

174 - 5404 135 - 1

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

**BEICHI Madjeda**

**En vue d'obtenir le diplôme de Master**

Domaine : Sciences de la matière

Filière : Chimie

Option : Chimie des Substances Naturelles

Titre

**Etude de la bioconversion, biodégradation et  
photodégradation du limonène**

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

|               |      |               |                       |
|---------------|------|---------------|-----------------------|
| Y. Daghbouche | Pr   | Présidente    | Université de Blida 1 |
| Z. Zeffouni   | MAA  | Examinatrice  | Université de Blida 1 |
| M. El Hattab  | Prof | Promoteur     | Université de Blida 1 |
| Z.F Ferradji  | MCB  | Co-promotrice | Université de Blida 1 |

Promotion 2015-2016

MA-540-135-1



## **REMERCIEMENT**

*Au nom d'Allah le plus grand merci lui revient de nous avoir guidés vers le droit chemin, de nous avoir aidées tout au long de nos années d'étude*

*Nos plus remerciement vont également à :  
Notre promoteur Mr .EL HATTAB Mohamed, pour avoir accepté de diriger la réalisation de ce mémoire, pour son aide et son conseil.*

*Les deux Co-promoteurs, Mr. A .BABIS. et Dr. F. FERRADJI Pour leur aide et suivi au long de l'établissement de notre travail.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Mr .BABIS., Je tiens à lui témoigner ma gratitude pour ses encouragements, sa patience avec moi, sa gentillesse et ces qualités scientifiques et humaines*

*Pr.. Y. DAGHBOUCHE pour avoir répondu favorablement et accepté de présider ce jury.  
Veuillez trouver cher maitre dans ce modeste travail l'expression de notre haute considération et notre profonde gratitude.*

*Dr. F. FERRADJI, qui a bien voulu sacrifier une partie de leur temps pour enrichir ce document par leurs éventuelles enrichissantes critiques,*

*Nous tenons à remercier M<sup>elle</sup> HAMICHE.S pour son soutien et patience qu'elle m'accordé tout au long de notre stage. Sans oublier  
Mesdames MEBARKI.L et ELAICHI.K, ingénieurs de laboratoire pour leur soutient aussi.*

*Melle BOUNAAS Karima pour sa gentillesse et son aide dans la réalisation de ce modeste travail.*

*Ainsi toute l'équipe de laboratoire du pavillon 5, sans oublier tous nos enseignants, et tous ce qui nous ont aidés de près ou de loin à réaliser ce modeste travail.*

**MERCI**

**MADJEDA**



## **DEDICACE**

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...  
Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect,  
A ceux qui me sont les plus chers, a ceux qui m'ont toujours encouragé  
Aussi, c'est tout simplement que...*

*Je dédie ce travail ...*

*Aux être les plus chers, à ceux qui ont consacré leur vie pour mon éducation et ma réussite :*

*A Mes très chers parents*

*Vous avez été pour moi au long de mes études le plus symbole d'amour, de dévouement qui ont ni cessé ni diminué.*

*J'espère de tout mon cœur qu'on ce jour vous soyez fière de moi, et que je réalise l'un de vos rêves.*

*J'espère être la fille que vous aviez voulu que je sois, et je m'efforcerais d'être digne de ce vous auriez souhaité que je sois. Ce titre de MASTER en chimie des substances naturelles je le porterai fièrement et je vous le dédie tout particulièrement.*

*A ma très chère grand-mère*

*Celle qui m'a toujours ouvert ses bras et soutenue dans tout ce que j'ai entrepris ; celle qui a su être bonne, gentille et compréhensive avec moi*

*A mes très chers frères Abderrahim, Lakhdar, et Abdeldjelil.*

*A mes oncles et tantes, à mes cousins et cousines, a tous les membres de la famille*

*A mes très chères amies*

*Fatiha, Selma, Amina, Kheira et Sonia*

*Je dédie ce travail à toute notre préparation, les jours et les nuits blanches, nos larmes et nos fous rires, nos déceptions et nos éclats de joie. A notre belle amitié.*

**MADJEDA**



## Résumé

Ce travail porte sur l'étude de la bioconversion, la biodégradation du limonène par deux souches *Streptomyces rochei strain AB1* et *paenibacillus popilliae C1*.

Il porte également sur la photodégradation du limonène par un rayonnement UV et par un rayonnement haute énergie de Césium 137. La pureté du limonène a été mise en évidence à travers des analyses préliminaires par, IRTF et par CG/SM.

La détermination des concentrations permettant de délimiter le domaine d'inhibition vis-à-vis le métabolite de limonène par des deux souches. Cette concentration a été déterminée comme étant égale à 10mg/mg.

L'étude de la bioconversion a été effectuée en utilisant un milieu LB liquide pour la souche de *paenibacillus popilliae* et un milieu ISP<sub>9</sub> riche. La biodégradation a été menée sur un milieu ISP<sub>9</sub> pauvre. La photodégradation a été effectuée en utilisant deux sources d'énergie électromagnétique, le rayonnement UV et le rayonnement haute énergie de Cs137.

La bioconversion du limonène par la souche *paenibacillus popilliae* et *Streptomyces rochei strain AB1*, a permis l'obtention d'autres de monoterpènes hydrocarbonés et oxygénés notamment le cis-carveol, carvone, menthol, linalool, sabinène, limonène-1.2diol, myrcène, isopiperitone.

La biodégradation du limonène par la souche *Streptomyces rochei strain AB1* a mené à l'obtention d'autres monoterpènes à l'image de menthol, carvone, isopiperitone, limonène 1,2 diol..., La photodégradation du limonène par UV et par le <sup>137</sup>Cs a permis l'obtention des monoterpènes communs à l'image de, beta myrcène, linalool, et la carvone ..., et de monoterpènes différents pour chaque types de rayonnements. Ainsi nous avons relevé la présence de, alpha pinène, Beta-Terpinène, limonène oxyde, linalool, 1,4cineol, dans la photodégradation par UV et celle de Beta-Thujene, Myrcène, linalool, carvone, dans la photodégradation par le rayonnement haute énergie de Cs 137.

*Mots clés : Bioconversion, biodégradation, photodégradation, rayonnement UV, rayonnement haute énergie Cs 137, limonène, Peanibacillus popilliae, Streptomyces rochei,*

## Abstract

This work focuses on the study of the bioconversion, biodegradation of limonene by two stems *Streptomycesrocheistrain AB1* et *paenibacilluspopilliaeC1*. It also includes photo-degradation of limonene by UV radiation and high-energy radiation of cesium 137. The purity of limonene has been demonstrated through preliminary analyzes, FTIR and GC / MS. The detremination of the concentration needed to difine the field of inhibition relator to the metabolite by the topo stems.

This concentration was determined to be equal to 10mg / mg. The study of the bioconversion was carried out using a liquid LB medium for the strain of paenibacilluspopilliae and rich environment ISP9. The Biodegradation was conducted on a poor environment ISP9 .The photodégradtion was conducted using two sources of electromagnetic energy, UV radiation and high-energy radiation from 137Cs. The bioconversion of limonene by paenibacilluspopilliae and StreptomycesrocheistrainAB1 strain, allowed obtaining other hydrocarbon monoterpenes and oxygenated especially cis-carveol, carvone, menthol, linalool, sabinene, 1.2diol limonene, myrcene, isopiperitone ... The biodégradtion limonene by the strain Streptomycesrocheistrain AB1 led to obtaining other monoterpenes as menthol, carvone, isopepirtone, limonene 1.2 ... diol the photodégradtion of limonene by UV and by the 137Cs provides common monoterpenes as beta myrcene, linalool, carvone and different monoterpenes for each type of radiation. So we noted the presence of alpha-pinene, beta-Terpinene, limonèneoxyde, linalool, 1,4cineol in the photodégradtion UV and the Beta-thujene, myrcene, linalool, carvone, in photodégradtion by high-energy radiation Cs 137.

*Keywords: Bioconversion, biodegradation, photodegradation ,limonene, UV radiation, high-energy radiation by Cs-173, Peanibacillus popilliae, Streptomyces rochei,*

## Liste des abréviations

|                            |   |
|----------------------------|---|
| <b>ATCC</b>                | : American Type Culture Collection                                      |
| <b>°C</b>                  | : Degré Celsius   |
| <b>pH</b>                  | : Potentiel Hydrogène   |
| <b>S</b>                   | : <i>Streptomyces</i>   |
| <b>[C]</b>                 | : Concentration   |
| <b>IRTF</b>                | : Infrarouge à Transformateur de Fourier                                |
| <b>KBr</b>                 | : Bromure de potassium  |
| <b>CG-SM</b>               | : Chromatographie en phase Gazeuse associée à la Spectrométrie de Masse |
| <b>LB</b>                  | : Milieu Luria Bertani  |
| <b>ISP9</b>                | : International Streptomyces Project 9                                  |
| <b>tr.min<sup>-1</sup></b> | : Tourne par minute   |

## Liste des figures

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figure 1  | : la production de vanilline à partir de matières premières naturelles par bioconversion d'iso eugénol                           | 11 |
| Figure 2  | : Bioconversion d'acétate linalyl par le genre <i>Bacillus subtilis</i>  | 11 |
| Figure 3  | : Bioconversion de 1,4 cineol par le genre <i>Bacillus cereus</i>  | 11 |
| Figure 4  | : Formes énantiomères du limonène  | 13 |
| Figure 5  | : Métabolites secondaires obtenus par la biotransformation du limonène par la souche <i>pseudomonas fluorescences</i>            | 15 |
| Figure 6  | : Appariel de Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG/MS) .                                    | 21 |
| Figure 7  | : Repiquage de la Souche <i>paenibacillus.p</i>  | 22 |
| Figure 8  | : Repiquage de souche <i>Streptomyces rochiaie</i>   | 22 |
| Figure 9  | : Méthode de réalisation de l'inoculum (suspension bactériennes)   | 23 |
| Figure 10 | : Etapes de l'extraction des métabolites secondaires à partir de la bioconversion de limonène                                    | 26 |
| Figure 11 | : Source radioactive de césium 137   | 28 |
| Figure 12 | : Spectre IRTF d'absorbance limonène 5mg/ml dans CH <sub>2</sub> CL <sub>2</sub>   | 29 |
| Figure 13 | : Profil Chromatographique d'analyse du limonène   | 30 |
| Figure 14 | : Teste d'inhibition de limonène   | 30 |
| Figure 15 | : Profil chromatographique d'analyse de la phase organique (1)   | 32 |
| Figure 16 | : Voies de la bioconversion de limonène par <i>peanibacillus popilliea</i>   | 33 |
| Figure 17 | : Profil chromatographique d'analyse de la phase organique (2)   | 34 |
| Figure 18 | : Voies de la bioconversion de limonène par <i>sterptomyces rochie</i>   | 36 |
| Figure 19 | : Profil chromatographiques des métabolites secondaires obtenus par la biodégradation de limonène par <i>sterptomyces rochie</i> | 37 |
| Figure 20 | : Voies de la biodégradation de limonène par <i>sterptomyces rochie</i>  | 39 |
| Figure 21 | : Profil chromatographie des métabolites secondaires obtenus par la photodégradation du limonène par rayons UV (a) et Cs137 (b)  | 41 |
| Figure 22 | : Voies de photodégradation de limonène par rayons UV et les rayonnent hauts énergie Cs  | 43 |

## Liste des tableaux

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Tableau 1 | Caractères bactériologique du genre <i>Bacillus</i>                                   | 7  |
| Tableau 2 | Caractères bactériologique du genre <i>streptomyces</i>                               | 8  |
| Tableau 3 | Biotransformations de certains monoterpènes par différentes microorganismes.          | 10 |
| Tableau 4 | Bioconversion des monoterpènes par espèce du genre <i>streptomyces</i>                | 12 |
| Tableau 5 | Travaux antérieurs sur la bioconversion du limonène                                   | 16 |
| Tableau 6 | Métabolites issus de la bioconversion du limonène par <i>peanibacillus popillia</i>   | 31 |
| Tableau 7 | Métabolites issus de la bioconversion du limonène par <i>streptomyces rochie</i>      | 35 |
| Tableau 8 | Métabolites issus de la biodégradation du limonène par <i>streptomyces rochie</i> AB1 | 38 |
| Tableau 9 | Métabolites obtenus par rayons UVetCs   | 42 |

## SOMMAIRE

|                        |      |
|------------------------|------|
| Remerciements          | I    |
| Dédicaces              | ii   |
| ملخص                   | lii  |
| Résumé                 | iv   |
| Abstract               | v    |
| Liste des abréviations | vi   |
| Liste des figures      | viii |
| Liste des tableaux     | x    |
| Introduction général   | 1    |

### Partie I : Synthèse bibliographique

|  |    |
|--|----|
| I. 1 Introduction  | 4  |
| I. 2 Notions générales sur la bioconversion  | 4  |
| I. 2.1 Définition de la bioconversion  | 4  |
| I. 2.2 Avantage des bioconversions   | 4  |
| I. 2.3 Inconvénients de la bioconversion   | 5  |
| I. 3 Généralités sur la biodégradation   | 5  |
| I. 3.1 Définition de la biodégradation   | 5  |
| I. 3.2 Principe de la biodégradation   | 6  |
| I. 4 Biocatalyseurs  | 6  |
| I. 5 Etude de la bioconversion des métabolites secondaires par les genres <i>Bacillus</i> et <i>Streptomyces</i> | 7  |
| I. 5.1 Généralités sur les microorganismes   | 7  |
| I. 5.1.1 Présentation de la famille <i>Bacillaceae</i>   | 7  |
| I. 5.1.2 Systématique et taxonomie de <i>Bacillus popilliae</i>  | 7  |
| I. 5.1.3 Description du genre <i>Streptomyces</i>  | 8  |
| I. 5.1.4 Systématique et taxonomie de <i>Streptomyces Rochei</i>   | 8  |
| I. 5.2 Biotransformation des terpènes  | 9  |
| I. 5.2.1 Bioconversion des monoterpènes par différents microorganismes   | 10 |
| I. 5.2.1.1 Bioconversion des monoterpènes par des espèces du genre <i>Bacillus</i>                               | 11 |

|  |    |
|--|----|
| I. 5.2.1.2 Bioconversion des monoterpènes par des espèces du genre <i>Streptomyces</i> | 12 |
| I. 5.2.2 Etude de la bioconversion du limonène   | 13 |
| a. Description chimique du limonène  | 13 |
| b. Propriétés et utilisation du limonène   | 13 |
| c. Biotransformation microbienne du limonène   | 14 |
| d. Travaux antérieurs sur la bioconversion du limonène par différents microorganismes  | 14 |

## Partie II : Etude expérimentale

|   |    |
|---|----|
| II. 1 Introduction  | 19 |
| II. 2 Matériels et méthodes   | 19 |
| II. 2.1 Analyses préliminaires du Limonène  | 19 |
| II. 2.1.1 Analyse par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)                          | 19 |
| II. 2.1.2 Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)      | 20 |
| II. 2.2 Etude de l'activité catabolique par <i>Penibacillus popilliae</i> et <i>Streptomyces rochei</i> | 21 |
| II. 2.2.1 Origine des souches utilisées   | 21 |
| II. 2.2.2 Préparation et composition des milieux de culture   | 21 |
| II. 2.2.3 Repiquage des souches et préparation des précultures  | 22 |
| II. 2.2.4 Détermination de la concentration optimale par le test d'inhibition                           | 22 |
| II. 2.2.4.1 Principe de la méthode  | 22 |
| II. 2.2.4.2 Procédure générale  | 23 |
| II. 2.2.5 Etude de la bioconversion et la biodégradation du limonène                                    | 24 |
| II. 2.2.5.1 Bioconversion par <i>Streptomyces rochei</i> AB1  | 24 |
| II. 2.2.5.2 Bioconversion par <i>Peanibacillus popilliae</i> 1C   | 24 |
| II. 2.2.5.3 Biodégradation par <i>Streptomyces rochei</i> AB1   | 24 |
| II. 2.2.6 Extraction des métabolites  | 25 |

|   |    |
|---|----|
| II. 2.3 Etude la photodégradation du limonène   | 27 |
| II. 2.3.1 Phodégradation par des rayons hauts énergie de <sup>137</sup> Cs  | 27 |
| II. 2.3.1.1 Principe  | 27 |
| II. 2.3.1.2 Mode opératoire   | 27 |
| II. 2.3.2 Phodégradation par des rayons UV  | 28 |
| II. 2.3.2.1 Généralités   | 28 |
| II. 2.3.2.2 Mode opératoire   | 29 |
| <b>II. 3 Résultats et discussion</b>  | 29 |
| II.3.1 Analyse préliminaire du limonène   | 29 |
| II. 3.1.1 Analyse par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier du limonène   | 29 |
| II. 3.1.2 Analyse du limonène par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)                            | 29 |
| II. 3.2 Détermination de la concentration assimilable non inhibitrice pour la bioconversion et la biodégradation par le test d'inhibition | 30 |
| II. 3.3 Bioconversion du limonène par <i>Peanibacillus popilliae</i> et <i>Streptomyces rochei</i>  | 31 |
| II. 3.3.1 Bioconversion du limonène par <i>Peanibacillus popilliae</i>  | 31 |
| II. 3.3.2 Bioconversion du limonène par <i>Streptomyces rochei</i>  | 33 |
| II. 3.4 Biodégradation du limonène par <i>Streptomyces rochei</i>   | 36 |
| II. 3.5 Photodégradation du limonène par un rayonnement UV et par rayonnement haute énergie de <sup>137</sup> Cs                          | 40 |
| Conclusion générale   | 45 |
| Références bibliographiques   | 47 |
| Annexes   |    |

# **INTRODUCTION GENERALE**

Cette étude comporte deux principales parties :

- La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique dans laquelle nous présentons des concepts basés sur la bioconversion et biodégradation suivis des différents travaux antérieurs portant sur la bioconversion du limonène par diverses souches.
- La seconde partie est réservée à une étude expérimentale portant sur la bioconversion et biodégradation de R (+) limonène par les deux souches bactériennes *streptomyces rochei strain ABI* et *paenibacillus popilliae*. Des aspects liés aux conditions opératoires ont été envisagés. Également, l'étude de la photodégradation du limonène par deux types de rayonnements, UV et haute énergie du Cs137, a été réalisée.

# **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. 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 [2].

La première partie de ce mémoire est consacrée à une synthèse bibliographique dans laquelle nous présentons dans un premier temps un aperçu général sur la bioconversion, la biodégradation, et ses avantages et inconvénients, suivi par une étude de la bioconversion des métabolites secondaires par les genres *Bacillus* et *Streptomyces*, dans laquelle nous décrivons brièvement les microorganismes étudiés, ainsi que les différents travaux de recherche portant sur les voies métaboliques et les principaux produits formés de la bioconversion des terpènes. Un intérêt plus particulier est accordé à l'étude de la bioconversion d'un monoterpène monocyclique en l'occurrence le limonène.

## **I. 2 Notions générales sur la bioconversion**

### **I. 2.1 Définition de la bioconversion**

Les biotransformations, également appelées transformations microbiennes ou bioconversions, 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 [2]. Les bioconversions sont utilisées aussi bien pour la synthèse d'arômes alimentaires [3]. Que pour la production de molécules ayant un intérêt pharmaceutique [4]. La Biotransformation microbienne est l'une des technologies les plus appropriées pour obtenir des composés naturels à valeur ajoutée dans des conditions très favorables à l'environnement [5]. C'est la capacité de la culture de cellules végétales pour catalyser la conversion d'un précurseur aisément disponible peu coûteux en un produit final plus précieux. Ce précurseur ne peut être transformé de manière efficace par des méthodes chimiques traditionnelles [2].

### **I. 2.2 Avantages de bioconversion**

Les bioconversions, lorsqu'on les compare à des réactions chimiques classiques, ont l'avantage d'être régio et stéréo sélectives, ce qui conduit à des produits de formes énantiomériques données permettant la production des produits chiraux à partir de mélanges racémiques dont la demande dans les domaines pharmaceutique et agroalimentaire est importante.

Les avantages majeurs des réactions de bioconversion sont :

- La mise en œuvre de réactions de bioconversion permet d'éliminer certaines faiblesses inhérentes aux techniques classiques d'extraction
- Les bioconversions permettent également une autonomie vis-à-vis de l'approvisionnement en matières premières fortement influencée par les saisons notamment dans le cas de végétaux aromatiques
- Elle permet aussi de diminuer les volumes des résidus d'extraction
- Plus d'une réaction peut être effectuée en utilisant des cultures de cellules qui expriment une série d'activités enzymatiques
- Les bioconversions sont de, plus, particulièrement adaptées aux nouvelles normes mondiales relatives au « développement durable » et au label « naturel » actuellement très recherché par les institutions politiques et les consommateurs [2].

### **I. 2.3 Inconvénients de la bioconversion**

Il y a lieu de souligner certains inconvénients liés à l'utilisation de la bioconversion. On peut citer dans ce cadre :

- Certains métabolites secondaires sont des substrats toxiques, même à des cellules entières
- Certains métabolites secondaires sont peu solubles dans l'eau
- La plupart des biotransformations des métabolites secondaires conduisent à de faibles rendements. [6]
- La volatilité des métabolites secondaires provoque des problèmes lors de biotransformation, tels que les pertes des substrats et produits
- La Biotransformation des métabolites secondaires se déroule souvent sur plusieurs voies métaboliques conduisant à un mélange de produits [1].

## **I. 3 Généralités sur la biodégradation**

### **I. 3.1 Définition de la biodégradation**

La biodégradation consiste en la décomposition ou la dégradation catalysée de matières organiques par des micro-organismes (bactéries, champignons et algues). Ces matières organiques sont converties en dioxyde de carbone ou en eau. Cependant, le procédé de biodégradation est souvent utilisé pour le traitement des déchets naturels [7].

Il existe deux types de biodégradation :

- **La biodégradation primaire** : Elle est définie comme étant la dégradation partielle de la structure moléculaire de la substance initiale. Cette dégradation peut conduire à la perte de propriétés caractéristiques de la substance telle que son activité biologique.
- **La biodégradation ultime (biodégradation totale)** : Elle correspond à la minéralisation totale du matériau. Ce dernier est totalement dégradé par l'action des micro-organismes sous forme de dioxyde de carbone (dans des conditions aérobies) ou de méthane (dans des conditions anaérobies), d'eau, de sels minéraux et peut être sous forme de nouvelles cellules [8].

### I. 3.2 Principe de la biodégradation

Le terme « biodégradation » correspond à l'élimination complète d'une substance organique en produits simples tels que  $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $CH_4$ ,  $H_2$ , acétate et autres produits de fermentation. Le processus complet de la dégradation est également appelé minéralisation, (biodégradation ultime). D'autre terme ont été également proposés pour définir d'autres situations mettant en jeu les micro-organismes. En effet, la voie de dégradation la plus directe (voie métabolique) repose sur l'utilisation de la substance organique comme source d'énergie et de carbone par le microorganisme [8].

### I. 4 Biocatalyseurs

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 (cellule en croissance) tels que les eucaryotes comme les champignons filamenteux et les levures ou des organismes procaryotes comme les bactéries.

Le biocatalyseur peut également être une enzyme déterminée, présente au sein d'un extrait cellulaire ou sous forme purifiée. La grande diversité des microorganismes autorise de nombreuses réactions enzymatiques au sein d'une large diversité de voies métaboliques. Leur utilisation simple, leur rapidité de croissance et leur facilité d'adaptation à des conditions imposées par des contraintes techniques et économiques sont des atouts supplémentaires qui favorisent leur emploi dans des procédés de biotransformation. Les cellules végétales comportent plus d'inconvénients que celle d'enzymes ou de microorganismes, cependant, leur utilisation peut néanmoins être avantageuse pour la production de métabolites secondaires complexes. [2]

## I. 5 Etude de la bioconversion des métabolites secondaires par les genres *Bacillus* et *Streptomyces*

### I. 5.1 Généralités sur les microorganismes

#### I. 5.1.1 Présentation de la famille *Bacillaceae*

Le genre *Bacillus* appartient à la famille des *Bacillaceae* [9]. Les bactéries de cette famille sont de grands bacilles en forme de bâtonnets à Gram positif, groupées en chaînettes, formant des spores mobiles (voir figure : 1). La plupart sont des saprophytes du sol, de l'eau, de l'air et des plantes. Les caractéristiques de la famille des *Bacillaceae* sont regroupées dans le tableau : 1

Tableau 1 : Caractères bactériologiques du genre *Bacillus* [10]

| Caractéristiques  | <i>Bacillus</i>  |
|-------------------|--|
| Gram              | Gram +<br>sont des gros bacilles rectilignes à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (de 0,5 x 1,2 µm jusqu'à 2,5 x 10 µm) |
| Catalase          | +  |
| Type respiratoire | Aérobie stricte ou<br>Aéroanaérobie facultative  |
| Mobilité          | + ou – grâce à une ciliature péritriche parfois capsulés   |
| Spores            | +  |

#### I. 5.1.2 Systématique et taxonomie de *Bacillus popilliae*

*Bacillus popilliae* a pour systématique :

Règne : Bactéries

Embranchement: Firmicutes

Classe : Bacilli

Ordre : Bacillales

Famille : Paenibacillaceae

Genre : *Paenibacillus*

Espèce : *Popilliae*

### II. 5.1.3 Description du genre *Streptomyces*

Le genre *Streptomyces* appartient à la famille des *streptomycetaceae*. Les *Streptomyces* sont donc des organismes procaryotes qui possèdent une structure filamenteuse, leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de l'acide diamino-pimélique [11]. Les *Streptomyces* sont des organismes aérobies, à coloration de Gram positive, chimioorganotrophes, catalase positive de la classe *Actinobacteri*. Ils possèdent un métabolisme oxydatif et un taux G+C% compris entre 69% et 78%. Les Streptomycètes ont la capacité de produire une large gamme de métabolites qui ont des applications importantes en santé humaine et animale. Plus de 60% des composés antifongiques et antibactériens et de phytohormones sont produits par *Streptomyces*. Les *Streptomyces* produisent un grand nombre de pigments responsables des différentes couleurs du mycélium en plus des pigments diffusibles [12].

Tableau 2 : Caractères bactériologiques du genre *Streptomyces* [11]

| Caractéristiques                | Streptomyces   |
|---------------------------------|--|
| Gram                            | Gram +<br>Bactéries filamenteuse dont les hyphes de longueurs variables avec un diamètre compris entre 0.5 et 0.2 µm |
| Catalase, Oxygenase, Peroxydase | +  |
| Type respiratoire               | Aérobic stictic  |
| Mobilité                        | + ou – grâce à une ciliature péritriche parfois capsulés   |
| Spores                          | Des hyphes stables peuvent produire des mycéliums aériens avec longueurs chaîne de spores                            |

### II. 5.1.4 Systématique et taxonomie de *Streptomyces Rochei*

*Streptomuces sp.* a pour systématique :

**Règne :** Bactéries

**Embranchement:** Actinobacteria

**Classe :** Actinomycètes

**Ordre :** Actinomycétales

**Famille :** Streptomycetaceae

**Genre :** *Streptomyces*

**Espèce :** *Rochei*

## **I. 5.2 Biotransformation des terpènes**

Cette partie concerne l'action des microorganismes sur les terpènes et les voies de dégradation de ces composés par différents types de microorganismes dans des conditions d'aérobiose. Toutefois la majeure partie de la biotransformation des terpènes a été attribuée aux bactéries, champignons et levures. Ces microorganismes aérobies ainsi qu'anaérobies utilisent les terpènes comme une source de carbone et d'énergie, Certaines bactéries du genre *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. mallei*) sont les plus résistantes à l'activité des terpènes [13]. Plusieurs essais in vitro ont montré la dégradation de divers terpènes par *P. gladioli*, [14] *P. putida* GS1, *P. fluorescens*[15]. D'autres bactéries, comme *Bacillus stearothermophilus* [16] *Eschérichia coli* [17]. et les coques comme *Rhodococcus erythropolis*. [18], ou *Rhodococcus opacus*. Sont des espèces capables de contribuer à la biodégradation des terpènes. Une majeure partie des essais expérimentaux étudiant la bioconversion des terpènes sont réalisés dans des conditions d'aérobiose, puisque la présence d'oxygène moléculaire est un facteur déterminant des voies métaboliques chez les microorganismes. Dans ces voies, les molécules d'oxygène sont des substrats finaux accepteurs d'électrons, avec production de CO<sub>2</sub> à partir des carbones issus des terpènes [19].

### **I. 5.2.1 Bioconversion des monoterpènes par différents microorganismes**

Nous regroupons dans le tableau 3 les données recueillies dans la littérature concernant la biotransformation de certains monoterpènes par différents microorganismes. Cette synthèse est loin d'être complétée, tout fois elle donne une vision claire sur l'intérêt de bioconversion dans l'obtention de métabolite d'intérêt.

### I. 5.2.1.1 Bioconversion des monoterpènes par des espèces du genre *Bacillus*

Nous citons à illustration exhaustive trois exemples de bioconversion des monoterpènes par les espèces du genre *Bacillus*.

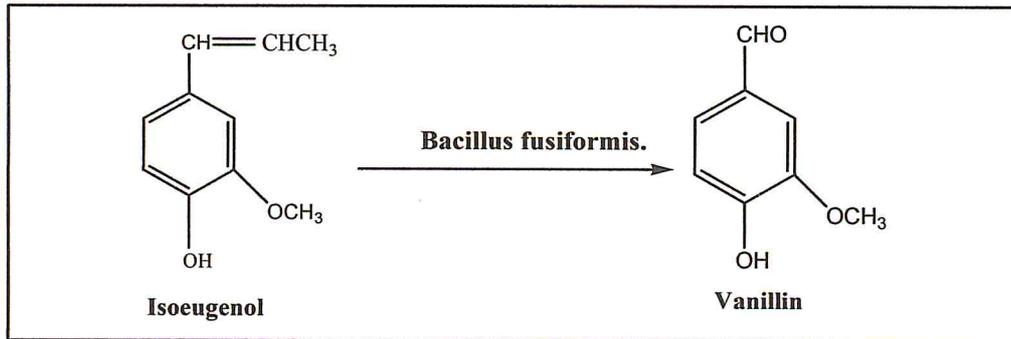


Figure 1 : La production de vanilline à partir de matières premières naturelles par bioconversion d'iso eugénol [21].

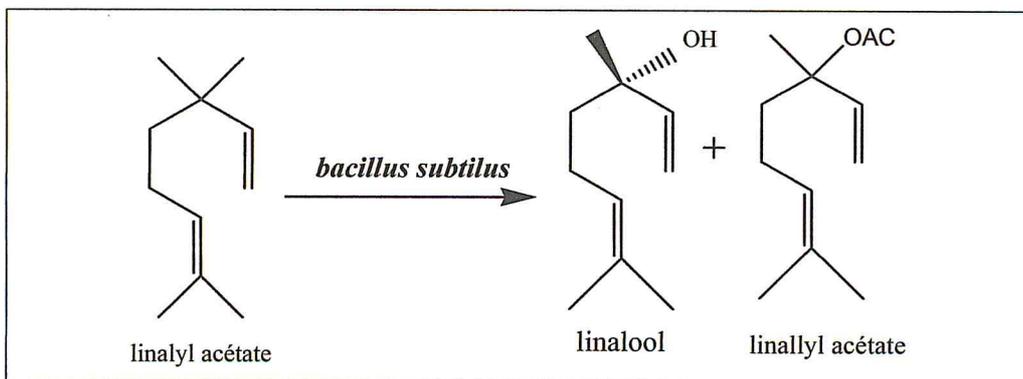


Figure 2 : Bioconversion d'acétate linalyl par le genre Bacillus subtilis [16]

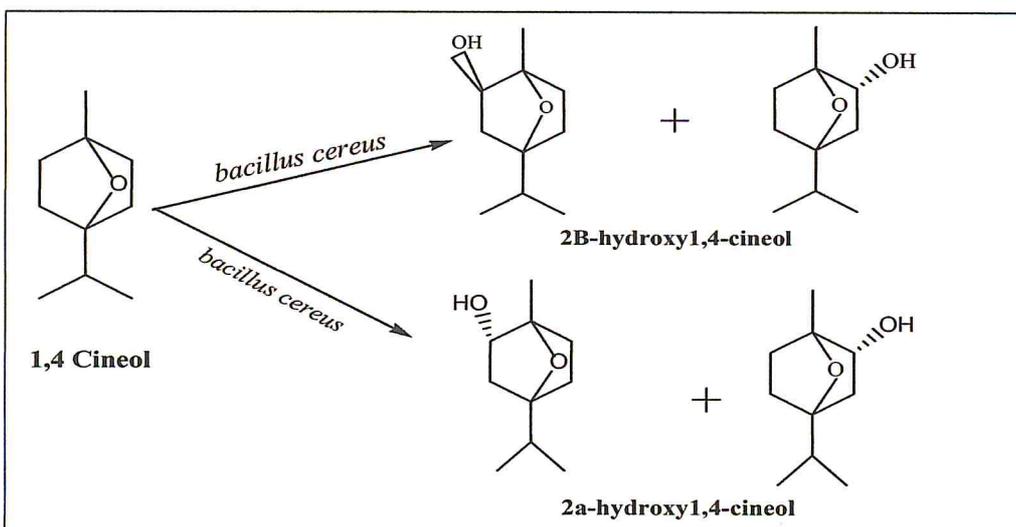


Figure 3 : Bioconversion de 1,4 cineol par le genre Bacillus cereus [22]

### I. 5.2.1.2 Bioconversion des monoterpènes par des espèces du genre *Streptomyces*

Plusieurs travaux ont été effectués sur la bioconversion des terpènes, en particulier les monoterpènes, par le genre *Streptomyces*, dont certains d'entre eux sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau4:** Bioconversion des monoterpènes par différentes espèces du genre *Streptomyces*

| <i>Microorganismes</i>                       | <i>Métabolites</i>      | <i>Produits</i>  | <i>Réf</i>   |
|--|-------------------------|--|--------------|
| <i>Streptomyces bottropensis</i><br>SY-2-1   | 1,8-cineole             | (+)-2a-hydroxy-1,8-cineole   | [23]         |
| <i>Streptomyces ikutamanensis</i><br>Ya-2-1  |                         | (+)-3a-hydroxy-1,8-cineole   |              |
| <i>Streptomyces griseus</i>                  | 1,4-cineole             | 8-hydroxy-1,4-cineole  | [24]         |
| <i>Streptomyces bottropensis</i> ,<br>SY-2-1 | (+)-<br>carvotanacetone | 5b-hydroxy-(+)-<br>neoisocarvomenthol et a-<br>hydroxy-(+)-carvotanacetone                       | [25]         |
| <i>Streptomyces bottropensis</i><br>SY-2-1   | (-)-<br>carvotanacetone | 5b-hydroxy-<br>(-)-carvotanacetone et 8-<br>hydroxy-(-)-carvotanacetone.                         | [25]         |
| <i>Streptomyces</i> A-5-1                    | (-)-carvone             | (-)- <i>trans</i> carveol  | [25]<br>[26] |
| <i>Streptomyces bottropensis</i> .           | (+)-carvone             | (+)-carvone-8,9-epoxide et (+)-<br>5a-hydroxycarvone   | [27]         |
| <i>Streptomyces ikutamanensis</i><br>Ya-2-1  | (-)-Perillyl<br>alcohol | 8,9-epoxy-<br>(-)-perillyl alcohol   | [26]         |
| <i>Streptomyces humidus</i> Tu-1             | Thymol                  | (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> )- et (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> )-2-hydroxy-<br>3- <i>p</i> -menthen-5-one | [27]         |
| <i>Streptomyces ikutamanensis</i> ,<br>Ya-21 | Geranial<br>Neral       | Geraniol<br>Nerol  | [26]         |

## I. 5.2.1 Etude de la bioconversion du limonène

### a. Description chimique du limonène

Le limonène ( $C_{10}H_{16}$ ) (1-méthyl-4-prop-1-èn-2-yl-cyclohexène) est un monoterpène monocyclique d'hydrocarboné, c'est liquide incolore à température ambiante, qui est responsable de l'odeur caractéristique des agrumes il est l'un des terpènes le plus largement répandu dans la nature [27]. Le limonène possède deux énantiomères (Fig.4). C'est un composé utilisé en tant que réactif en synthèse organique, il possède plusieurs activités biologiques. En raison de la similarité entre le D-limonène et certains composés aromatiques et médicinaux (carvéol, carvone et alcool perillyl), cet isomère est plus important que son isomère (L) du point de vue de sa biotransformation microbienne. Les produits intéressants dérivés du D-limonène sont des composés oxygénés comme le carvéol, l'alcool perillyl, l' $\alpha$ -terpinéol, le carvone et le menthol [28], Les propriétés organoleptiques (arome et odeur) du limonène et son utilisation dans les aliments et d'autres applications ont encouragé les scientifiques et les industriels à travailler intensivement sur sa synthèse et sa conversion microbienne [29]. Au cours des dernières années, beaucoup de travaux ont été réalisés sur la bioconversion du limonène ont relève de faibles rendements en raison de la volatilité et la toxicité du limonène vis-à-vis de plusieurs micro-organismes [28].

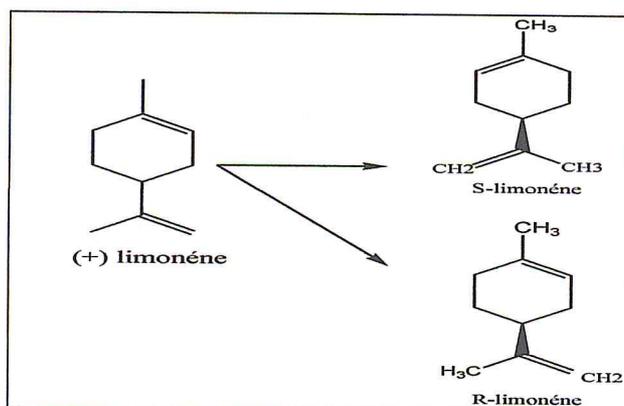


Figure 4: Formes énantiomères du limonène

### b. Propriétés et utilisation du limonène

Le limonène possède les propriétés suivantes : [28]

- Inducteur de l'apoptose, inhibe la croissance cellulaire maligne, et anti - tumoral
- Antiseptique et antiviral
- Sédatif et relaxant musculaire
- Prévention du cancer de la peau
- La thérapie anticancéreuse.

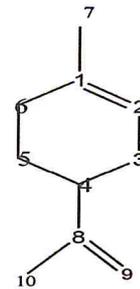
### c. Biotransformation microbienne du limonène

La biotransformation du limonène 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. Globalement, deux voies métaboliques principales ont été observées dans la biotransformation du limonène à savoir l'hydroxylation et l'époxydation.

#### → *Hydroxylation du limonène*

L'hydroxylation a été souvent observée sur les groupements méthyle et méthylène en différentes positions dont certaines sont mentionnées ci-dessous.

- ✓ hydroxylation en position 7 et formation de l'alcool perillylique [30].
- ✓ hydroxylation en position 3 et formation de l'isopiperitenol [31].
- ✓ hydroxylation en position 6 et formation de carvéol [30].
- ✓ hydroxylation en position 8 et formation de l' $\alpha$ -terpinéol [32].



#### → *Epoxydation du limonène*

L'époxydation du limonène est observée sur les doubles liaisons

- ✓ époxydation en position 1,2 et formation du limonène-1,2-époxyde [33].
- ✓ époxydation en position 8,9 et formation du limonène 8,9 époxyde [34].

### d. Travaux antérieurs sur la bioconversion du limonène par différents microorganismes

La gamme de microorganismes qui participe à la biotransformation du limonène est large. Certaines bactéries, comme les *pseudomonas*, les *bacilles* et les *coques* transforment le limonène en alcool perillylique en acide perillylique, en  $\alpha$ -terpinéol, ou en limonène-6,8-diol [21, 22, 23].

La *Rhodococcus erythropolis* DCL14 est la seule coque qui transforme le limonène par époxydation en position 1,2 formant du 1,2 oxyde de limonène dont l'oxydation aboutit à la production des isomères diols correspondants qui sont probablement oxydés en hydroxyacétone. La souche *Xanthobacter* sp. C20 est une souche transforme le limonène par époxydation en position 8,9. Plusieurs champignons et levures participent aussi à la biotransformation du limonène. Il semble que toutes les biotransformations du limonène par les levures ou champignons commencent par les enzymes mono-oxygénases. Dans cette partie, on cite quelques travaux sur la bioconversion du limonène par des différents microorganismes [34].

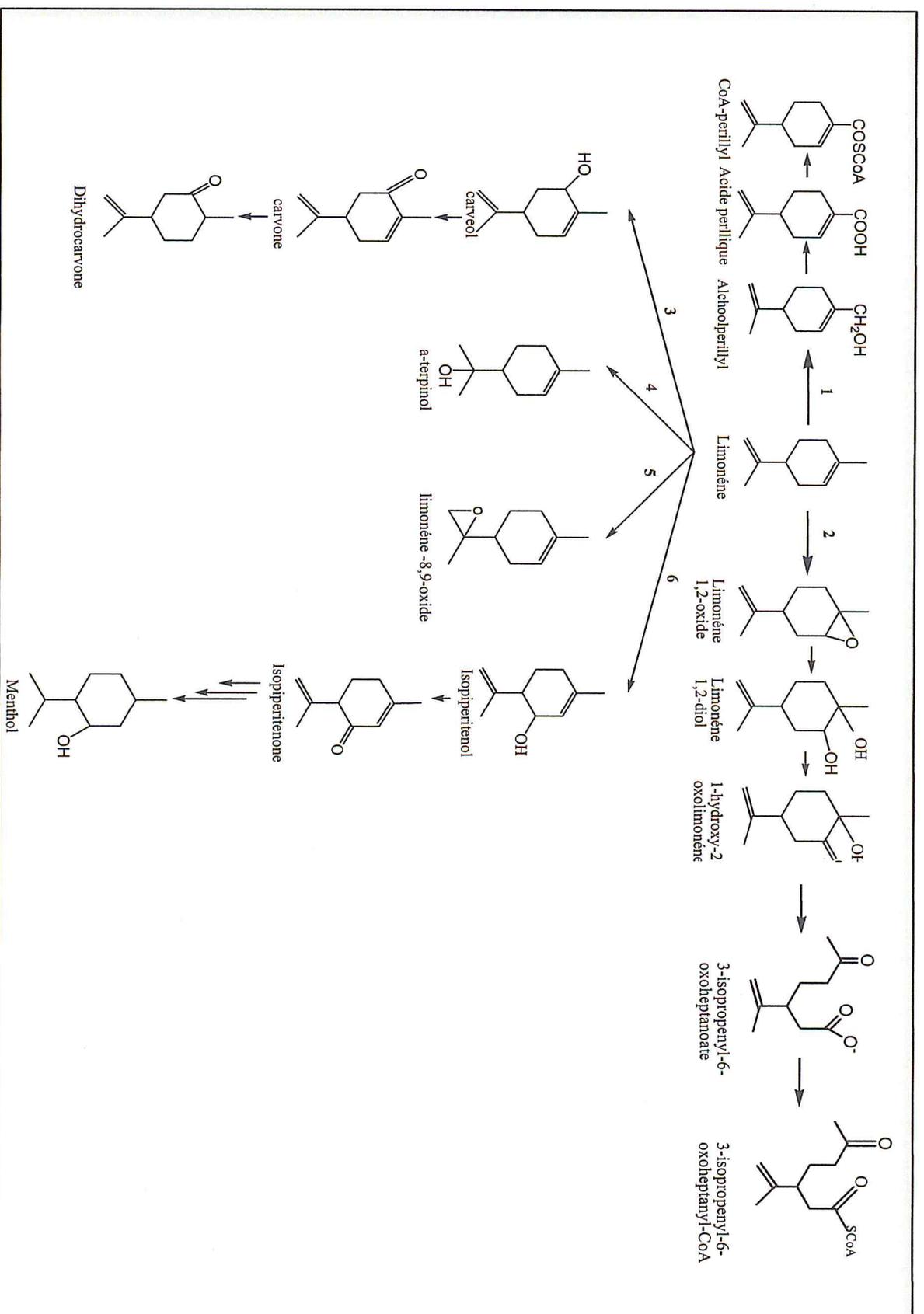
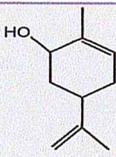
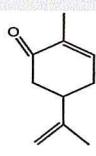
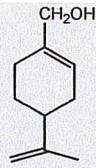
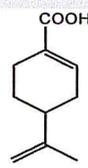
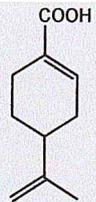
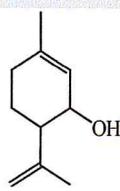
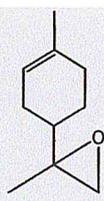


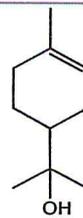
Figure 5: Métabolites secondaires obtenus par la biotransformation du limonène par la souche *Pseudomonas fluorescens*.

**Tableau 5: Travaux antérieurs sur la bioconversion du limonène**

| <i>Microorganismes</i>                   | <i>Produits</i>         | <i>Structure</i>  | <i>Référence</i> |
|--|-------------------------|---|------------------|
| <i>Pseudomonas sp.pl</i>                 | carveol                 |    | [35]             |
| <i>Aspergillus cellulose M-77</i>        |                         |   | [36]             |
| <i>Pleurotus sapidus</i>                 |                         |   | [37]             |
| <i>Escherichia coli</i>                  |                         |   | [38]             |
| <i>Rhodococcus opacus PWD4</i>           |                         |   | [39]             |
| <i>penicillium digitatum</i>             | Carvone                 |    | [39]             |
| <i>Pleurotus sapidus</i>                 |                         |   | [40]             |
| <i>Rhodococcus erythropolis PWD8</i>     |                         |   | [41]             |
| <i>Aseprgillus cellulosa M-77</i>        | Alchoole peryllique     |    | [36]             |
| <i>Bacillus stearothermophilus BR388</i> |                         |   | [20]             |
| <i>Echerichia.coli(9.6Kb)</i>            |                         |   | [42]             |
| <i>Mycobacterium sp.HXN-1500</i>         |                         |   |                  |
| <i>Pseudomonas sp.Pl</i>                 | Acide perillic          |   | [35]             |
| <i>Pseudomonas incognita</i>             |                         |   | [38]             |
| <i>Pseudomonas gladioli</i>              |                         |   | [43]             |
| <i>Pseudomonas putida GS1</i>            |                         |   | [44]             |
| <i>Mycobacterium sp.HXN-1500</i>         |                         |   |                  |
| <i>Pseudomonas sp.Pl</i>                 | Acide perillic          |  | [23]             |
| <i>Pseudomonas incognita</i>             |                         |   | [38]             |
| <i>Pseudomonas gladioli</i>              |                         |   | [38]             |
| <i>Pseudomonas putida GS1</i>            |                         |   | [45]             |
| <i>Mycobacterium sp.HXN-1500</i>         |                         |   |                  |
| <i>Hormonema sp.UOFSy657474</i>          | Isopépiritenol          |  | [31]             |
| <i>Xanthobacter sp.C20</i>               | Limonene 8,9<br>époxyde |  | [34]             |

*Penicillium digitatum* DSM 62840  
*Cladosporium* sp.T12  
*Armillaireira melleae*  
*Pseudomonas gladioli*  
*Bacillus sterothermophilus* BR388

$\alpha$ -terpinéol

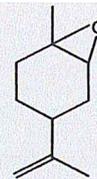


[40]

[38]

*Diplodia gossypina* ATTCC10936  
*Corynespora erythropolis* DCL14

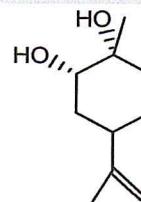
Limonène 1,2 époxy



[46]

*Diplodia gossypina* ATTCC 10936  
*Armillaireira melleae*  
*Corynespora cassicola*  
DSM62474\5  
*Cladosporium* sp.T7  
*Aspergillus cellulosa* M-77

Limonène 1,2 diol



[36]

# **PARTIE II**

## **Etude expérimentale**

## II.1 Introduction

Notre travail expérimental porte sur l'étude de la bioconversion et la biodégradation du limonène par deux souches bactériennes, à savoir, *Paenibacillus popilliae* et *Streptomyces rochei strain AB1*. Elle a trait également à la photodégradation par un rayon UV et par rayon à haute énergie de  $^{137}\text{Cs}$ . L'étude expérimentale comporte trois points :

- Le premier point est consacré aux analyses préliminaires du limonène par spectrophométrie infrarouge à transformée de Fourier et par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
- Le deuxième point a été réservé à la mise en évidence de processus de bioconversion qui a été réalisée en 4 étapes
  - Préparation des différents types de milieu de culture
  - Détermination de concentration minimale inhibitrice
  - Protocole de la bioconversion et de biodégradation
  - Analyse des métabolites obtenus
- Le troisième point porte sur la photogéradation du limonène

L'analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a été réalisée au Laboratoire des Plantes Médicinales et Aromatiques (Département de l'agronomie de l'Université Blida 1). La préparation des milieux de culture a été effectuée au sein du Laboratoire de microbiologie (Département de Génie des procédés de l'Université Blida 1), les procédures de la bioconversion et la biodégradation ont été effectuées au Laboratoire de Chimie des Substance Naturelles et de Biomolécules (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-ou chimique (CRAPC) à Bousmail.

## II.2 Matériels et méthodes

### II.2.1 Analyse préliminaire du limonène

#### II.2.1.1 Analyse par spectrophotométrie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

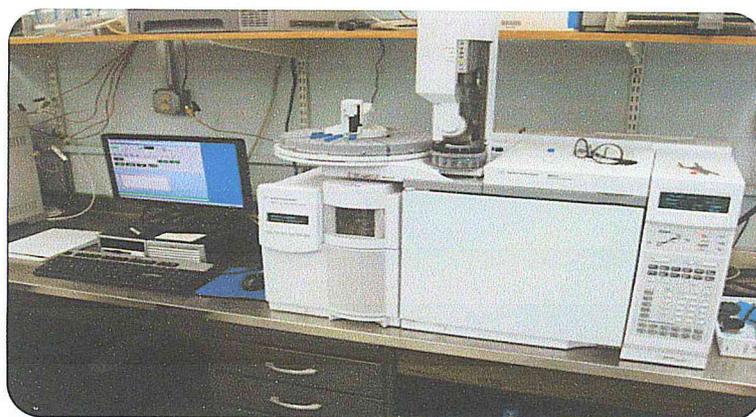
L'analyse a été effectuée sur un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) de marque Bruker type Tensor 27, équipé d'un détecteur sulfate triglicinedeuteré DTGS à température ambiante, d'une source infrarouge moyen ( $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ), d'un rayonnement laser et un diviseur de faisceau KBr. Le traitement des spectres est réalisé avec le logiciel OPUS 6.5 fonctionnant sous le système d'exploitation Microsoft Windows XP

Le limonène a été préparé à l'état liquide dans le dichlorométhane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) à une concentration de 5mg/ml. Les fenêtres utilisées dans cette partie pour l'analyse de la phase liquide sont en fluorure de baryum ( $\text{BaF}_2$ ) avec une entretoise en téflon de chemin optique égal à 0.1 mm et l'acquisition de spectre a été effectuée avec une résolution de  $4 \text{ cm}^{-1}$ .

### II.2.1.2 Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CGSM)

L'analyse est effectuée sur un chromatographe de type HP 6800 couplé à un spectromètre de masse de type HP MSD 5973 (figure 7), dans les conditions suivantes :

- Le limonène injecté est dissous dans l'acétate à 5mg/ml
- Une colonne capillaire de type HP5 (polydiméthylesiloxane 100%), de longueur 30m d'un diamètre interne de 0.25 mm et une épaisseur du film de 0.25  $\mu\text{m}$ .
- Un gaz vecteur (hélium) d'un débit de 5 ml/mn.
- Analyse en mode Scan (34 à 450 amu) avec une température d'interface de 280  $^{\circ}\text{C}$ .
- ionisation par impact électronique (IE),
- Analyseur : Quadripôle, avec une température de Source = 230 $^{\circ}\text{C}$ .
- La programmation du four est : 100 $^{\circ}\text{C}$  - 5 $^{\circ}/\text{mn}$  - 220 $^{\circ}\text{C}$
- Injection d'une quantité de 1  $\mu\text{l}$  en mode Splitless : 1/90 avec la température 250  $^{\circ}\text{C}$ .



**Figure 6 :** Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS)

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

### II.2.2.1 Origine des souches utilisées

- *Paenibacillus popilliae* C1 : La souche *Bacillus* utilisée dans cette étude est la souche *paenibacillus popilliae* (1C), elle a été isolée d'un sol sableux contaminé par les hydrocarbures pétroliers de la région de Hassi-Messaoud (sud d'Algérie) [8].
- *Streptomyces rochei* strain AB1 : La souche *Streptomyces* utilisée dans cette étude est la souche *Streptomyces rochei* strain AB1 (GU434672), elle a été isolée d'un sol humide à Boufarik, la souche AB1 est productrice de Kératinase et protéase et peroxydase. [47].

### II.2.2.2 Préparation et composition des milieux de culture

La composition chimique des différents milieux de culture, de bioconversion et de biodégradation utilisée dans notre étude 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 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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 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 de culture utilisés sont stérilisés par autoclavage pendant 20 min à 120 °C et leur pH est ajusté à 7.2 par les solutions : NaOH (0.1 N) et HCl (0.1N). Les différentes étapes effectuées pour la préparation des milieux de culture sont les suivantes :

- Faire fondre les milieux gélosés dans un bain marie réglé à 95°C
- Couler aseptiquement les milieux 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
- Les boîtes de Pétri sont séchées pendant quelques minutes à température ambiante. Les couvercles des boîtes doivent être maintenus fermés.

### II.2.2.3 Repiquage des souches et préparation des précultures

Le repiquage des souches a été réalisé à l'aide d'une pipette Pasteur par ensemencement d'une colonie bien isolée sur des boîtes de Pétri contenant le milieu LB pour *Paenibacillus Popiliae* et le milieu ISP2 ou ISP9 pour *Streptomyces rocheistrain*. Les précultures ont été préparées dans 50 mL du milieu, et inoculés à partir des cultures bactériennes de 24 h. Les flacons et les boîtes de Petrie sont alors incubés à 45°C pendant 24 h pour *Paenibacillus Popiliae* et à 30 °C pendant 72h pour *Streptomyces rocheistrain*.



**Figure 7 :** Repiquage de la Souche *Paenibacillus.p*      **Figure 8:** Repiquage de souche *Streptomyces*

## II. 2.2.4 Détermination de la concentration optimale par le test d'inhibition

### II. 2.2.4.1 Principe de la méthode

La technique consiste à utiliser des disques de papiers buvards, imprégnés de la substance à tester. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension du germe étudié. La substance diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration inversement proportionnel à la distance par rapport au disque. Une zone circulaire indemne des colonies bactériennes se forme autour du disque, appelée zone d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à la substance, plus il est petit, plus la bactérie est résistante.

### II. 2.2.4.2 Procédure générale

#### → Préparation de de la gamme de concentration du limonène

Une gamme de concentration du substrat étudié (limonène) allant de : 0.05 mg/mL à 15g/mL a été préparée à partir de la solution mère de 30 mg/mL diluée dans le méthanol.

#### → Préparation de l'eau physiologique

Il s'agit d'un simple support salé. 9 g de NaCl a été dissous dans 1 litre d'eau distillée, la solution obtenue a été répartie dans des tubes à fond plats à raison de 9 mL par tube. Les tubes sont stérilisés dans l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes.

#### → Préparation de l'inoculum (suspension bactérienne)

Le travail s'effectue dans des conditions aseptiques, il faut prendre soin de nettoyer avec l'alcool ou de l'eau de javel la paillasse, de stériliser les tubes et les milieux et sans oublier de travailler avec des gants stériles.

A partir d'une culture pure de *Paenibacillus popilliae* obtenue après 48h sur milieu gélose LB solide, racler à l'aide d'une anse de platine 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques (figure 10). Décharger l'anse dans 5 à 10 mL d'eau physiologique stérile à 0.9%, bien homogénéiser la suspension bactérienne.

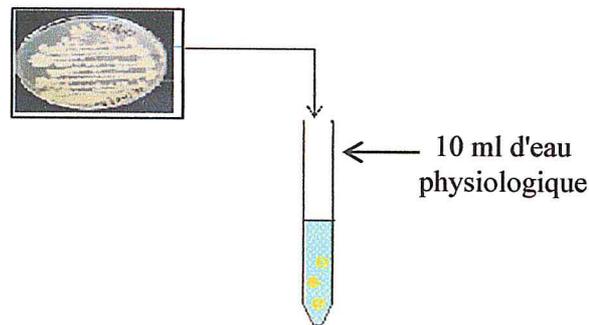


Figure 9 : méthode de réalisation de l'inoculum (suspension bactériennes)

#### → Ensemencement

Le milieu Mueller-Hinton est fondu et refroidi à 45°C, coulé en boîte de pétri à une épaisseur de 0.4 mm, après la solidification de la gélose, tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne de *Paenibacillus popilliae*, 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 gélosée de haut en bas en stries serrées. Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même, finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de pétri avec la même suspension, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois. Le milieu utilisé pour la réalisation de la concentration inhibitrice est le milieu Muller-Hinton.

#### → Déposition des disques

Après stérilisation, des disques ont été imprégnés de limonène à différentes concentrations 0.05mg/ml à 15g/ml et déposés au centre de la gélose à l'aide d'une pince permettant son adhésion sur la gélose. La diffusion est faite pendant 30mn. Les boîtes renversées sont mises dans l'incubateur pendant 24h à 45°C.

#### → Lecture des résultats

La lecture des résultats se fait par la mesure de la zone d'inhibition qui est représentée par une auréole formée autour de disque.

## **II. 2.2.5 Etude de la bioconversion et la biodégradation du limonène**

### **II. 2.2.5.1 Bioconversion par *Streptomyces rochei* AB1**

Un volume de 2 mL de préculture a été inoculé dans un flacon de 250 ml contenant 50 mL d'ISP9 riche. Le milieu de culture a été pré-incubé à l'obscurité dans un incubateur statique à 30 °C pendant une semaine au cours de laquelle une bonne croissance bactérienne a eu lieu. Après 7 jours, la biotransformation a été initiée par l'addition directe de 10 mg / mL du limonène dans le flacon de culture dans des conditions stériles (stérilisation par micro-seringue de 0,45 µm). Ensuite, placés dans un incubateur statique pendant 6 jours à 30 °C.

### **II. 2.2.5.2 Bioconversion par *Peanibacillus popilliae* 1C**

Un volume de 2 ml de préculture a été inoculé dans un flacon de 250 ml contenant 50 ml de milieu LB liquide. La biotransformation a été initiée par l'addition directe de 10 mg / mL du limonène dans le flacon de culture dans des conditions stériles. Ensuite, le flacon a été placé dans un incubateur statique à 45°C pendant une semaine. La durée de l'expérience de la bioconversion était d'une semaine.

### **II. 2.2.5.3 Biodégradation par *Streptomyces rochei* AB1**

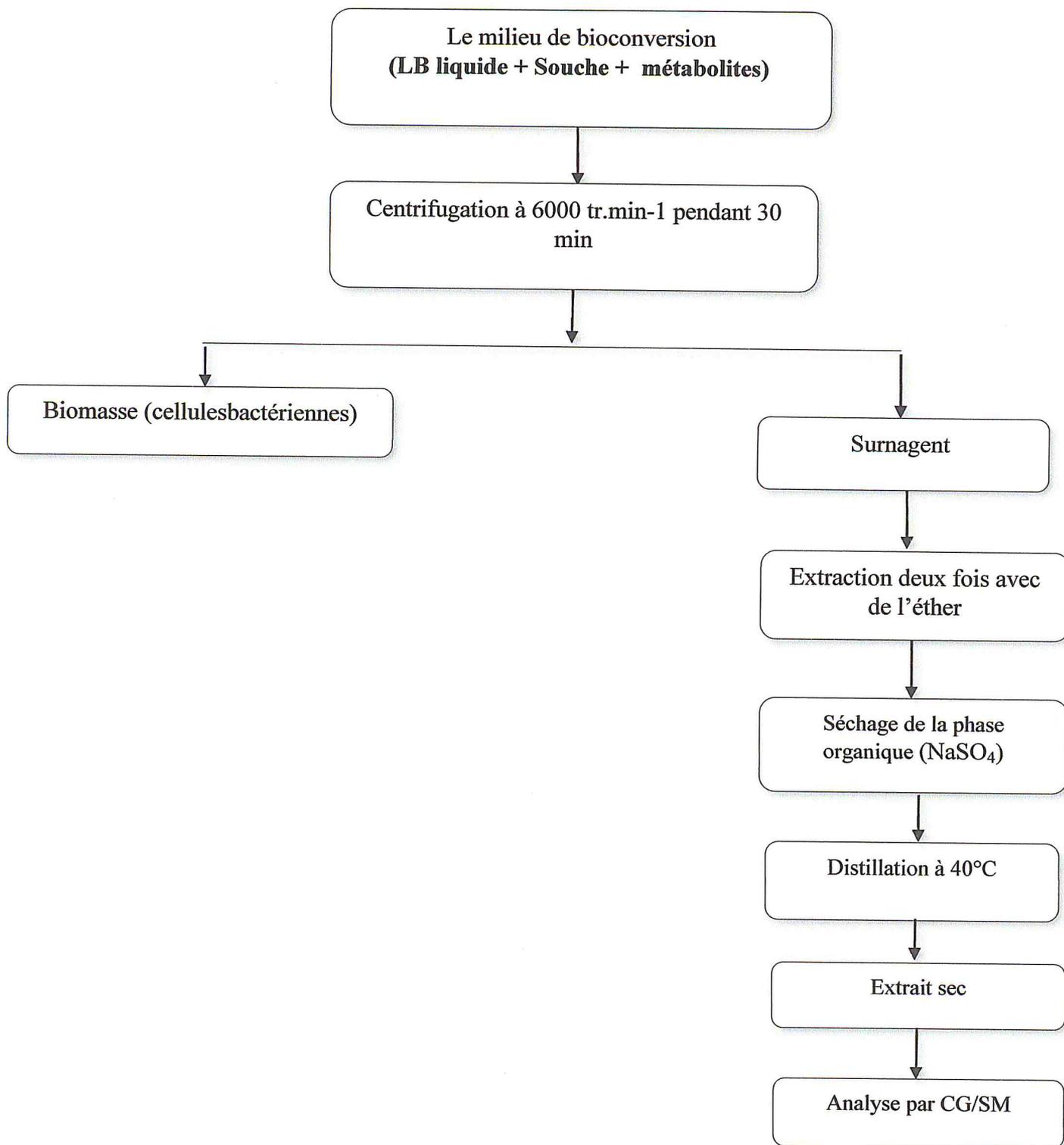
L'expérience de la biodégradation a été réalisée suivant les mêmes étapes que celles de la bioconversion, la seule différence est dans le milieu de préculture utilisé (le milieu riche ISP9 utilisé dans la bioconversion a été remplacé par le milieu pauvre ISP2 dans la biodégradation). Le suivi de la cinétique de la biodégradation est assuré pendant une semaine à raison d'un prélèvement à chaque 24h.

## **II. 2.2.6 Extraction des métabolites**

La procédure d'extraction des produits de bioconversion et de biodégradation de limonène par les deux souches *paenibacillus popilliae* C1 et *Streptomyces sp* AB1, est décrite par les étapes suivantes :

- Centrifugation à 6000 tr.min<sup>-1</sup> pendant 30 min à deux reprises pour l'élimination des biomasses (cellules bactériennes) ;
- Récupération des surnageant ( $V_{paenibacillus\ popilliae} = 40\text{ ml}$ ,  $V_{Streptomyces\ sp\ AB1} = 43\text{ ml}$ ) pour enfin subir une extraction deux fois consécutive avec de l'éther di éthylique (v/v) ;
- Séchage des deux phases organiques sur du sulfate de sodium anhydre (NaSO<sub>4</sub>),

- Filtration de ces dernières en utilisant du papier wathmann ;
- Distillation des deux phases organiques à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40°C pour éliminer le solvant ;
- Les extraits sec obtenus sont de couleur marron-jaunâtre;
- Diluer le mélange de produits final dans de l'acétate d'éthyle (0,84 ml) ;
- Analyser des deux mélanges dilués dans de l'acétate d'éthyle par une CG/SM. (voir en annexe)



**Figure 10 :** Etapes d'extraction des métabolites secondaires à partir de la bioconversion du limonène

## **II. 2.3 Etude la photodégradation du limonène**

La photodégradation est la dégradation d'une molécule causée par l'absorption de photons provenant de différents types de rayonnements.

### **II. 2.3.1 Phodégradation par des rayons hauts énergie de $^{137}\text{Cs}$**

#### **II. 2.3.1.1 Principe**

Le traitement ionisant envoie sur la cible traitée des particules de haute énergie : électrons accélérés par des accélérateurs ou particules assimilées à des photons pour le rayonnement gamma. En arrivant en contact des atomes de la cible, les particules éjectent des électrons à partir des couches superficielles. Un effet ionisant a lieu. Ces électrons, dits primaires, ionisent les molécules du milieu, d'où formation d'électrons secondaires ayant une énergie suffisante pour ioniser d'autres molécules. Ce phénomène appelé effet Compton, se poursuit jusqu'à ce que l'énergie du dernier électron soit équivalente à l'énergie de rupture d'une liaison chimique au sein d'une molécule [48].

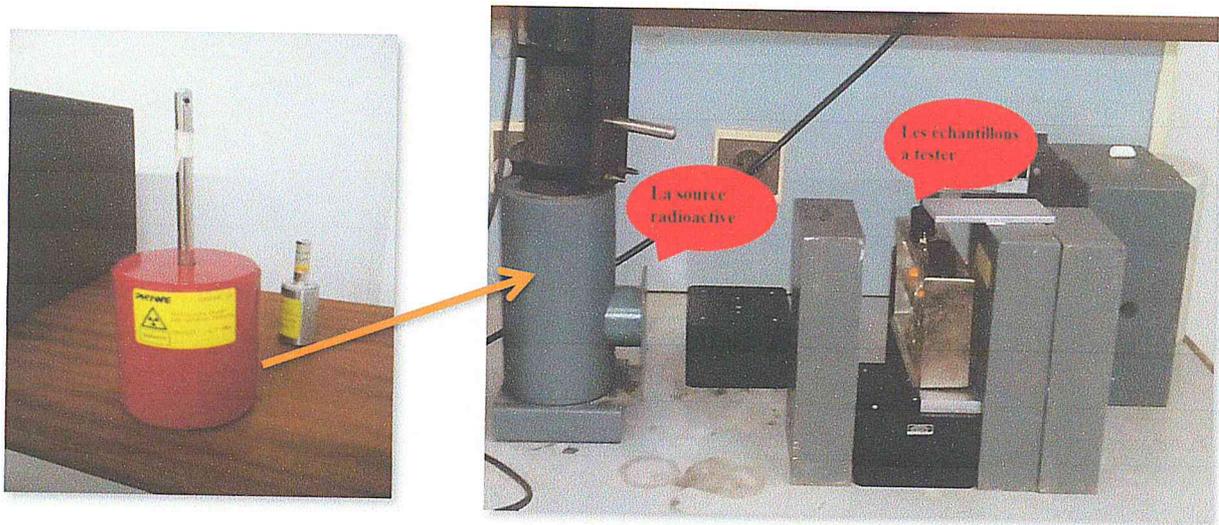
Les sources de rayonnements ionisants sont divers : les électrons accélérés, le rayonnement X, le rayonnement gamma issus d'une source radioactive de Cobalt  $^{60}\text{Co}$  ou de Césium  $^{137}\text{Cs}$  [49]. Les radionucléides  $^{60}\text{Co}$  et  $^{137}\text{Cs}$  ont été largement utilisés pour l'irradiation des denrées alimentaires.

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

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

#### **II. 2.3.1.2 Mode opératoire**

Dans un tube bien fermé, 20 mg de limonène pur à l'état liquide est introduite et déposée horizontalement en face la source du rayonnement de  $^{137}\text{Cs}$  pendant 15 min (Figure 12). À la fin de l'opération, la masse de limonène est diluée dans l'acétate d'éthyle et soumise à une analyse par CG/SM.



**Figure 11 : Source radioactive de Césium 137**

## **II.2.3.2 Photodégradation par des rayons UV**

### **II.2.3.2.1 Généralités**

La photodégradation sous l'effet de rayonnement ultraviolet constitue l'une des voies de dégradation abiotique [49]. Ce processus de dégradation, peut avoir lieu à la surface du sol, dans l'air, ou dans les eaux de surfaces. La photodégradation a été réalisée à l'aide d'une lampe UV à 254nm (figure13) contenu dans un système fermé qui comporte un ventilateur.

### **II.2.3.2.2 Mode opératoire**

Dans un bécher, une masse de 50 mg de limonène est introduite et placée verticalement sous la lampe pendant 60 min. En fin d'opération, la masse de limonène est diluée dans l'acétate d'éthyle et soumise à une analyse par CG/SM.

## II. Résultats et discussion

### II.3.1 Analyse préliminaire du limonène

#### II.3.1.1 Analyse par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier du limonène

Le spectre IRTF du limonène préparé dans le dichlorométhane à une concentration de 5 mg.ml<sup>-1</sup> est représenté par la figure 13. L'analyse du spectre du limonène montre des bandes situées à 2920 et 2857 cm<sup>-1</sup> liées aux vibrations des groupements CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub>, et une bande à 1645 cm<sup>-1</sup> correspondant à la vibration d'allongement des liaisons C=C. La bande qui apparaît à 1377 cm<sup>-1</sup> est caractéristique des groupes CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub>. Il y a lieu de noter que les bandes qui apparaissent vers 2400 cm<sup>-1</sup> sont liées à la présence de CO<sub>2</sub> dans le compartiment de mesures.

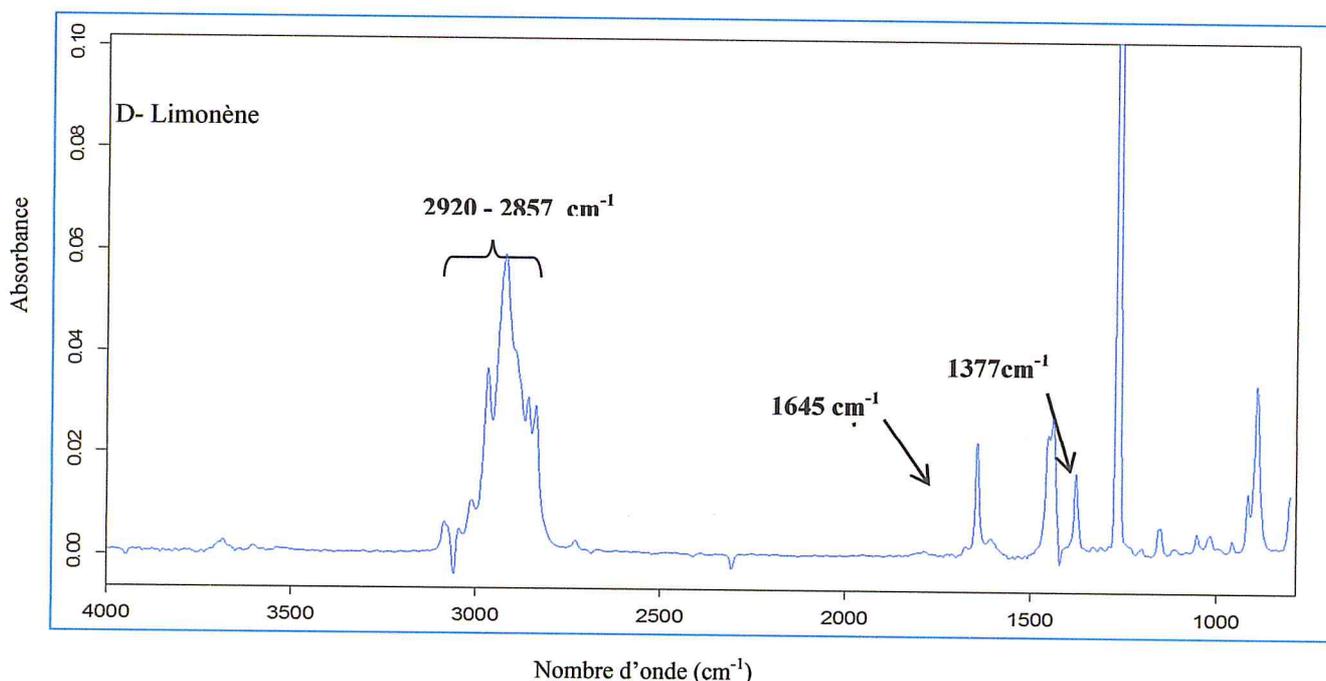


Figure 12 : Spectre IRTF d'absorbance du limonène (5 mg/mL)

#### II.3.1.2 Analyse du limonène par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)

Le profil chromatographique (figure 14) montre la présence d'un seul pic élué à un temps de rétention de 3,4 min correspondant au limonène. Ceci dénote la pureté du limonène utilisé pour les différentes manipulations.

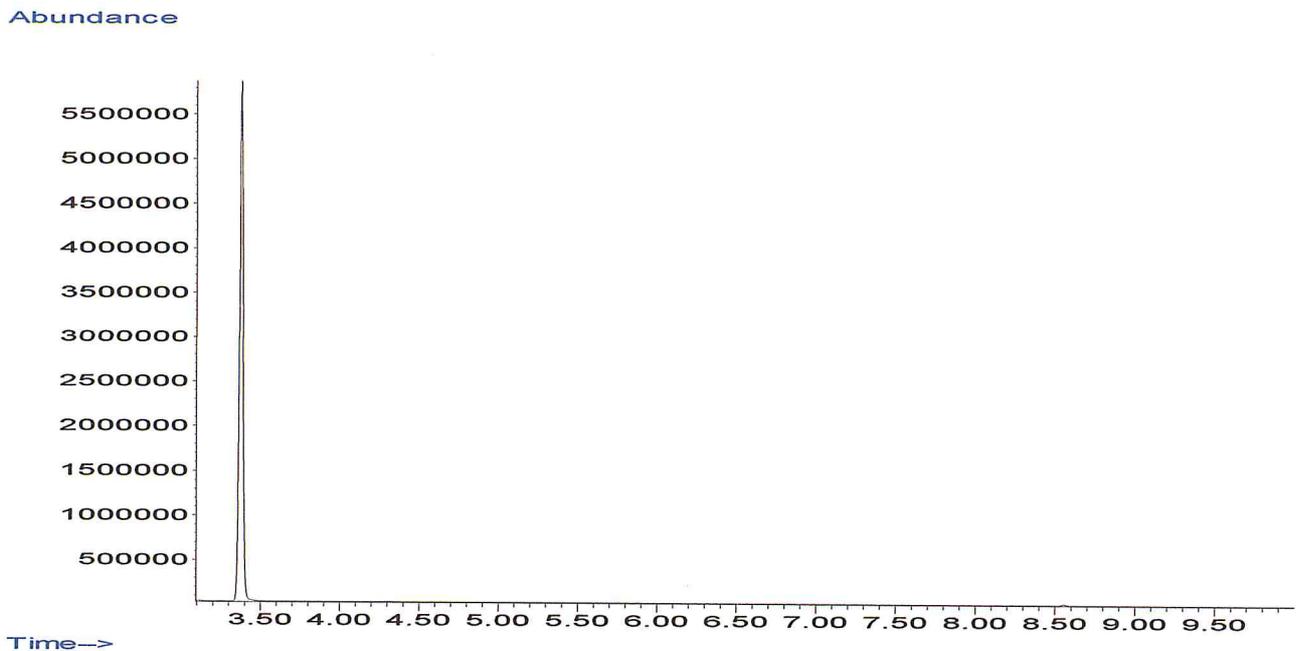
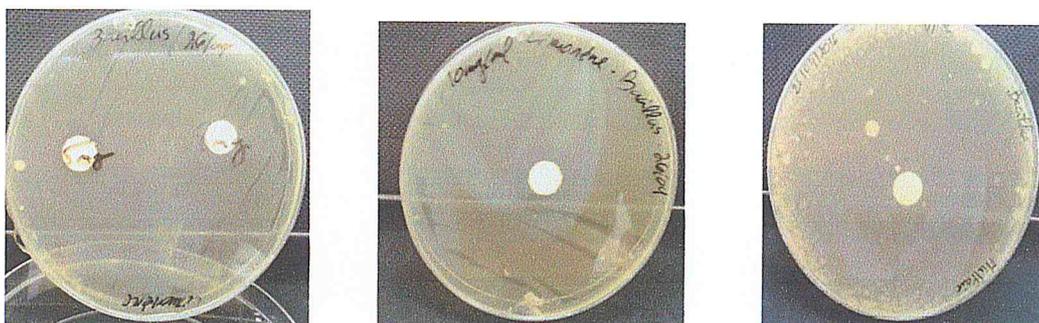


Figure 13 : Profil chromatographique d'analyse du limonène

### II. 3.2 Détermination de la concentration assimilable non inhibitrice pour la bioconversion et la biodégradation par le test d'inhibition

Différentes concentrations du substrat (limonène) à savoir 0.05, 0.5, 1, 5, 8, 10 et 15 mg/ml ont été testées dans le but de déterminer la concentration assimilable non inhibitrice du substrat (limonène) permettant d'estimer la sensibilité de la souche *Paenibacillus popilliae* vis-à-vis du limonène.

Nous avons constaté une absence totale de zones d'inhibition (figure 14) avec toutes les concentrations utilisées. Ceci montre la résistance de la souche vis-à-vis des différentes concentrations testées, et exprime ainsi l'absence de la toxicité du substrat vis-à-vis de la souche *Paenibacillus popilliae*. L'absence des zones d'inhibition pourraient être liés aussi à la volatilisation du substrat ou son faible degré de diffusion sur la gélose.



Concentration de 5 et 8 mg/mL

Concentration de 10mg/mL

Concentration de 15mg/mL

Figure 14: Tests d'inhibition de limonène vis-à-vis de la souche *Paenibacillus popilliae*

## II.3.3 Bioconversion du limonène par *Peanibacillus popilliae* et *Streptomyces rochei*

### II.3.3.1 Bioconversion du limonène par *Peanibacillus popilliae*

Le limonène soumis à des tests de bioconversion a permis de récupérer une phase organique (1) (mélange des métabolites) renfermant les différents métabolites obtenus. L'analyse par CG/SM de la phase organique a montré le profil chromatographique donné par la figure 15. L'examen du chromatogramme de la figure 16, révèle la présence de plusieurs métabolites représentant les produits de bioconversion du limonène par *Peanibacillus popilliae*. L'identification des différents produits a été faite en se basant sur les banques de donnée spectrales (Wiely,7n Niste02,NBS75K) ainsi que sur les données de la littérature comportant les spectres de masse des produits purs. Les produits identifiés sont regroupés dans le tableau 6.

**Tableau 6 :** Métabolites issus de la bioconversion du limonène par *Peanibacillus popilliae*

| N° | Nom systématique                                      | Nom trivial             | Formule  | Temps de rétention |
|----|---|-------------------------|--|--------------------|
| 1  | (Acide 3-méthylbutanoïque)                            | Acide isopentanoïque    | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>  | 2.34               |
| 2  | cis-2,8-Menthadien-1-ol                               | cis-2,8-Menthadien-1-ol | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              | 5.013              |
| 3  | p-Mentha-1,3,8-triene                                 | p-Mentha-1, 3,8-triene  | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>                | 5.247              |
| 4  | Acide octanoïque                                      | Acide octanoïque        | C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>  | 5.735              |
| 5  | cis-2-Methyl-5-[1-methylethenyl]-2-cyclohexen-1-ol    | Cis-carveol             | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              | 6.684              |
| 6  | trans-2-Methyl-5-[1-methylethenyl]-2-cyclohexen-1-ol  | Trans carveol           | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              | 6.915              |
| 7  | trans-2-Methyl-5-[1-methylethenyl]-2-cyclohexen-1-one | trans- Carvone          | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              | 7.166              |
| 8  | 1-Methyl-4-(1-methylethenyl)-1,2-cyclohexanediol      | Limonene-1.2diol        | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> | 9.220              |

Abundance

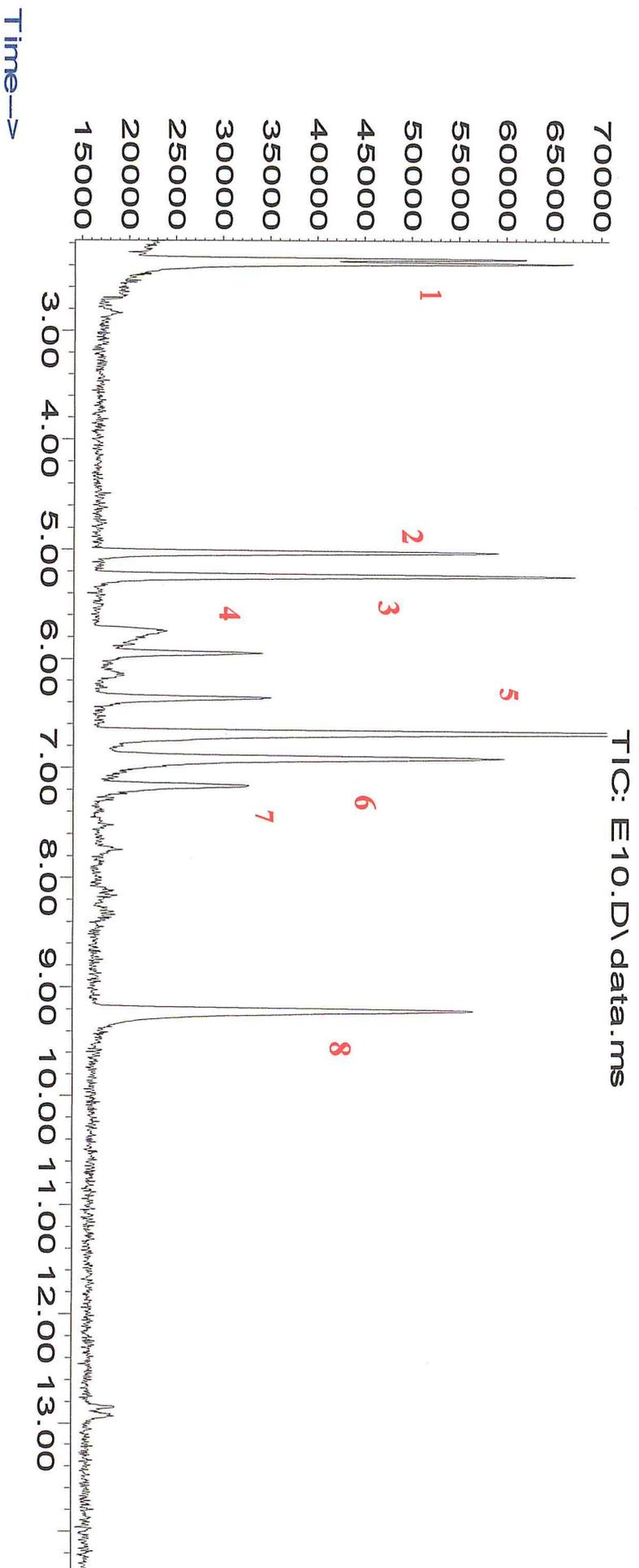


Figure 15 : Profil chromatographique d'analyse de la phase organique (1) (mélange des métabolites)

La figure suivante illustre les voies métaboliques de la bioconversion du limonène par *Peaibacillus popilliae*

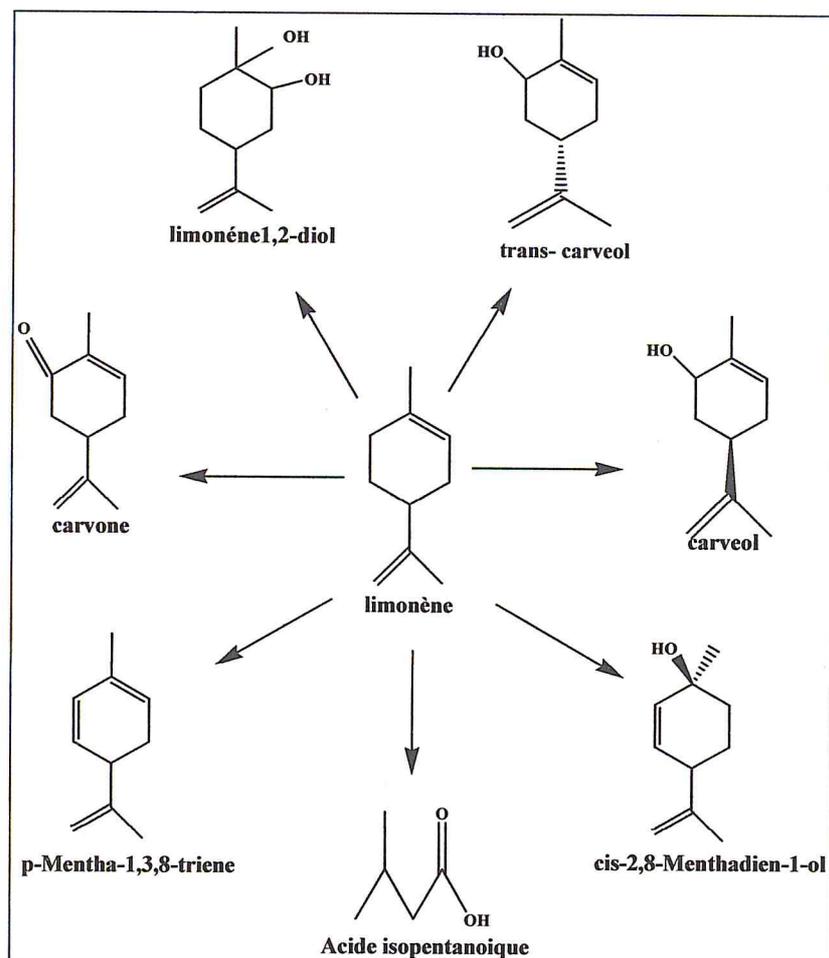


Figure 16: Voies de bioconversion de limonène par *Peaibacillus popilliae*

### II. 3.3.2 Bioconversion du limonène par *Streptomyces rochei*

La bioconversion du limonène effectué dans les conditions décrites précédemment a permis de récupérer une phase organique comportant les produits issus de la bioconversion. L'analyse par CG/SM de la phase organique a montré le profil chromatographique donnée par la figure 17. L'examen du chromatogramme révèle la présence de plusieurs métabolites qui sont regroupés dans le tableau 7.

Abundance

TIC: M2.D\data.ms

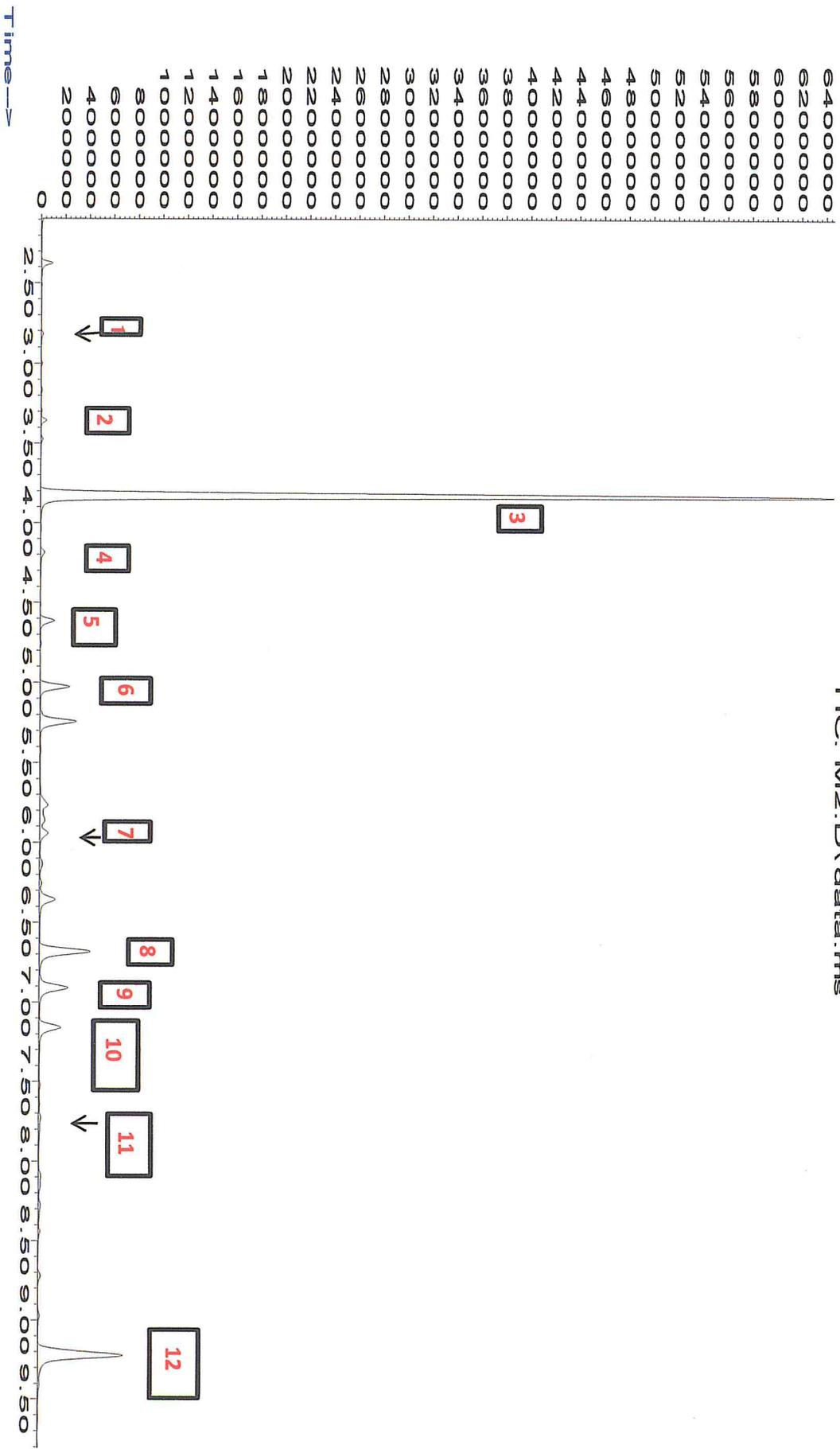


Figure 17 : Profil chromatographique d'analyse de la phase organique (2) (mélange des métabolites)

**Tableau 7:**Métabolites issus de la bioconversion du limonène par *Streptomyces rochei* AB1

| N° | Nom systématique  | Nom trivial                   | Formule  | Temps de rétention |
|----|---|-------------------------------|--|--------------------|
| 1  | $\alpha$ – pinène   | $\alpha$ – pinène             | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>                | 3.002              |
| 2  | Myrcène   | Myrcène                       | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>                | 3.353              |
| 3  | d-limonène  | d-limonène                    | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub>                | 3.834              |
| 4  | Octanol   | Octanol                       | C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O              | 4.195              |
| 5  | 3,7-diméthyl octa- 1,6- dien-3-ol-                                | Linalool                      | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | 4.614              |
| 6  | Trans -2,8-menthadien-1-ol  | Trans -mentha-2.8- diene-1-ol | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              | 5.023              |
| 7  | 5-méthyl-2-[1-méthylethényl ]-[1-<br>alph,2alpha...] Cyclohexanol | Menthol                       | C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O              | 5.864              |
| 8  | cis-2-méthyl-5-[1-méthylethényl]-2-<br>cyclohexen-1-ol            | Cis-carveol                   | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              | 6.684              |
| 9  | trans-2-méthyl-5-[1-méthylethényl]-2-<br>cyclohexen-1-ol          | Trans-carveol                 | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              | 6.915              |
| 10 | trans-2-méthyl-5-[1-méthylethényl]-2-<br>cyclohexen-1-one         | Trans-carvone                 | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              | 7.166              |
| 11 | S-3-méthyl-6-[1-méthylethényl] -<br>2-cyclohexen-1-one-           | Isopiperitone                 | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              | 7.733              |
| 12 | 1-méthyl-4-[1-méthylethényl]<br>1,2-cyclohexanediol               | Isocarvométhol                | C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> | 9.22               |

La figure suivante illustre les voies métaboliques de la bioconversion de limonène par *Streptomyces rochei*

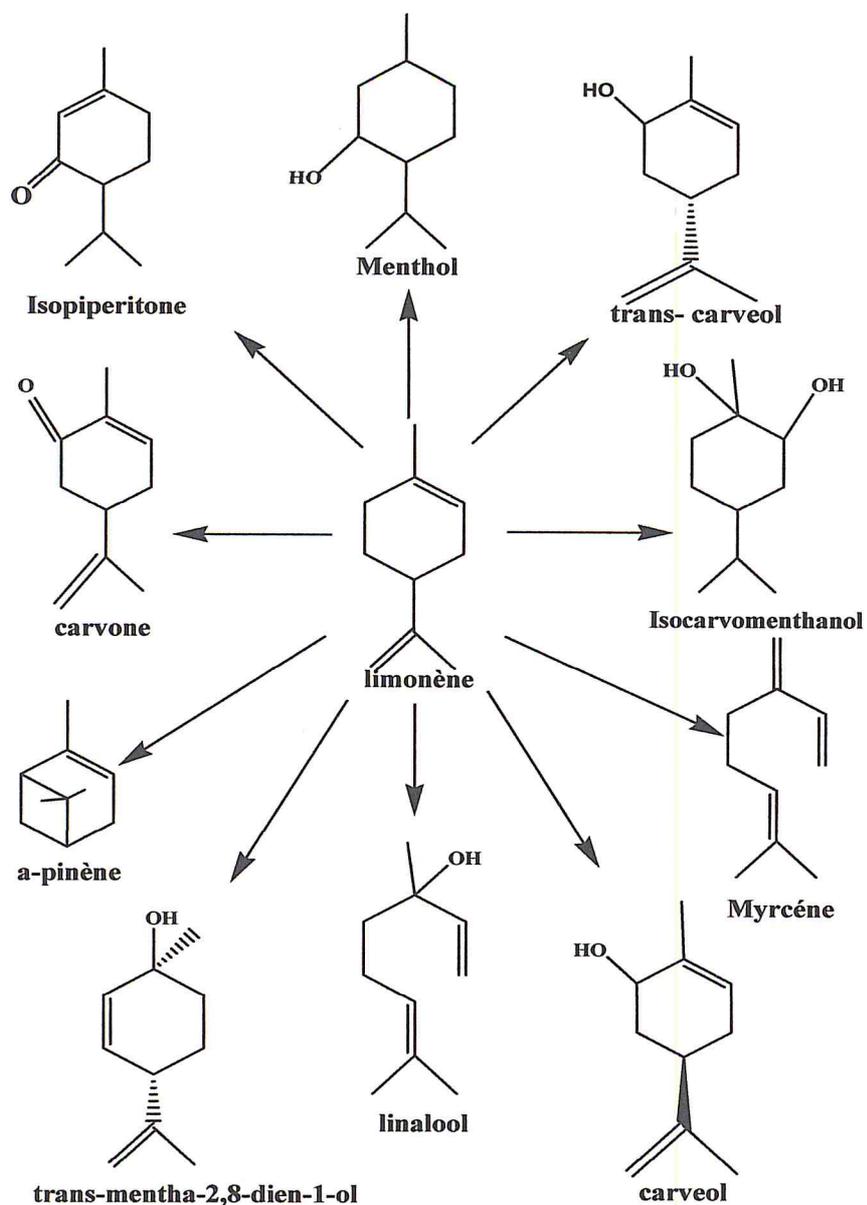


Figure 18: Voies de bioconversion de limonène par *Streptomyces rochei*

### II.3.4 Biodégradation du limonène par *Streptomyces rochei*

Le limonène soumis à un test de biodégradation a permis de récupérer une phase organique (mélange de métabolites). L'analyse par CG/SM de la phase organique a montré le profil chromatographique donné par la figure 19.

Abundance

TIC: M1.D\data.ms

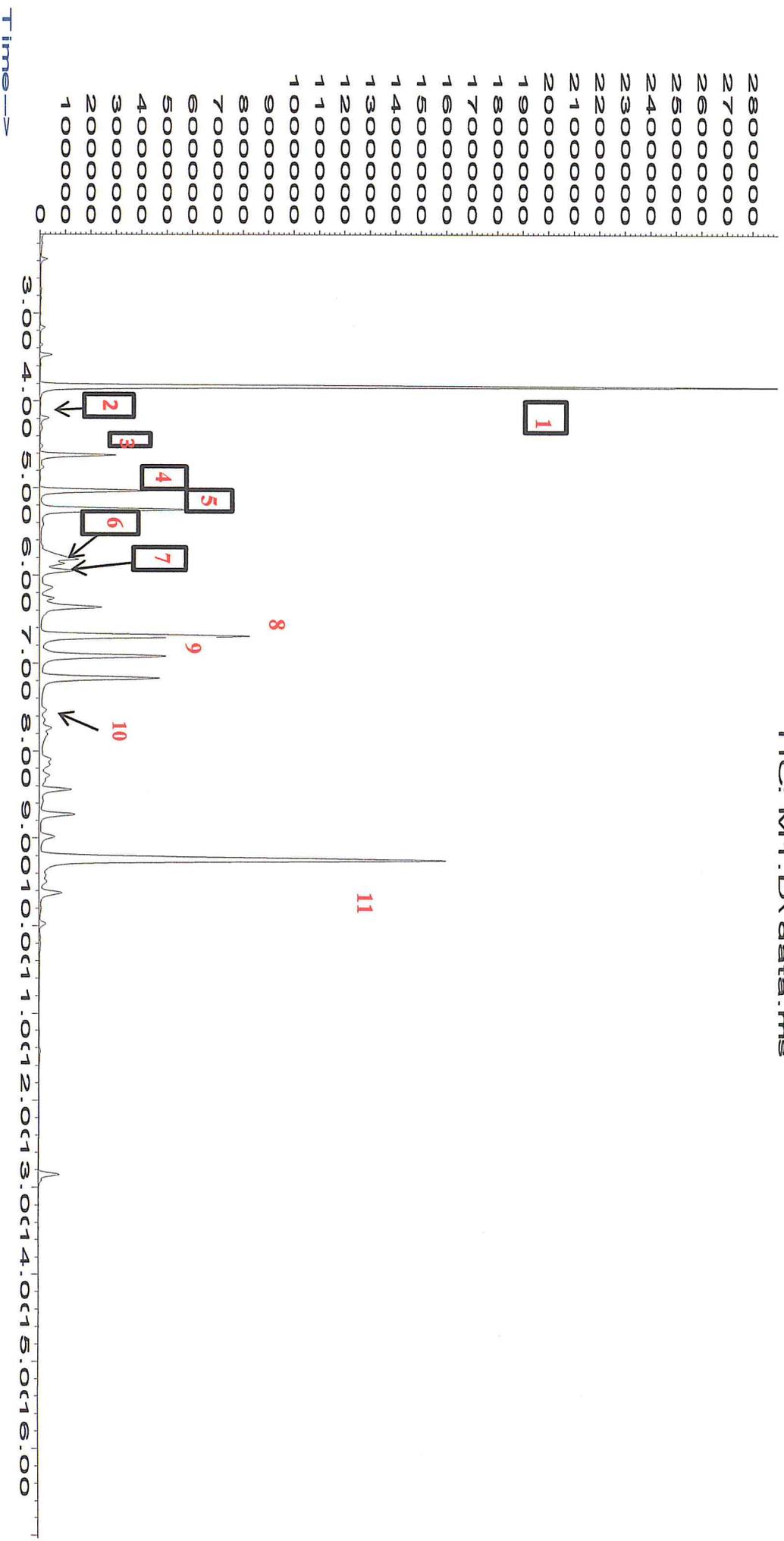


Figure 19: Profil chromatographiques des métabolites secondaires obtenus par la biodégradation de limonène par *Streptomyces rochei*

Le tableau 8 regroupe les différents métabolites obtenus par la biodégradation de limonène en utilisant la souche *Streptomyces rochei*.

**Tableau 8 :** Métabolites secondaires obtenus par la biodégradation du limonène en utilisant la souche *Streptomyces rochei*.

| <i>N°</i> | <i>Sous-produit</i>   | <i>Nom systématique</i>    | <i>Formule</i>                                 | <i>Tr(min)</i> |
|-----------|---|----------------------------|--|----------------|
| 1         | d-limonène  | d-limonène                 | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub>                | 3.834          |
| 2         | Octanol   | Octanol                    | C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O              | 4.193          |
| 3         | 1,6 –octadien-3-ol-3,7-diméthyl                                       | linalool                   | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | 4.614          |
| 4         | Trans -2,8-menthadien-1-ol  | Trans -2,8-menthadien-1-ol | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              | 5.023          |
| 5         | méthyl-2-[1-méthylethényl]-[1- $\alpha$ ,2 $\alpha$ ...] Cyclohexanol | Menthol                    | C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O              | 5.864          |
| 6         | cis-2-méthyl-5-[1-méthylethényl]-2 cyclohexen-1-ol                    | Cis-carveol                | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              | 6.695          |
| 7         | trans-2-méthyl-5-[1-méthylethényl]-2 cyclohexen-1-ol                  | Trans-carveol              | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              | 6.695          |
| 8         | trans-2-méthyl-5-[1-méthylethényl]-2-cyclohexen-1-one                 | Trans-carvone              | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              | 7.166          |
| 9         | S-3-méthyl-6-[1-méthylethényl] -2-cyclohexen-1-one-                   | Isopiperitone              | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              | 7.733          |
| 10        | 4[1-méthylethényl]-1-cyclohexene-1-méthanol                           | Alcool perillylique        | C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O              | 8.269          |
| 11        | 1,2-cyclohexanediol,1-méthyl-4-(1,méthylethényl)                      | Limonene-1.2diol           | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> | 9.220          |

La figure suivante illustre les voies métaboliques de la biodégradation de limonène par *Streptomyces rochei*.

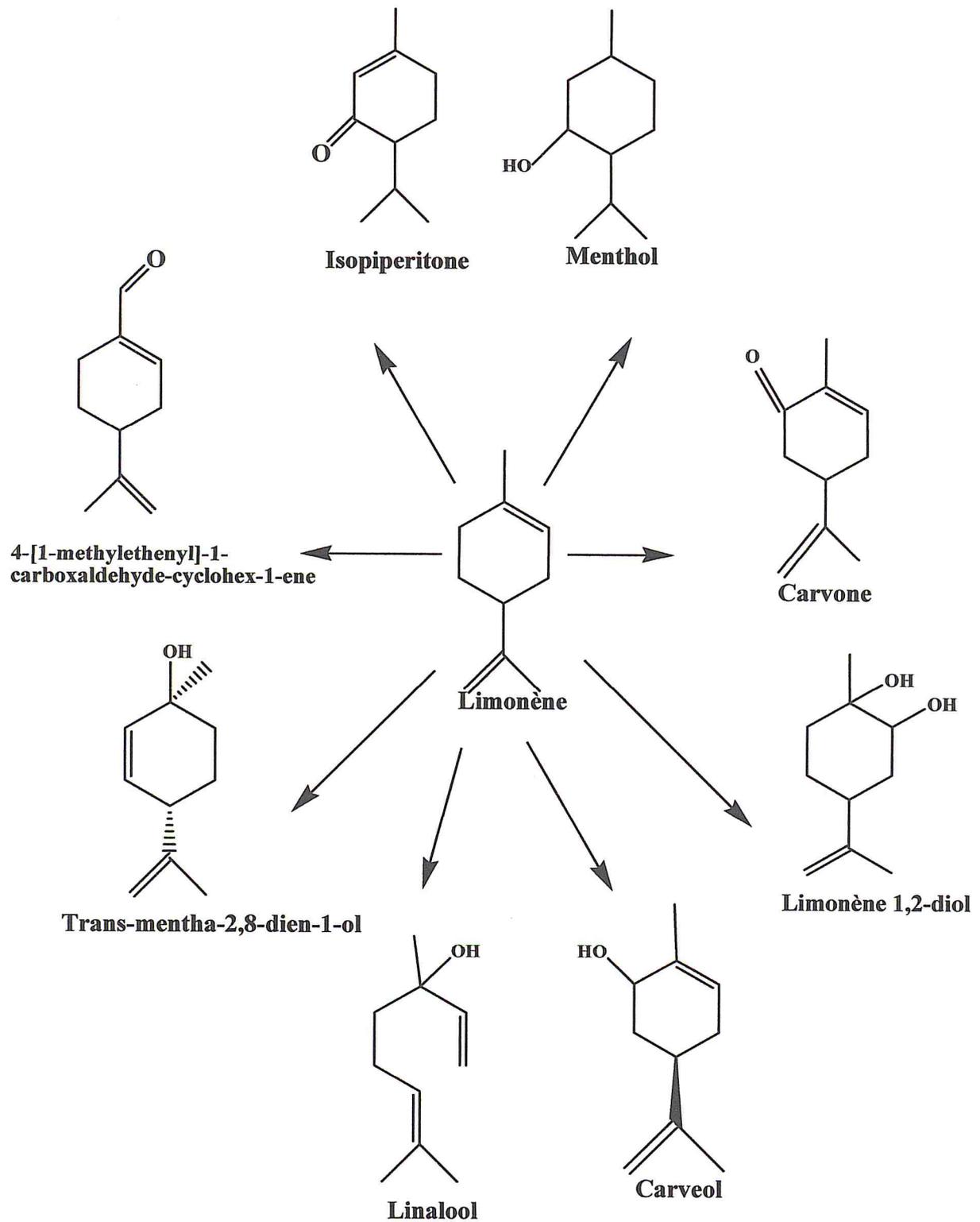


Figure 20 : Voies de biodégradation de limonène par *Streptomyces rochei*

L'examen des tableaux 6,7 et 8 ainsi que des figures 15, 17, et 19 , révèle que le limonène a subi au cours de la bioconversion et la biodégradation par les deux souches *Peaenibacillus popilliae* et *Streptomyces rochei* une dégradation totale. En se basant sur les données de la littérature on se rend compte que des produits comme Cis-carveol, trans-Carvone, obtenus dans le présent travail, ont été également constatés lors de bioconversion de limonène en utilisant successivement *Pseudomonas sp.*PI [42] , *Aspergillus cellulose* M-77 , et *Rhodococcus erythropolis* PWD8 [38]. Le limonène 1,2-diol a été relevé dans la bioconversion de limonène par les souches *Diplodia gossypina* ATTCC 10936, *Armillaireira melleae* et *Aspergillus cellulosa* M-77 [36]. D'autre part, les données de la bibliographie reportent, comme métabolites de la bioconversion de limonène, l'obtention de l' $\alpha$ -terpinéol, alcool perillylique, acide perillylique, et limonène-6,8-diol respectivement par *Bacillus stearothermophilus* BR388, *Pseudomonas incognita* et *Corynespora cassicola* DSM62474 [37].

Il y a lieu de souligner que  $\alpha$ -pinène, linalool, menthol, isopiperitone, isocarvavomenthol, acide isopentanoïque, cis-2,8menthadien-1-ol , p-mentha,1,3,8- triene, ont été identifiés pour la première fois, comme produits de bioconversion et biodégradation de limonène, par les deux souches *Peaenibacillus popilliae* et *Streptomyces rochei*.

### II.3.5 Photodégradation du limonène par un rayonnement UV et par rayonnement haute énergie de $^{137}\text{Cs}$

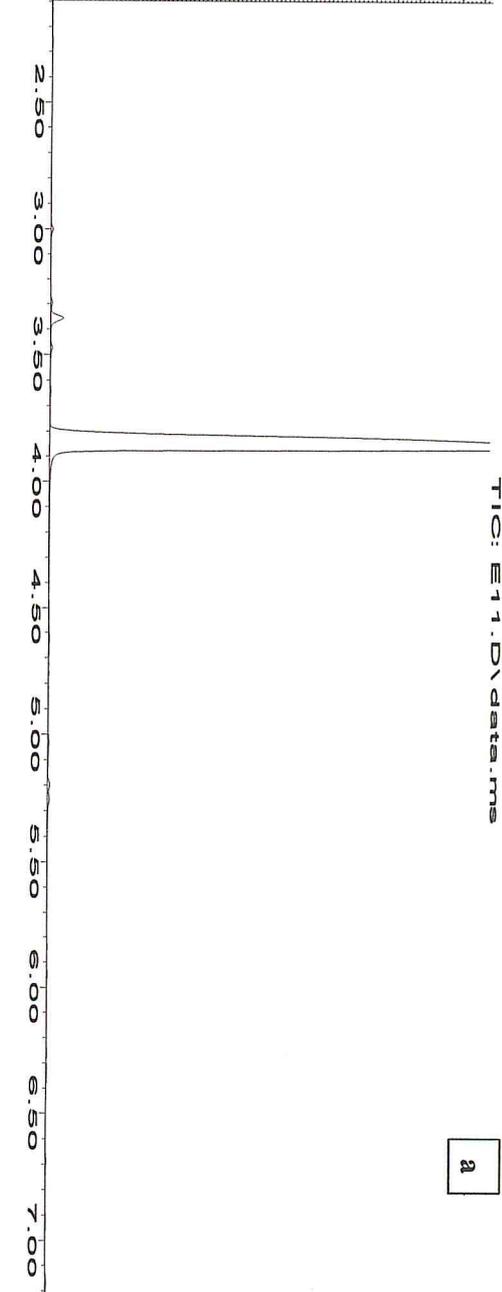
L'analyse par CG/SM du limonène liquide soumis à la photodégradation par le rayonnement UV et par le rayonnement haute énergie de Césium 137 a permis d'enregistrer les profils chromatographiques donnés par les figures 21 et 22. Les deux chromatogrammes révèlent la présence de plusieurs métabolites représentant le résultat de la photodégradation par les deux sources d'énergie.

Les produits identifiés pour la photodégradation du limonène par le rayonnement UV et par le rayonnement haute énergie de Césium sont donnés respectivement par les tableaux 9 et 10.

Abundance

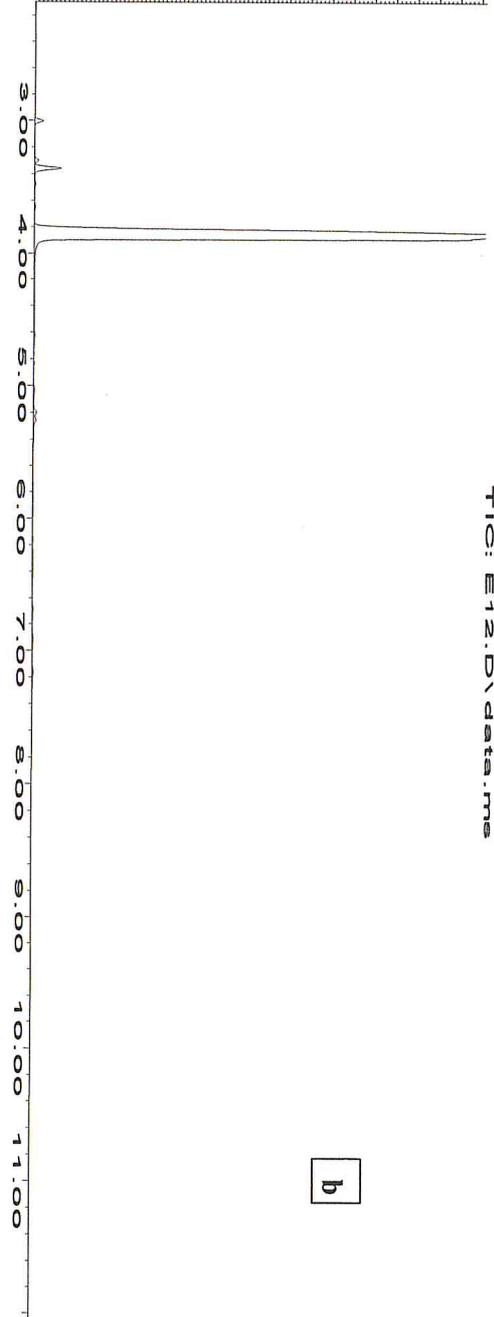
1s+07  
9500000  
9000000  
8500000  
8000000  
7500000  
7000000  
6500000  
6000000  
5500000  
5000000  
4500000  
4000000  
3500000  
3000000  
2500000  
2000000  
1500000  
1000000  
500000

Time-->



a

1.05s+07  
1s+07  
9500000  
9000000  
8500000  
8000000  
7500000  
7000000  
6500000  
6000000  
5500000  
5000000  
4500000  
4000000  
3500000  
3000000  
2500000  
2000000  
1500000  
1000000  
500000



b

Figure 21 : Profil chromatographiques des métabolites secondaires obtenus par la photodégradation de limonène par rayons UV(a) et Cs-137(b)

L'identification des différents produits a été faite en se basant sur les banques des données spectrales (Wiley 7n, Nist 02, NBS75 k). Nous avons constaté que la photodégradation par UV et par le rayonnement haute énergie de Cs-137 produit des métabolites communs et quelques spécifiques à la voie de photodégradation. Ainsi, nous relevons l'obtention du myrcène, d-limonène, Linalool, Carvone,  $\alpha$ -Thujene par les deux voies de photodégradation. Cependant, nous avons noté la présence de l' $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -terpinène, Myrcène, d-limonène, Linalool, Carvone, Oxyde de Limonène, uniquement dans le cas de la photodégradation par UV. Ces résultats peuvent être interprétés par la voie de photodégradation imposée par la stabilité des intermédiaires réactionnels.

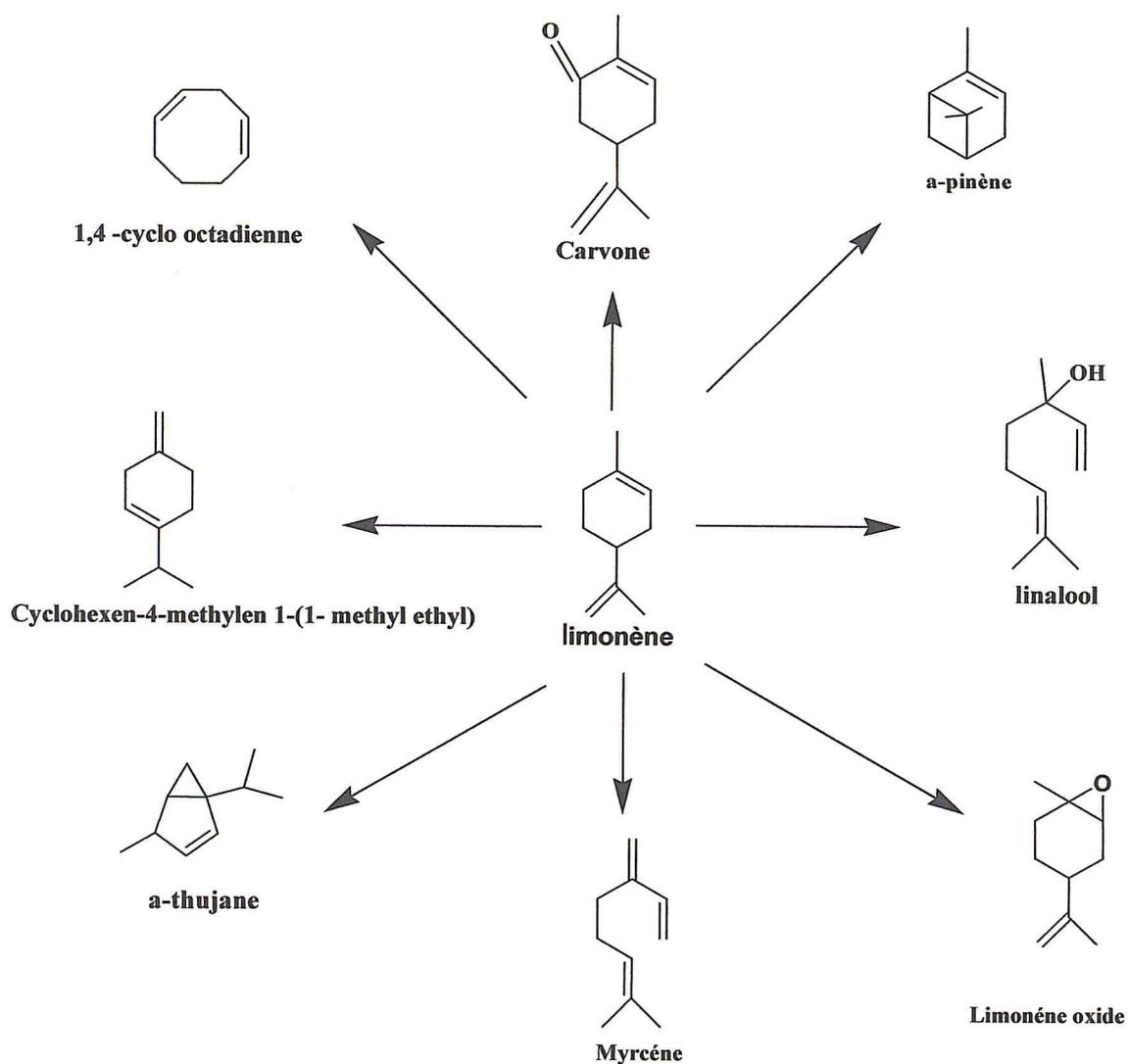
**Tableau 9 : Métabolites obtenus par rayon UV et Cs137**

| Nom systématique                                       | Nom trivial        | Temps Ret. | Formule                           | Photodégradation par UV | Photodégradation par Cs 137 |
|--|--------------------|------------|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| alpha-pinéne   | $\alpha$ -pinéne   | 3.004      | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>   | +                       | -                           |
| 4-méthylène-1-[1-méthylethyl]Cyclohexène               | $\beta$ -terpinène | 3.295      | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub>   | +                       | -                           |
| Myrcène  | Myrcène            | 3.365      | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>   | +                       | +                           |
| d-limonène   | d-limonène         | 3.842      | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>   | +                       | +                           |
| 3,7-diméthyl-1,6-octadiène-3-ol                        | Linalool           | 4.611      | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O | +                       | +                           |
| 1,4-cyclooctadiène                                     | 1,4-cyclooctadiène | 5.254      | C <sub>8</sub> H <sub>12</sub>    | +                       | -                           |
| 1-méthyl-4-[1-méthylethyl]7,oxabicyclo[4.1.0]heptane   | Oxyde de Limonène  | 5.201      | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O | +                       | -                           |
| trans-2-méthyl-5-[1-méthylethényl]-2-cyclohexène-1-one | Carvone            | 7.162      | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O | +                       | +                           |
| 4-méthyl-1-[1-méthylethyl bicyclo[3.1.0] hex-2-ène     | $\alpha$ -thujène  | 3.319      | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>   | -                       | +                           |

+ : Existe

- : Absent

La figure suivante illustre la voie de la photodégradation du limonène par les rayons UV et les Cs-137.



**Figure 22** : Voie de photodégradation de limonène par les rayons UV et les rayonnements hauts énergie Cs 137

# **CONCLUSION GENERALE**

## Conclusion générale

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

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

Afin de déterminer la concentration des réactions de bioconversion et de biodégradation, nous avons réalisé une série de tests d'activité qui nous a permis d'estimer la concentration d'inhibition à 10 mg/ml. La valeur de cette concentration a été utilisée pour la suite de nos expériences sur la bioconversion et la biodégradation. La bioconversion de limonène par la souche *peanibacillus popilliae*, a permis d'obtenir un mélange de métabolites, notamment des monoterpènes, comme :  $\alpha$ - pinène ; Myrcène ; octanol ; Menthol ; Isopiperitone ; Isocarvomenthol ; Acide Isopepntaoique ; cisé,2 -8 Menthadiene-1ol. En utilisant la souche *Streptomyces rochei*, la bioconversion de limonène a mené à des métabolites relativement identiques à ceux obtenus précédemment, on peut citer :

La biodégradation de limonène par la souche *peanibacillus popilliae* n'a pas pas mené à des résultats concluants. Toutefois, la biodégradation du métabolite par *Streptomyces rochei* a permis d'obtenir : Linalool ; Menthol ; Limonène-1.2-diol.

La photodégradation de limonène par un rayonnement UV et par un rayonnement haute énergie Cs-137 a révélé la présence de deux métabolites, identiques pour les deux voies de photodégradation, à savoir :  $\alpha$ -thujene.  $\beta$  -terpinène ; Myrcène ;  $\alpha$ -pinène.

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

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références bibliographiques

- [1] P.Khirwadkar , V.Dave, K.Dashara. "A review on biotransformation" journal of research in pharmacy and biotechnology .1136-1137, 2014
- [2] L.Denis . "Etudes sur la voie de dégradation de l'a-pinène chez *Pseudomonas rhodesiae* en milieu biphasique liquide-liquide". Biotransformation des terpènes et terpinoïdes , thèse de doctorats Génie Chimique et Biochimique :université de Blaise Pascale.2008
- [3] U.Krings , G. Berger , "Biotechnological production of flavours and fragrances". *Appl. Microbiol. Biotechnol* , 1-8. 1998.
- [4] M .Ayres H, J.R. Furr, A.D .Russel , "Effect of permeabilizers on antibiotic sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa*." *Lett. Appl. Microbiol*, 13-16. 1999.
- [5] T Chatterjee, And D.K. Bhattacharyya. "Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*". *Appl. Microbiol Biotechnol*. 541-546. 2001
- [6] J.M.S .Cabral, C. Ratledge . & B .Kristiansen. " Biotransformations: Basic Biotechnology", *Cambridge University Press*, 471-501.2001
- [7] N.Tourta. "Etude de la biodégradation des films de polyéthylène basse densité à usage agricole".biodégradation .thèse de doctorats biomolécules et chimie organique: Université Hadj Lakhdar de Batna.2012
- [8] F.Z. Mesbaïah, « Etude de la biodégradabilité d'un hydrocarbure aromatique polycyclique "Naphthalène" et optimisation de la performance bactérienne en milieu PCN », mémoire de magister, université Saad Dahleb Blida, Algérie, 2011
- [9] W .Fitch, " Toward defining the course of evolution: minimum change" for a specific tree topology. *Syst. Zool*. 406 -416. 1971.
- [10] N.B, Jansen , G.T .Tsao,. "Production of optically active 2, 3-butanediol by *Bacillus polymyxa*". *Biotechnol. Bioeng*. 366-377. 1988
- [11] S.T .Williams et T .Cross Actinomycetes, dans: *Methods in microbiology. Academic Press, London*: 295-334. 1971
- [12] H.A .Lechevalier et 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* (volume 2). *Springer-Verlag Edition Berlin* : 1915-1922. 1981

- [13] D.J Best, N.C.Floyd , A Magalhaes, A Burfield ,and P.M. Rhodes Initial enzymatic steps in the degradation of alpha-pinene by *Pseudomonas fluorescens* Ncimb 11671. *Biocatal. Biotransfor.* PP: 147–159 .1987
- [14] P .Fontanille, C.Larroche, *Pseudomonas rhodesiae* PF1: a new and efficient biocatalyst for production of isonovalal from  $\alpha$ -pinene oxide. *Biocatal. Biotransformation* 413 421.2002
- [15] A, Boontawan , And D. C. Stuckey. “A membrane bioreactor for the biotransformation of alpha-pinene oxide to isonovalal by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671”. *Applied Microbiology and Biotechnology* 643-649. 2006.
- [16] M.J van der Werf , H.J.,Swarts, and J.A.M. De Bont *Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene. *Appl. Environ. Microbiol* 2092–2102. .1999b.
- [17] F .Lueddeke, A Wuelfing , M .Timke, Germer,F,Weber ,J. A .Dikfidan,A,et al. Geraniol and geraniol dehydrogenases induced in anaerobic monoterpene degradation by *Castellaniella defragrans*. *Appl. Environ. Microbiol* 2128–2136. 2012.
- [18] K. Förster-Fromme, and D .Jendrossek. Catabolism of citronellol and Related acyclic terpenoids in pseudomonads. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 859–869. 2010
- [19] D Brodkorb, M.,Gottschall , R.,Marmulla, F .Lueddeke ,and J.Harder .Linalool dehydratase-isomerase, a bifunctional enzyme in the anaerobic degradation of *monoterpenes*. *J. Biol. Chem.* 30436–30442. 2010
- [20] T, Chatterjee, and D.K. Bhattacharyya. “Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 541-546. 2001.
- [21] E .Shimoni, U .Ravid, Y. Shoham.” Isolation of a *Bacillus* sp. capable of transforming isoeugenol to vanillin”. *J Biotechnol.* 1-9. 2000.
- [22] K. H. C,Baser, “Handbook of ESSENTIAL OILS Science, Technology, and Applications”, Ed. K. Hüsnü Can Baser, Gerhard Buchbauer, , 2010.

- [23] Y. Noma, H. Nishimura, and C. Tatsumi, "Biotransformation of carveol by Actinomycetes.1. Biotransformation of (-)-cis-carveol and (-)-trans-carveol by *Streptomyces bottropensis*", SY-2-1, *Proc. 24th TEAC*, 67-70. 1980
- [24] Y. Noma. and H. Nishimura, "Biotransformation of (-)-carvone and (+)-carvone by *S. ikutamanensis* Ya-2-1". *Annual Meeting of Agricultural and Biological Chemical Society*, Book of abstracts, p. 390. 1983
- [25] W. Liu., A. Goswami, R.P. Steffek, R.L. Chemman, F.S. Sariaslani, J.J. Steffens, and J.P.N. Rosazza. "Stereochemistry of microbiological hydroxylations of 1,4-cineole". *J. Org. Chem.*5700-5704. 1988
- [26] Y. Noma, S. Nonomura, and H. Sakai. "Conversion of (-)-carvotanacetone and (+)-carvotanacetone by *Pseudomonas ovalis*, strain 6-1, *Agric. Biol. Chem.*, 38: 1637-1642. 1974a
- [27] Y. Noma. "On the pattern of reaction mechanism of (+)-carvone conversion by actinomycetes". Biochemical reduction of terpenes, part X, *Ann. Res. Stud. Osaka Joshigakuen Junior College*, 23: 27-31 1979b.
- [28] Carvalho. C, and M. R. daFonseca. "Biotransformation of limonene-1, 2-epoxide to limonene-1,2-diol by *Rhodococcus erythropolis*" cells An introductory approach to selective hydrolysis and product separation. *Food Technology and Biotechnology* 181-185. 2000.
- [29] J. B. Hinou, C. E. Harvala, And E. B. Hinou, "Antimicrobial activity screening of 32 common constituents of essential oils". *Pharmazie* .302-303, 1989.
- [30] W., Duetz, A. H. M. Fjallman, S. Ren, C. Jourdat, and B. Witholt. "Biotransformation of D-Limonene to (1) trans-Carveol by Toluene-Grown *Rhodococcus Opacus PWD4* Cells". *Applied and Environmental Microbiology* .2829-2832. 2001
- [31] M. S., E Van Dyk. Van Rensburg, and N. Moleki.. "Hydroxylation of (+) limonene, (-) alpha-pinene and (-) beta-pinene by a *Hormonema sp*". *Biotechnology Letters* 431- 436. 1998
- [32] H. C., D. A. Chang, and P. J. Oriel. "Cloning and expression of a limonene degradation pathway from *Bacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli*". *Journal of Food Science*.551-553. 1995
- [33] W. R., B Abraham., Stumpf, and K. Kieslich. "Microbial transformation of terpenoids with 1-p-menthene skeleton". *Applied Microbiology and Biotechnology* 24: 24-30. 1986.

- [34] **M.J Van Der Werf, H.J Swarts, and J.A.M ,De Bont.** “Rhodococcus erythropolis DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene”. *Appl Environ Microbiol* 65, 2092–2102. 1999
- [35] **ER ,Bowen,** “Potential by-products from microbial transformation of d-limonene”. *Florida State Horticultural Society, Florida*, 304 .1975
- [36] **Y, Noma, S, Yamasaki, Y, Asakawa** “Biotransformation of limonene and related compounds by *Aspergillus cellulosa*”. *Phytochemistry* .2725–2727.1992
- [37] **TK, Cheong, PJ, Oriol.** “Cloning and expression of the limonene hydroxylase of *Bacillus stearothermophilus* BR388 and utilization in two-phase limonene conversions”. *Appl Biochem Biotechnol*.903-915 .2000
- [38] **Duetz WA, Fjallman AHM, Ren SY, Jourdat C, Witholt B** Biotransformation of d-limonene to (+) trans-carveol by toluene-grown *Rhodococcus opacus* PWD4 cells. *Appl Environ Microbiol* 67:2829–2832 .2001
- [39] **MJ, Van der Werf, JAM ,De Bont”** Screening for microorganisms converting limonene into carvone”. *New frontiers in screening for microbial biocatalysts*. Elsevier, pp 231–234. 1998.
- [40] **RS, Dhavalikar, PK, Bhattacharyya** “Microbiological transformations of terpenes. Fermentation of limonene in a soil pseudomonad”. *Indian J Biochem* 3:144-157, 1966
- [41] **J, Onken RG Berger** “Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*”. *J Biotechnol* 69:163–168, 1999
- [42] **G ,Speelmans, A, Bijlsma G, Eggink .”**Limonene bioconversion to high concentrations of a single and stable product, perillic acid, by a solvent-resistant *Pseudomonas putida* strain”. *Appl Microbiol Biotechnol* 50:538–544. 1998
- [43] **WR, Abraham, HMR. Hoffmann, K, Kieslich G .Reng,”** Stumpf B Microbial transformations of some monoterpenoids and sesquiterpenoids”. In: *Enzymes in organic chemistry*. *Ciba Foundation Symposium III*. Pitman, London, pp 146-160. 1986a
- [44] **Draczynska LB (1987)** Oxidation of selected p-menthane derivatives by means of *Armillariella mellea* (honey fungus), a parasite of woodlands. *J Basic Microbiol* 27:191–196

[45] Q. Tan, Day DF, and KR. Cadwallader Bioconversion of R-(+) - limonene. Process Biochem 33:29–37. 1998

[46] BB, Mukherjee, G, Kraidman, “Synthesis of glycols by microbial transformations of some monocyclic terpenes”. Appl Microbiol 25:447–453.1973

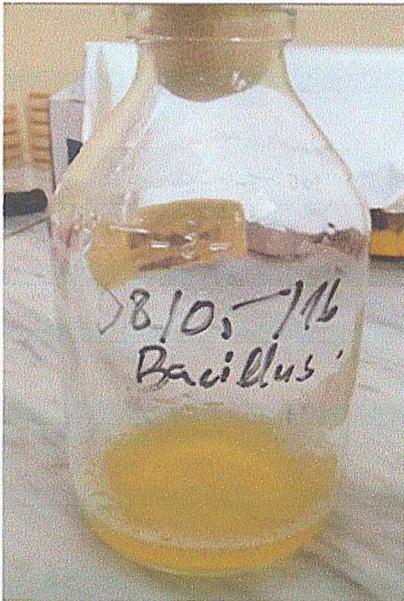
[47] F-z Ferradji « étude des voies métaboliques de la biodégradabilité des hydrocarbures en vue d’une application d’un procédé de biodépollution des eaux de me ». Thèse de doctorat : Chimie industrielle. Université Saad dahlab blida. 2014

[48] L. Gallien, « Traitements ionisants et industries alimentaires », Anales du colloque. APRIA, Paris. 1-12, 1987.

[49] E. Pelizzetti, C. Minero, “Mechanism of the photo-oxidative degradation of organic pollutants over TiO<sub>2</sub> particles” , Electrochimica Acta, 38 (1): 47-55, 1993.

<sup>64</sup>G. Toniazzo, D.Oliveira Biotransformation of (-)β-Pinene by *Aspergillus niger* ATCC 9642  
Department of Biochemistry, Instituto de Química, pp: 121–124, 2005.

## ANNEXE 1



Milieu de bioconversion par  
*Peanibacillus popilliae*



Milieu de biodégradation par  
*Streptomyces rochei*



Milieu de bioconversion par *Streptomyces rochei*

## ANNEXE 2

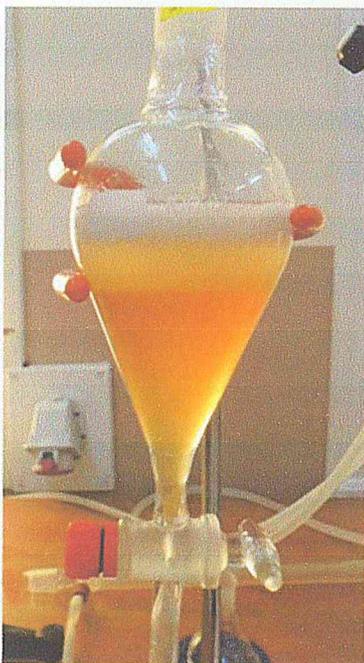
### Méthodologie de l'extraction des métabolites secondaires



**Centrifugeuse**



**Culot bactérien**



**Extraction Liquide-Liquide**



**Rotavapeur**

### ANNEXE 3



**Système de la lampe UV**



**Autoclave**