été ajoutés au milieu afin d'obtenir une concentration de 3 mg/mL. La culture est incubée à 30 °C pendant 7 jours en mode statique.

II. 2.2.5.2 Centrifugation de l'extrait de culture bactérienne

III. La centrifugation de l'extrait de culture bactérienne obtenu pour les deux souches après 7 jours d'incubation a été réalisée à l'aide d'une centrifugeuse de type HETTICH (Annexe 3) à 6000 tour/min pendant 45 min. A l'issue de cette étape, un surnageant et un culot sont obtenus pour chaque souche (Figure 9).

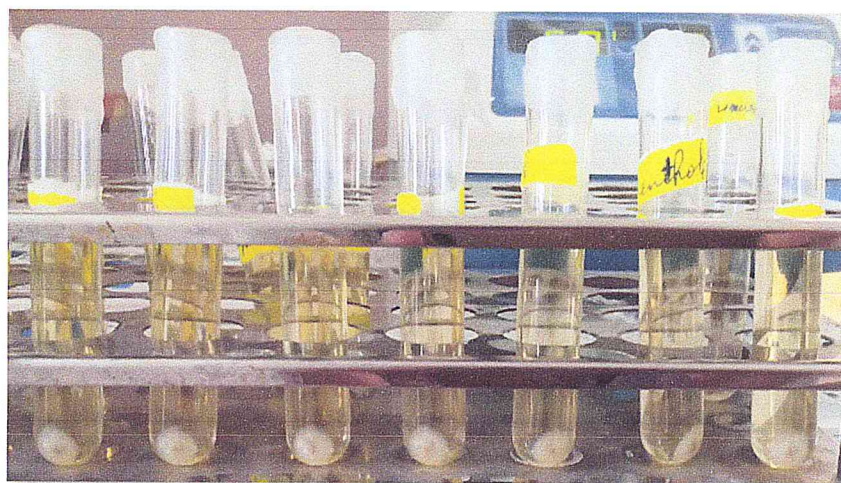


Figure 7 : Centrifugation de l'extrait de culture bactérienne

II. 2.2.5.3 Extraction liquide- liquide du surnageant obtenu

Le surnageant de culture a été récupéré par pipetage et extrait avec l'éther diéthylique (1:1 ; v/v par rapport au volume du surnageant). Deux phases sont obtenues : une phase organique et une phase aqueuse (Figure 10). La phase organique a été alors séchée sur du sulfate de sodium et concentrée à l'aide de l'évaporateur rotatif (Annexe 3), et ainsi la masse de l'extrait brut obtenu a été déterminée pour chaque procédés. Cette opération a été répétée deux fois

afin d'épuiser complètement les composés désirés. Le rendement d'extraction est calculé selon la relation suivant :

$$R (\%) = (m_{\text{Finale}} / m_{\text{Initial}}) * 100$$

R : Rendement de la bioconversion et la biodégradation obtenu en pourcentage.

m_{Finale} : Masse de finale en gramme.

m_{Initial} : Masse initiale du menthol utilisé en gramme.

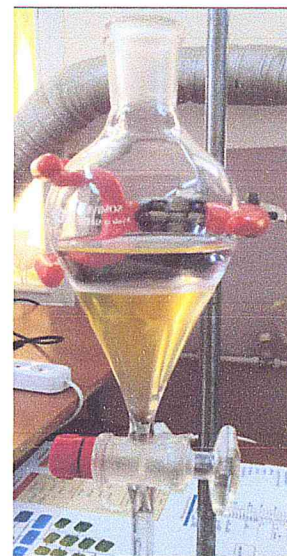


Figure 8 : Extraction du surnageat

II. 2.3 Dégradation du menthol par l'énergie lumineuse électromagnétique

II. 2.3.1 La photodégradation par lumière UV

Le rayonnement ultraviolet (UV), également appelé lumière noire parce qu'il n'est pas visible à l'œil nu, est un rayonnement électromagnétique d'une longueur d'onde plus courte que celle de la lumière visible. Il est capable de casser ou détruire de nombreuses molécules organiques comme le menthol.

Une masse de 50 mg du menthol est soumis à des interactions par la lumière UV pendant 45 min. L'échantillon obtenue a été dissous dans l'acétate d'éthyle et analysés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

II. 2.3.2 La photodégradation par les rayons de Césium 137 à haute énergie

Le principe global consiste en la dégradation du menthol par bombardement avec des rayons à haute énergie du type césium Cs137 (élément radioactif) (Figure 11). Des masses de 100 mg, 20 mg, 50 mg et 50 mg du menthol ont été bombardées respectivement pendant 1 min, 5 min, 10 min et 15 min (Figure 12). Les échantillons obtenus ont été dissous dans l'acétate d'éthyle (Tableau 3) et analysés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Tableau 3 : Conditions de la photodégradation par les rayons de Cs137 à haute énergie

Temps de bombardement (min)	1	5	10	15
Masse du Menthol (mg)	100	20	50	50
Volume d'acétate d'éthyle ajouté (mL)	3	1	0.5	0.5



Figure 10 : Montage de la photodégradation



Figure 9 : Source des rayons Césium

II. 2.4 Analyse par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM)

Les différents échantillons obtenus par les différentes voies de dégradation du menthol à savoir la bioconversion, la biodégradation et la photodégradation ont été soumis à une analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse dans les mêmes conditions que précédents. L'identification des différents composés ou métabolites transformés a été faite en se basant sur les banques de données spectrales (Wiley 7n.1, NBS 75k.1, Nist 02) ainsi que sur les données de la littérature.

II. 3 RESULTATS ET DISCUSSION

II. 3.1 Analyses préliminaires du menthol

II. 3.1.1 Analyse par Chromatographie sur couche mince (CCM)

L'analyse par chromatographie sur couche mince du menthol à une concentration de 5mg/ml par élution avec le système binaire Hexane/Acétate d'éthyle (70/30) est présentée dans la figure13.



Figure 11: Chromatographie sur couche mince du menthol

Cette figure montre l'apparition d'une seule tache orange bien définie correspondant au menthol. Cette tache est caractérisée par un facteur de rétention $R_f = 2.1$ (Rapport frontal : rapport de la distance de migration du composé par rapport à celle du solvant).

II. 3.1.2 Analyse par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)

L'analyse du spectre infrarouge du menthol (Figure 14) montre la présence d'une bande à 3289 cm^{-1} caractéristique du groupement O-H, il montre aussi des bandes dans la région entre 2955 et 2846 cm^{-1} liées aux vibrations des groupes CH_2 et CH_3 , les bandes entre 1458 cm^{-1} et 1361 cm^{-1} caractérisent la déformation des groupes CH, CH_2 et CH_3 . Le menthol présente une bande vers 1028 cm^{-1} caractéristique de la fonction C-OH d'un alcool.

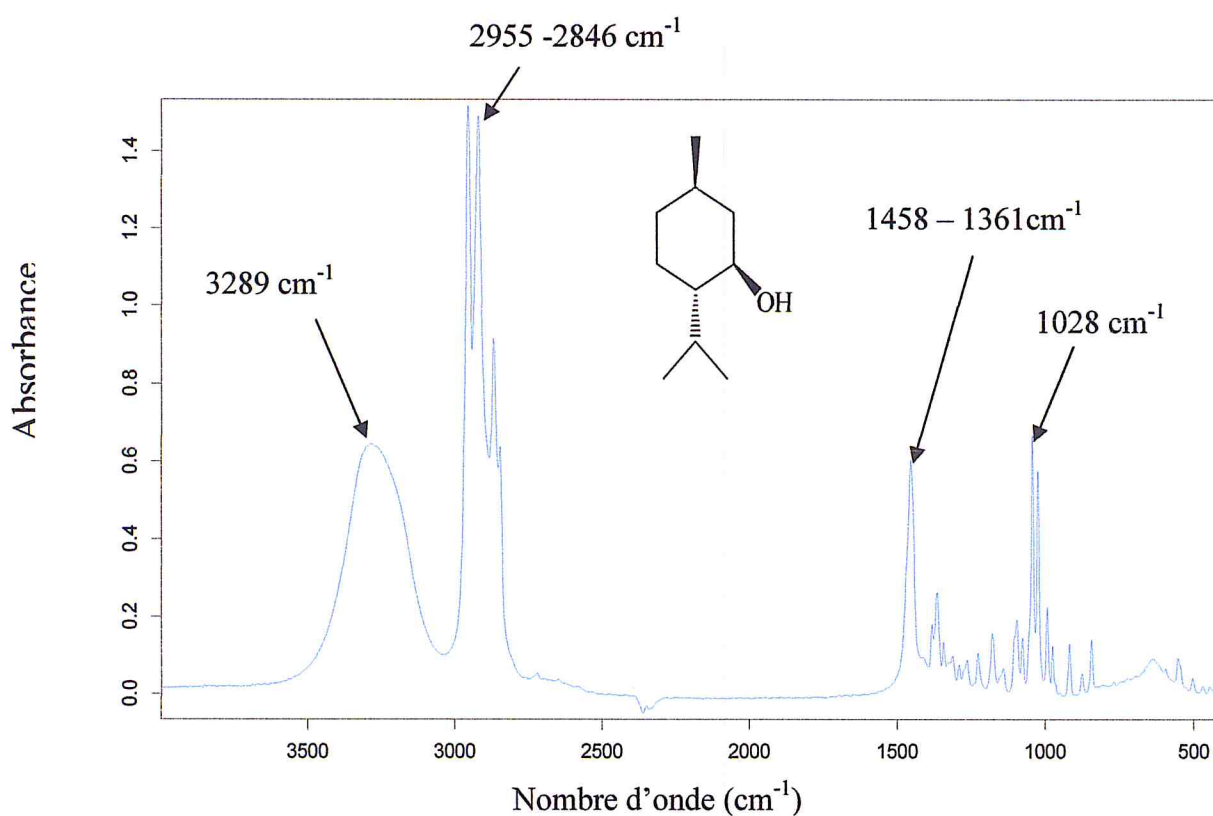


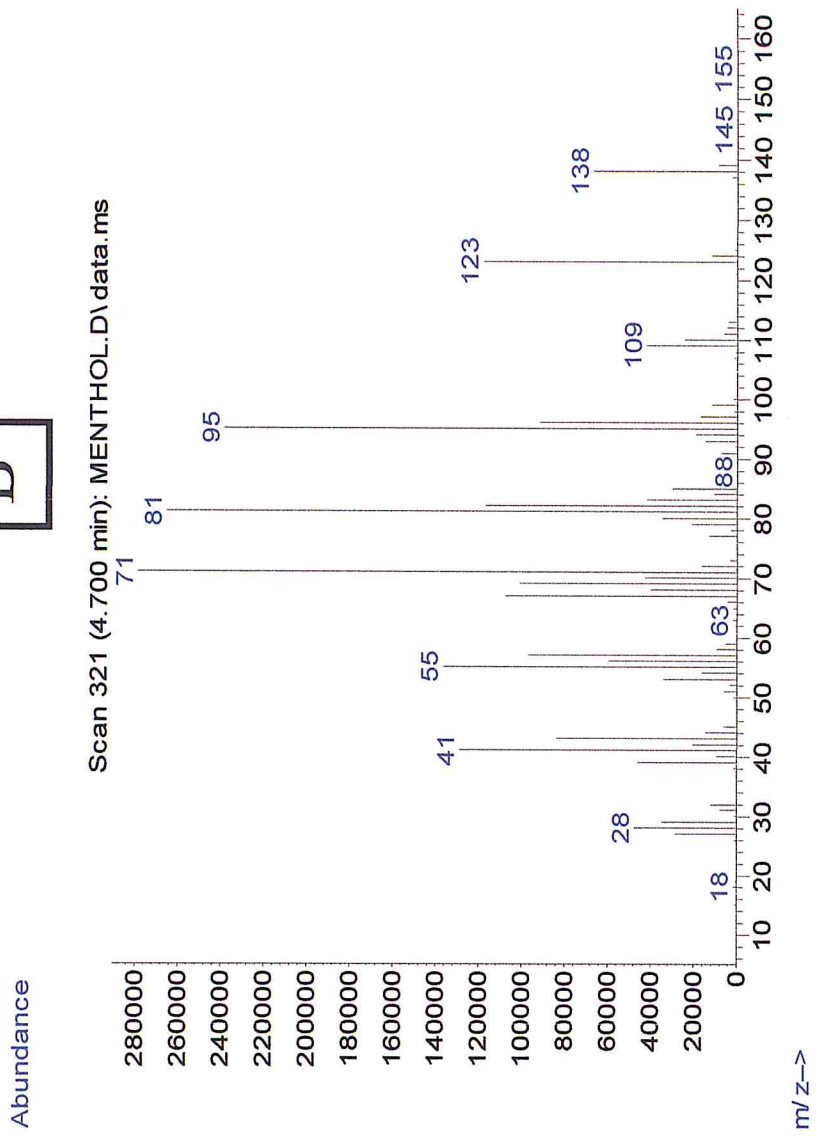
Figure 12: Spectre IRTF d'absorbance du menthol

II. 3.1.3 Analyse par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/MS)

Le profil chromatographique (Figure 15 A) révèle la présence d'un seul pic intense qui correspond au menthol (Figure 15 B) avec un temps de rétention de 4.71 min.

Les résultats des différentes analyses préliminaires (CCM, IRTF, CG/SM) permettent de conclure que le menthol utilisé est pur.

B



A

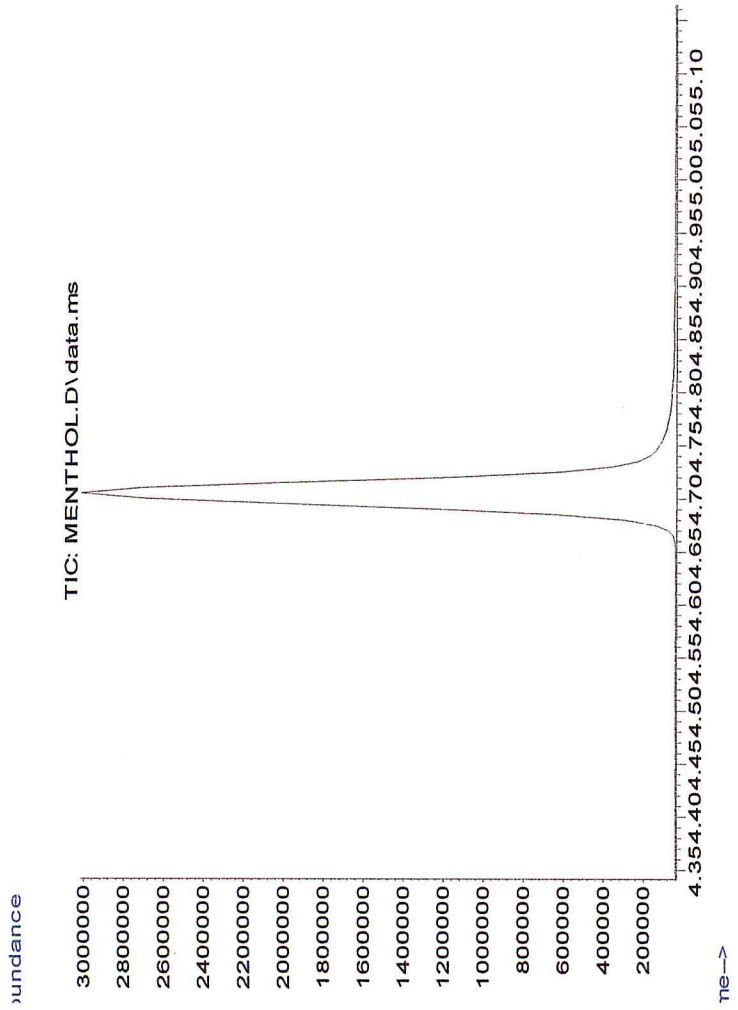


Figure 13 : A : Profil chromatographique d'analyse du menthol

B : Spectre de masse du menthol

II. 3.2 Détermination de la concentration assimilable non inhibitrice pour la bioconversion et la biodégradation

II. 3.2.1 Détermination de la gamme de concentration par le test d'inhibition

Dans le but de déterminer la concentration assimilable non inhibitrice du substrat (menthol) permettant d'estimer la sensibilité des deux souches *Paenibacillus popilliae* et *Streptomyces rochei* vis-à-vis du menthol, différentes concentrations ont été testées : 0,05 (a) ; 0,5 (b) ; 1 (c) ; 5 (d) ; 10 (e) ; 20 (f) et 30 (g) mg/mL

La souche *Paenibacillus popilliae* soumise à des concentrations de 0,05 à 10 mg/mL du menthol montre une résistance. Toutefois, à des concentrations supérieures à 20 mg/mL, la souche est sensible au métabolite étudié (menthol) (Figure 16).

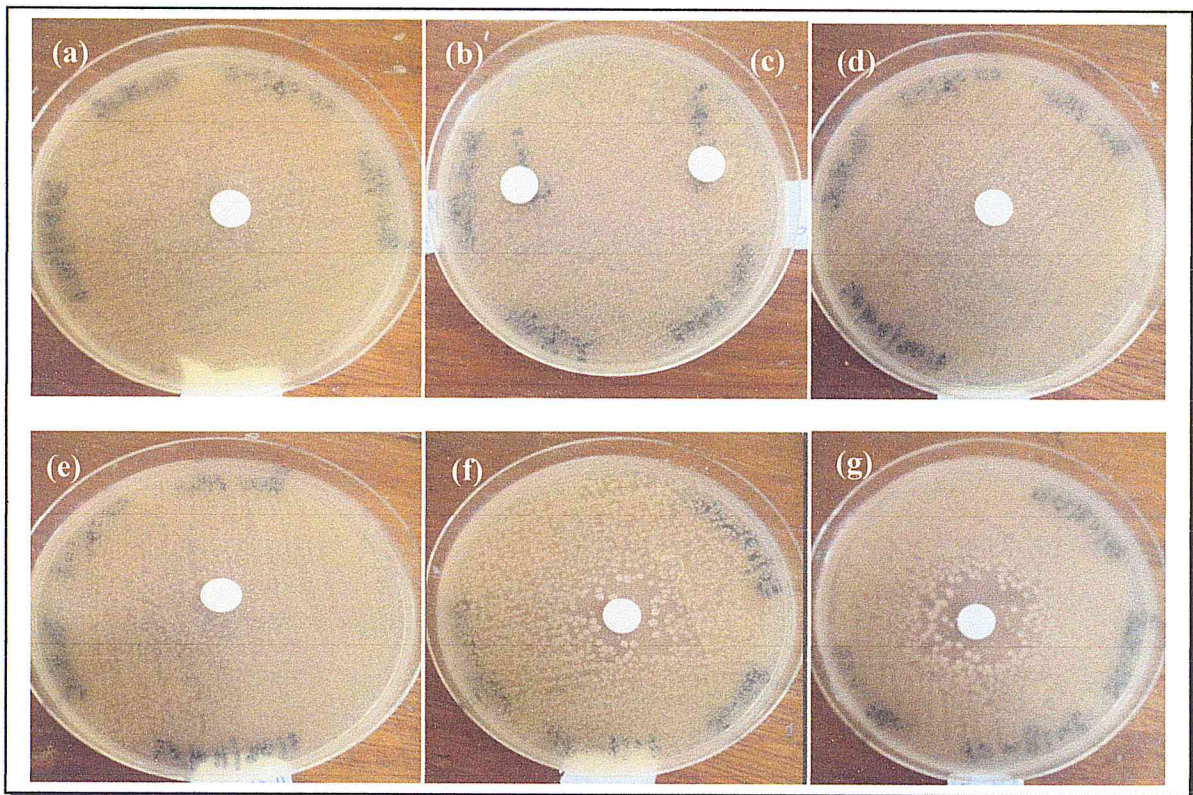


Figure 14 : Effet de concentration du menthol sur la croissance de *Paenibacillus popilliae* 1C [(a) = 0,05mg/mL ; (b) =0,5mg/ml ; (c) = 1 mg/mL ; (d) = 5mg/mL ; (e) = 10mg/ml, (f) = 20mg/ml, et (g) = 30mg/mL].

Concernant la souche *Streptomyces rochei* AB1, les résultats montrent une sensibilité pour des concentrations du menthol s'étalant entre 5 et 30 mg/mL. Par contre, pour la gamme de concentrations inférieure à 5 mg/mL, la souche montre une absence totale des zones d'inhibition qui indique la résistance de la souche en vers le menthol (Figure 17).

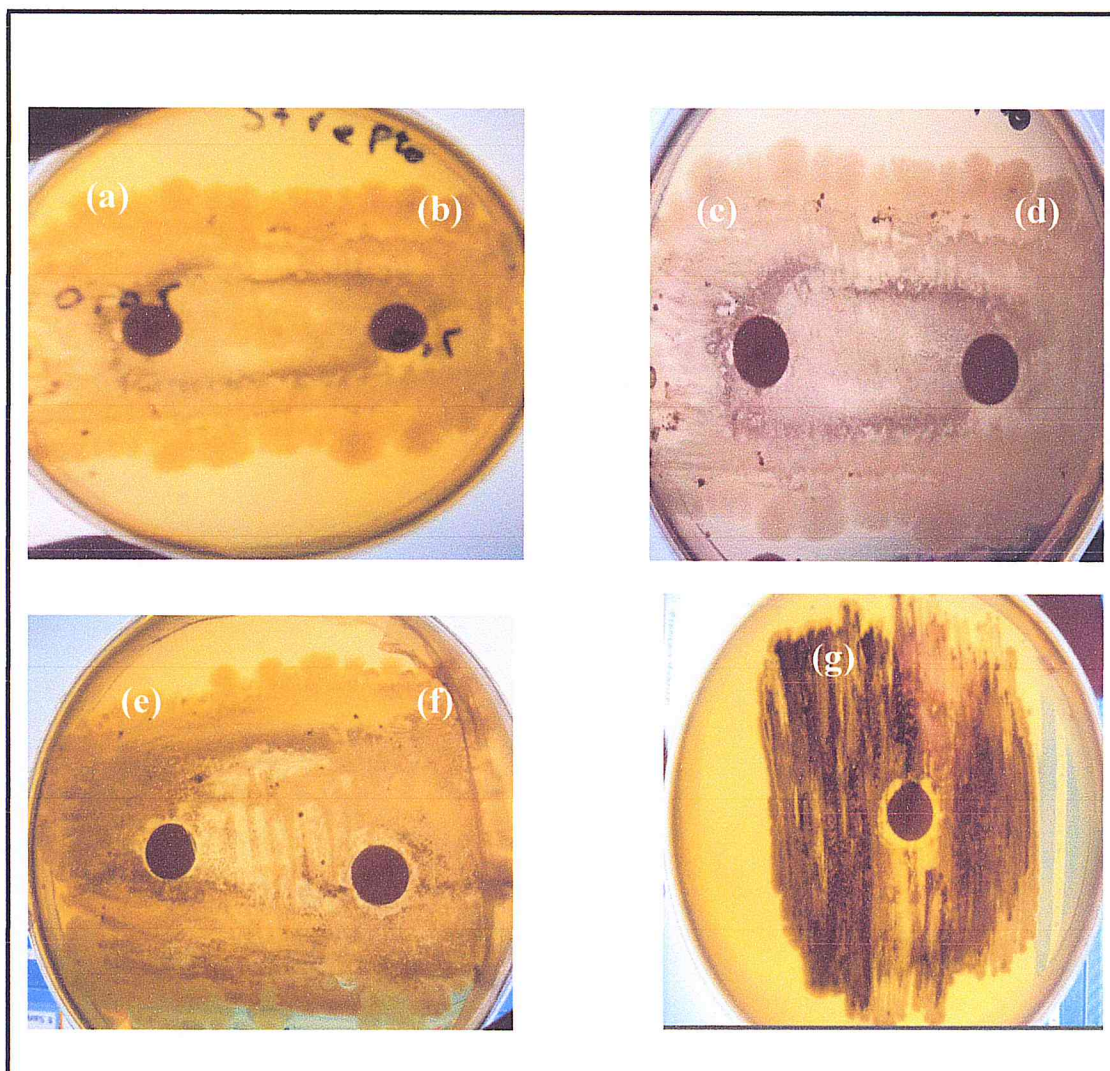


Figure 15 : Effet de concentration du menthol sur la croissance de *Streptomyces rochei* AB1 [(a) = 0,05mg/mL ; (b) =0,5mg/ml ; (c) = 1mg/mL ; (d)= 3mg/mL ; (e)= 5mg/ml et (f) = 10mg/ml, (g) = 20mg/mL.

Par conséquent, les concentrations pouvant être utilisées pour la bioconversion et la biodégradation doivent être inférieures à 5 mg/mL pour *Streptomyces rochei* et comprise entre 0.05 et 10 mg/mL pour *Paenibacillus popilliae*. La concentration choisie pour la suite du travail est de 3 mg/mL pour les deux souches.

II. 3.3 La bioconversion et la biodégradation du menthol

II. 3.3.1 La souche *Paenibacillus popilliae* 1C

La bioconversion et la biodégradation du menthol par *Paenibacillus popilliae* ont été réalisées dans les mêmes conditions de : pH = 7.2, Température d'incubation = 45 °C, Temps d'incubation = 7 jours et avec la même concentration du menthol de 3 mg/mL. La seule différence entre les deux procédés réside dans le milieu de culture, la bioconversion a été réalisée sur milieu LB riche et la biodégradation sur milieu MM pauvre.

Nous avons constaté dans le milieu de culture utilisé pour la biodégradation une inhibition de la croissance bactérienne de souche *Paenibacillus popilliae*. Cette inhibition est probablement due au manque de source de carbone (Extrait de levure) par rapport au milieu riche de bioconversion et que la souche n'a pas utilisé le menthol comme source de carbone. Par contre, dans un milieu utilisé pour la bioconversion, nous avons constaté une croissance bactérienne.

L'analyse par CG/SM de la phase organique, obtenue suite à la bioconversion et la biodégradation du menthol (Figure 19), montre l'absence de nouveaux pics caractérisant ainsi l'incapacité de la souche *Paenibacillus popilliae* de bioconvertir le menthol. Le profil chromatographique ne montre que le pic du menthol à 5.9 min.

Ce résultat confirme celui obtenu par l'analyse chromatographique sur couche mince CCM (Figure 18) de la phase organique comparée à une solution témoin du menthol qui a montré que les deux produits sont élevés à la même Rf, ce qui confirme le non transformation du menthol.

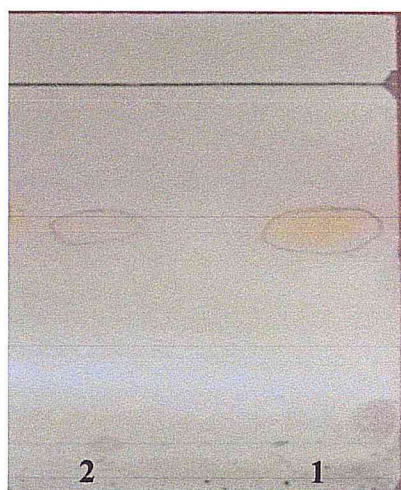


Figure 16 : L'analyse chromatographique sur couche mince CCM de
1 : Solution témoin
2 : La phase organique de bioconversion

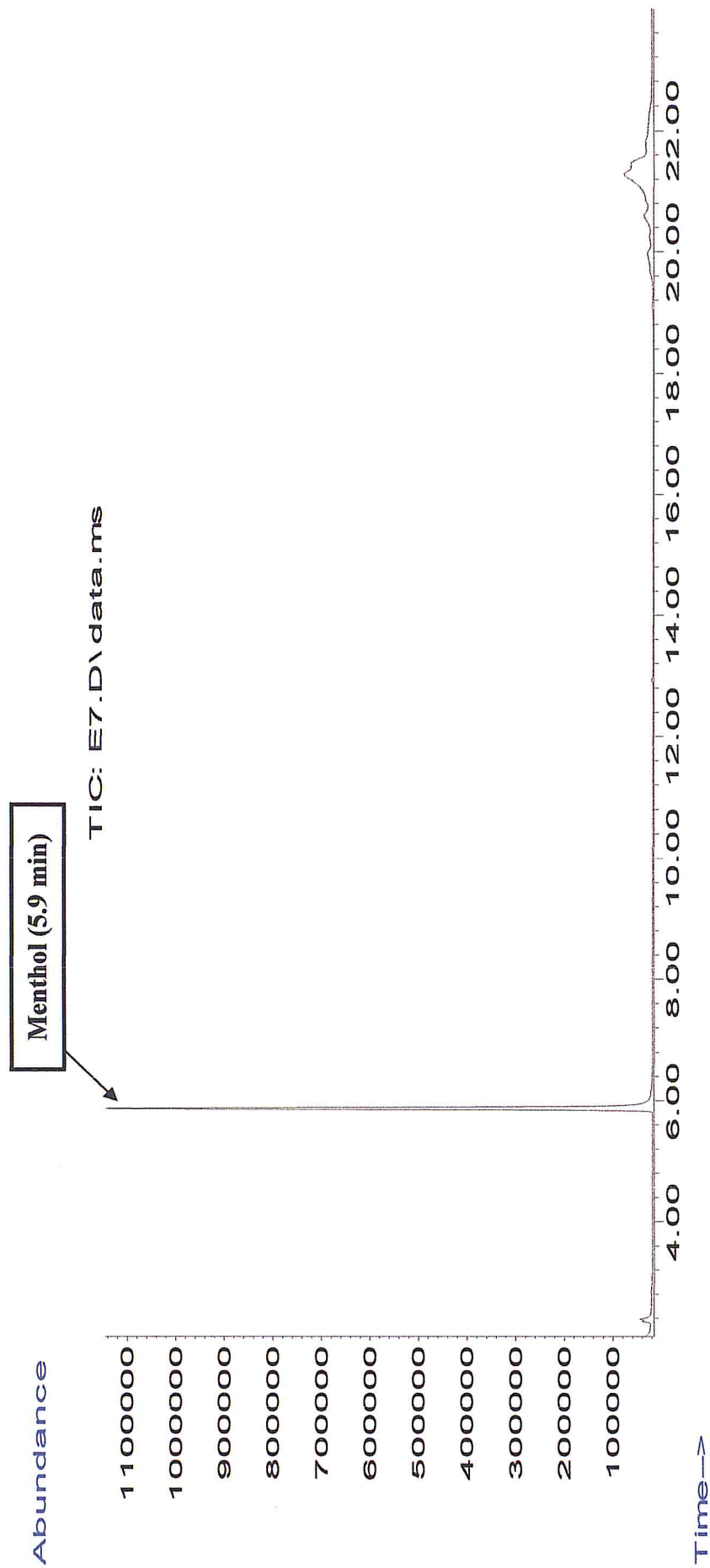


Figure 17: Profil chromatographique d'analyse de la bioconversion et la biodégradation du menthol par *Paenibacillus popilliae*.

II. 3.3.2 La souche de *Streptomyces rochei* AB1

Les conditions utilisées pour les deux procédés de bioconversion et de biodégradation sont : pH = 7.2, Température d'incubation = 30 °C, Temps d'incubation = 7 jours et avec la même concentration du menthol de 3 mg/mL. Le milieu ISP9 riche utilisé pour la bioconversion et ISP9 pauvre pour la biodégradation.

La souche de *Streptomyces rochei* AB1 a prouvée son efficacité dans la dégradation du menthol pendant 7 jours d'incubation, les différents produits ont été identifiés par CG/SM (Figure 20) et identifiés en se basant sur les banques de données spectrales.

➤ Calcul du rendement des deux réactions

Le rendement des deux réactions de la bioconversion et la biodégradation du menthol est exprimé par la relation suivante :

$$R (\%) = (m_{\text{finale}} / m_{\text{Initiale}}) * 100$$

Rendement de la bioconversion $R = (11.3/150) * 100 = 8\%$

Rendement de la biodégradation $R = (7.1/150) * 100 = 5\%$

➤ Les principaux produits obtenus à partir de la biodégradation du menthol sont regroupés dans le tableau 4 et la planche 7 :

Tableau 4: Les principaux produits de la biodégradation du menthol par *Streptomyces rochei* AB1

N°	Tr (min)	Nom du composé	Formule	%
1	3,88	Eucalyptol	C ₁₀ H ₁₈ O	97
2	3,83	D-Limonène	C ₁₀ H ₁₆	95
3	2,99	3- Carène	C ₁₀ H ₁₆	86
4	2,99	1R α -pinène	C ₁₀ H ₁₆	90
5	8,16	Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	78
6	3,00	(E) 1,3, 6-Octatriene, 3,7-dimethyl	C ₁₀ H ₁₆	83

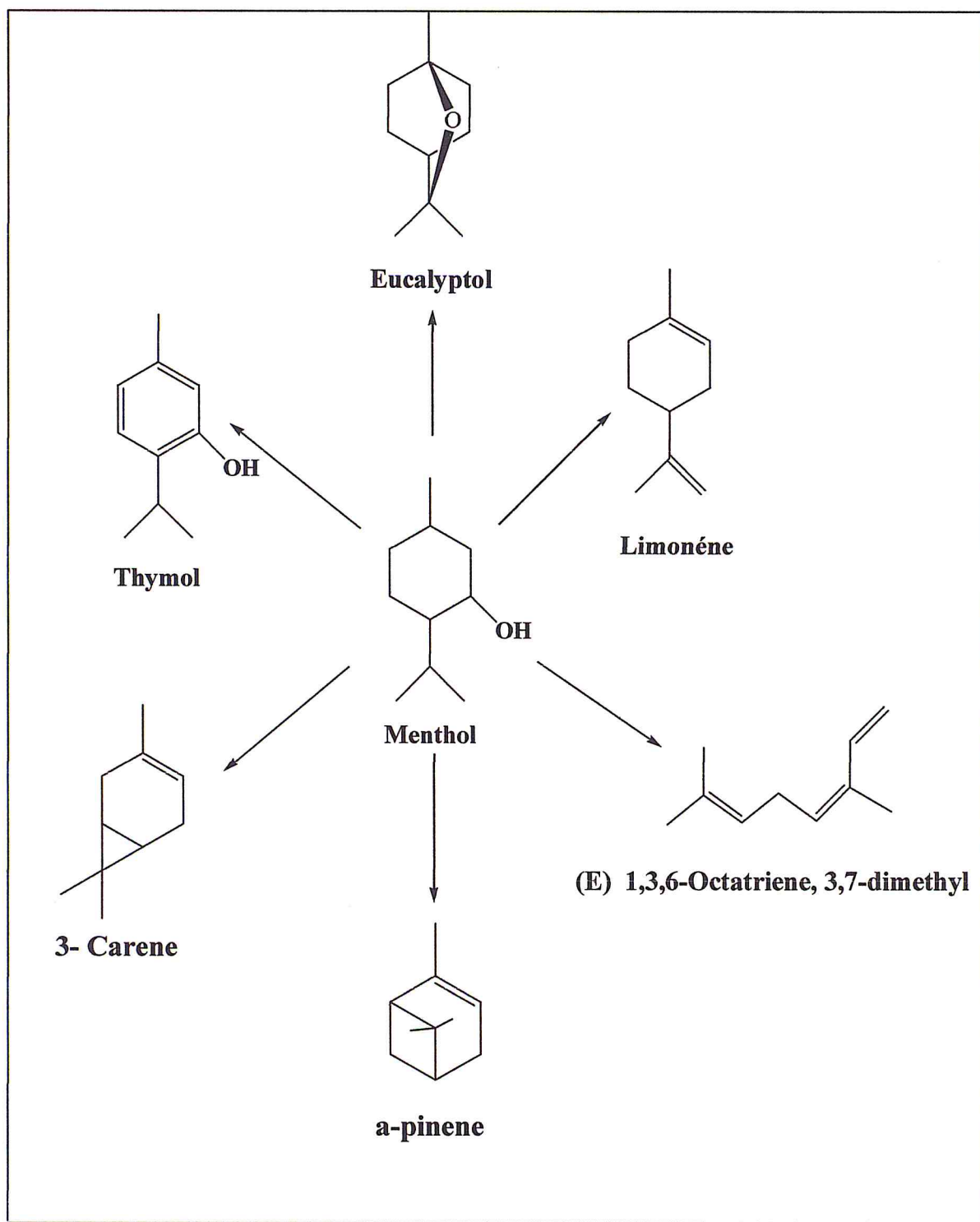


Planche 7: Les voies métaboliques de la biodégradation du menthol par *Streptomyces rochei* AB1

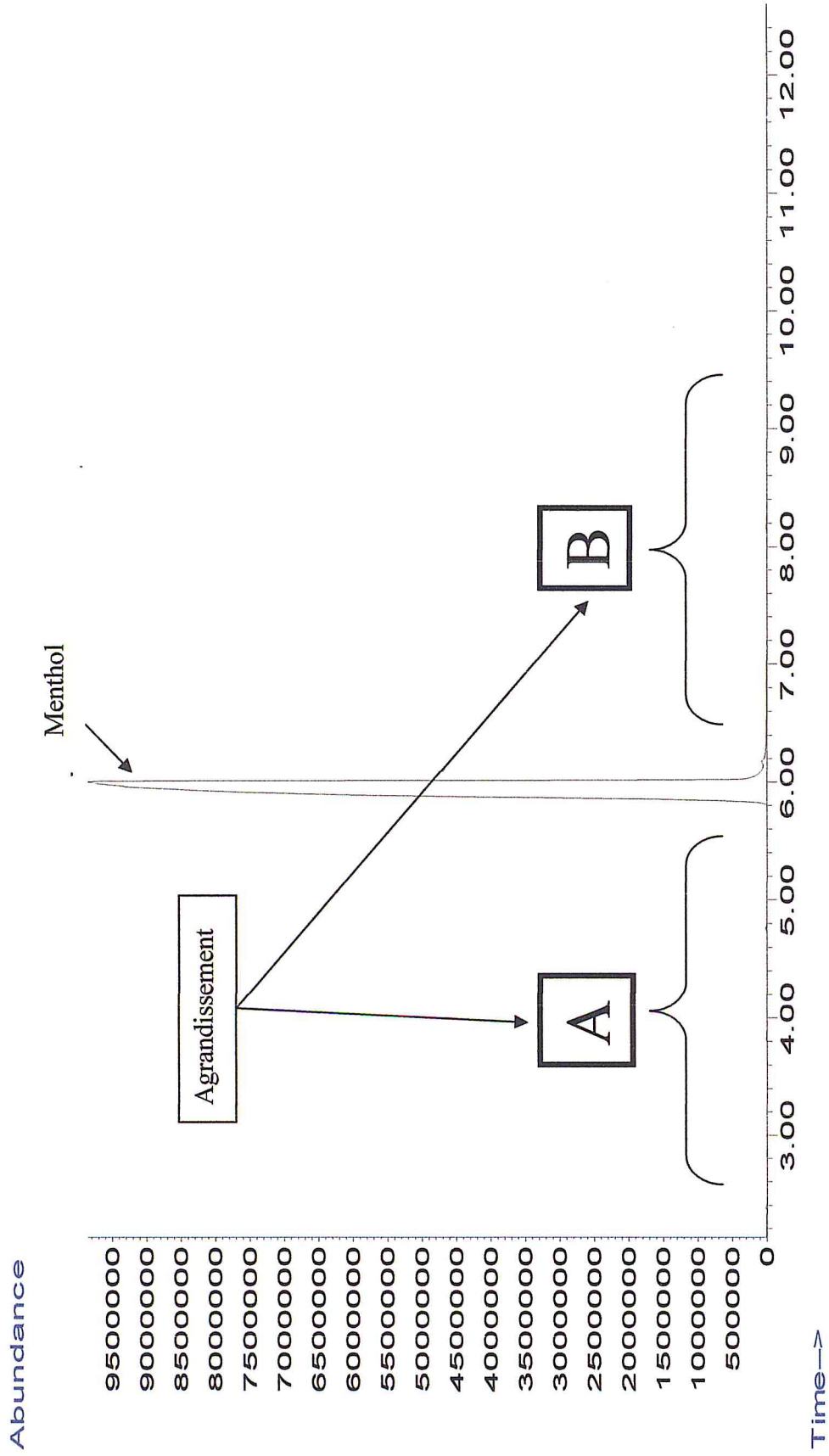


Figure 18 : Profil chromatographique d'analyse de la biodégradation du menthol par *Streptomyces rochei*
ABI

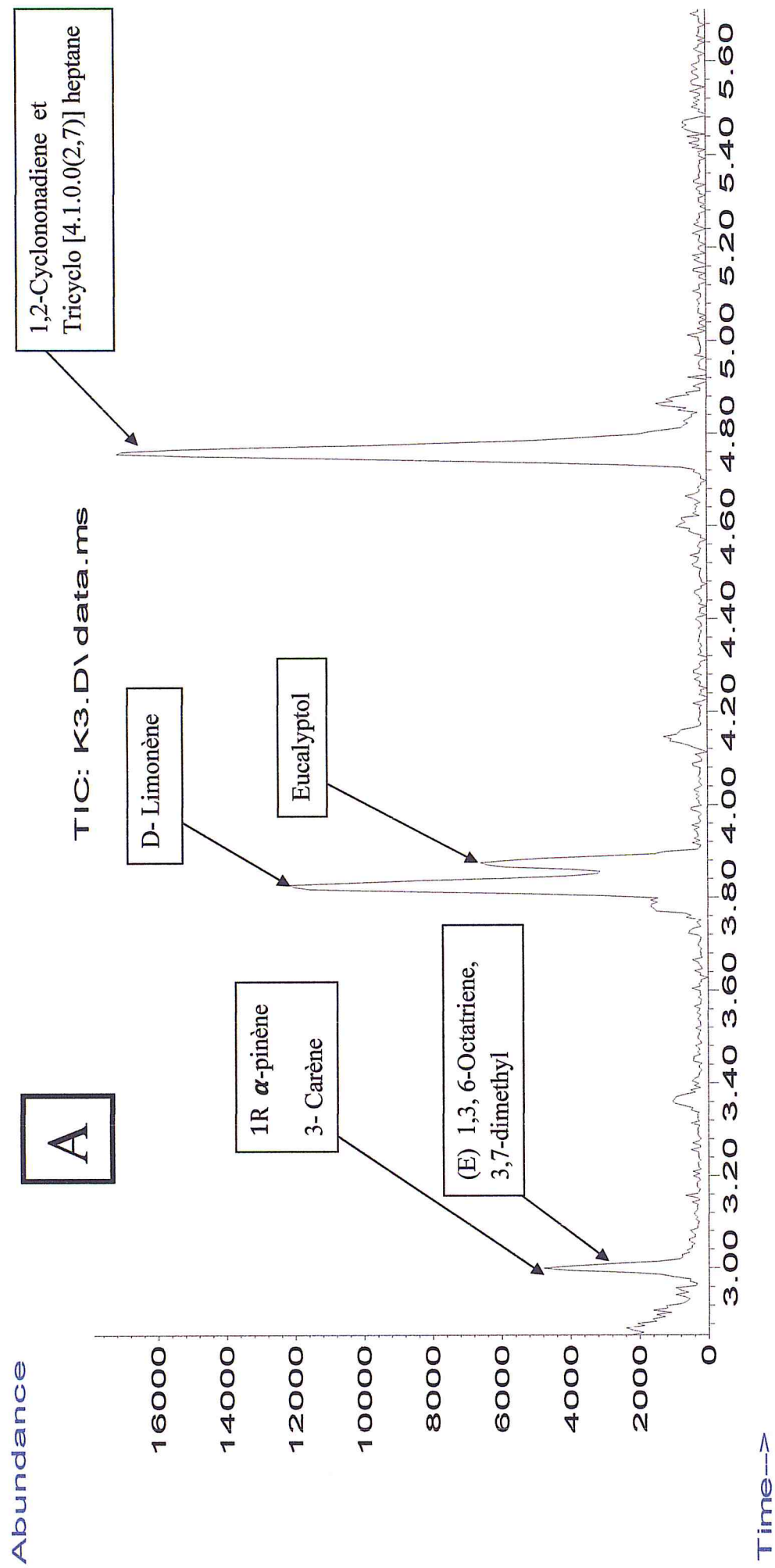


Figure 18 : Agrandissement de la zone A

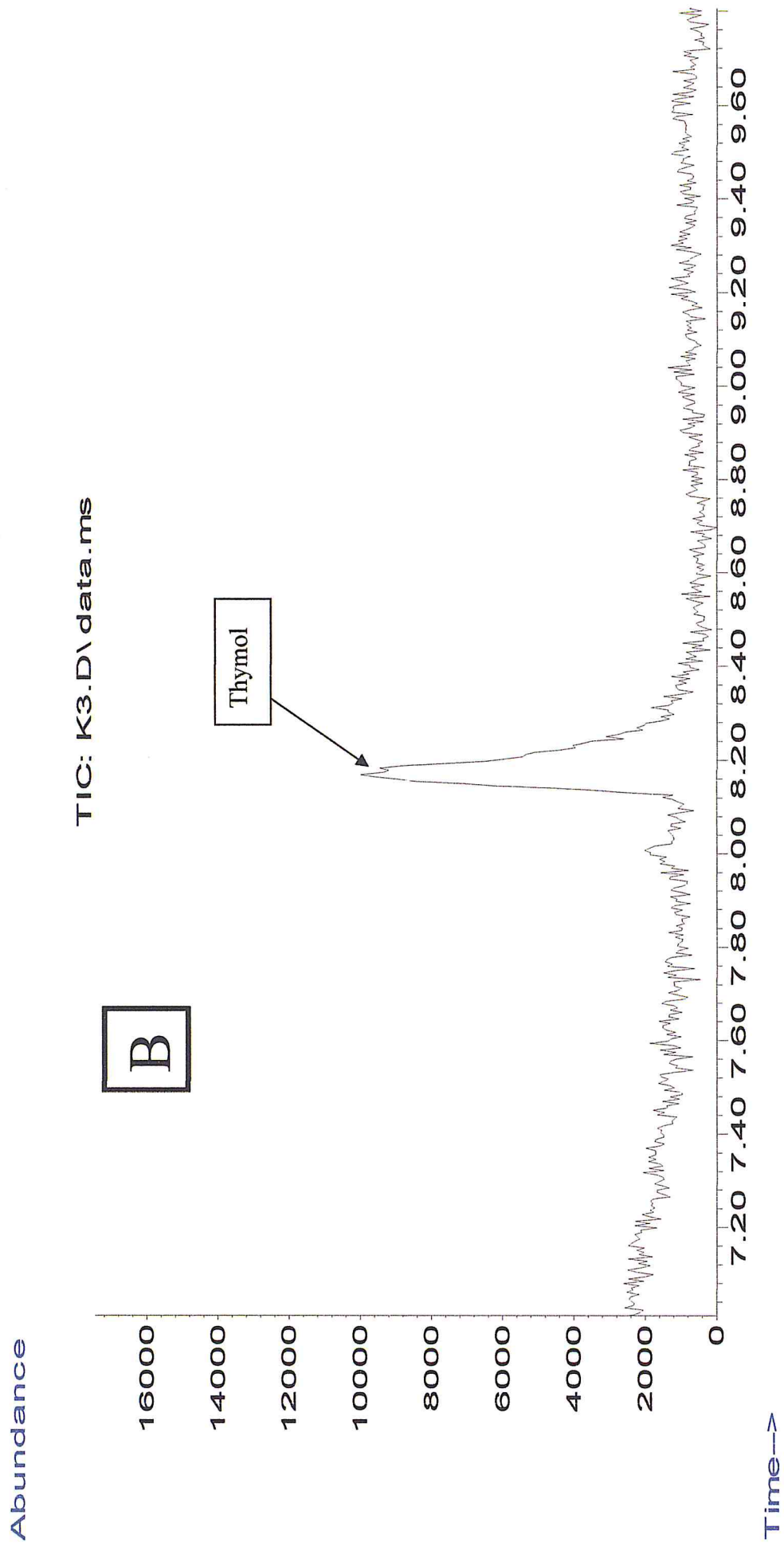


Figure 18 : Agrandissement de la zone B

- D'autre part, la bioconversion du menthol conduit aussi à la production d'un mélange de monoterpènes donnés par la planche 8 et le tableau 5, qui ont été identifiés par CG/SM (Figure 21) :

Tableau 5 : Les différents produits de la bioconversion du menthol par *Streptomyces rochei* AB1

N°	Tr (min)	Nom du composé	Formule	%
1	4,75	1, 3,5-Hexatriene	C ₆ H ₈	43
2	4,74	Trans Epoxy-Ocimene	C ₁₀ H ₁₆ O	72
3	3,82	D-limonène	C ₁₀ H ₁₆	96
4	8,19	Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl) (Carvacrol)	C ₁₀ H ₁₄ O	86
5	8,14	Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	86
6	8,14	Phenol, p-tert-butyl	C ₁₀ H ₁₄ O	64
7	8,16	O-isopropylanisole	C ₁₀ H ₁₄ O	64

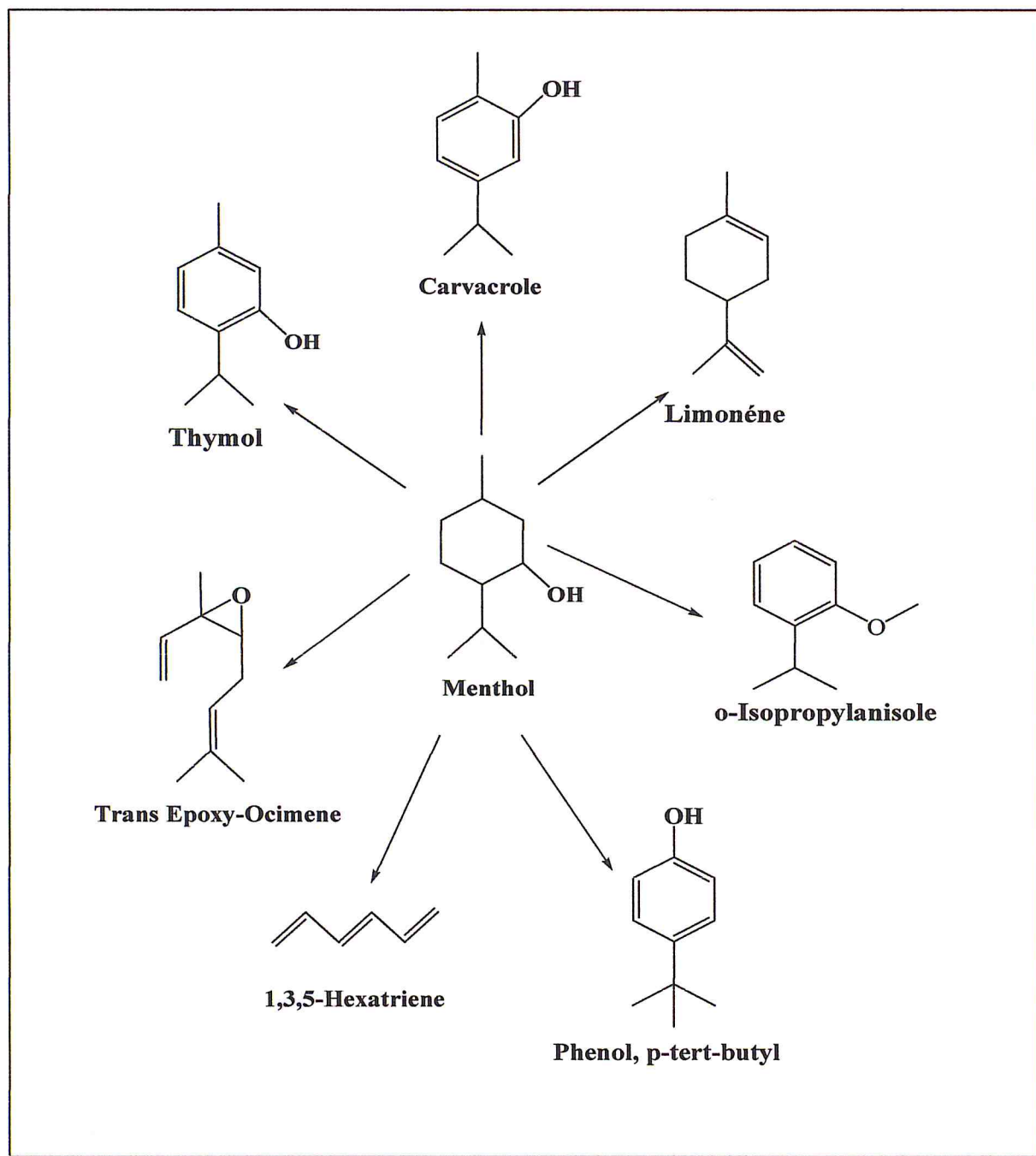


Planche 8 : Les voies métaboliques possibles de la bioconversion du menthol par *Streptomyces rochei* AB1

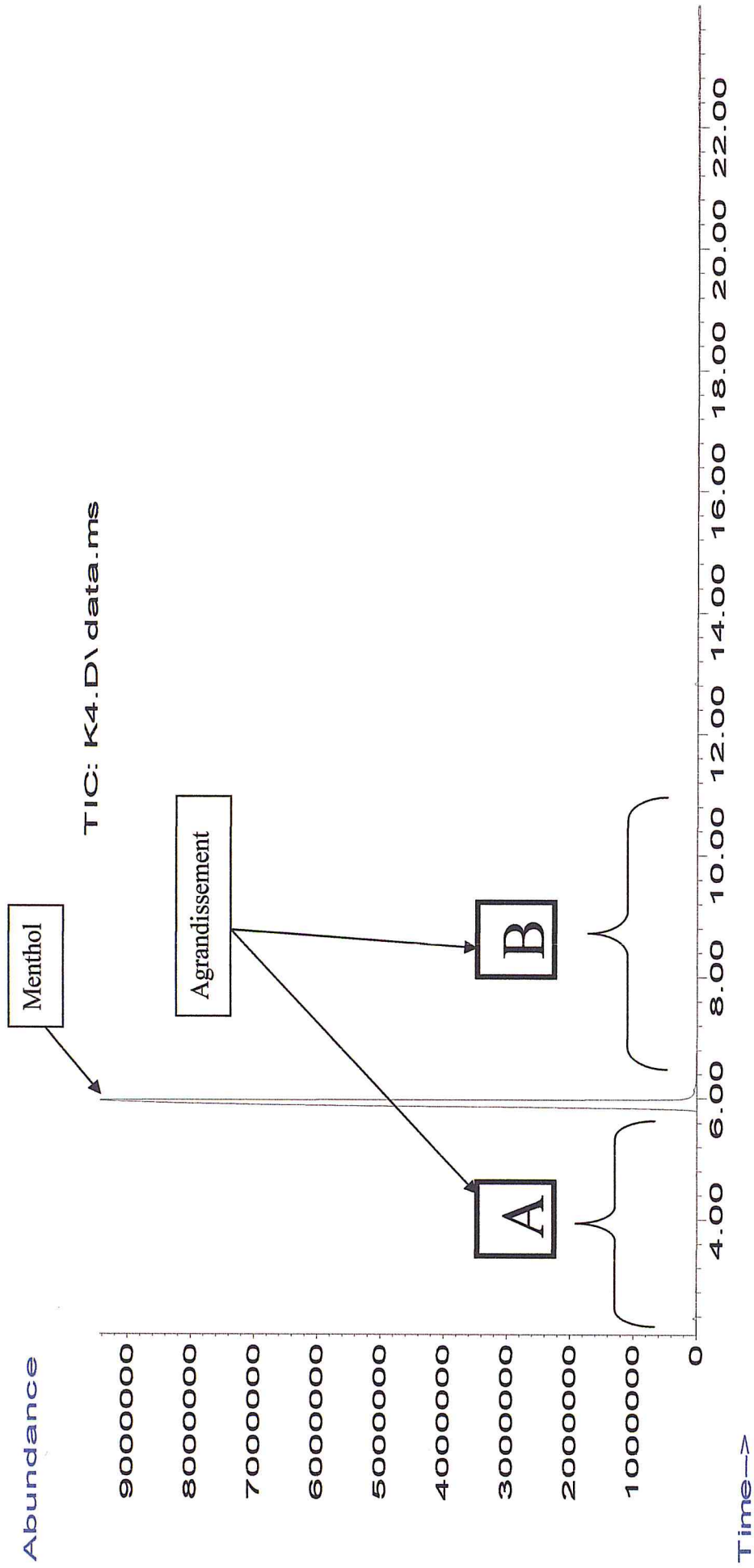


Figure 19 : Profil chromatographique d'analyse de la bioconversion du menthol par *Streptomyces rochei* ABI

A

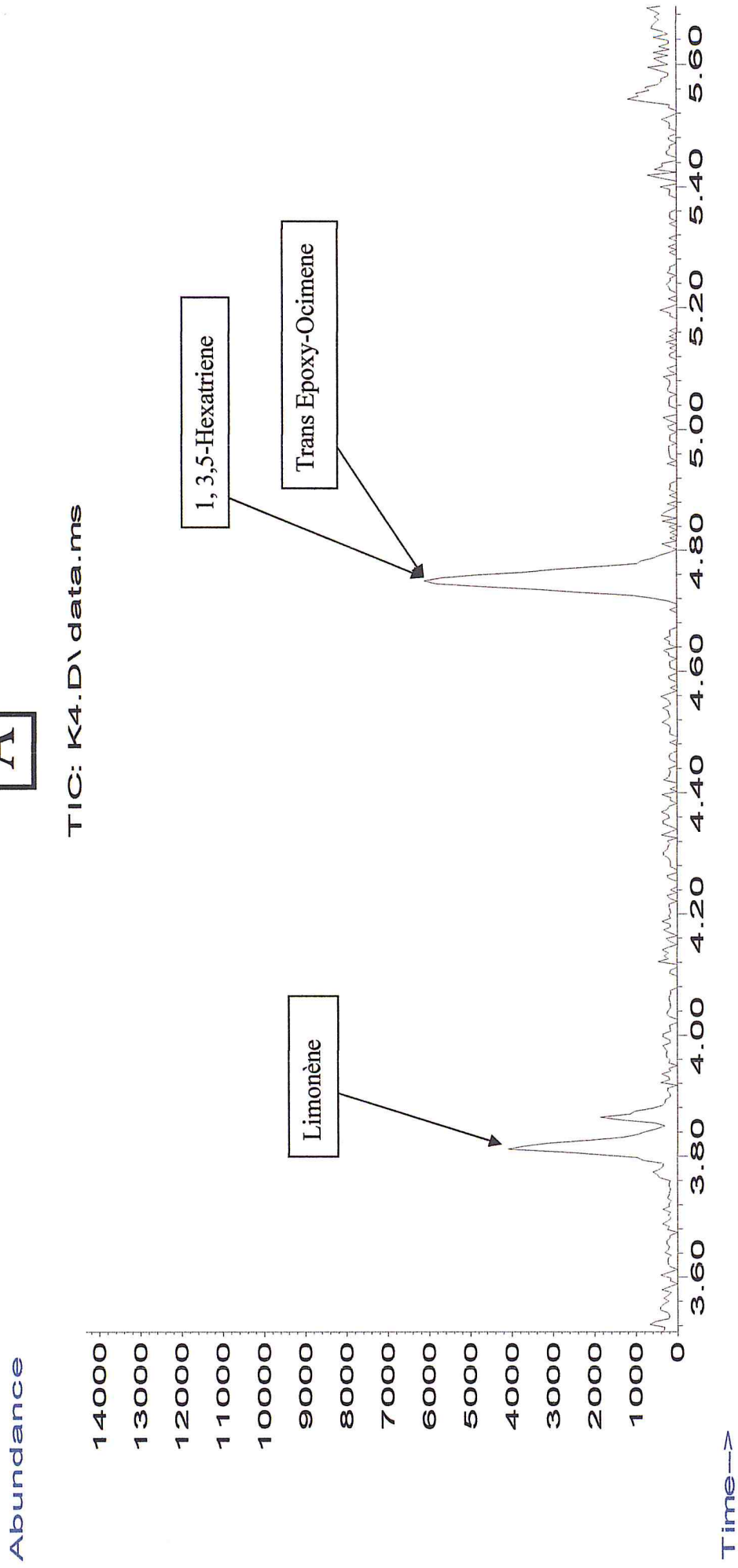


Figure 19 : Agrandissement de la zone A

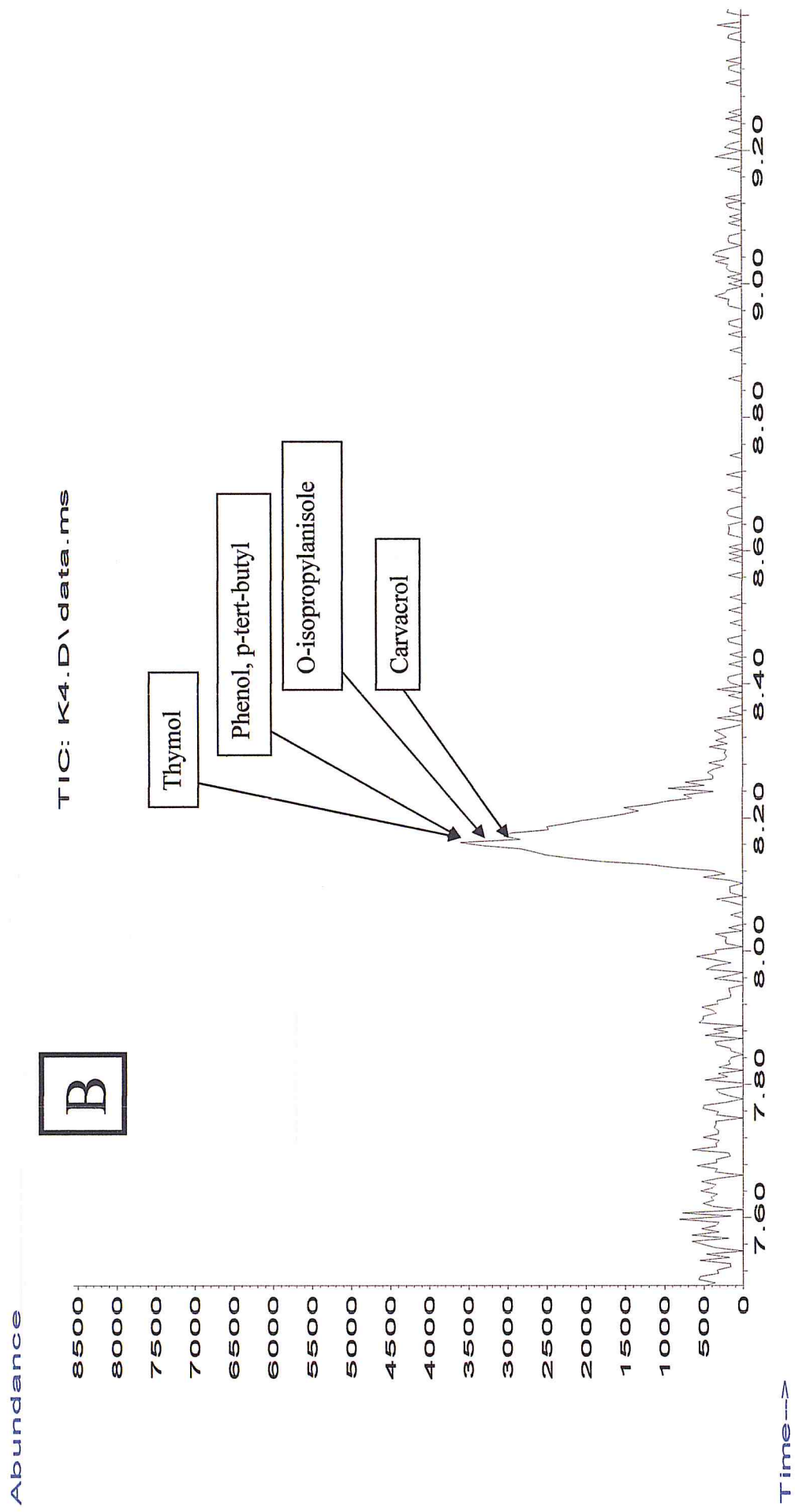


Figure 19 : Agrandissement de la zone B

II. 3.4 Dégradation du menthol par l'énergie lumineuse électromagnétique

II. 3.4.1 La photodégradation par la lumière UV

L'analyse par chromatographie gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (Figure 22) montre la présence d'un seul pic à 6 min qui représente le menthol. Par conséquent, le rayonnement ultraviolet UV ne dégrade pas le menthol dans un temps de 45 min.

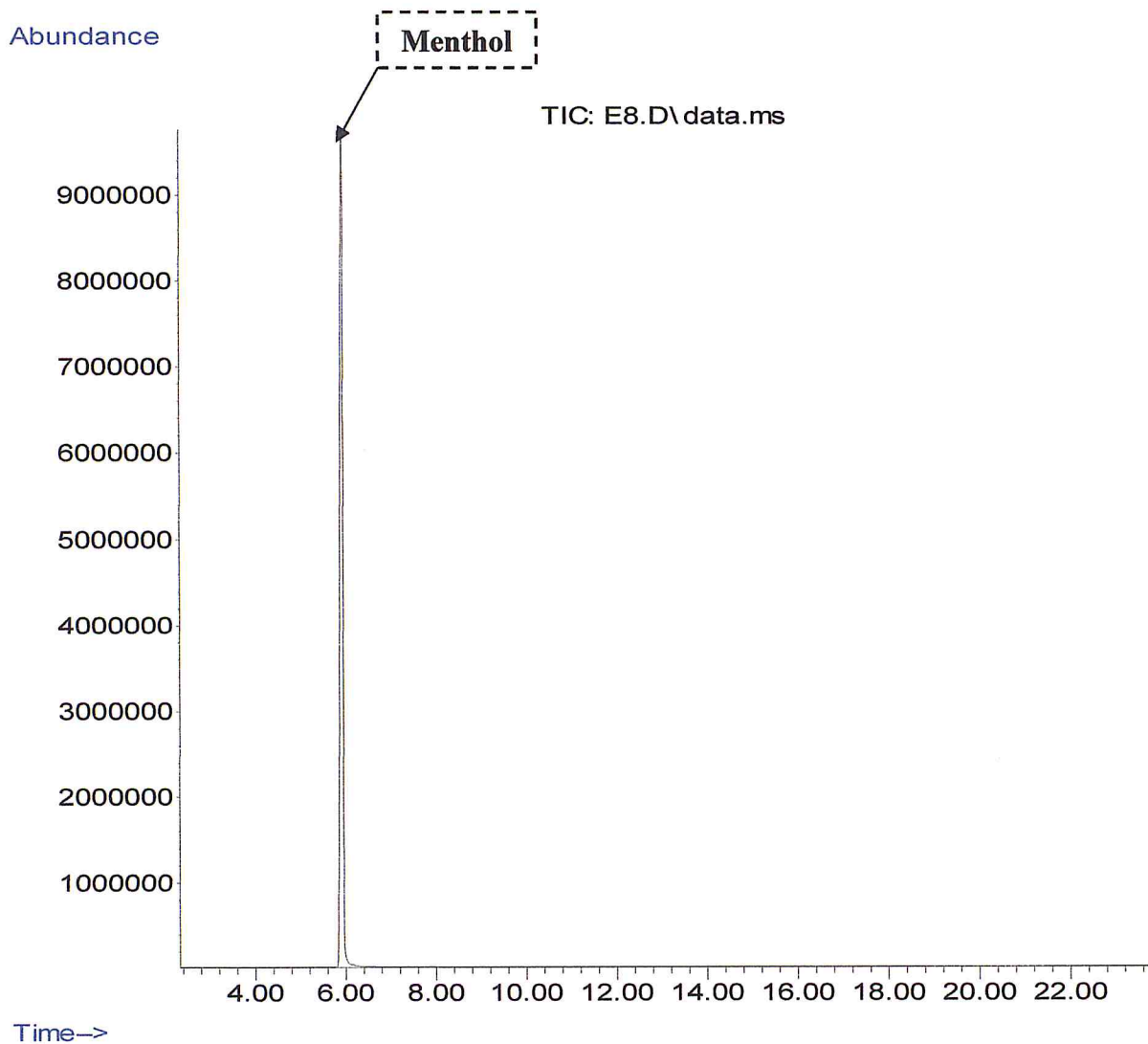


Figure 20 : profil chromatographique de la photodégradation du menthol par la lumière UV

II. 3.4.2 La photodégradation par les rayons de Césium Cs137 a haute énergie

La photodégradation du menthol par les rayons de césium haute énergie a été étudiée dans des différents périodes de 1, 5, 10, 15 min.

Les résultats de CG/SM (Figure 23) montre que un temps de bombardement de 1 et 5 min est insuffisant pour dégrader le menthol, par contre dans un temps de 10 et 15 min permet d'oxyder le menthol en menthone (Cis cyclohexanone -5- methyl -2-(1-methylethyl) (figure 24) caractérisé par un temps de rétention de 5,57 min (planche 9):

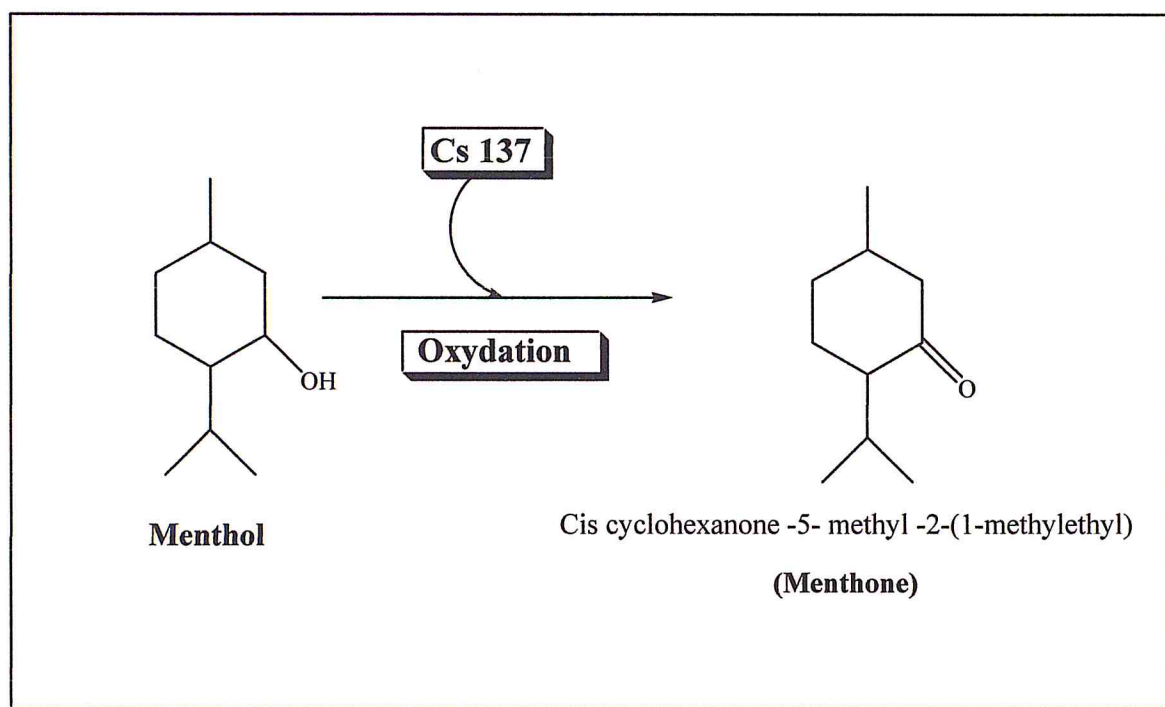


Planche 9 : La voie de la photodégradation du menthol par les rayons de Cs137 à haute énergie

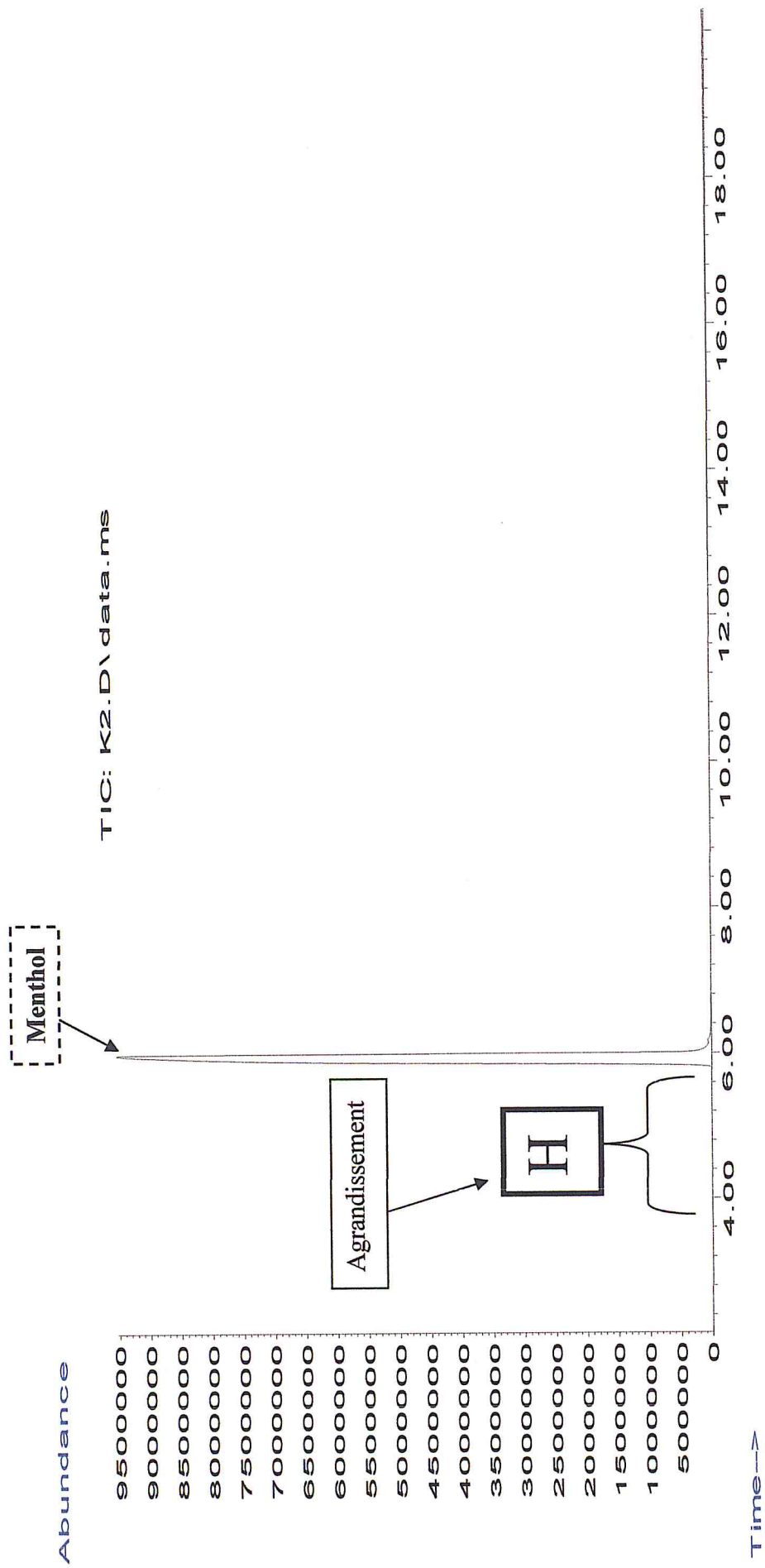


Figure 21 : Profil chromatographique de la photodégradation du menthol par les rayons de Cs137 à haute énergie

Abundance

TIC: K2.D\ data.ms

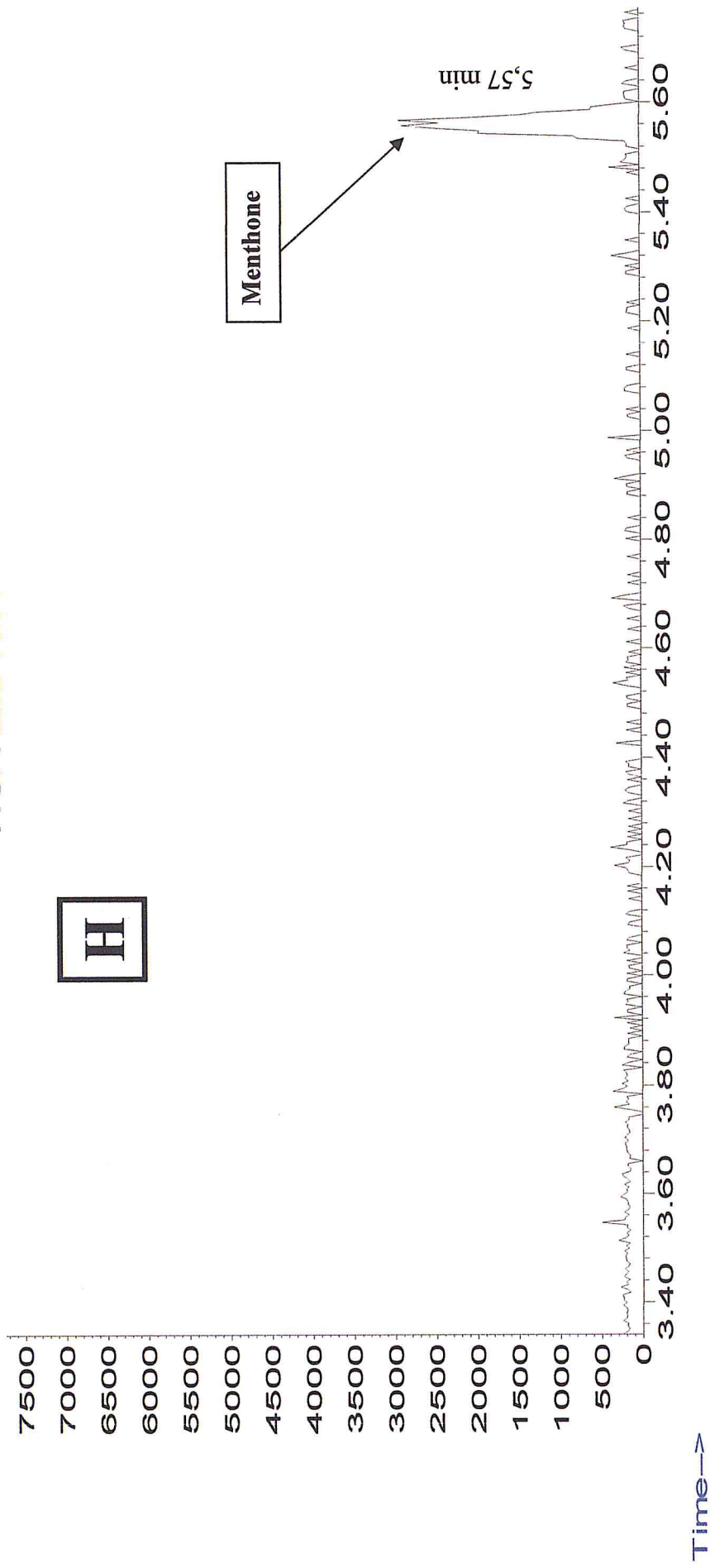


Figure 21 : Agrandissement de la zone H

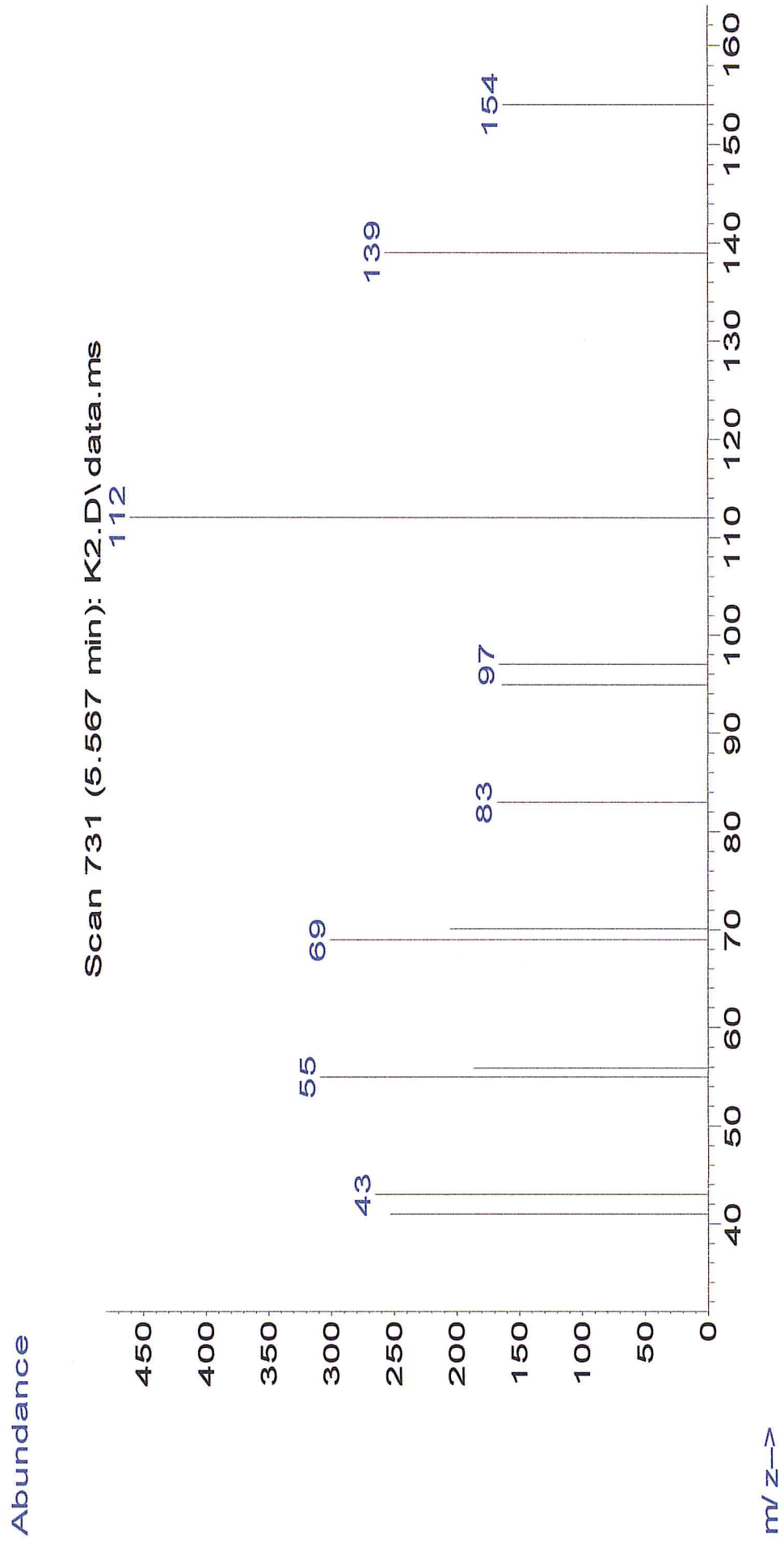


Figure 22 : Spectre de masse du menthone

**CONCLUSION
GENERALE**

Conclusion générale

Le présent travail est consacré à l'étude de la bioconversion et la biodégradation du menthol par les deux souches bactériennes de *peanibacillus popilliae* et *Streptomyces rochei* et sa photodégradation par les rayons UV et les rayonnements à haute énergie de Cs137.

L'analyse préliminaire par Chromatographie sur couche mince (CCM), Spectrophotomètre Infrarouge à Transformé de Fourier (IRTF) et par Chromatographie en phase gazeuse couplée à spectroscopie de masse (CG/SM), a montré que le métabolite étudié (menthol) est pur.

Afin de déterminer la concentration des réactions de bioconversion et de biodégradation, nous avons réalisé une série des testes d'activité qui nous a permis d'estimer la concentration d'inhibition à 3 mg/mL. La valeur de cette concentration a été utilisée pour la suite de nos expériences sur la bioconversion et la biodégradation.

La bioconversion du menthol par la souche *peanibacillus popilliae* n'a pas mené à des résultats concluants. Cet état de fait peut être lié à des conditions opératoires non optimisés. Il peut être dû également au fait que la voie métabolique de la souche ne permet pas de dégrader le substrat considéré (menthol).

Tout comme , la bioconversion, l'utilisation de la souche *peanibacillus popilliae* n'a pas permis la biodégradation du menthol , probablement aux même raison évoquées précédemment.

En utilisant la souche *Streptomyces rochei*, la bioconversion et la biodégradation du menthol a mené à des mélanges de métabolites, notamment des monoterpènes, comme : D-limonène, Thymol, Trans Epoxy-Ocimene, Phenol, p-tert-butyl, O-isopropylanisole, 1, 3,5-Hexatriene pour la bioconversion et Eucalyptol, 3-Carène, α -pinène, (E) 1,3,6-Octatriene,3,7-dimethyl, D- limonène et le thymol pour la biodégradation.

La photodégradation par un rayonnement de Cs137 à haute énergie a permis l'oxydation du menthol en menthol. Par contre la photodégradation par le rayonnement UV du menthol n'est pas aboutie à des résultats concluants.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

References bibliographiques

- [1] G. Molina, M.R. Pimentel and G.M. Pastore, « Pseudomonas: a promising biocatalyst for the bioconversion of terpenes », *Applied Microbiology Biotechnology*, 97, 1851–1864, (2013).
- [2] B. Suresh, T. Ritu, G.A. Ravishankar, « Biotransformations as applicable to food industries », In: Shetty K, Paliyath G, Pometto A, Levin RD (eds) *Food biotechnology*, edn. Marcel Dekker, New York, 1655–1690, (2006).
- [3] H. Bousaab, « Bioconversion éco-compatible de triterpénoïdes par des bactéries immobilisées sur *Luffa cylindrica* », Thèse de doctorat, Université de Haute Alsace-Mulhouse, French, (2011).
- [4] A. Schmid, J.S. Dordick, B. Haue, A. Kiener, M. Wubbolts and B. Witholt, « Industrial biocatalysis today and tomorrow », *Nature* 409, 258-268, (2001).
- [5] G. Molina, D.M. Pinheiro, M.R. Pimentel, R. dos Ssanros, and G.M. Pastore « Monoterpene Bioconversion for the Production of Aroma Compounds by Fungi Isolated from Brazilian Fruits », *Food Science Biotechnology*, 22(4), 999-1006, (2013).
- [6] J.V. Madeira Junior, C.B. Teixeira and G.A. Macedo, « Biotransformation and bioconversion of phenolic compounds obtainment: an overview », *Critical Reviews in Biotechnology*, 35, 1, 75-81, (2013).
- [7] F. Bister-Miel, C. Agier, M. Bury, C. Viel and J.L. Guignard, « Biotransformations comparées de benzyloquinoléines par des suspensions cellulaires végétales non productrices d'alcaloïde », *Bulletin de la Société Botanique de France. Lettres Botaniques*, 135, 1, 57-70, (1988).
- [8] C. Larroche, J.B. Gros, P. Fontanille, « Microbial processes. Dans : Flavours and fragrances : Chemistry, biprocessing and sustainability », Berger R.G. (Ed), Springer - Verlag, Berlin, Heidelberg, 575-597, (2007).
- [9] K.M. Raval, P.S. Vaswani and D.R. Majumder, « Microbial biotransformation: Pharmaceutical peptides », *Biological and Food Science Research*, 1, 1-14, (2012).

- [10] H.Y. Alfarrar and M. Nor Omar, « Microbial Transformation of Natural Products », *Biological Sciences*, 3, 10, 357- 364, (2013).
- [11] Z.A. Siddiqui, « Biotransformational studies on bioactive secondary metabolites of plant origin », Thèse de doctorat, university of Karachi, Pakistan, 2007.
- [12] D. Linares, « Etudes sur la voie de dégradation de l'a-pinène chez *Pseudomonas rhodesiae* en milieu biphasique liquide-liquide », Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II, (2012).
- [13] M.F. Hegazy, T.A. Mohamed, A.I. ElShamy, A.H. Mohamed, U.A. Mahalel, E.H. Reda, A.M. Shaheen, W.A. Tawfik, A.A. Shahat, K.A. Shams, N.S. Abdel-Azim, F.M. Hammouda « Microbial biotransformation as a tool for drug development based on natural products from mevalonic acid pathway: A review », *Advanced Research*, 6, 17–33, (2015).
- [14] J.M.S. Cabral, « Biotransformations. Dans : Basic Biotechnology », Ratledge C. & Kristiansen B. (Ed), Cambridge University Press, Cambridge, 471-501, (2001).
- [15] V. Dave, P. Khirwadkar, K. Dashora, « A review on biotransformation », *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, 2, 2, 1136-1140, (2014).
- [16] P. Schreier, « Biotechnology and flavour production », Proc. 8th International Biotechnology Symposium, 2, Paris, France, 869-883, (1988).
- [17] A.H. Scragg, « The production of aromas by plant cell cultures », *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 55, 239-267, (1997).
- [18] 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 », *Biotechnology Advances*, 19, 175-199, (2001).
- [19] M. Malecky, « The metabolism of terpenoides in caprins », Thèse de doctorat, l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Paris, (2008).
- [20] A.M. Benabdallah, « Screening de souches extrêmophiles halophiles du genre *Bacillus* de la Sebkhah d'Oran (caractérisation phénotypique) », Mémoire de Magister, Université de Tlemcen, (2014).

- [21] M. Awais, A.S. Aamer, H. Abdul and H. Fariha, « Isolation, identification and optimization of bacitracin produced by *Bacillus* sp », *Pakistan Journal of Botany*, 39,4, 1303-1312, (2007).
- [22] H. Maughan and G. Van der Auwera « *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading » *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 789–797, (2011).
- [23] M.Dj. Bounoua, « Essais d'utilisation des *Pseudomonas spp.* et *Bacillus spp.* dans le biocontrôle de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* sur tomate et *Verticillium dahliae* sur l'olivier », Mémoire de Magister en biotechnologie, Université d'Oran.
- [24] F. Boughachiche, « Étude de molécules antibiotiques secrétées par des souches appartenant au genre *Streptomyces*, isolées de Sebka », Thèse de doctorat, Université Mentouri- Constantine, (2012).
- [25] H.A Lechevalier and M.P Lechevalier, « Introduction to the order Actinomycetales », dans : Starr M.P., Stolp H., Truper H.G., Ballows A. et Schlegel H.G. *The prokaryote*, Springer-Verlag Edition Berlin, 2, 1915-1922, (1981).
- [26] E. Stackebrandt, P. Schumann « Introduction to the Taxonomy of Actinobacteria », dans: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K., Stackebrandt E. *Prokaryotes*, Springer Science, Business Media, LLC edition New York, USA, 297-321, (2006).
- [27] F. Zermane, « Etude des caractéristiques culturelles des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose des substances pectiques et des composés organiques de synthèse », Mémoire de Magister en biotechnologie, Université Mentouri Constantine, (2008).
- [28] 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 », *Organic Chemistry*, 53, 5700–5704, (1988).
- [29] K.H.C. Baser, G. Buchbauer, « Handbook of essential oils: science, technology, and applications », Ed by Taylor and Francis Group, LLC, an informa business, Boca Raton London New York, (2010).

- [30] N. Savithiry, D. Gage, W. Fu, P. Oriel, « Degradation of Pinene by *Bacillus pallidus* BR425 », *Biodegradation*, 9, 337-341, (1998).
- [31] A.Z.M. Badee, A.H. Shahinaz, F.S.M. Nashwa, « Utilisation of orange peel in the production of α -terpineol by *Penicillium digitatum* (NRRL 1202) », *Food Chemistry*, 126, 849–854, (2011).
- [32] R. Marmulla and J. Harder, « Microbial monoterpene transformations - areview », *Frontiers in Microbiology*, 5, 3, (2014).
- [33] M. Zhang, P. Xu, S. Han, H.Q. Yan, C.Q. Ma, « Metabolism of isoeugenol via isoeugenol-diol by a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* HS8 », *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 771-779, (2006).
- [34] D. Hua, C. Ma, S. Lin, L. Song, Z. Deng, Z. Maomy, Z. Zhang, B. Yu, P. Xu, « Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a newly isolated *Bacillus pumilus* strain: Identification of major metabolites », *Biotechnology*, 130, 463- 470, (2007).
- [35] 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*, 177–179, (1988).
- [36] Y. Noma, and H. Nishimura, « Microbiological transformation of 1, 8-cineole. Production of 3 β -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*, 196, (1981).
- [37] 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*, 204–206, (1986).
- [38] L. David, and H. Veschambre, « Preparation d'oxydes de linalol par bioconversion », *Tetrahedron Letters*, 25, 543–546, (1984).
- [39] Y. NOMA and H. Nishimura, « Bottrospicatols, Novel Monoterpenes Produced on Conversion of (-)- and (+)-Cis-Carveol by *Streptomyces* », *Agricultural and Biological Chemistry*, 51:7, 1845-1849, (1987).

- [40] Y. Noma, « Conversion of (-)-Carvone by Strains of *Streptomyces*, *A-5-1*, and *Nocardia*, *I-3-11* », *Agricultural and biological chemistry*, 44 (4), 807-812, (1980).
- [41] T. Hayashi, S. Uedono, C. Tatsumi, « Conversion of α -terpineol to 8,9-epoxy-p-menthan-1-ol » *Agricultural and Biological Chemistry*, 36, 690–691, (1972).
- [42] Y. Tsukamoto, S. Nonomura, H. Sakai, « Formation of p-cis-menthan-1-ol from p-menthane by *Pseudomonas mendocina* SF », *Agricultural Biological Chemistry*, 39, 617–620, (1975).
- [43] M. Ashengroph, I. Nahvi and H. Zarkesh-Esfahani, « A bioconversion process using a novel isolated strain of *Pseudomonas* sp. ISPC2 to produce natural vanillin from isoeugenol », *Research in Pharmaceutical Sciences*, 3, 2, 41-47, (2008).
- [44] P. Rodríguez, W. Sierra, S. Rodríguez, P. Menéndez, « Biotransformation of 1,8-cineole, the main product of *Eucalyptus* oils », *Electronic Journal of Biotechnology*, 9, 3, (2006).
- [45] Q. Tan, D. F. Day, « Bioconversion of limonene to α -terpineol by immobilized *Penicillium digitatum* », *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, 96-101, (1998).
- [46] A. Esmaili and El. Hashemi, « Biotransformation of myrcene by *Pseudomonas Aeruginosa* », *Journal of Chemistry Central*, 5, 26, (2011).
- [47] Y. Ghasemi, A. Mohagheghzadeh, M. Moshavash, Z. Ostovan, S. Rasoul-Amini, M. H. Morowvat, M. Bagher Ghoshoon, M. Javad Raei, S. Bagher Mosavi-Azam, « Biotransformation of monoterpenes by *Oocystis pusilla* », *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25,1301–1304, (2009).
- [48] M. Trytek, K. Jedrzejewski, J. Fiedurek, « Bioconversion of α -pinene by a novel cold-adapted fungus *Chrysosporium pannorum* », *Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42, 181–188, (2015).
- [49] J.L. Bicas, F.F.C. Barros, R. Wagner, H. T. Godoy, G. M. Pastore, « Optimization of R-(+)-*a*-terpineol production by the biotransformation of R-(+)-limonene », *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35, 1061–1070, (2008).

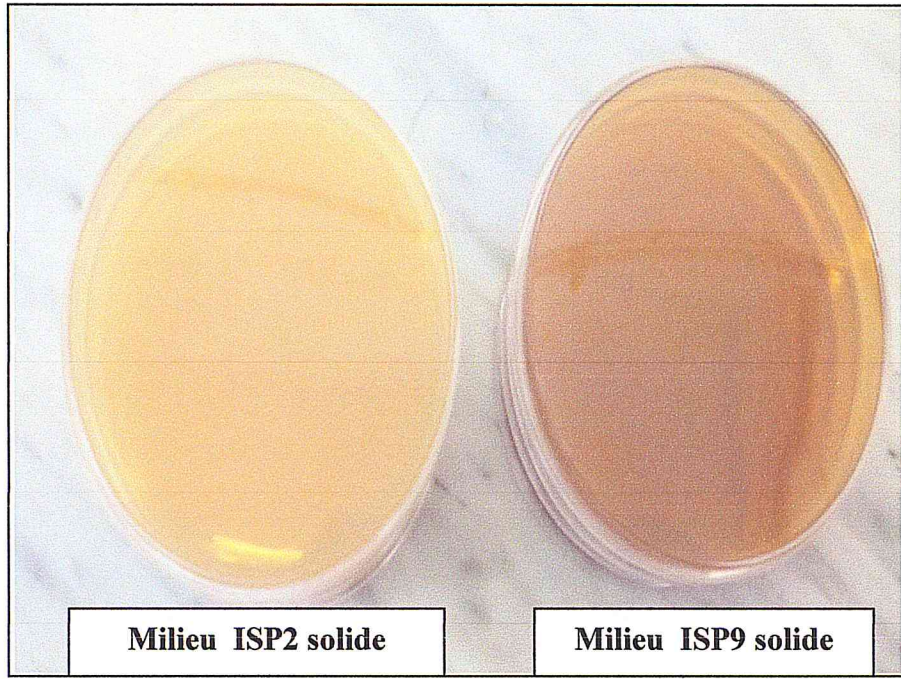
- [50] T. Chatterjee, D.K. Bhattacharyya, « Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida* », *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 541–546, (2001).
- [51] G. Toniazzo, D. De Oliveira, C. Dariva, E.G. Oestreicher, and O.A.C. Antunes, « Biotransformation of (–) β -Pinene by *Aspergillus niger* ATCC 9642 », *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121–124, (2005).
- [52] R. Eccles, « Menthol and Related Cooling Compounds », *Pharmacy and Pharmacology*, 46, 618-630, (1994).
- [53] R. Chizzola, « Regular Monoterpenes and Sesquiterpenes (Essential Oils) », *Institute of Animal Nutrition and Functional Plant Compounds, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria*, 2979-2998, (2013).
- [54] A. Gelal, « Influence of menthol on first pass elimination », *Journal of Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7, 2, 119 – 124, (2008).
- [55] R.B. Croteau, E.M. Davis, K.L. Ringer, M.R. Wildung, « (-)-Menthol biosynthesis and molecular genetics », *Journal of Naturwissenschaften*, 92, 562–577, (2005).
- [56] S.K. Talapatra and B. Talapatra, « Chemistry of Plant Natural Products », Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 388, (2015).
- [57] M. Malecky, « The metabolism of terpenoids in caprins », *Thèse de doctorat, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Paris*, (2008).
- [58] Y. Asakawa, H. Takahashi, M. Toyota, and Y. Noma, « Biotransformation of monoterpenoids, (-) and (+) Menthols, terpinolene and carvotanacetone by *Aspergillus* species », *Phytochemistry*, 30, 3981–3987, (1991).
- [59] Atta-ur-Rahman, M. Yaqoob, A. Farooq, S. Anjum, F. Asif, and M.I. Choudhary, «Fungal transformation of (1*R*,2*S*,5*R*)-(–)Menthol by *Cephalosporium aphidicola* », *Journal of Natural Product*, 61, 1340–1342, (1998).
- [60] A. Esmaili, N. Saad, S. Safaiyan, A. Rustaiyan «Biotransformation of (–)-menthol by spores of *Mucor ramannianus* and study of the pathways involved», *herba polonica*, 55, 2, 52-55, (2009).

- [61] A. Esmaceli, H.R. Mirmhadi, and F. Rafiee, « Biotransformation of menthol by *Chlorella vulgaris* and study of the pathways involved », *Chemistry of Natural Compounds*, 49, 6, (2014).
- [62] A. Esmaceli, AH.Zarea, S.Sharafian, S. Safaiyan, A. Rustaiyan, « Biotransformation of menthol by sporulated surface cultures of *Penicillium. sp.* and study of the pathways involved», *herba polonica*, 55, 1, 79-82, (2009).
- [63] F. Mesbaiah, « Etude de la biodégradabilité d'un hydrocarbure aromatique polycyclique 'Naphtalène' et optimisation de la performance bactérienne en milieu PCN », *Mémoire de MAGISTER, Université Blida1, Algérie*, (2011).
- [64] Z. Saadi, « Etude de la dégradation fongique des polymères : cinétique de dégradation des polymères et caractérisation des sous-produits de dégradation, Etude de l'écotoxicité de ces polymères », *thèse de doctorat, Université du MAINE, France*, (2008).
- [65] M. Soltani « Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone », *thèse de doctorat, université de Paris*, (2004).
- [66] J. Kurola, « Microbial activities in boreal soils: Biodegradation of organic contaminants at low temperature and ammonia oxidation » *Academic Dissertation in Environmental Ecology*, (2006).
- [67] F. Ferradji, « Etude des voies métaboliques de la biodégradabilité des hydrocarbures en vue d'une application d'un procédé de biodépollution des eaux de mer », *thèse de doctorat, Université Blida1, Algérie*, (2014).

ANNEXES

ANNEXE 1

Les milieux de culture utilisés

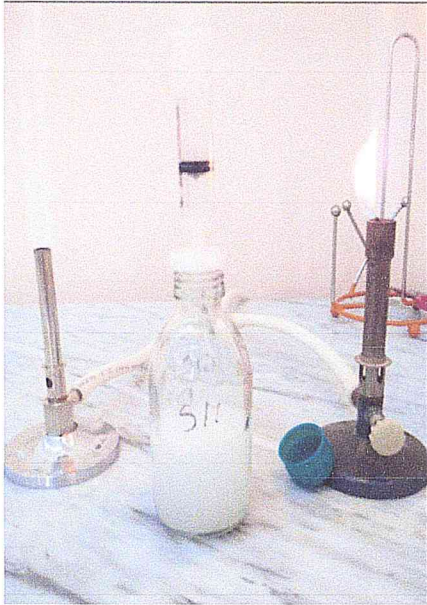


Milieu Minimum



Milieu Luria Bertani

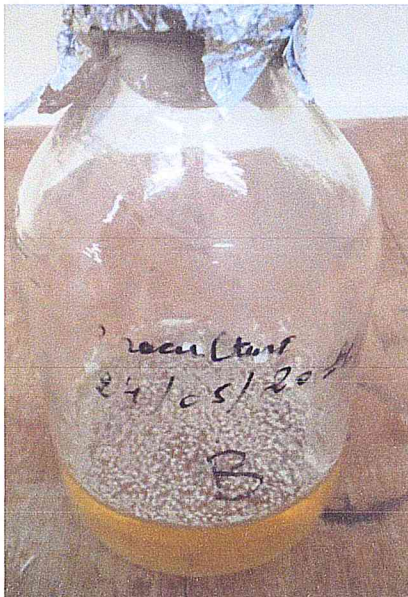
ANNEXE 2



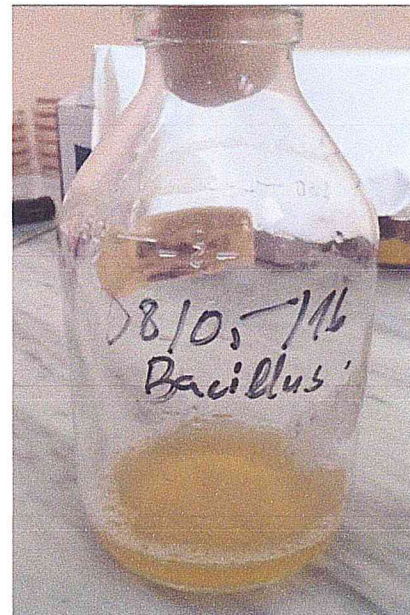
Filtration de la solution



Les filtres de 45 µm



Culture bactérienne de
Streptomyces rochei



Culture bactérienne de
Paenibacillus noniliae 1C

ANNEXE 3



Centrifugeuse



Autoclave



Evaporateur rotatif