

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
LACHEHEB Khaira

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Sciences de la matière
Filière : Chimie
Option : Chimie des Substances Naturelles

Titre

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

Soutenu publiquement le 27 juin 2016 devant le jury composé de :

Y. Daghbouche	Pr	Présidente	Université de Blida1
Z. Zaffouni	MAA	Examinatrice	Université de Blida1
A. Badis	Pr	Promoteur	Université de Blida1
F. Z. Ferradji	MCB	Co/Promoteur	Université de Blida1

Promotion 2015-2016

Remerciements

Au terme de ce travail, je remercie Dieu « Tout Puissant » pour ce qu'il m'a donné comme force pour effectuer ce travail.

Je tiens à remercier très sincèrement mon promoteur Pr. Abdelmalek BADIS 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 au Pr. Mohamed EL HATTAB, professeur à la faculté des sciences université de Blida 1. Je tiens à lui témoigner ma gratitude pour ses encouragements et sa disponibilité. Je le remercie pour ses qualités scientifiques et humaines, qu'il trouve ici le témoignage de mon grand respect et de mon estime et aussi 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 respect.

Je tiens à remercier Mme Yasmina DAGHBOUCHE, Professeur à la faculté des sciences université de Blida 1 pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider le jury de soutenance.

J'adresse mes sincères remerciements à Mme Zakia ZAF'F'OUNI, maitre de conférences qui m'a fait l'honneur 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.

Je remercie chaleureusement M^{elle} Sonia HAMICHE, M^{elle} Leyrat MEBAREK et M^{elle} Karima BOUNAASE, pour leurs disponibilités et leurs aides précieux, ces conseils et ses encouragements.

J'adresse aussi mes sincères remerciements Mme Lamia KHELOWIA et tous les personnes du laboratoire de Microbiologie du Département de Chimie industrielle, de m'avoir reçue au sein du Laboratoire.

De même je remercie infiniment Mr Djamel TOUFAHI 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.

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 matériel nécessaires pour la réalisation de ce travail.

Dédicaces

*Je dédie ce travail à mes chers parents pour leur soutien indéfectible et encouragement
durant toute ma vie.*

*Qu'ils soient assurés de mon profond respect et de ma gratitude pour tous les efforts que vous
avez fournis en ma faveur.*

*Que ce travail soit le symbole de mon grand amour, et de ma reconnaissance de leurs efforts
déployés et leur soutien inoubliable durant ces années de sacrifices.*

Toutes mes sœurs et tous mes frères pour leurs sacrifices et soutien.

A toute ma famille

A toutes mes amies

Ainsi qu'à tous ceux qui me sont cher

*Pour une sincérité si merveilleuse jamais oubliable, en leurs souhaitant tout le succès, tout le
bonheur.*

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

ملخص

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

لقد سمح تحديد تراكيز الثيمول بحصر مجال تثبيط السلالتين بالنسبة للمستقلب وقد حدد هذا التركيز ب 2 ملغ/مل

Streptomyces rochei (AB1) و 1مغ/مل ل *Peaenibacillus popilliae* (1C).

تم إجراء دراسة التحويل البيولوجي باستعمال وسط سائل يدعى LB سلالة *Paenibacillus popilliae* 1C أما دراسة التحول البيولوجي و التحلل البيولوجي فقد تمت باستعمال وسط آخر وهو باستخدام على التوالي الوسط ISP9 الغني و ISP9 الفقير *Streptomyces rochei* AB1. أما وبالنسبة للتحليل الضوئي، فقد تم باستعمال مصدرين هما الأشعة فوق البنفسجية والأشعة ذات الطاقة العالية بالسيزيوم 137.

إن شروط العمل على التحويل البيولوجي و التحلل البيولوجي لثيمول بالسلالة *Paenibacillus popilliae* 1C لم تسمح بالتحول الأحيائي و لا بالتحول البيولوجي.

فيما يتعلق بالسلالة *Streptomyces rochei* AB1 سمح لنا التحول البيولوجي و التحلل البيولوجي بالحصول على المنتول.

سمح لنا التحلل الضوئي بواسطة الأشعة ذات الطاقة العالية لسيزيوم 137 بالحصول على ألفا بينين.

إن شروط العمل بواسطة التحلل الضوئي لثيمول بواسطة الأشعة فوق البنفسجية لم يعطي أي نتائج حاسمة.

الكلمات المفتاحية: التحول الأحيائي، التحلل البيولوجي، التحلل الضوئي ، الأشعة ذات الطاقة العالية فوق البنفسجية بالسيزيوم 137 ، الثيمول (*Peaenibacillus popilliae* (1C) ، *Streptomyces rochei* (AB1) .

Résumé

Le présent travail porte sur l'étude la bioconversion et la biodégradation du thymol par deux souches *Paenibacillus popilliae* 1C ATCC 14706 (AF071861), et *Streptomyces rochei* AB1 (GU434672). La photodégradation par un rayonnement UV et par un rayonnement haute énergie de Cs137 a également envisagée. La pureté du thymol 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 thymol a été effectué sur les deux souches. Cette concentration a été déterminée et égale à 1 mg/mL pour *Paenibacillus popilliae* 1C et 2 mg/mL pour *Streptomyces rochei* AB1.

Concernant la souche *Paenibacillus popilliae* 1C, la bioconversion a été effectuée sur le milieu LB riche, par contre, la biodégradation a été réalisée en utilisant le milieu minimum.

La bioconversion et la biodégradation du thymol par la souche *Streptomyces rochei* AB1 a été mené en utilisant, respectivement, le milieu ISP 9 riche et ISP 9 pauvre.

La photodégradation a été effectuée en utilisant l'énergie électromagnétique des rayonnements UV et haute énergie Cs137.

Les conditions opératoires de biotransformation et de biodégradation du thymol par la souche *Paenibacillus popilliae* 1C, n'ont pas permis sa biotransformation ni même sa biodégradation.

Concernant la souche *Streptomyces rochei* AB1, la biotransformation et la biodegradation sont permis notamment l'obtention du menthol.

La photodégradation par le rayonnement haute énergie du Cs137 a permis notamment l'obtention du le 1-R- α pinène. Les conditions opérations de la photodégradation du thymol par le rayonnement UV n'ont pas abouti à des résultats concluants.

Mots clés : Bioconversion, biodégradation, photodégradation, césium 137, lumière UV, thymol, *Paenibacillus popilliae* 1C, *Streptomyces rochei* AB1.

Abstract

This work focuses on the study of bioconversion and biodegradation of thymol by two strains *Paenibacillus popilliae* 1C ATCC 14706 (AF071861), and *Streptomyces rochei* AB1 (GU434672). The Photo degradation by UV radiation and high-energy radiation from 137Cs was adapted. The purity of thymol has been elucidated by preliminary analyzes including TLC, FTIR and GC / MS.

Determining concentrations for delimiting the inhibiting domain towards thymol was performed on the two strains. This concentration was determined and equal to 1 mg / mL for *Paenibacillus popilliae* 1C and 2 mg / ml for *Streptomyces rochei* AB1.

On strain *Paenibacillus popilliae* 1C, the bioconversion was performed on the LB rich medium, however, the Biodegradation was performed by using the minimum medium. The bioconversion of thymol and biodegradation by *Streptomyces rochei* AB1 was conducted using, respectively, the ISP medium 9 rich and poor ISP 9.

The Photodegradation was performed using electromagnetic energy UV radiation and high-energy 137Cs.

The operating conditions of biotransformation and biodegradation of thymol by the strain *Paenibacillus popilliae* 1C, did not allow the biotransformation nor its biodegradation.

Regarding *Streptomyces rochei* AB1, the biotransformation and biodegradation are allowed including obtaining menthol.

The Photodegradation by high-energy radiation from 137Cs allowed including obtaining the 1-R- α -pinene. The operations conditions thymol photodégradation by UV radiation did not lead to conclusive results.

Keywords: Bioconversion, biodegradation, photodegradation, cesium-137, UV light, thymol, *Paenibacillus popilliae* 1C, *Streptomyces rochei* AB1.

Liste des abréviations

ATCC :	American Type Culture Collection
°C :	Degré Celsius
CCM :	Chromatographie sur couche mince
Rf :	Rapport frontal
IRTF :	Infrarouge à transformée de Fourier
KBr :	Bromure de potassium
CG/SM :	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
LB :	Luria –bertani
MM :	Milieu strictement minéral
ISP2 :	International <i>streptomyces</i> project 2
ISP9 :	International <i>streptomyces</i> project 9
pH :	Potentiel Hydrogène
tr.min ⁻¹ :	tourne par minute

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Position systématique de <i>Bacillus</i>	7
Tableau 2 :	Bioconversion microbienne des métabolites secondaires par <i>Bacillus</i>	7
Tableau 3 :	Position systématique de bactérie <i>Streptomyces</i>	9
Tableau 4 :	Bioconversion microbienne des métabolites secondaires par <i>Streptomyces</i>	9
Tableau 5 :	Bioconversion microbienne des métabolites secondaires par divers microorganismes	10
Tableau 6 :	Bioconversion microbienne du thymol	13
Tableau 7 :	Diamètres (mm) des zones d'inhibition du thymol par <i>Paenibacillus</i> <i>popilliae</i> 1C	33
Tableau 8:	Rendements de la bioconversion et biodégradation	34

Liste des planches

Planche 1 :	Voies métaboliques de bioconversion du thymol	14
Planche 2 :	Autres voies métaboliques de bioconversion du thymol	15
Planche 3 :	Biodégradation du (+)-linalool par <i>Pseudomonas pseudomallei</i>	17
Planche 4 :	Biodégradation du 1-p-menthène par <i>Pseudomonas sp. strain (PL)</i>	17
Planche 5 :	Biodégradation du citronellol par <i>Pseudomonas citronellolis</i>	18
Planche 6 :	Biodégradation du géraniol par <i>Pseudomonas citronellolis</i>	18
Planche 7 :	Bilan de la réaction de bioconversion et biodégradation du thymol par <i>Streptomyces rochei</i> AB1	37
Planche 8 :	Photodégradation du thymol par le rayonnement haute énergie de Césium (Cs 137)	40

Liste des figures

Figure 1 :	(a) <i>Streptomyces strain</i> AB1; (b) <i>Paenibacillus popilliae</i> 1 C	23
Figure 2 :	Schéma simplifié du principe de la méthode de teste d'inhibition	25
Figure 3 :	Centrifugation de culture bactérienne	26
Figure 4 :	Extraction du surnageant	27
Figure 5 :	A : Dispositif de photodégradation ; B : Source des rayons Césium	28
Figure 6 :	Chromatographie sur couche mince du thymol	29
Figure 7 :	Spectre IRTF d'absorbance de thymol	30
Figure 8 :	Chromatographique d'analyse de thymol	31
Figure 9:	Effet de la concentration du thymol sur la croissance <i>Paenibacillus popilliae</i> 1C (A= 0,5 et 1mg/mL, B= 5 et 10mg/mL, C= 20mg/mL, et D= 25mg/mL).	32
Figure10 :	Effet de la concentration du thymol sur la croissance de <i>Streptomyces rochei</i> AB1 (A= 0,5 et 1mg/mL, B= 25 mg/mL).	33
Figure 11:	A : Profil chromatographique d'analyse de bioconversion et biodégradation du thymol par <i>Paenibacillus popilliae</i> 1C B : Spectre de masse du thymol	36
Figure 12:	A : Profil chromatographique d'analyse de bioconversion et biodégradation du thymol par <i>Streptomyces rochei</i> AB1 B : Agrandissement des pics du chromatogramme de menthol C : Spectre de masse du thymol ; D : Spectre de masse du menthol	38
Figure 13:	A : Profil chromatographique d'analyse du thymol par lumière UV B : Spectre de masse du thymol	41
Figure 14:	A : Profil chromatographique d'analyse de Photodégradation du thymol par des rayons de Césium pendant de 5 min et 10 min. B : Agrandissement des pics du chromatogramme de α . Pinène C : Spectre de masse du thymol ; D : Spectre de masse du α . Pinène	42

SOMMAIRE

Remerciements	I
Dédicaces	III
ملخص	IV
Résumé	V
Abstract	VI
Liste des abréviations	VII
Liste des tableaux	VIII
Liste des planches	IX
Liste des figures	XII
Introduction générale	1
Partie I : Synthèse bibliographique	
I.1 Introduction	4
I.2 Bioconversion (Biotransformation)	4
I.2.1 Processus de bioconversion : description, avantages et inconvénients	4
I.2.2 Biocatalyseurs	5
I.3 Bioconversion par les microorganismes	6
I.3.1 Bioconversion des métabolites secondaires par <i>Bacillus</i>	6
I.3.1.1 Généralités sur le genre <i>Bacillus</i>	6
I.3.1.2 Caractères bactériologiques	6
I.3.1.3 Travaux antérieure de la bioconversion des métabolites secondaires par <i>Bacillus</i>	7
I.3.2 Bioconversion des métabolites secondaires par <i>Streptomyces</i>	8
I.3.2.1 Généralités sur le genre <i>Streptomyces</i>	8
I.3.2.2 Travaux antérieur de la bioconversion des métabolites secondaires par <i>Streptomyces</i>	9
I.3.3 Bioconversion des métabolites secondaires par d'autres microorganismes	10
I.4 Bioconversion du thymol	12
I.4.1 Etude chimique du thymol	12
I.4.2 Utilisation du thymol	12
I.4.3 Bioconversion du thymol par différentes microorganismes	12
I.5 Biodégradation	16

I.5.1 Définition de biodégradation	16
I.5.2 Type de biodégradation	16
I.5.3 Principes de la biodégradation	16
I.5.4 Biodégradation du métabolite secondaire par les microorganismes	17
Partie II : Etude expérimentale	
II.1 Introduction	20
II.2 Matériel et méthodologie expérimentale	20
II.2.1 Analyses chimiques préliminaires du thymol	20
II.2.1.1 Analyse préliminaire par chromatographie sur couche mince	21
II.2.1.2 Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	21
II.2.1.3 Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	21
II.2.2 Bioconversion et la biodégradation du thymol	22
II.2.2.1 Origine des souches utilisées	22
II.2.2.2 Milieux de culture	23
II.2.2.3 Repiquage des souches	24
II.2.2.4 Préculture	24
II.2.2.5 Détermination de la concentration assimilable non inhibitrice pour la bioconversion et la biodégradation	24
II.2.2.6 Etude de la bioconversion et de la biodégradation du thymol	25
II.2.2.7 Extraction liquide-liquide	26
II.2.3 Photodégradation du thymol	27
II.2.3.1 Etude de la photodégradation par lumière UV	27
II.2.3.2 Etude de la Photodégradation par des rayons de césium	27
II.2.4 Analyse par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la Spectrométrie de masse	28
II.3 Résultat et discussion	
II.3.1 Analyses chimiques préliminaires du thymol	29
II.3.1.1 Analyse préliminaire par chromatographie sur couche mince	29
II.3.1.2 Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	29
II.3.1.3 Analyse du thymol par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	30

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

La bioconversion est définie comme une transformation chimique catalysée par des micro-organismes ou leurs enzymes, elle fait partie du domaine de la biotechnologie qui a gagné une attention considérable [1].

L'utilisation de biocatalyseurs dans les processus d'obtention des produits finis à haute valeur ajoutée constitue un des domaines où les sciences du vivant sont susceptibles de trouver un aboutissement industriel. Dans le marché très convoité des arômes et des parfums, les bioconversions permettent de produire des composés possédant le label « naturel », à la plus-value commerciale indéniable. Les synthèses chimiques existantes souffrent des problèmes technologiques et scientifiques considérables qui sont difficiles à surmonter, tels que la réduction de la consommation d'énergie, et le respect des exigences légales strictes sur les émissions de produits dangereux [2].

Les principaux avantages de l'utilisation de la bioconversion microbienne par rapport à la synthèse chimique comprennent le fait que ce procédé peut être réalisé dans des conditions douces, générant des déchets moins toxiques, et les réactions ont lieu dans des conditions acceptables sur le plan écologique, qui réduisent l'impact environnemental [2].

Les terpènes font partie de ces précurseurs renouvelables abondamment représentés dans la nature. On les trouve notamment en quantité importante dans les huiles essentielles extraites des plantes. Leur bioconversion peut également conduire à l'obtention des composés intéressants pour l'industrie des arômes et pour l'industrie pharmaceutique [2].

Le thymol appartient au groupe de monoterpènes monocycliques et il fait partie des huiles essentielles de plantes herbacées *Thymus vulgaris* [3]. La bioconversion du thymol 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.

L'objectif du présent travail est d'étudier les voies impliquées lors de la bioconversion et la biodégradation du thymol par deux souches bactériennes à savoir *Paenibacillus popilliae* 1 C et *Streptomyces rochei* AB1 et. Dans un comparatif, nous avons étudié sa photodégradation par lumière UV et des rayons césium à haute énergie ^{137}Cs .

Cette étude comporté deux parties principales :

- La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique dans laquelle nous présentons les concepts généraux de la bioconversion, suivi des différents travaux de bioconversion des métabolites secondaires par *Bacillus*, *streptomycètes* et par d'autres microorganismes. Ensuite, nous décrivons l'étude chimique et bioconversion du thymol par différentes microorganismes. Enfin, la Processus de biodégradation et quelque travaux de biodégradation des métabolites secondaires par les microorganismes.
- La seconde partie est réservée à une étude expérimentale qui a pour objectif, la bioconversion et la biodégradation du thymol par *Paenibacillus popilliae* 1C et *Streptomyces rochei* AB1. Elle porte également sur la photodégradation du thymol par lumière UV et rayon de césium 137Cs. Nous complétons le travail par des analyses chimiques par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

PARTIE I

Synthèse bibliographique

I.1 Introduction

Les terpènes constituent une source principale des composés aromatiques que l'on trouve dans les huiles essentielles et les plantes supérieures.

La bioconversion des terpènes est intéressante car elle permet la production d'arômes et de parfums énantiomères pures dans des conditions de réaction douces. Les produits fabriqués par des procédés de bioconversion peuvent être considérés comme naturels.

La synthèse bibliographique est consacrée à l'action des microorganismes sur les terpènes et la possibilité de bioconversion de ces composés par différents types de microorganismes dans des conditions d'aérobiose. Nous présentons également certains travaux effectués sur *Bacillus* et *Streptomyces* utilisées comme bactéries modèles. Les travaux sur le métabolisme microbien du thymol, comme molécule modèle, les voies métaboliques et les produits principaux formés sont également discutés. Nous présentons également la définition, les types et principes de biodégradation, et la biodégradation du métabolite secondaire par les microorganismes.

I.2 Bioconversion (Biotransformation)

I.2.1 Processus de bioconversion : description, avantages et inconvénients

Les bioconversions (biotransformations) également appelées transformations microbiennes, peuvent être définies comme étant l'utilisation d'un catalyseur biologique pour convertir un substrat ou précurseur en un produit donné selon un nombre limité d'étapes enzymatiques [4].

La bioconversion constitue un outil efficace pour la modification structurale des composés naturels et synthétiques bioactifs pour synthétiser de nouveaux composés. Dans ce cadre, une molécule est modifiée par la transformation de ses groupes fonctionnels avec ou sans la dégradation de son squelette carboné. Ces modifications conduisent à la formation des composés bioactifs nouveaux et utiles qui ne sont pas faciles à préparer par des méthodes chimiques [4].

La synthèse chimique se traduit souvent par des procédés de production nocifs pour l'environnement et manque souvent de sélectivité de substrat, ce qui provoque éventuellement la formation des mélanges réactionnels indésirables et augmente les coûts en aval, en ce sens, les biocatalyseurs peuvent être en mesure d'offrir plusieurs avantages par rapport à la voie classique [5-6].

Les bioconversions comparées à des réactions chimiques ont l'avantage incontestablement de générer moins de déchets, d'utiliser des conditions écologiques acceptables et d'être régio et stéréo-sélectives, ce qui conduit à des produits de forme énantiomérique de grande importance dans les domaines pharmaceutique et agroalimentaire. Elles sont également très efficaces en termes d'énergie puisqu'elles peuvent avoir lieu à des températures, pression et pH modérés. La production des composés est généralement simplifiée par un nombre d'étapes plus restreints [2]. 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 [2].

Les biotransformations des monoterpènes sont communément reconnues comme étant très intéressantes économiquement mais difficiles à réaliser par des procédés conventionnels. Ce phénomène est essentiellement lié aux propriétés physico-chimiques de ces molécules [2]. Ce sont en effet des composés relativement instables, surtout dans les milieux aqueux et oxygénés. Ils peuvent subir facilement un nombre important de réactions chimiques spontanées comme l'autooxydation, l'isomérisation, la racémisation, l'hydratation, la cyclisation ou encore le réarrangement ou la polymérisation [2]. Ces phénomènes abiotiques peuvent d'une part entrer en compétition avec la réaction biologique, entraînant ainsi une diminution du rendement de bioconversion et peuvent d'autre part générer chimiquement les produits de la bioconversion, ce qui brouille l'estimation de son efficacité réelle. Enfin, les produits de bioconversion eux-mêmes peuvent être la cible de réactions abiotiques [2].

I.2.2 Biocatalyseurs

Le biocatalyseur employé peut être une cellule entière d'origine animale, végétale ou microbienne. 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 des 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 [7-8].

I.3 Bioconversion par les microorganismes

L'utilisation des microorganismes entiers permet de réaliser des transformations complexes sollicitant un ensemble d'enzymes, toutefois, il est difficile d'obtenir des résultats satisfaisants lorsque deux enzymes purifiées sont présentes dans le même milieu de bioconversion [2].

La bioconversion microbienne est une combinaison de réactions biochimiques, permettant de transformer les structures des produits phytochimiques et des composés organiques, en exploitant des micro-organismes et leurs enzymes isolées, de développer une variété de constituants utiles, par des réactions régio-stéréo-sélectivité [9].

Deux voies peuvent être utilisées. Dans la première, le substrat est ajouté directement au milieu de croissance au bout d'un temps déterminé de culture. La deuxième technique conduit à la séparation de la biomasse du milieu de croissance par filtration ou centrifugation suivie d'une remise en suspension dans un nouveau milieu réactionnel, conventionnel ou non, où elle sera utilisée pour convertir le substrat [2]. Le succès de ces techniques de bioconversion passe par une connaissance accrue des propriétés et des possibilités métaboliques du microorganisme utilisé. Il est donc primordial de sélectionner ce dernier avec soin [2].

I.3.1 Bioconversion des métabolites secondaires par *Bacillus*

I.3.1.1 Généralités sur le genre *Bacillus*

Les *Bacillus* sont des bactéries aérobies ou aéro-anaérobies facultatives formant des endospores. Depuis la découverte de la bactérie (1913), la possession d'une spore a été utilisée comme une clé dans la classification. Les caractéristiques distinctives entre les membres du genre *Bacillus* et les autres bacilles sporulant sont la nature aérobie stricte ou facultative, la forme bacillaire et la production de catalase. Le genre *Bacillus* a subi des changements taxonomiques considérables. Les premières tentatives de classification des espèces de *Bacillus* sont fondées sur deux caractéristiques: la croissance aérobie et la formation d'endospores [10].

I.3.1.2 Caractères bactériologiques

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles rectilignes à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (de 0,5 x 1,2 µm jusqu'à 2,5 x 10 µm), sporulés, à Gram positif ou à Gram variable (fréquemment, la coloration de Gram n'est positive que pour les très jeunes cultures) [11]. La classification de *Bacillus* est donnée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Position systématique de *Bacillus* [11].

Classification	
Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Bacillales</i>
Famille	<i>Bacillaceae</i>
Genre	<i>Bacillus</i>
Espèce	<i>Paenibacillus popilliae</i> 1C

I.3.1.3 Travaux antérieure de la bioconversion des métabolites secondaires par *Bacillus*

Les *Bacillus* sont réellement bien adaptées pour transformer les terpènes. En effet, leur faculté de se développer sur une large gamme des composés organiques comme source unique de carbone leur permet d'être largement représentés dans la nature [12]. Dans les dernières années, les travaux (tableau 2) sur la bioconversion par *Bacillus* présents dans les produits naturels ont constaté un intérêt particulier.

Tableau 2 : Bioconversion microbienne des métabolites secondaires par *Bacillus*

Microorganismes	Bioconversions	Produits	réf
<i>Bacillus subtilis</i>	(±)-Linalyl acetate	(+)-(<i>S</i>)-linalool (±)-linallyl acetate	[13]
<i>Bacillus cereus</i>	1,4-cineole	2α-hydroxy-1,4- Cineole 2β-hydroxy-1,4- Cineole	[14]

<i>Bacillus stearothersophilus</i> BR388	Limonene	Alcool perillyl Perillyl aldehyde α -terpineol	[15]
<i>Bacillus pallidus</i> BR425	α -pinene	Limonene Pinocarveol	[16]
<i>Bacillus fusiformis</i>	Isoeugenol	Vanilline	[17]
<i>Bacillus pumilus</i>	Isoeugenol	Vanilline	[18]

I.3.2 Bioconversion des métabolites secondaires par *Streptomyces*

I.3.2.1 Généralités sur le genre *Streptomyces*

Le mot *Streptomyces* regroupe tous les membres du genre *Streptomyces*, c'est le genre d'actinomycètes le plus abondant et surtout le plus performant dans la production des métabolites secondaires importants (surtout les antibiotiques).

Les *Streptomycètes* sont des organismes procaryotes, aérobies, à coloration de Gram positive, chimioorganotrophes, catalase positive qui appartiennent à l'ordre des actinomycetales de la classe actinobacteria [19]. Comme la majorité des microorganismes du sol, la plupart des *Streptomyces* se comportent en bactéries mésophiles (avec une croissance maximale à une température varie entre 25°C à 30°C) et neutrophiles (croissance entre pH 5 et 9 avec un maximum autour de la neutralité) [20]. Ces bactéries présentent un grand intérêt industriel. Elles sont à l'origine de la grande majorité des antibiotiques utilisés en thérapie humaine et vétérinaire. Le métabolisme secondaire se met en place dans les étapes tardives du développement morphologique des *Streptomyces*. La classification de *Streptomyces* est donnée dans le tableau 3.

Tableau 3 : Position systématique de bactérie *Streptomyces* [20].

Classification	
Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Actinobacteria</i>
Classe	<i>Actinobacteria</i>
Ordre	<i>Actinomycetales</i>
Famille	<i>Streptomycetaceae</i>
Genre	<i>Streptomyces</i>
Espèce	<i>Streptomyces rochei</i> AB1

I.3.2.2 Travaux antérieur de la bioconversion des métabolites secondaires par *Streptomyces*

Le genre *Streptomyces* est le genre d'actinomycètes le plus abondant et surtout le plus performant dans la bioconversion des métabolites secondaires importants.

Les principaux travaux de la bioconversion des métabolites secondaires par les souches de *Streptomyces*, sont regroupés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Bioconversion microbienne des métabolites secondaires par *Streptomyces*.

Microorganismes	Bioconversions	Produits	Réf
<i>Streptomyces</i>	(R)-(-)-linalool	Trans- furanoid linalool oxide	[21]
<i>ikutamanensis,</i>	(R)-(+)-linalool	Cis-furanoid linalool oxide	
<i>Streptomyces</i>	Cumin aldehyde	Cumin alcohol	[21]
<i>ikutamanensis</i>		Cuminic acid	
<i>Actinomycetes</i>	Thymol methyl ether	9-hydroxythymol	[22]
<i>Streptomyces</i>		Methyl ether	
<i>humidus</i>		7-hydroxy- methyl ether	

<i>Streptomyces bottropensis SY-2-1</i>	(-)-trans-carveol (-)-cis-carveol	(+)-bottrospicatol (-)-5 β -hydroxy-cis-carveol (+)-isobottrospicatol	[23]
<i>Streptomyces bottropensis SY-2-1</i>	(+)-trans-carveol	(+)-carvone (+)-carvone-8,9-epoxide (+)5ahydroxycarvone	[24-25]
<i>Streptomyces bottropensis SY-2-1</i>	1,8-cineole	(+)-2 α -hydroxy-1,8-cineole (+)-3 α -hydroxy-1,8-cineole	[26-27]

I.3.3 Bioconversion des métabolites secondaires par d'autres microorganismes

L'importance de la bioconversion est expliquée par le nombre de travaux très importants, publiés durant les dernières années. Le tableau 5 regroupe les principaux travaux de bioconversion utilisant divers types de microorganismes.

Tableau 5 : Bioconversion microbienne des métabolites secondaires par divers microorganismes

Microorganismes	Bioconversions	Produits	Réf
<i>Aspergillus niger ATCC 9142</i>	Linalool	Pyranoïde linalool oxyde	[28]
<i>Pseudomonas spp</i>	(R)-(+)- β -citronellol	(+)-cis-Rose oxide (+)-trans-Rose oxide	[29]
<i>Streptomyces A-5-1</i>	(-) carvone	(-) trans carveol	[30]
<i>Nocardia 1-3-11</i>	R- carvone	(-) cis carveol	[30]
<i>Pseudomonas sp.</i>	β -Pinene α - Pinene	Carvone	[31]

<i>Pseudomonas sp. TK2102</i>	Eugenol	Vanillin	[32]
<i>Aspergillus niger</i>	(+)-Carvone	(-)-Isodihydrocarvo	[33]
<i>Pseudomonas sp.</i>	p-cymene	Cumic acid	[31]
<i>Pseudomonad</i>	(+)-limonene	(+)-carvone (+)-1-p menthene- 6,9-diol (+)-cis-carveol	[34]
<i>Cutworm Spodoptera litura</i>	(-)-Citronellene	(3R)-3,7-dimethyl-6-octene- 1,2-diol (3S)-3,7-dimethyl-6-octene- 1,2-diol	[35]
<i>Aspergillus niger</i>	(-)-Carvone	(+)-Dihydrocarvone	[33]
<i>Pseudomonas convexa</i>	Citral	Geranic acid	[36]
<i>Pseudomonas Fluorescens NCIMB 11671</i>	α -pinene	α -pinene oxide	[37]
<i>Streptomyces ikutamanensis</i>	1,8-cineole	(+)-3 α -hydroxy-1,8-cineole (+)-3 β - hydroxy-1,8-cineole (+)-3-oxo-1,8-cineole	[26]
<i>Aspergillus cellulosa M-77</i>	(-)-menthol	4 β -hydroxymenth Predominantly	[38]
<i>Aspergillus niger TBUYN-2</i>	(+)-limonene (+)-carvone	(+)-8-p-menthene-1,2-trans- diol	[39]
<i>Rhodococcus erythropolis DCL 14</i>	(S)-limonene	(-)-trans-carveol	[40]

I.4 Bioconversion du thymol

I.4.1 Etude chimique de thymol

Le thymol (5-méthyl-2-(propan-2-yl)-phénol) de la formule brute $C_{10}H_{14}O$ et une masse moléculaire de 150,22 g/mol [3]. Le thymol est une molécule naturelle extraite de l'huile essentielle de plantes, notamment le thym. Le thymol est un terpène qui fait partie de la famille des monoterpènes, lipophile et volatil. Il n'est pas dangereux pour l'homme aux doses rencontrées, mais peut altérer le goût du miel [3]. Le thymol est vendu sous forme de cristaux incolores avec une odeur caractéristique [3].

Le thymol est naturellement synthétisé dans les plantes avec deux unités d'isopréniques qui elles-mêmes sont obtenues par la voie de l'acide mévalonique à partir du coenzyme A [3]. Il peut aussi être synthétisé de manière chimique par une alkylation du m-crésol avec de l'isopropanol et du propylène [3].

I.4.2 Utilisation de thymol

Dès l'Égypte ancienne, le thymol était utilisé pour la conservation des momies. En Grèce antique, le thym était utilisé pour ses qualités aromatiques et brûlé au sein des temples sacrés. Depuis toujours, le thym est un symbole de courage et d'admiration. Aujourd'hui, le thymol entre dans la composition des différents médicaments grâce à ses propriétés antibactérienne, antiseptique et antifongique [3].

I.4.3 Bioconversion du thymol par différentes microorganismes

La bioconversion du thymol 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. La gamme de microorganismes qui participe à la bioconversion du thymol est large. En effet des nombreux travaux ont permis de mettre en évidence leur bioconversion en terpénoïdes par différents microorganismes. Le tableau 6 décrit les principales voies de bioconversion du thymol par des souches bactériennes.

Tableau 6 : Bioconversion microbienne du thymol

Microorganismes	Bioconversions	Produits	Réf
<i>Aspergillus niger</i>	Thymol	3-methylcyclohexanol	[41]
<i>Eucalyptus perriniana</i>	Thymol	5-methyl-2-(1-methylethyl) phenyl β-D glucopyranosid. 5-methyl-2-(1-methylethyl) phenyl 6-O-(β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosid	[42]
<i>Genera Nocardia</i>	Thymol	2-isopropyl-5-methylbenzene-1,4-diol	[43]
<i>Mycobacterium</i>	Thymol	5-hydroxymethyl-2-isopropylphenol	[43]
<i>Colletotrichum acutatum</i>	Thymol	Thymyl methyl ether	[44]
<i>Botryodiplodia theobromae</i>	Thymol	Thymyl acetate	[44]
<i>Streptomyces humidus</i>	Thymol	(1R, 2S) -2-hydroxy-3-p-menth-5-one. (1R, 2R) -2-hydroxy-3-p-menth-5-one.	[45]
<i>Pseudomonas</i>	Thymol	6-hydroxy-thymol, 7-hydroxy-thymol, 7,9-hydroxythymol, 9 –dihydroxy-thymol,	[46]

		Thymol-7-oic acid, Thymol-9-oic acid	
--	--	---	--

Les deux planches 1 et 2 regroupent les différentes étapes, et mécanismes de la bioconversion du thymol par les différents microorganismes après que les produits obtenus.

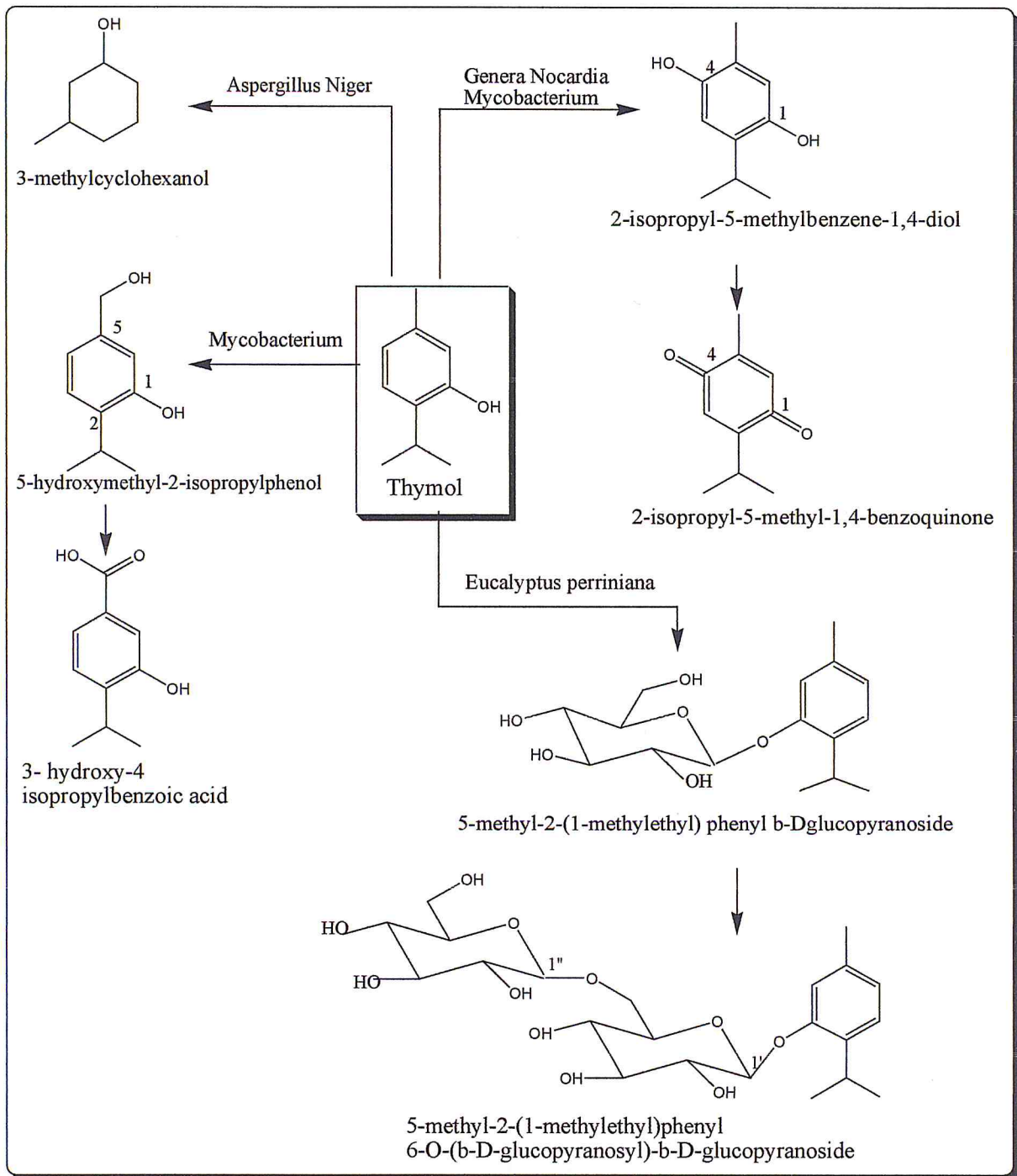


Planche 1: Voies métaboliques de bioconversion du thymol

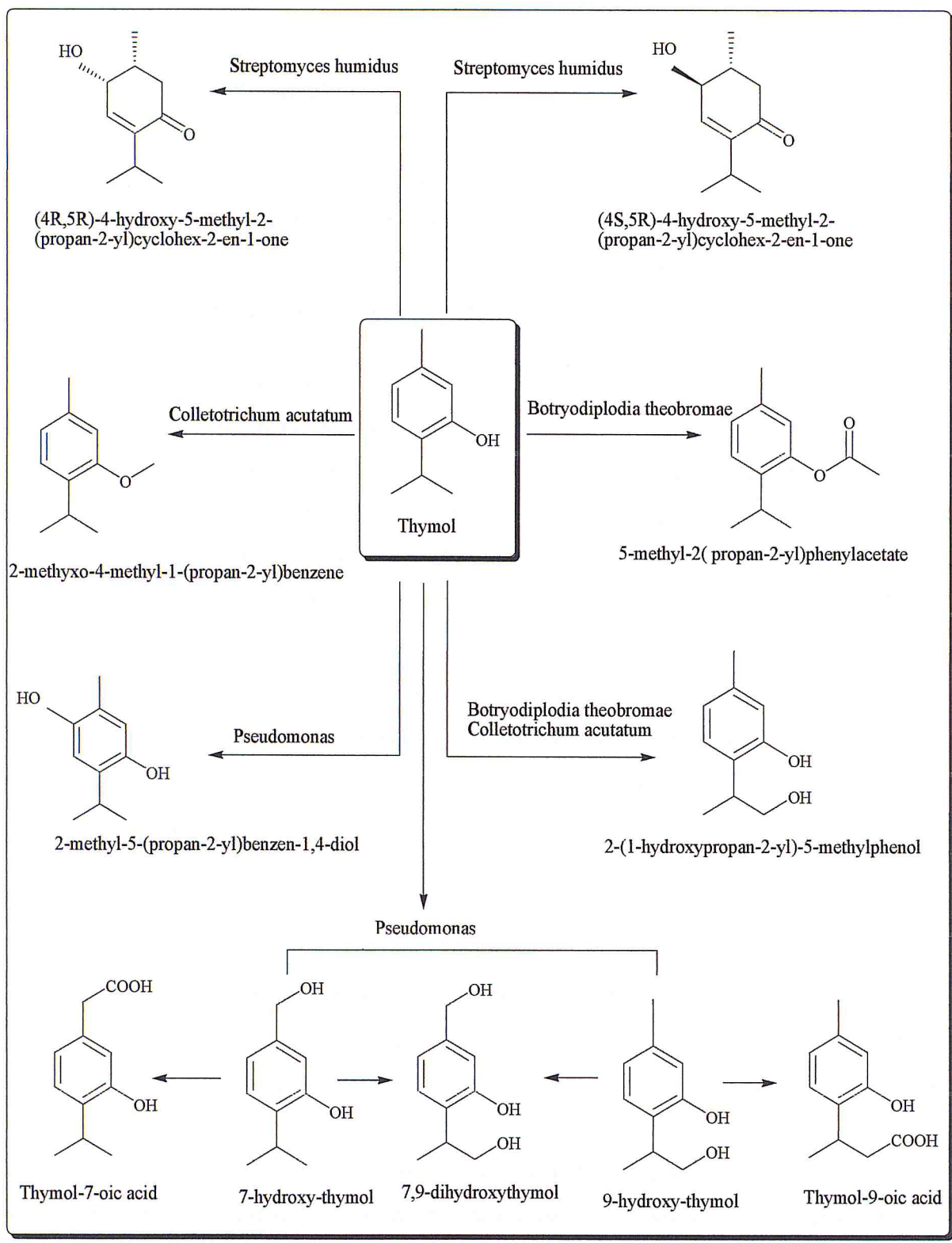


Planche 2: Autres voies métaboliques de bioconversion du thymol

I.5.4 Biodégradation du métabolite secondaire par les microorganismes

La biodégradation des métabolites secondaires par les microorganismes est moins étudiée.

Les planches 3, 4, 5 et 6 regroupent les différentes étapes, et mécanismes de la biodégradation des métabolites secondaires par les différents microorganismes avant que les produits obtenus.

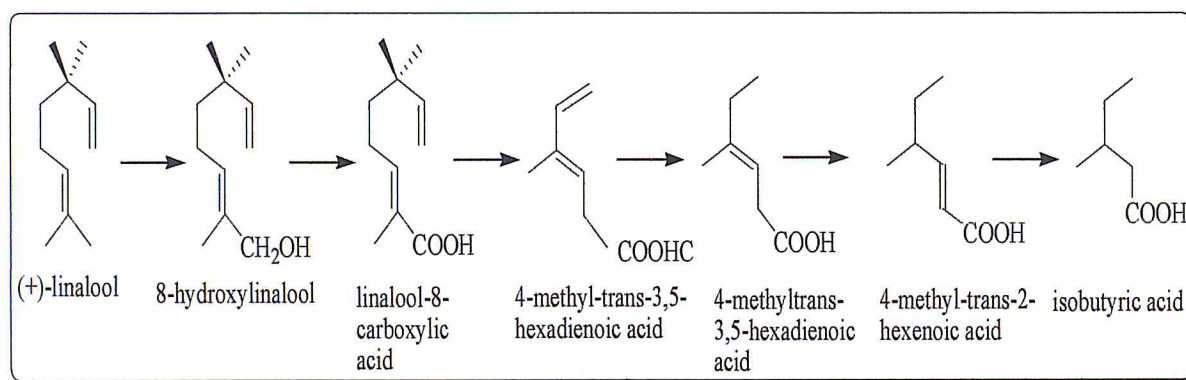


Planche 3 : Biodégradation du (+)-linalool par *Pseudomonas pseudomallei* [50].

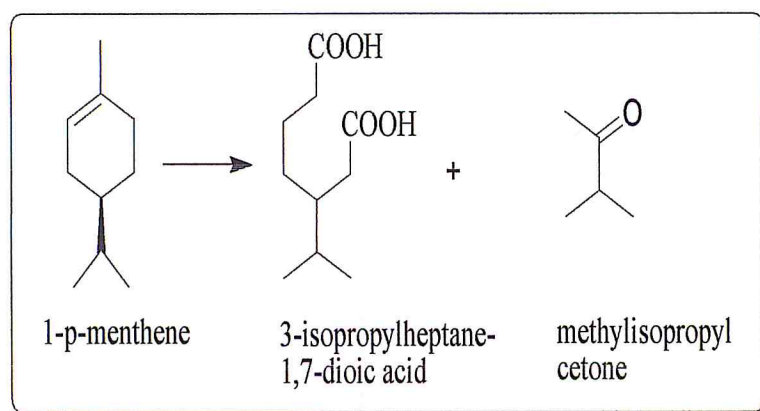


Planche 4: Biodégradation du 1-p-menthene par *Pseudomonas sp. strain (PL)* [51].

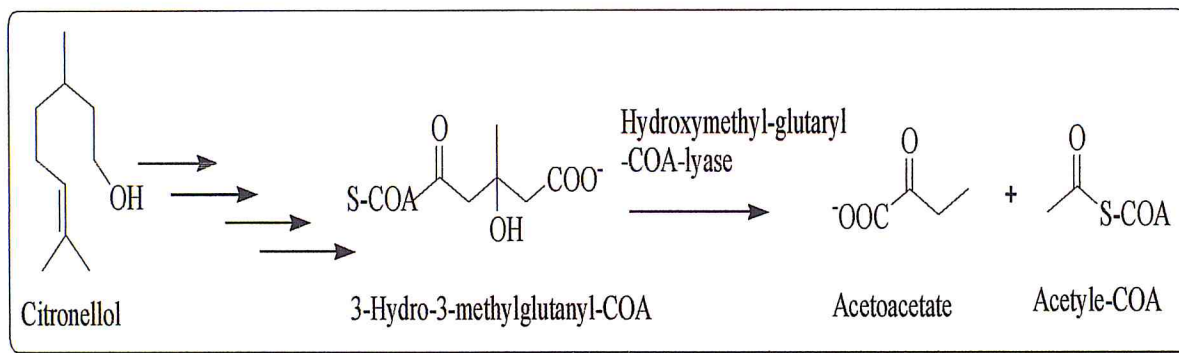


Planche 5: Biodégradation du citronellol par *Pseudomonas citronellolis* [52].

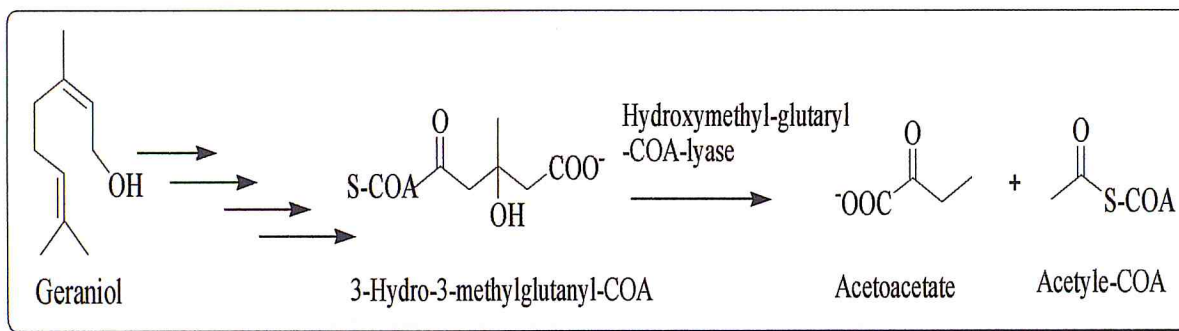


Planche 6: Biodégradation du géranol par *Pseudomonas citronellolis* [52].

PARTIE II

Etude expérimentale

II.1 Introduction

Notre travail expérimental s'intègre dans un large domaine de recherche. Il porte d'une part, sur l'étude de la bioconversion et la biodégradation d'un composé terpénique, en l'occurrence le thymol, par deux souches bactériennes à savoir *Paenibacillus popilliae* 1 C et *Streptomyces rochei* AB1 et, d'autre part, sur sa photodégradation par différents types des rayonnements, a été également réalisé.

Le travail expérimental comprend quatre étapes :

- Analyses préliminaires par CCM, IRTF et CG/SM pour la vérification de la pureté du thymol ;
- Détermination de la concentration assimilable non inhibitrice pour la bioconversion et la biodégradation;
- Bioconversion et biodégradation du thymol par deux souches bactériennes *Paenibacillus popilliae* 1 C et *Streptomyces rochei* AB1;
- Photodégradation du thymol par lumière UV et par des rayons césium à haute énergie;
- Analyses par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse des 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.

II.2 Matériel et méthodologie expérimentale

II.2.1 Analyses chimiques préliminaires du thymol

Les analyses préliminaires par chromatographie sur couche mince, spectrométrie infrarouge a transformée de Fourier et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ont été effectuées de le but de vérifier la pureté du thymol.

II.2.1.1 Analyse préliminaire par chromatographie sur couche mince

L'analyse par chromatographie sur couche mince a été réalisée sur une plaque d'aluminium recouverte de gel de silice Si 60 Mesh/F254 de type Merck. L'échantillon a été utilisé à une concentration de 5mg/mL dans le dichlorométhane. L'analyse a été effectuée par élution avec le système binaire : hexane / acétate d'éthyle (v/v : 70/30). La révélation a été réalisée avec l'acide sulfurique, suivie du chauffage de la plaque.

II.2.1.2 Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

L'analyse a été effectuée par un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) de marque Bruker type Tensor 27, équipé d'un détecteur de type sulfate triglycine deutéré DTGS, d'un rayonnement laser, d'une séparatrice de radiation en KBr et d'une fente type global. L'acquisition des spectres a été effectuée avec une résolution de 4 cm⁻¹ et un nombre de scan de 5 scans.

L'analyse IRTF a été réalisée en phase solide sur un échantillon conditionnée en pastille de KBr. La technique de pastille en bromure de potassium (KBr) est la plus couramment utilisée pour la préparation d'échantillons solides pour des analyses infrarouge. Un mélange homogène de 2 mg du thymol et 50 mg de bromure de potassium a été préparé puis finement broyé. Il a été déposé dans un moule puis soumis à une très forte pression. Il est ensuite extrait du moule sous la forme d'une pastille.

II.2.1.3 Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

- **Description de l'appareil**

L'analyse qualitative du thymol a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse « CG-SM ». 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 91%.

- **Conditions opératoires d'analyse par CG/SM**

L'analyse a été effectuée sur un chromatographe de type HP 6800 couplé à un spectromètre de masse de type HP MSD 5973, dans les conditions suivantes :

- L'échantillon de thymol est dilué dans l'acétate d'éthyle à 5mg/mL.
- Une colonne capillaire de type HP5 (polydiméthylsiloxane 100%), de longueur 30 m d'un diamètre interne de 0.25 mm et une épaisseur du film de 0.25 µm.
- Un gaz vecteur (hélium) d'un débit de 0.3 mL/mn.
- Analyse en mode Scan (34 à 450 amu) avec une température d'interface 280 °C.
- Ionisation par Impact électronique (IE).
- Analyseur : Quadripôle, avec la température de Source = 230°C.
- La programmation du four est : 100°C -5°C -220°C.
- Injection d'une quantité de 1 µl en mode Splitless : 1/90 à la température de 250 °C.

II.2.2 Bioconversion et la biodégradation du thymol

II.2.2.1 Origine des souches utilisées

Les souches bactériennes *Paenibacillus popilliae* 1 C ATCC 14706(AF071861) (Figure 1(b)), et *Streptomyces rochei* AB1 (GU434672) (Figure 1(a)) utilisées dans notre étude, ont été isolées et identifiées dans le cadre des travaux de recherche du Laboratoire de Chimie de Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSN-BioM) de l'Université de Blida 1 et Laboratoire de Bioprocédés Environnementaux du centre de Biotechnologie Sfax (Tunisie), (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., et La souche AB1 a été isolée à partir d'un sol humide de la région de Boufarik (Mitidja) en mars 2007 [53-54].

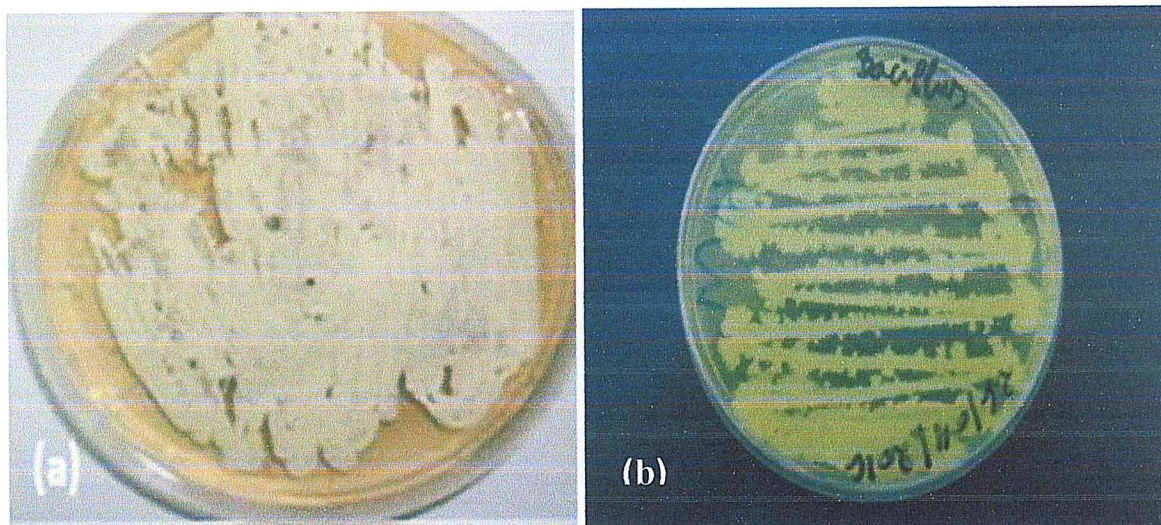


Figure 1 : (a) *Streptomyces strain AB1*; (b) *Paenibacillus popilliae 1 C*

II.2.2.2 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 de substances qui favorisent la multiplication des microorganismes.

Cinq milieux de culture liquides ont été utilisés à savoir LB, MM, ISP2, ISP9 riche et ISP9 pauvre. La composition chimique des différents milieux est donnée ci-après :

- **Milieu luria –bertani (LB) :** 5 g Extrait de levure, 10 g Peptone, 5 g NaCl, dans 1L l'eau distillée.

Milieu strictement minéral (MM) : 0,1 g Extrait de levure, 0,4 g NH_4Cl , 0,3 g K_2HPO_4 , 10 g NaCl, 0,33 g $\text{MgCl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g $\text{CaCl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$. Le milieu est additionné par 1 mL d'une solution d'éléments traces métalliques (EMT) qui contient par litre : 0,64 g $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,11 g $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,79 g $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,15g $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans 1L l'eau distillée.

- **Milieu international streptomyces project 2 (ISP2) :** 4 g Extrait de levure, 10 g Extrait de malte, 4 g Glucose, dans 1 L L'eau distillée.
- **Milieu international streptomyces project 9 (ISP9) riche :** 10 g Glucose, 2,84 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,38 g KH_2PO_4 , 5,65 g $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1g $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mL d'EMT, dans 1L l'eau distillée.
- **Milieu international streptomyces project 9 (ISP9) pauvre :** 10 g Glucose, 2,84 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,38 g KH_2PO_4 , 5,65 g $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1 g $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mL d'EMT, dans 1L l'eau distillée.

Tous les milieux solides sont additionnés avec 20 g/L d'agar. Le pH est ajusté à 7,2 par la solution de NaOH 0.1 N puis les milieux sont autoclaves à 120 °C pendant 20 min (Annexe (a)).

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.

Le repiquage des souches se fait par prélèvement d'un fragment de colonie à l'aide d'une pipette Pasteur stérilisée à la flamme. Ce fragment est ensemencé à la surface d'une boîte de Pétri contenant un des milieux de culture. Ces boîtes sont incubées à 45°C pendant 48 h pour *Paenibacillus popilliae* 1C et 30 °C pendant 72 h pour *Streptomyces rochei* AB1.

II.2.2.4 Préculture

La préparation des précultures est une étape consistant à réactiver la souche conservée au réfrigérateur, elle précède chaque expérience. Les précultures ont été préparées dans 100 mL du milieu contenu dans des flacons de 250 mL, et inoculés à partir des cultures bactériennes de 24 h préservée au réfrigérateur. Les flacons sont alors incubés à 45°C pendant 24 h pour *Paenibacillus popilliae* 1C et à 30 °C pendant 72h pour *Streptomyces rochei* AB1.

II.2.2.5 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.

→ Principe de la méthode

La technique consiste à déposer des disques stériles de 9 mm de diamètre imprégnés d'une concentration connue du substrat testé sur un milieu de culture coulé en boîte de pétri, et inoculée au préalable par la suspension bactérienne à étudier, puis incubé l'étuve. À la fin de la période d'incubation, si le substrat est efficace, une zone pâle apparaît autour du disque, indiquant l'inhibition de la croissance microbienne, cette région s'appelle « zone d'inhibition

» ou « halo d'inhibition ». Plus le diamètre de cette zone d'inhibition est grand plus la souche est sensible au substrat, plus il est petit, plus la souche est résistante [55].

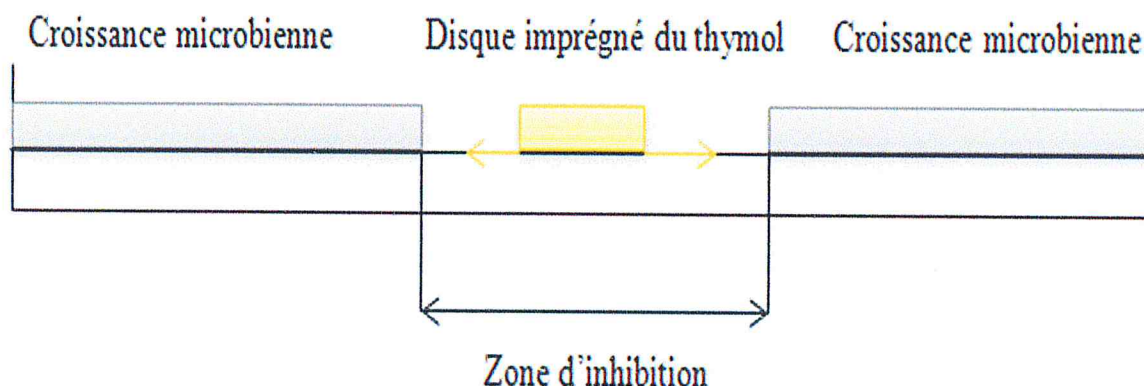


Figure 2 : Schéma simplifié du principe de la méthode de teste d'inhibition

→ Procédure générale

Les suspensions bactériennes de *Paenibacillus popiliae* 1C et *Streptomyces rochei* AB1 ont été préparées en prélevant 2 à 3 colonies bien isolées et identiques à partir d'une culture microbienne de 24 h et les introduire dans des tubes à essais contenant 9 mL d'eau physiologique stérile. Ils ont été par la suiteensemencées respectivement à la surface des milieux LB et ISP2 préalablement coulées dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre à raison de 15 mL par boîte.

Les disques absorbants ont été stérilisés et imbibés par différentes concentrations du thymol (0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL, 25 mg/mL) et déposés sur la surface du milieu de culture inoculée avec les deux bactéries testées. Notons que les différentes concentrations sont préparées par dilution du thymol dans le méthanol. Les boîtes de pétri étaient maintenues à 4°C pendant 4 heures afin de permettre une bonne diffusion du thymol dans le milieu, puis incubées à 45°C/24h pour *Paenibacillus popiliae* 1C et 30°C/72h pour *Streptomyces rochei* AB1.

II.2.2.6 Etude de la bioconversion et de la biodégradation du thymol

Les cultures bactériennes utilisées pour les études de la bioconversion et la biodégradation du thymol ont été réalisées en deux étapes : Une étape de pré-culture et une autre de culture. En effet, les flacons de pré-culture vont servir à inoculer celles destinées aux essais de bioconversion et biodégradation. Ces deux dernières se dérouleront dans les mêmes conditions à savoir la concentration du substrat, la durée et la température d'incubation, à l'exception du milieu de culture. Cependant, les milieux utilisés pour la bioconversion et la

biodégradation de *Paenibacillus popilliae* 1C sont respectivement le milieu LB et le milieu MM. Pour *Streptomyces rochei* AB1, les milieux de bioconversion et de biodégradation sont respectivement le milieu ISP9 riche et le milieu ISP9 pauvre.

- **Bioconversion et biodégradation par *Paenibacillus popilliae* 1C**

Une quantité 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 pour préculture. L'incubation a été réalisée à 45°C pendant 7 jours. Après incubation de 7^{ème} jour on ajoute une concentration de 1 mg/mL à partir une solution mère (préparée par dissolution de 1,5g du thymol dans 50 mL de l'eau stérile et 0.02 % de tween 80. La solution a été filtrée sur des filtres stériles de 0,45 µm de diamètre.) du thymol. Le mélange a été incubé à nouveau à 45°C pendant 7 jours en mode statique.

- **Bioconversion et biodégradation par *Streptomyces rochei* AB1**

Un (01) mL de préculture a été inoculé dans un flacon de 250 mL contenant 50 mL de milieu de culture. Une concentration de 2mg/mL du thymol a été ajoutée à la culture. Le mélange a été incubé à 30°C pendant 7 jours en mode statique.

II.2.2.7 Extraction liquide-liquide

Les cultures de chaque souche obtenues après 7 jours d'incubation ont été centrifugées à l'aide d'une centrifugeuse (Annexe (b)) de type HETTICH à 6000 tours/min pendant 45 min. A l'issue de cette étape, un surnageant et un culot sont obtenus pour chaque souche (Figure 3).

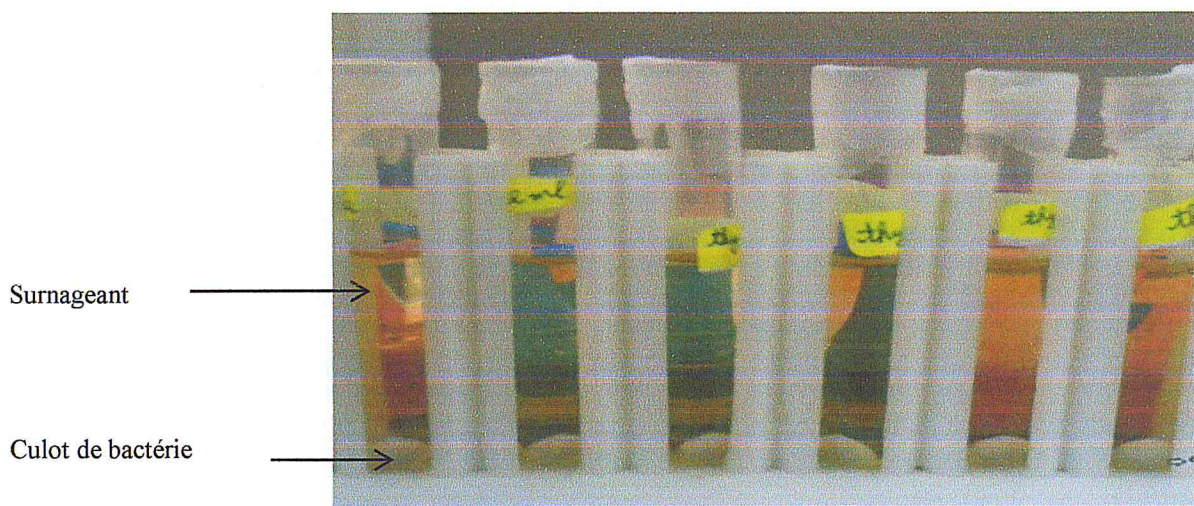


Figure 3: Centrifugation de culture bactérienne

Le culot bactérien a été éliminé (Figure 3) et le surnageant de culture a été récupéré puis soumis à une extraction liquide-liquide avec de l'éther diéthylique (1:1 ; v/v par rapport au volume du surnageant). Deux phases sont obtenues (Figure 4), une phase aqueuse et une phase organique. La phase organique a été séchée sur du sulfate de sodium, l'éther a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif (Annexe (c)) afin d'obtenir un produit réactionnel pur.

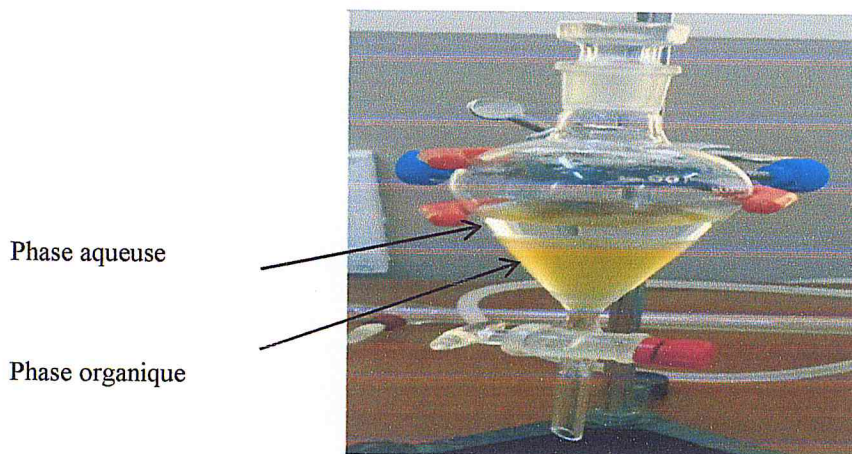


Figure 4 : Extraction du surnageant

II.2.3 Photodégradation du thymol

II.2.3.1 Etude de 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 thymol.

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

Une masse de 50 mg du thymol 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 Etude de la Photodégradation par des rayons de césium

Le principe global consiste en la dégradation du thymol par bombardement avec des rayons à haute énergie du type césium Cs 137 (élément radioactif) (Figure 5). Des masses de 100 mg, 20 mg et 50 mg du thymol ont été bombardées respectivement pendant 1 min, 5 min

et 10 min. Les échantillons obtenus ont été dissous dans l'acétate d'éthyle et analysés par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

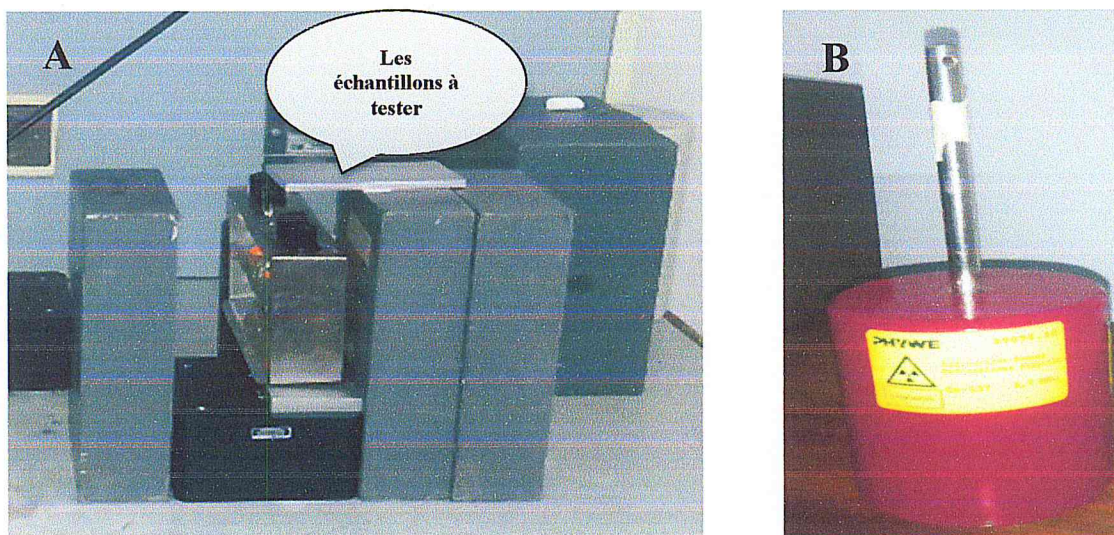


Figure 5 : A : Dispositif de photodégradation

B : Source des rayons Césium

II.2.4 Analyse par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la Spectrométrie de masse

Les différents échantillons obtenus par la bioconversion, la biodégradation et la photodégradation ont été soumis à des analyses 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 Résultat et discussion

II.3.1 Analyses chimiques préliminaires du thymol

II.3.1.1 Analyse préliminaire par chromatographie sur couche mince

L'analyse par chromatographie sur couche mince (Figure 6) montre l'apparition d'une seule tâche rose correspondant au thymol, dilué dans le dichlorométhane à une concentration de 5mg/mL et révélé par l'acide sulfurique. Cette tâche est caractérisée par le facteur de rétention ($R_f = 0,54$).

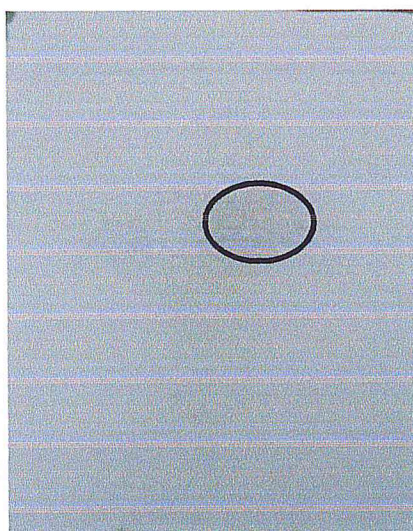


Figure 6 : Chromatographie sur couche mince du thymol

II.3.1.2 Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Le spectre IRTF du thymol préparé dans une pastille de KBr avec une masse de 2 mg est représenté par la figure 7.

L'examen du spectre infrarouge du thymol montre une bande large à 3232 cm^{-1} liée à l'élongation de la liaison O-H, des bandes intenses à 2965 et 2872 cm^{-1} représentant les groupements CH_2 et CH_3 . On peut constater aussi la présence d'une bande vers 1620 cm^{-1} caractéristique de $\text{C}=\text{C}$ aromatique. Une bande vers 1243 cm^{-1} caractéristique de la fonction C-O d'élongation. Le thymol présente également la bande à 1088 cm^{-1} correspondant à C-OH d'un alcool, et la bande de 946 cm^{-1} caractéristique de la fonction isopropyle.

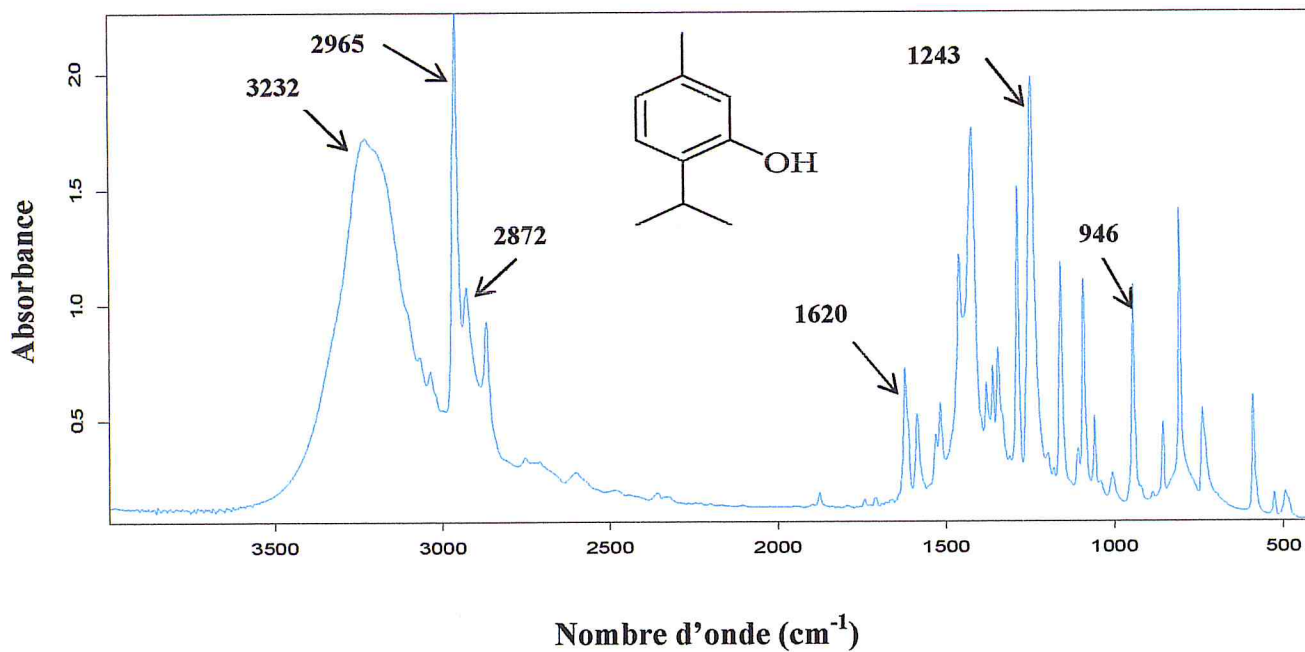


Figure 7 : Spectre IRTF d'absorbance de thymol

II.3.1.3 Analyse du thymol par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Une masse de 2 mg du thymol est dissoute dans 5 ml d'acétate d'éthyle, la solution est injectée dans les conditions citées ci-dessus II.2.1.3.

Le chromatogramme obtenu par CG/SM (Figure 8) révèle la présence d'un seul pic à 5,98 min. L'identification du composé réalisée en se basant sur les banques des données spectrales ainsi que sur les données de la littérature indique que ce pic est le thymol.

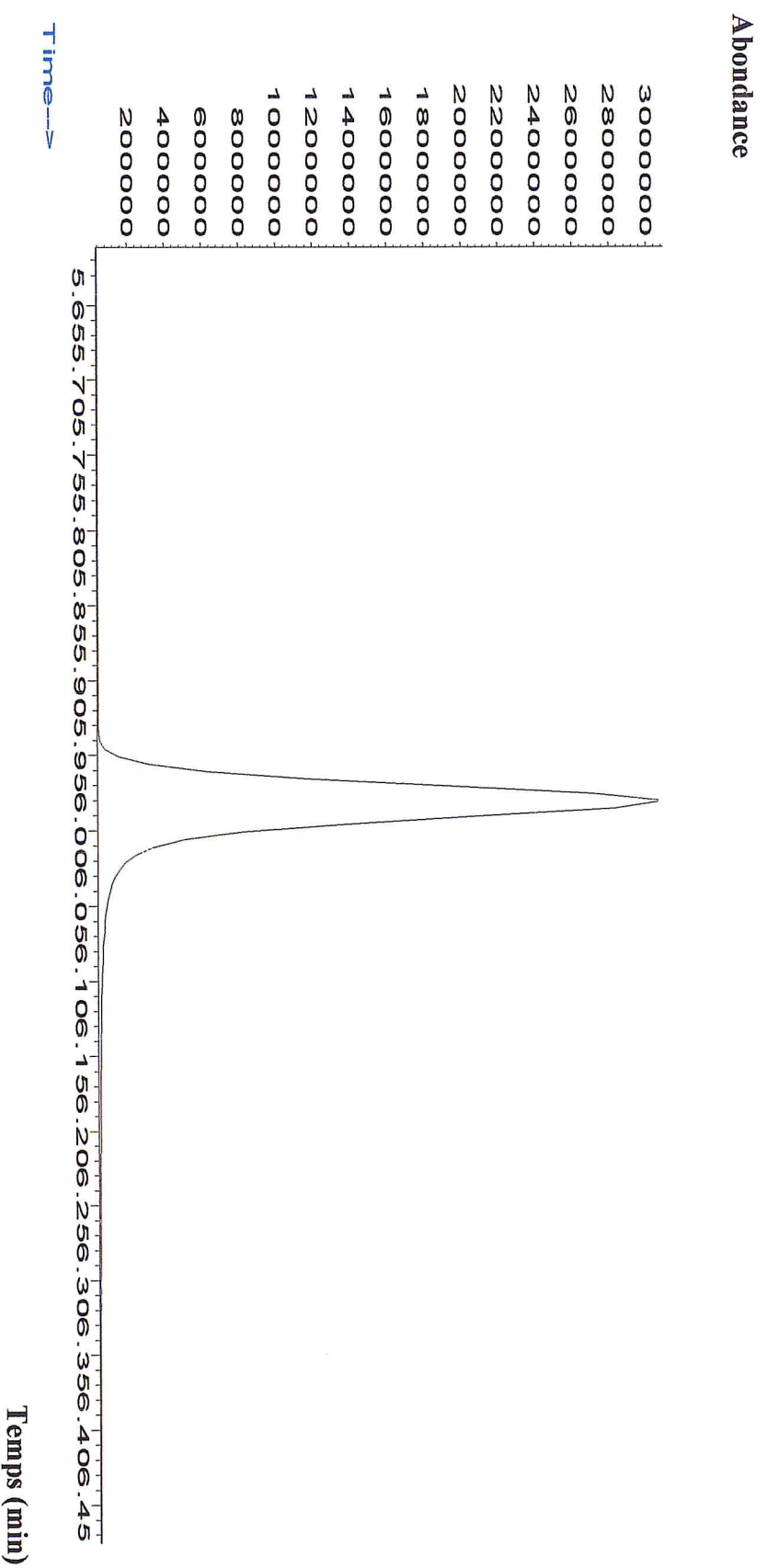


Figure 8 : Chromatographique d'analyse du thymol

Les différentes analyses montrent que le thymol utilisé dans notre étude expérimentale est de grade analytique.

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

L'effet de la concentration du thymol *vis-à-vis* de la croissance bactérienne de *Paenibacillus popilliae* 1C a été remarqué après 24h d'incubation par des zones d'inhibition correspondant à des anneaux transparents (Figure 9).

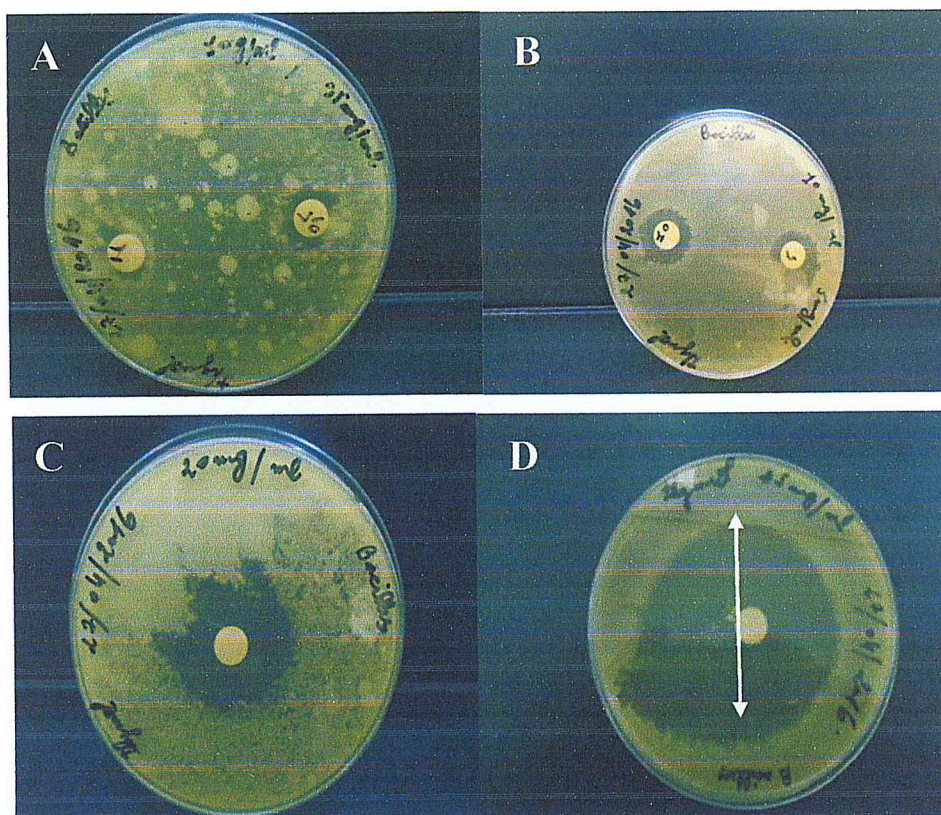


Figure 9: Effet de la concentration du thymol sur la croissance *Paenibacillus popilliae* 1C (A= 0,5 et 1mg/mL, B= 5 et 10mg/mL, C= 20mg/mL, et D= 25mg/mL).

Le tableau 7 résume les diamètres des zones d'inhibitions obtenues à différentes concentrations du thymol.

Tableau 7 : Diamètre (mm) des zones d'inhibition du thymol par *Paenibacillus popilliae* 1C

Concentration (mg/mL)	Diamètre (mm)	Sensibilité
0,5	0	-
1	0	-
5	17	+
10	20	+
20	33	+
25	54	+

(+) sensible, (-) résistant.

Nous constatons que la croissance bactérienne augmente avec l'augmentation de la concentration du thymol. La sensibilité de la souche vis-à-vis du thymol commence à une concentration de 5 mg/ml. Le diamètre le plus élevé a été obtenu à la concentration la plus élevée, soit 25 mg/ml. A des concentrations inférieures à 5 mg/ml, la souche n'est pas sensible.

L'étude de la sensibilité de *Streptomyces rochei* AB1 vis-à-vis du thymol a montré (Figure 10) une très faible sensibilité caractérisée par une concentration de 25 mg/ml.

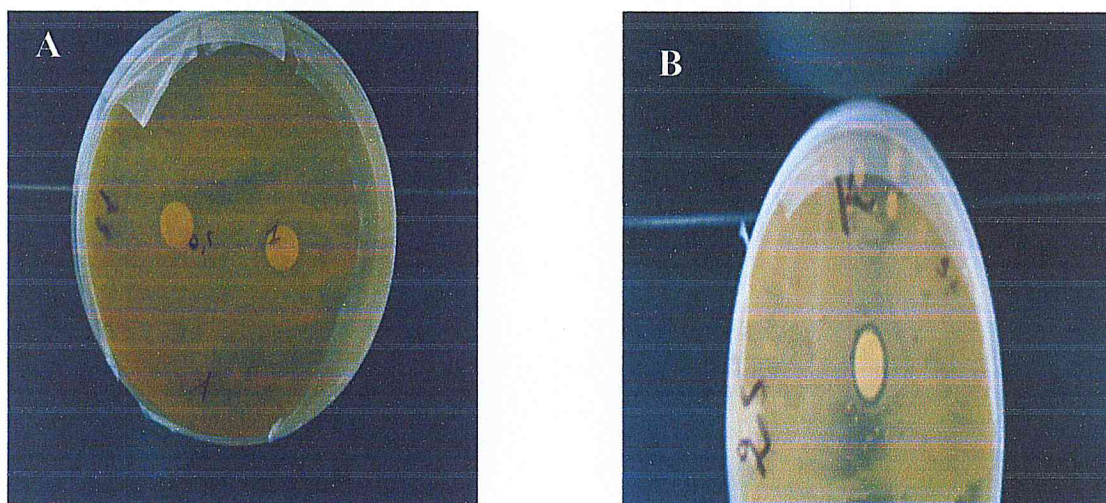


Figure 10: Effet de la concentration du thymol sur la croissance de *Streptomyces rochei* AB1 (A= 0,5 et 1mg/mL, B= 25 mg/mL).

On peut conclure que les deux concentrations 1 mg/ml et 2 mg/ml sont convenable à l'étude de la bioconversion et la biodégradation du thymol par *Paenibacillus popilliae* 1C et *Streptomyces rochei* AB1 respectivement.

II.3.3 Etude de la bioconversion et de la biodégradation du thymol

II.3.3.1 Rendement de la bioconversion et de la biodégradation

Les rendements de la bioconversion et de la biodégradation sont obtenus en utilisant la relation suivante :

$$R (\%) = M_{\text{finale}} / M_{\text{initiale}} \times 100 \%$$

R: Rendement de la bioconversion et biodégradation.

M_{finale} : Masse de la phase organique.

M_{initial}: Masse initial du thymol.

Les rendements de la bioconversion et de la biodégradation obtenus dans cette étude sont résumés dans le tableau 8.

Tableau 8: Rendements de la bioconversion et biodégradation

	Bioconversion	Biodégradation
<i>Paenibacillus popilliae</i> 1C	0%	—
<i>Streptomyces rochei</i> AB1	13%	13.8%

II.3.3.2 Analyse de la phase organique par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

- **Analyse des phases organiques obtenues par la bioconversion et la biodégradation du thymol par *Paenibacillus popilliae* 1C**

Nous avons constaté, en examinant le milieu de culture utilisé pour la biodégradation, une inhibition de la croissance bactérienne de la souche *Paenibacillus popilliae* 1C. 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 thymol comme source de carbone.

Par contre, dans le milieu utilisé pour la bioconversion, nous avons constaté une croissance bactérienne. L'analyse du profil chromatographique obtenu par CG/SM de la phase organique issue de la bioconversion et la biodégradation du thymol par la souche *Paenibacillus popilliae* 1C (Figure 11 A) a montré que le thymol (Figure 11 B) n'a subi aucune transformation. Ce résultat peut être interprété probablement par les conditions opératoires non optimisés ou que la souche utilisée ne peut effectivement pas transformer le métabolite étudié.

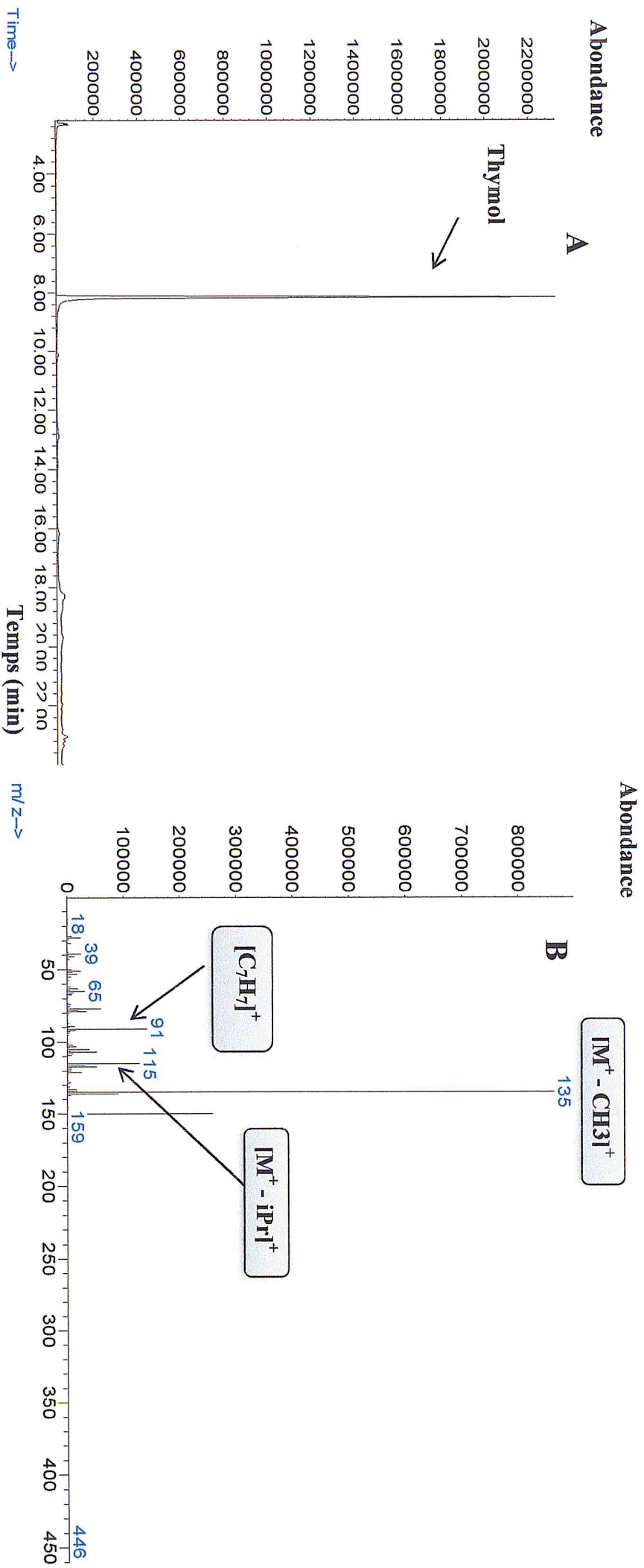


Figure 11: A : Profil chromatographique d'analyse de bioconversion et biodegradation du thymol par *Paenibacillus popilliae* 1C
B : Spectre de masse du thymol

- **Analyse des phases organiques de la Bioconversion et la biodégradation du thymol par *Streptomyces rochei* AB1**

Le profil chromatographique (Figure 12 A) obtenu par CG/SM des deux phases organiques issues de la bioconversion et la biodégradation (même profil) révèle la présence de deux pics ; l'un correspondant au thymol et l'autre au produit de bioconversion et/ou de biodégradation du thymol par *Streptomyces rochei* AB1 à un temps de rétention égal 5,86 min (Figure 12 B). L'identification de ce pic réalisée en se basant sur les banques de données spectrales Wiley 7n et NBS 75k.1 indique qu'il s'agit du menthol. Le spectre de masse du produit obtenu correspondant bel et bien au menthol (Figure 12 D).

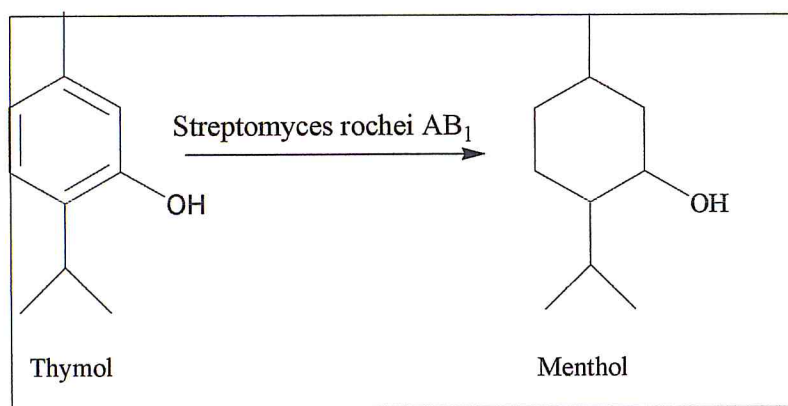


Planche 7 : Bilan de la réaction de bioconversion et biodégradation du thymol par *Streptomyces rochei* AB1

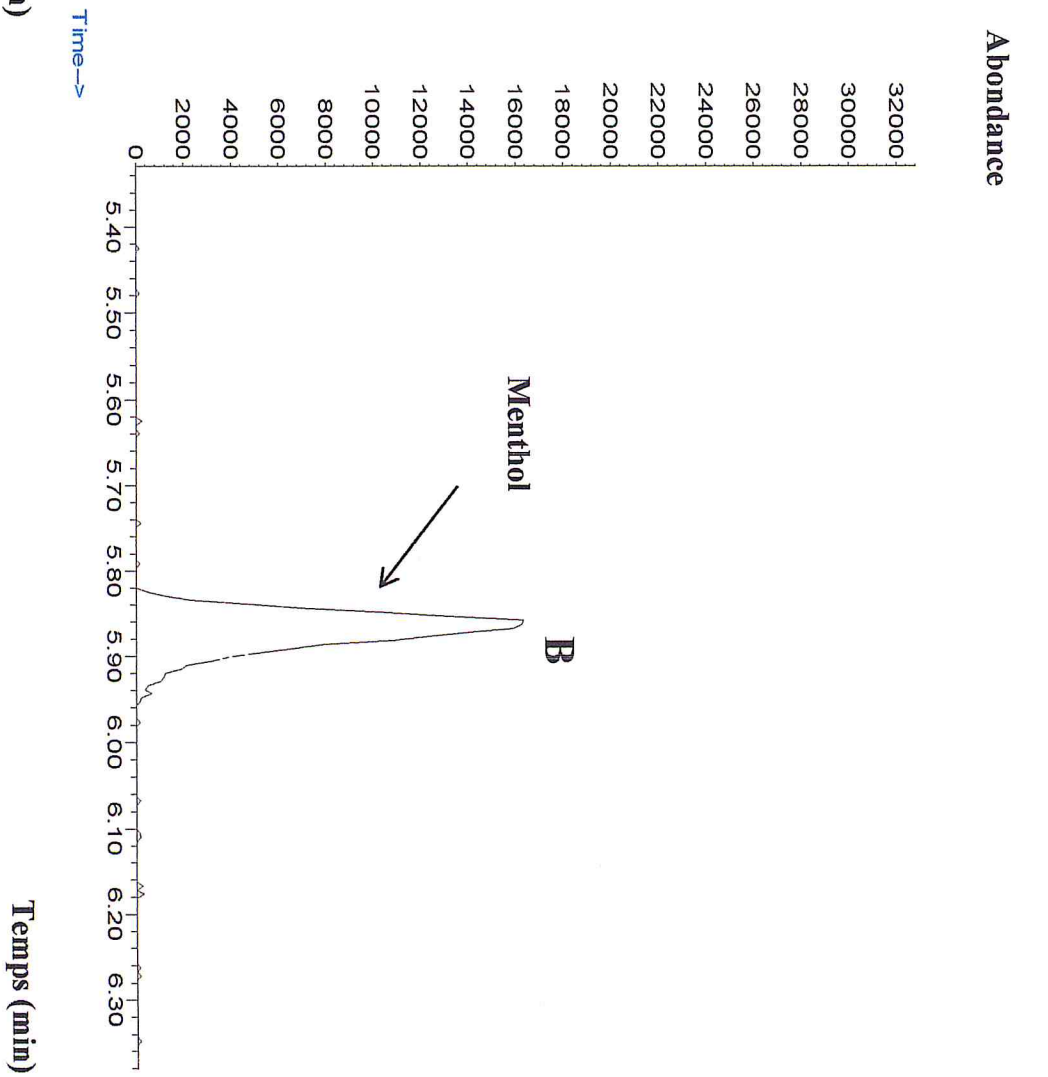
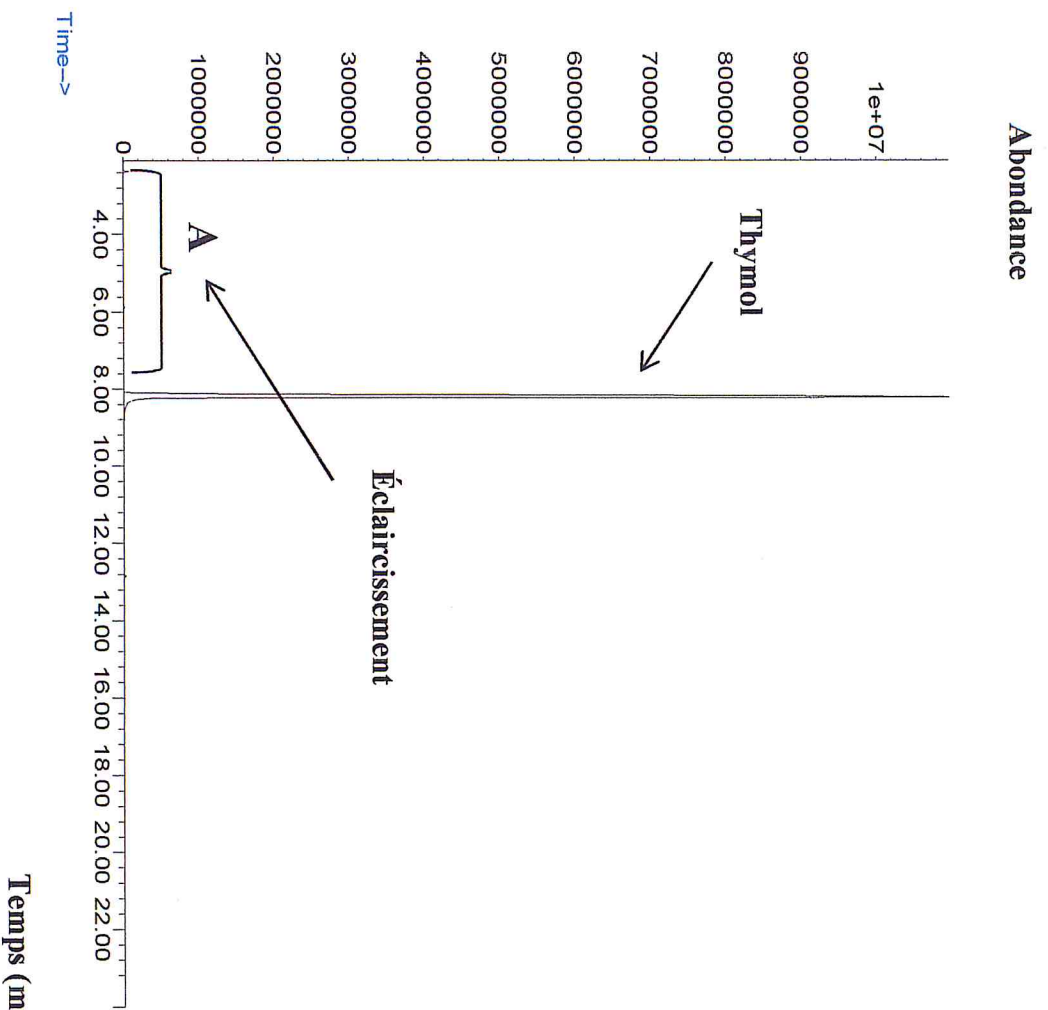


Figure 12: A : Profil chromatographique d'analyse de bioconversion et biodégradation du thymol par *Streptomyces rochei* ABI

B : Agrandissement des pics du chromatogramme de menthol

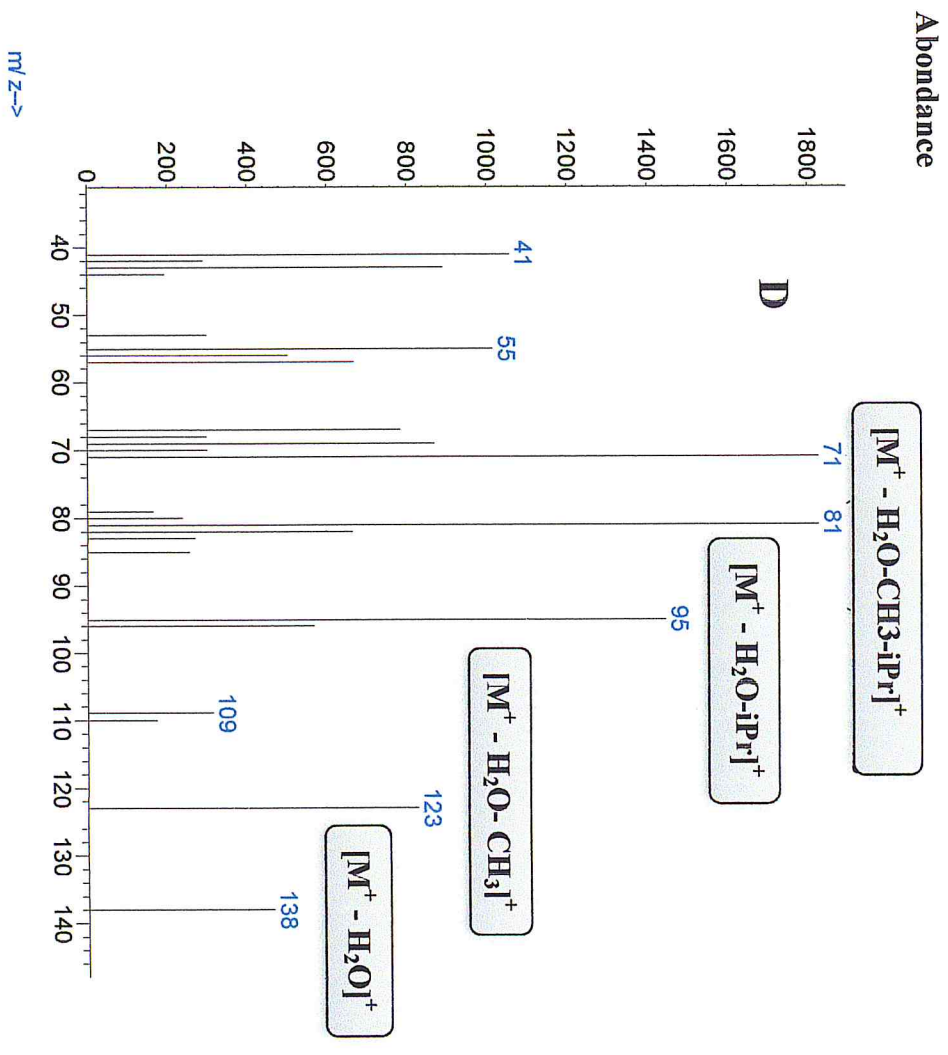
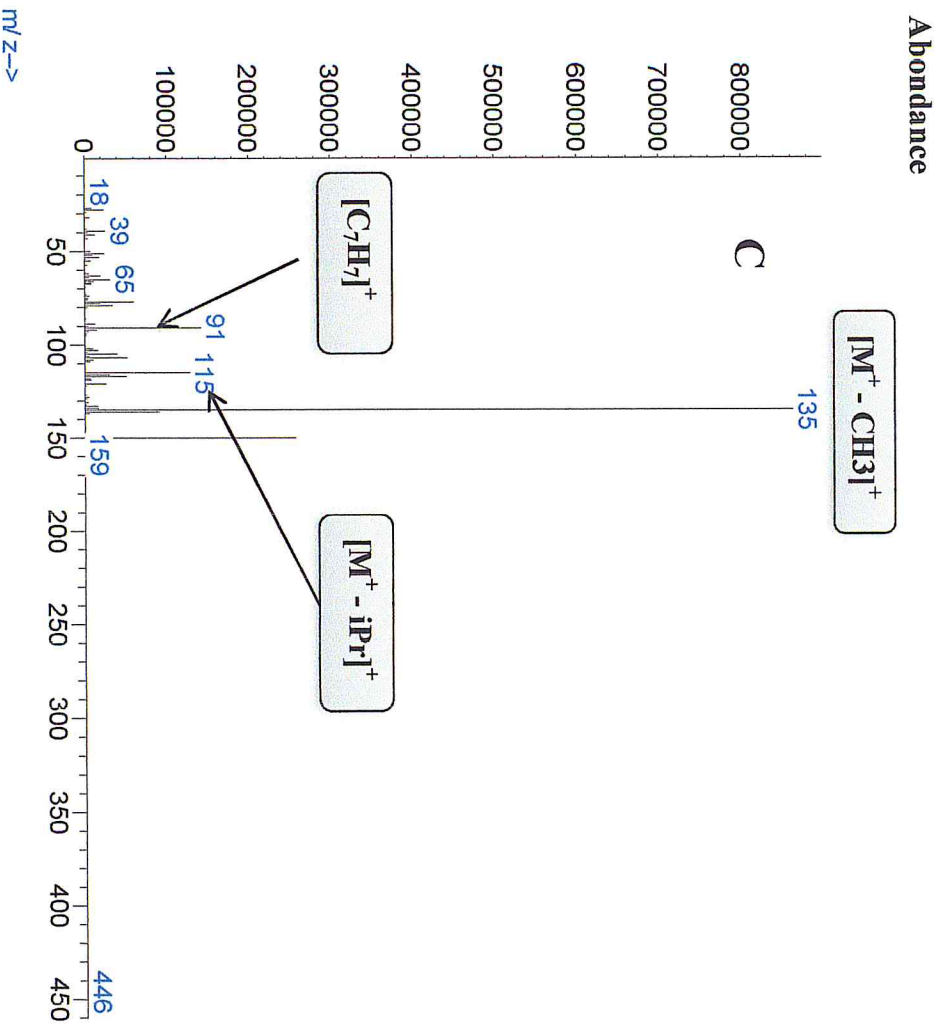


Figure 12: C : Spectre de masse du thymol ; D: Spectre de masse du menthol

II.3.3.3 Analyse des métabolites obtenus par photodégradation

- **photodégradation du thymol par la lumière UV**

L'analyse par chromatographie gazeuse couplé à la spectrométrie de masse montre l'absence totale de nouveaux pics (Figure 13 A). En effet le rayonnement ultraviolet UV ne dégrade pas le thymol dans un temps de 45 min (Figure 13 B).

- **Photodégradation du thymol par des rayons de Césium**

Le profil chromatographique (Figure 14 A) révèle la présence d'un nouveau pic. L'examen du spectre montre que le principal produit obtenu est l' α -Pinène avec un temps de rétention de 3 min pour un temps de bombardement par des rayons de Césium de 5 min et 10 min, par contre aucun produit n'est formé pendant 1 min de bombardement.

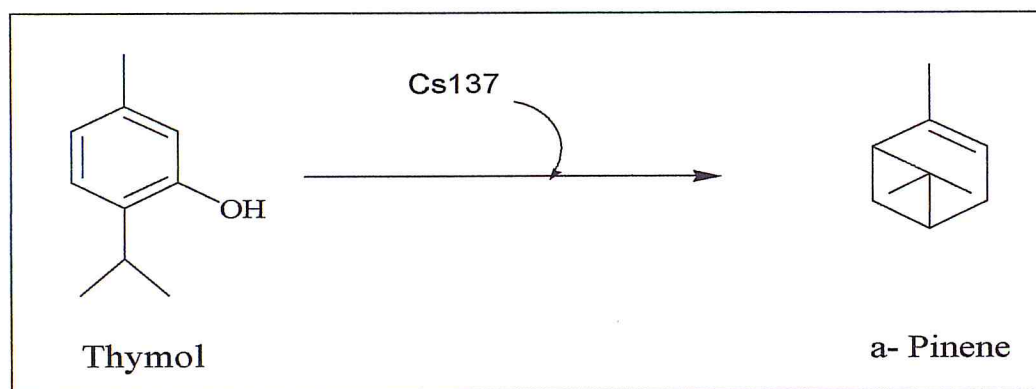


Planche 8: Photodégradation du thymol par le rayonnement haute énergie de Césium (Cs 137)

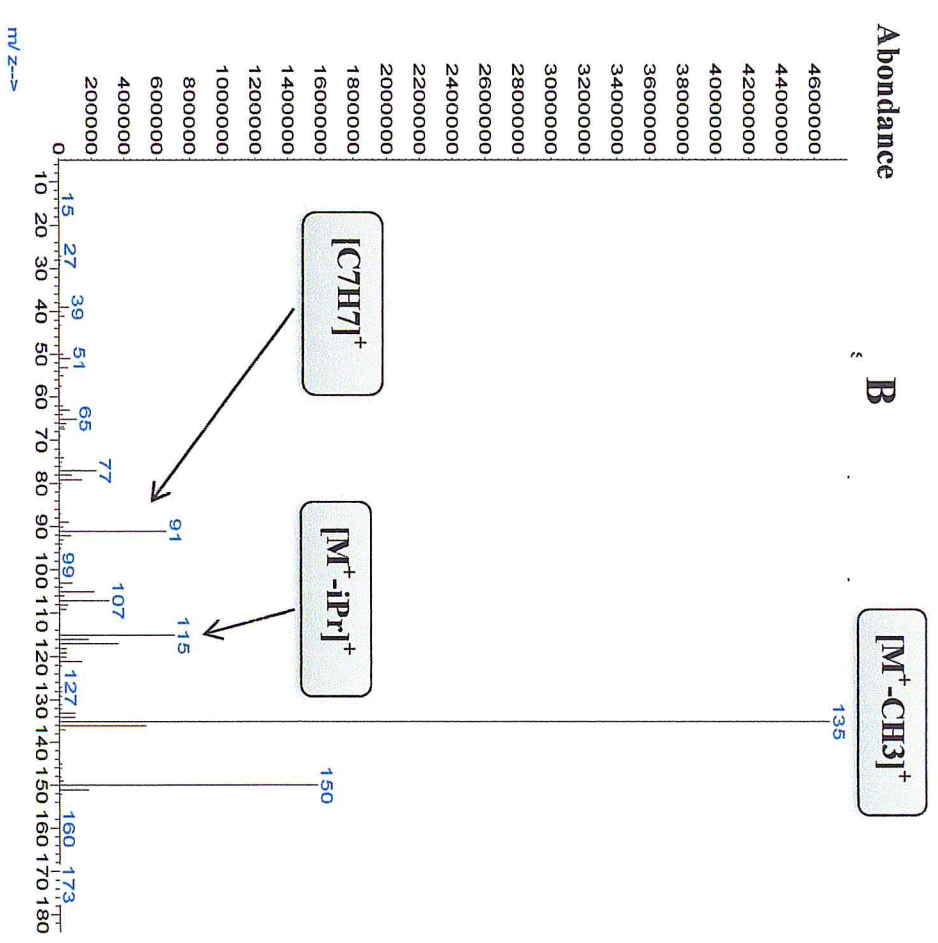
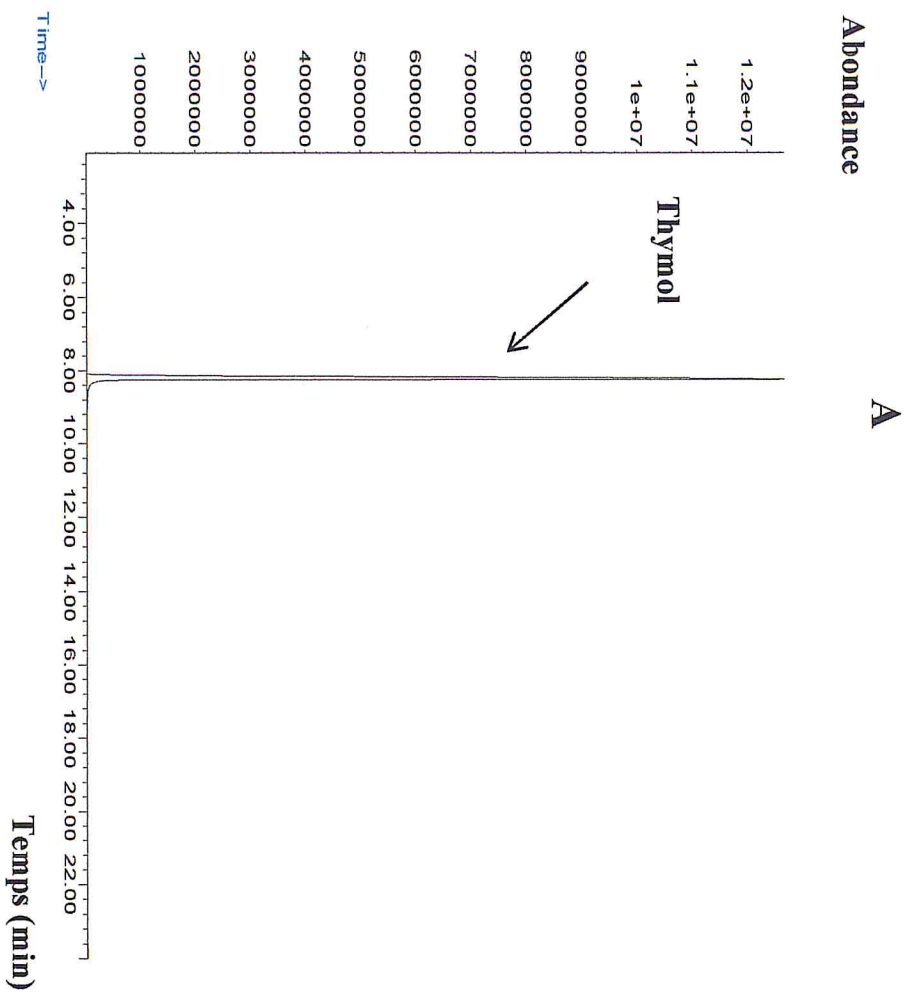
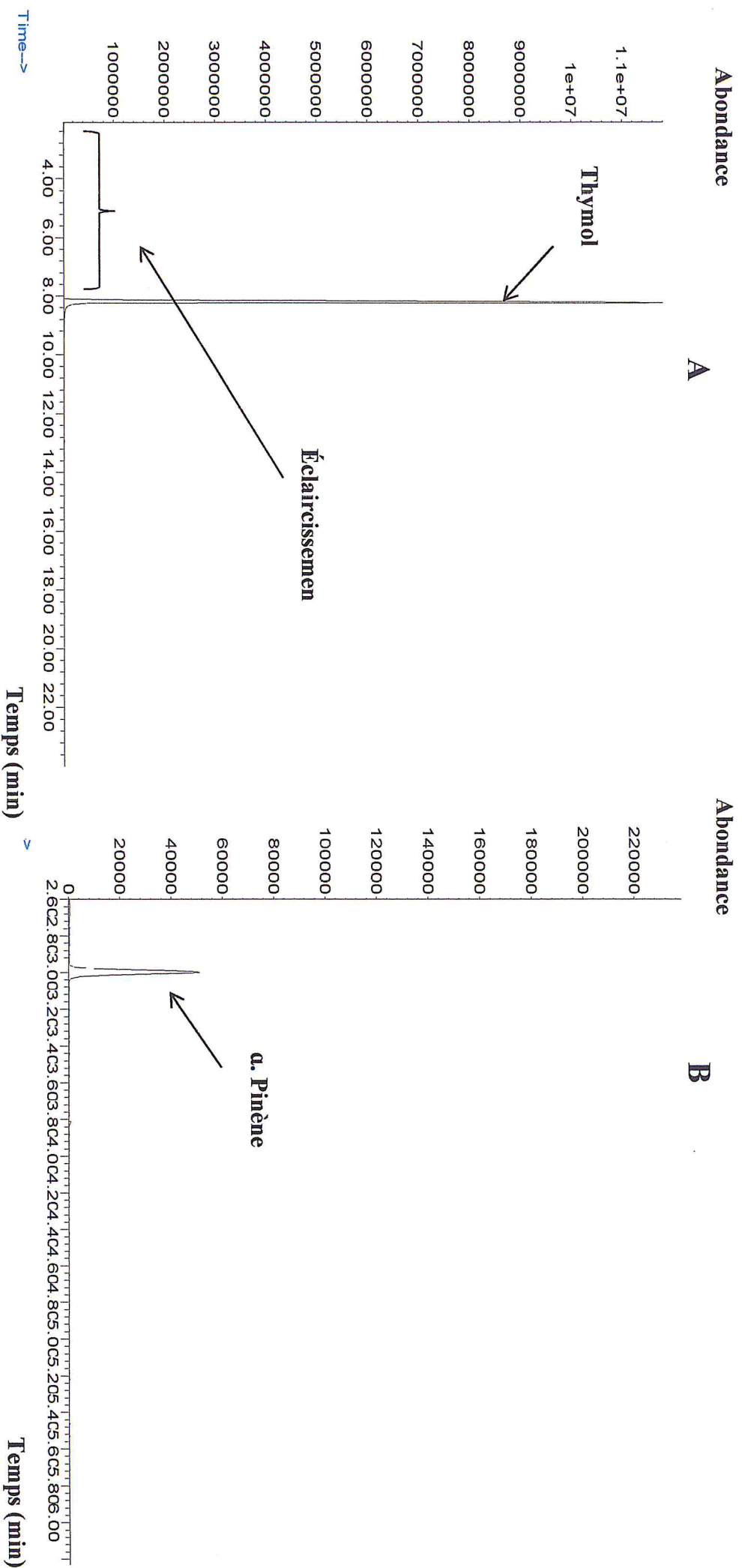


Figure 13: A : Profil chromatographique d'analyse du thymol par lumière UV, B: Spectre de masse du thymol



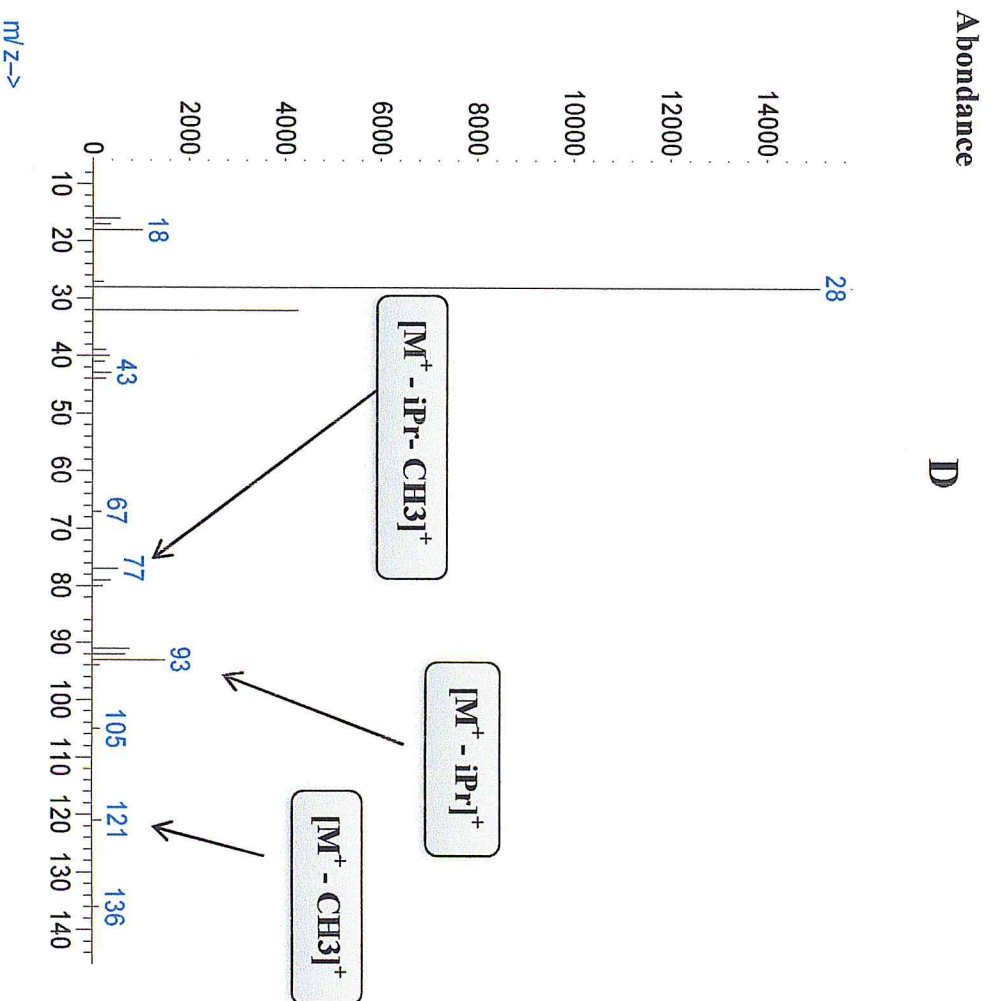
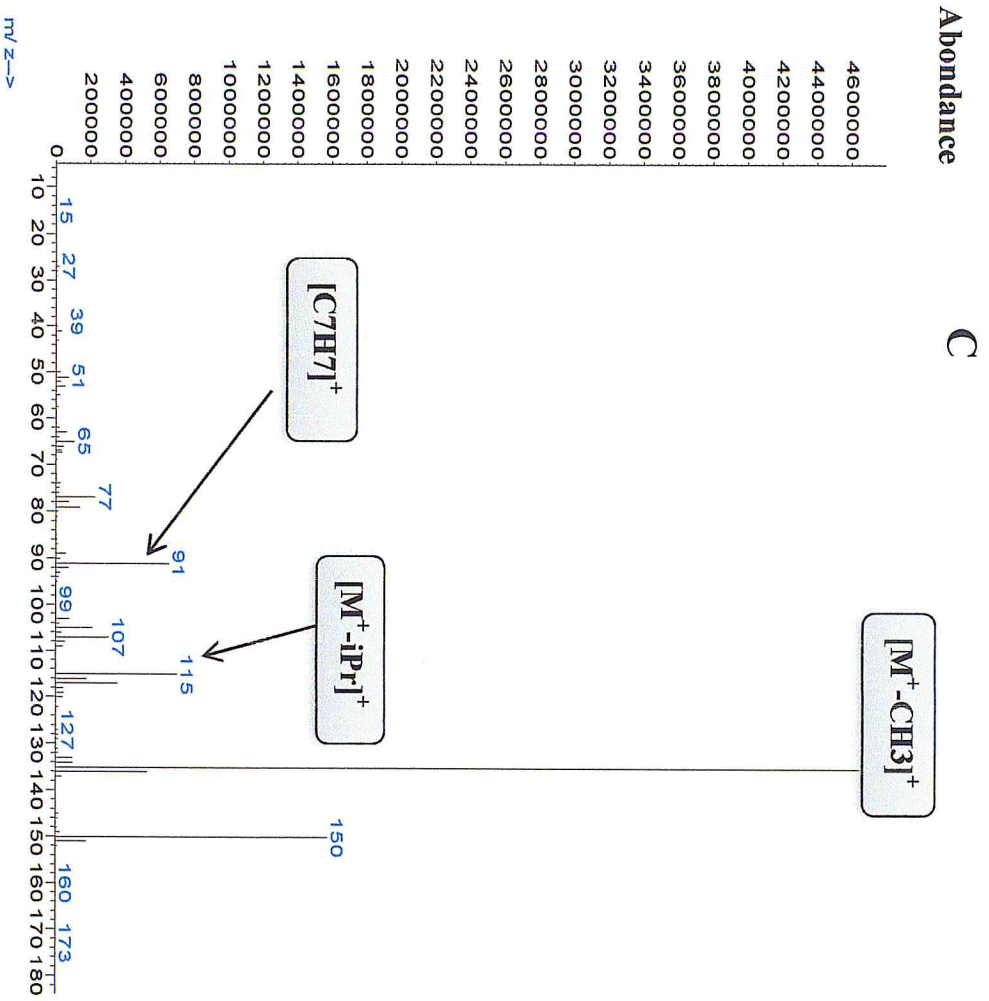


Figure 14: C : Spectre de masse du thymol ; D : Spectre de masse du α . Pinène

CONCLUSION

GÉNÉRALE

Conclusion

Le présent travail est consacré à l'étude de la bioconversion et la biodégradation d'un composé terpénique, en l'occurrence le thymol, par deux souches bactériennes à savoir *Paenibacillus popilliae* 1 C et *Streptomyces rochei* AB1 et, d'autre part, sur sa photodégradation par les rayons UV et les rayonnements à haute énergie Cs 137.

L'analyse préliminaire par chromatographie sur couche mince (CCM), spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) et par chromatographie sur phase gazeuse couplée à spectroscopie de masse (CG/SM), a montré que le métabolite est pur.

Nous avons déterminé la concentration d'inhibition qui a été utilisée par la suite pour les expériences de bioconversion et de biodégradation.

Les conditions opératoires de biotransformation et de biodégradation du thymol par la souche *Paenibacillus popilliae* 1C, n'ont pas permis sa biotransformation ni même sa biodégradation. Cet état de fait peut être lié à des conditions opératoires non optimisés.

Concernant la souche *Streptomyces rochei* AB1, la biotransformation et la biodégradation sont permis notamment l'obtention du menthol.

La photodégradation par le rayonnement haute énergie du Cs137 a permis notamment l'obtention du l' α -pinène. Les conditions opérations de la photodégradation du thymol par le rayonnement UV n'ont pas abouti à des résultats concluants.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- [1] I. G. Collado, « Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts», *Tetrahedron-Asymmetry*, 20, 385–397, 2009.
- [2] D. Linares, « Etudes sur la voie de dégradation de l'alpha-pinène chez *Pseudomonas rhodesiae* en milieu biphasique liquide/liquide», thèse de doctorat, Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, Paris, 20-24, 2008.
- [3] C. Gaël, « Étude des effets létaux et sublétaux d'une intoxication au thymol sur le développement et l'immunité des larves d'*Apis mellifera* élevées in vitro», thèse de doctorat, Université Toulouse III Paul Sabatier, Paris, 49-50, 2013.
- [4] C. Larroche, J. B. Gros, P. Fontanille, « Flavours and fragrances, Chemistry, biprocessing and sustainability», Ed. R.G. Berger, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 575-597, 2007.
- [5] M. A. Longo, M. S. Sanromán, « Production of food aroma compounds », *Food Technology and Biotechnology*, 44, 335–353, 2006.
- [6] E. J. Vandamme, W. Soetaert, « Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis», *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77, 1323–1332, 2002.
- [7] A. H. Scragg, «The production of aromas by plant cell cultures», *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 55, 239-267, 1997.
- [8] 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.
- [9] M. Baiping, F. Bing, H. Hongzhi, C. Yuwen « Biotransformation of Chinese Herbs and Their Ingredients», *World Science and Technology*, 12, 150-154, 2010.
- [10] D.H. Bergey, R.S. Breed, E.G.D. Murray, A.P. Hitchens, «Bergey's manual of determinative bacteriology», Ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1939.
- [11] J.G. Holt, N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, S.T. Williams, « Bergey's Manual of Determinative Bacteriology», Ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 428, 518-537, 1994.

- [12] R.Y. Stanier, N.J. Palleroni, M. Doudoroff, « The aerobic pseudomonads: A taxonomic study», *Journal of general microbiology*, 43, 159-271, 1966.
- [13] T. Oritani, K. Yamashita, «Microbial dl-acyclic alcohols», *Agricultural and Biological Chemistry*, 37, 1923–1928, 1973.
- [14] W. Liu, A. Goswami, R.P. Steffek, R.L. Chemman, F.S. Sariaslani, J.J. Steffens, J.P.N. Rosazza, « Stereochemistry of microbiological hydroxylations of 1,4-cineole», *Journal of Organic Chemistry*, 53, 5700-5704, 1988.
- [15] H. C. Chang, P. J. Oriel, «Bioproduction of perillyl alcohol and related monoterpenes by isolates of *Bacillus stearothermophilus*», *Journal of Food Science*, 59, 660-662, 1994.
- [16] N. Savithiry, D. Gage, W.J. Fu, P. Oriel, «Degradation of pinene by *Bacillus pallidus* BR425». *Biodegradation*, 9, 337–341, 1998.
- [17] L. Q. Zhao, Z. H. Sun, P. Zheng, L. L. Zhu, «Biotransformation of isoeugenol to vanillin by a novel strain of *Bacillus fusiformis*», *Biotechnology Letters*, 19, 1505-9, 2005.
- [18] 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 », *Journal of Biotechnology*, 4, 15-130, 2007.
- [19] E. Stackebrandt, F. A. Rainey, N. L. Ward-Rainey, «Proposal for a new hierarchic classification system *Actinobacteria classis nov.*», *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 479- 491, 1997.
- [20] M. T. Madigan, J.M. Martinko, «*Biologie des microorganismes*», Pearson Education France, PP, 331-423, PP, 686-718, 2007.
- [21] Y. Noma, M. Toyota, Y. Asakawa, «Reduction of terpene aldehydes and epoxidation of terpene alcohols by *S. ikutamanensis*, Ya-2-1». *Proc. 30th TEAC*, 204–206, 1986.
- [22] F. Demirci, N. Kirimer, B. Demirci, Y. Noma, K.H.C. Baser, «The biotransformation of thymol methyl ether by different fungi», *XII Biotechnology Congress*, 47, 2001.
- [23] Y. Noma, M. Iwami, «Separation and identification of terpene convertible actinomycetes: *S. bottropensis* SY-2-1, *S. ikutamanensis* Ya-2-1 and *S. humidus* Tu-1. *Bull.*», *Tokushima Bunri University*, 47, 99–110, 1994.

- [24] Y. Noma, H. Nishimura, «Biotransformation of carvone. 4. Biotransformation of (+)-carvone by *Streptomyces bottropensis*, SY-2-1». Proc. 26th TEAC, 156–159, 1982.
- [25] Y. Noma, H. Nishimura, «Microbiological conversion of carveol. Biotransformation of (-)-cis-carveol and (+)-cis-carveol by *S. bottropensis*, Sy-2-1», Proc. 28th TEAC, 171–173, 1984.
- [26] Y. Noma, H. Nishimura, «Microbiological transformation of 1,8-cineole. Oxidative products from 1,8-cineole by *S. bottropensis*, SY-2-1», Annual Meeting of Agricultural and Biological Chemical Society, Book of abstracts, 28, 1980.
- [27] Y. Noma, H. Nishimura, «Microbiological transformation of 1,8-cineole. Production of 3b-hydroxy- 1,8-cineole from 1,8-cineole by *S. ikutamanensis*, Ya-2-1», Annual Meeting of Agricultural and Biological Chemical Society, Book of abstracts, 196, 1981.
- [28] J.C.R. Demyttenaere, H.M. Willems, «Biotransformation of linalool to furanoid and pyranoid linalool oxides by *Aspergillus niger*», *Phytochemistry*, 47, 1029-1036, 1998.
- [29] R. P. Mariana, M. Gustavo, C. P. B. Thayse, M. P. Gláucia, «Biotransformation of Citronellol in Rose Oxide by *Pseudomonas* Spp.», *Chemical Engineering Transactions*, 27, 2012.
- [30] Y. Noma, « Conversion of (-)-Carvone by Strains of *Streptomyces*, A-5-1, and *Nocardia*, 1-3-11», *Agricultural and Biological Chemistry*, 44, 807-812, 1980.
- [31] P.M. Rhodes, N. Winskill, « Microbiological process for the preparation of 1-carvone», United States Patent, 4, 284-495, 1985.
- [32] Y. Washisu, T .Aida, N .Hashimoto, T .Kanisawa, «Production of vanillin and its related compound by fermentation», Japanese Patent, 52, 980, 1993.
- [33] Mari & J. van der Werf, Jan A.M. de Bont I, David J. Leak, «Opportunities in Microbial Biotransformation of Monoterpenes; *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*», Ed. T. Scheper, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 55, 148- 176, 1997.
- [34] R.S. Dhavalikar, P.K. Bhattacharyya, «Microbial transformation of terpenes. Part VIII. Fermentation of limonene by a soil *Pseudomonad*», *Indian Journal of Biochemistry*, 3, 144–157, 1966.

- [35] H. Takeuchi, M. Miyazawa, «Biotransformation of (-) and (+)-citronellene by the larvae of common cutworm (*Spodoptera litura*) as biocatalyst» Proc. 49th TEAC, 426–427, 2005.
- [36] G. Molina, M. R. Pimentel, G. M. Pastore, «*Pseudomonas*: a promising biocatalyst for the bioconversion of terpenes», Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 97, 1851–1864, 2013.
- [37] D.J. Best, N.C. Floyd, A. Magalhaes, A. Burfield, P.M. Rhodes, «Initial enzymatic steps in the degradation of alpha-pinene by *Pseudomonas fluorescens* Ncimb 11671», *Biocatalysis and Biotransformation*, 1, 147–159, 1987.
- [38] H. Asakawa, Takahashi, M. Toyota, Y. Noma, «Biotransformation of monoterpenoids, (-)-and (+)-menthols, terpinolene and carvotanacetone by *Aspergillus* species», *Phytochemistry*, 30, 3981–3987, 1991.
- [39] Y.Noma, M. Toyota, Y. Asakawa, «Biotransformation of (-)-carvone and (+)-carvone by *Aspergillus* spp. », Annual Meeting of Agricultural and Biological Chemistry, Sapporo, Japan, 68, 1985.
- [40] M.J. vander Werf, H.J. Swarts, J.A.M. De Bont, «*Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene», *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2092–2102, 1999.
- [41] E. Akbar, K. Abas, S. Shila, « Biotransformation of thymol by *Aspergillus niger*», *Chemistry of Natural Compounds*, 47, 6, 2012.
- [42] S. Kei, K. Yoko, N. Tomohisa, H. Hatsuyuki , N. Nobuyoshi, H. Hiroki, « Biotransformation of thymol, carvacrol, and eugenol by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*», *Phytochemistry*, 67, 2256–2261, 2006.
- [43] H. Veronika , S. Katharina, M. Annett , S. Frieder, « Two different primary oxidation mechanisms during biotransformation of thymol by gram-positive bacteria of the genera *Nocardia* and *Mycobacterium*», *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 1289–1297, 2013.
- [44] Y. Noma, « Formation of p-menthane-2,8-diols from (-)-dihydrocarveol and (+)-dihydrocarveol by *Aspergillus* spp.», The Meeting of Kansai Division of The Agricultural and Chemical Society of Japan, Kagawa, 28, 1988.

- [45] Y. Noma, M. Toyota, 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.
- [46] E.M. Chamberlain, S. Dagley, « The metabolism of thymol by a *Pseudomonas*». *Biochemical Journal*, 110, 755–763, 1968.
- [47] 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 6, 2004.
- [48] J. Kurola, «Microbial activities in boreal soils: Biodegradation of organic contaminants at low temperature and ammonia oxidation», Academic Dissertation in Environmental Ecology, 2006.
- [49] M. Marchand, R. Kantin, «contaminants chimiques en milieux aquatiques», *Oceanis*, 22, 3, 1996.
- [50] T. Murakami, I. Ichimoto, C. Tstsumom, «Microbiological conversion of linalool», *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 47, 699–703, 1973.
- [51] B. L. Hungund, P. K. Bhattachayya, P. N. Rangachari, «Methylisopropyl ketone from a terpene fermentation by the soil *Pseudomonad*, PL-strain», *Indian Journal of Biochemistry.*, 7, 80–81, 1970.
- [52] H. Birgit and J. Dieter, «Utilization of geraniol is dependent on molybdenum in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for different metabolic routes for oxidation of geraniol and citronellol», *Microbiology*, 151, 2277–2283, 2005.
- [53] F. Z. Mesbaiah, « Etude de la biodégradabilité d'un hydrocarbure aromatique polycyclique "naphtalene" et optimisation de la performance bacterienne en milieu PCN », Thèse de doctorat, Université de Blida 1, Algérie, 39, 2011.
- [54] F. Z. Ferradji, « Etude des voies métaboliques de la biodégradabilité des hydrocarbures en vue d'une application d'un procédé de biodepollution des eaux de mer », Thèse de doctorat, Université de Blida 1, Algérie, 60, 2014.
- [55] E. Jawetz, J. L. Melnick, E. A. Adelberg, « Microbiologie médicale », Presses Université Laval, 629, 1973.

Annexe

Annexe

Annexe (a) : Appareillage de l'autoclavage



Annexe (b) : Appareillage de centrifugeuse « La marque Hettiche ».



Annexe (c) : Appareillage d'Evaporateur rotatif

