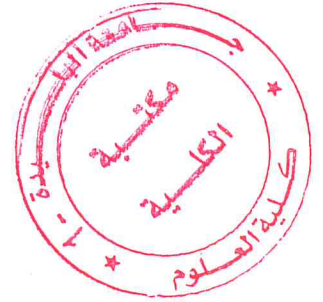


République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université BLIDA 1
Faculté des Sciences
Département de Chimie



Mémoire présenté par
CHAFAI Sabrina



En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière

Filière : Chimie

Option : Chimie des Substances Naturelles

Titre

Bioconversion des métabolites secondaires par une souche bactérienne isolée Localement à partir d'algue marine en vu de son Application Industrielle

Soutenu publiquement le « 04 juillet 2017 » devant le jury composé de :

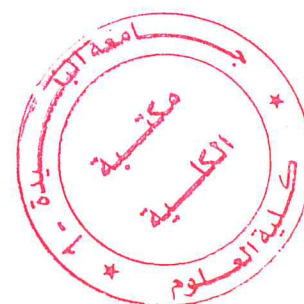
M.El Hattab	prof	Président	Université de Blida 1
F/Z Mesbaiah	MRB,CNRDPA	Examinatrice	Université de Blida 1
A. Badis	Prof	Promoteur	Université de Blida 1
F.Z. Ferradji	MCB	Co/Promotrice	Université de Blida 1

MA-540-162-1

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
CHAFAI Sabrina



En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière

Filière : Chimie

Option : Chimie des Substances Naturelles

Titre

Bioconversion des métabolites secondaires par une souche bactérienne isolée Localement à partir d'algue marine en vu de son Application Industrielle

Soutenu publiquement le « 04 juillet 2017 » devant le jury composé de :

M.El Hattab	prof	Président	Université de Blida 1
F/Z Mesbaiah	MRB,CNRDPA	Examinatrice	Université de Blida 1
A. Badis	Prof	Promoteur	Université de Blida 1
F.Z. Ferradji	MCB	Co/Promotrice	Université de Blida 1



Remerciements

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

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

J'adresse mes sincères remerciements à Pr.EL HATTAB Mohamed, Je tiens à lui témoigner ma gratitude pour ses encouragements, sa disponibilité, sa patience avec moi, sa gentillesse et ces qualités scientifiques et humaines.

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

Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à Mr.M.EL HATTAB professeur à l'Université de Blida 1, de m'avoir fait honneur de présider ce jury.

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

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

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

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

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



Dédicaces

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

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

Je dédie également ce travail à mes frères et sœurs.

A toute ma famille

A toutes mes amies

Ainsi qu'à tous ceux qui me sont cher

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

Sabrina

ملخص

يركز هذا العمل على دراسة التحويل البيولوجي و التحلل او التفكك البيولوجي لألفاينين باستخدام نوع من السلالات البكتيرية المعزولة محليا من الطحالب *Zonariatournefortii* و ترميزها *S33*. وبناء على التوصيف المورفولوجي، أنه ينتمي إلى جنس العصيات

Bacillus.

لقد سمح لنا تحديد التركيزات بترسيم تثبيط لألفاينين التي أجريت على مجال واحد من السلالات. تم تحديد هذا التركيز بأنه يساوي 500 ملغ/ل. تم إجراء التحويل البيولوجي على سلالة *S33 Bacillus* في الوسط الغني VNSS، على العكس التحلل البيولوجي تم في وسطين فقير ومتوسط من الغلوكوز.

إن شروط العمل على التحويل البيولوجي و التحلل البيولوجيا لألفاينين بالسلالة *S33 Bacillus*، سمح الحصول على مونوتريبين الهيدروكربوني والاكسيجينيني. التحلل البيولوجي لألفاينين أدى إلى الحصول على سيتزال، سيز-فريينول، دي-فريينون، و ترنس-سويغيفول كمنتج رئيسي .

إن التحويل البيولوجي لألفاينين انتج مونوتريبين، ألفا-تريينول، سيز-فريينول، ترنس-سويغيفول.

الكلمات المفتاحية : لألفاينين ، التحلل البيولوجي ، التحويل البيولوجي ، VNSS ، *Bacillus spS33* ، *Zonaria* ، *tournefortii*

Résumé

Le présent travail porte sur l'étude de la bioconversion et la biodégradation de α -pinène par une souche bactérienne isolée localement à partir de l'algue *Zonariatournefortii* codée S33. Sur la base d'une caractérisation morphologique, elle appartient au genre *Bacillus*.

La détermination des concentrations permettant de délimiter le domaine d'inhibition vis-à-vis le métabolite de l' α -pinène en vers la souche S33 a été fixée à 500 mg/l.

La bioconversion a été effectuée sur le milieu VNSS riche, par contre, la biodégradation a été réalisée en milieu sans et pauvre en glucose.

Les conditions opératoires de bioconversion et de biodégradation par la souche *Bacillus* S33 ont montré la formation des monoterpènes hydrocarbonés et oxygénés. La bioconversion a permis notamment l'obtention le cis-verbenol, D-verbénone, Citral, et le trans-Sobrerol comme produit majoritaire. La biodégradation de α -pinène par la souche S33 a mené à l'obtention d'autres monoterpènes, α -Terpineol, cis-Verbenol, trans-Sobrerol.

Mots clés : α -pinène, bioconversion, biodégradation, *Bacillus.sp* S33, VNSS , *Zonaria tournefortii*

Abstract

This work focuses on the study of the bioconversion and biodegradation of α -pinene by a bacterial strain isolated locally from the alga *Zonaria tournefortii* and coded S33. On the basis of morphological characterization, it belongs to the genus *Bacillus*.

Determining of concentrations for delineating the area of inhibition vis-a-vis α -pinene was performed on the strains. This concentration was determined to be equal to 500 mg / L.

The bioconversion was performed on the VNSS rich medium; on the contrary biodegradation was performed by using the minimum medium (glucose).

The bioconversion and biodegradation of α -pinene by *Bacillus* S33 strain, allowed obtaining other hydrocarbon monoterpenes and oxygenated. the bioconversion allows us to obtain including obtaining cis-verbenol, D-verbenone, Citral, and trans-Sobrerol the major product. The biodegradation of α -pinene by the strain *Bacillus* S33 led to obtaining other monoterpenes as α -Terpineol, cis-Verbenol, trans-Sobrerol.

Keywords : Bioconversion, biodegradation, α -pinene, *Bacillus.sp*S33, *Zonaria tournefortii*

SOMMAIRE

Remerciements	i
Dédicaces	iii
ملخص	iv
Résumé	v
Abstract	vi
Liste des abréviations	vii
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	ix
Liste des planches	x
Introduction général	1
Partie I : Synthèse bibliographique	
I. Introduction	4
I.1 Notions générales sur la biotransformation	4
I. 1.1 Définition de la bioconversion	4
I. 1.2 Facteur affectant la bioconversion	5
I. 1.3 Avantages et Inconvénients de la bioconversion	5
I.1.4 Définition de la biodégradation	6
I.1.5 Principe de la biodégradation	7
I.2 Généralité sur les Microorganismes marines	8
I.3 Bioconversion par les microorganismes	8
I.4 Etude de la bioconversion des métabolites secondaires par le genre <i>Bacillus</i>	9
I.4.1 Description du genre <i>Bacillus</i>	9
I.4.2 Classification du genre <i>Bacillus</i>	10
I.4.3 Bioconversion des monoterpènes par le genre <i>Bacillus</i>	11
I.4.4 Biotransformation des terpènes	12
I.5 Etude de la bioconversion de l' α -pinène	12
I.5.1 Description chimique de l' α -pinène	12
I.5.2 Propriétés physiques et chimique de l' α -pinène	13
I.5.3 Travaux antérieur de la bioconversion des pinènes	14
I.5.3.1 Bioconversion par les champignonnières marine	14
I.5.3.2 Bioconversion de l' α -pinène par divers microorganismes	15

Partie II : Etude expérimentale

II.1 Introduction	18
II.2 Matériel et méthodologie expérimentale	20
II.2.1 Origine de la souche utilisée	20
II.2.1.1 La souche bactérienne S33	20
II.2.2 Purification	20
II.2.3 Préparation et composition des milieux de cultures	21
II.2.4 Caractéristique phénotypiques de la souche S33	21
II.2.4.1 Identification préliminaire de la souche S33	21
II.2.4.2 Test de mobilité	22
II.2.4.3 Examen direct après coloration de Gram	23
II.2.4.4 Recherche de la catalase	23
II.2.4.5 Test d'oxydase	23
II.2.4.6 Galerie API	24
II.2.5 Détermination de la concentration minimal inhibitrice (CMI)	24
II.2.5.1 Lecture des résultats	24
II.2.5.2 Milieux de repiquage	25
II.2.5.3 Milieux de préculture	25
II.2.5.4 Préparation de la solution mère de l' α -pinène	26
II.2.5.4.1 La gamme de concentration du substrat l' α -pinène	26
II.2.5.5 Préparation de solutions diluées	26
II.3 Etude de la bioconversion et la biodégradation de α -pinène	26
II.3.1 Bioconversion par la souche S33	26
II.3.2 Biodégradation par la souche S33	27
II.3.2.1 Biodégradation en milieu pauvre en glucose	27
II.3.2.2 Biodégradation en milieu Sans glucose	27
II.4 Centrifugation de l'extrait de culture bactérienne	28
II.5 Extraction du surnageant	28
II.6 Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)	29

III. Résultats et discussion

III.1 Caractéristique phénotypique de la souche bactérienne S33	30
III.1.1 Mobilité	30
III.1.2 Coloration du Gram	30
III.1.3 Test de catalase	31
III.1.4 Test d'oxydase	31
III.1.5 Résultats de la galerie API E20	32
III.2 Détermination de la concentration minimal inhibitrice CMI pour la bioconversion et la biodégradation	33
III.3 Bioconversion et biodégradation de l' α -pinène par la souche <i>Bacillus</i> S33	35
III.3.1 Bioconversion de l' α -pinène par la souche <i>Bacillus</i> S33	35
III.3.2 Biodégradation en milieu pauvre en glucose de l' α -pinène par la souche <i>Bacillus</i> S33	38
Conclusion générale	44
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des abréviations

[C]	: Concentration
IRTF	: Infrarouge à Transformer de Fourier
°C	: Degré Celsius
Rf	: Rapport frontal
pH	: Potentiel Hydrogène
KBr	: Bromure de potassium
CG/SM	: Chromatographie en phase Gazeuse associée à la Spectrométrie de Masse
LB	: Milieu LuriaBertani
VNSS	: VaätanenNineSalt Solution
µl	: Microlitre
%	: Pourcent
v/v	: volume / volume
tr.min⁻¹	: tourne par minute

Liste des figures

Figure 1	: Classification du genre <i>Bacillus</i>	10
Figure 2	: Formes énantiomères de l' α -Pinène	13
Figure 3	: Méthodologie expérimentale du travail	19
Figure 4	: La souche bactérienne S33 isolée de l'algue brune <i>Zonaria tournefortii</i>	20
Figure 5	: Repiquage sur milieu LB	25
Figure 6	: Repiquage sur milieu VNSS	25
Figure 7	: Méthode de réalisation de l'inoculum	25
Figure 8	: Schéma représentant les étapes de la Bioconversion et la Biodégradation	27
Figure 9	: Extraction du surnageant de culture bactérienne	28
Figure 10	: Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS)	29
Figure 11	: L'état frais mobilité de la souche	30
Figure 12	: Test de mannitol-mobilité	30
Figure 13	: Les formes bâtonnets de la souche S33	31
Figure 14	: Bactéries de catalase positive (+)	31
Figure 15	: Bactérie d'oxydase positive(+)	31
Figure 16	: Galerie API E20 de la souche S33	32
Figure 17	: Effet de concentration de l' α -Pinène sur la croissance de la souche S33	34
Figure 18	: Profil chromatographique d'analyse CG-SM de la bioconversion de l' α -pinène par la souche <i>Bacillus</i> S33.	36
Figure 19	: Profil chromatographique d'analyse CG-SM de la biodégradation pauvre de l' α -pinène par la souche <i>Bacillus</i> S33	40

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Caractères bactériologique du genre <i>Bacillus</i>	9
Tableau 2 :	Bioconversion de quelques monoterpènes par le genre <i>Bacillus</i>	11
Tableau 3 :	Propriétés physiques et chimiques de l' α -Pinène	13
Tableau 4 :	Composition chimique des milieux de cultures	21
Tableau 5 :	Gamme de concentration du substrat l' α -pinène	26
Tableau 6 :	Regroupe les sucres dégradés	32
Tableau 7 :	Caractères bactériologiques de la souche S33	33
Tableau 8 :	Métabolites issus de la bioconversion de l' α -pinène par <i>Bacillus</i> S33	37
Tableau 9 :	Les principaux produits de la biodégradation pauvre de l' α -pinène par la souche <i>Bacillus</i> S33	39

Liste des planches

- Planche 1 :** Les voies métaboliques de l' α -Pinène par *Aspergillus niger* NCIM 612
- Planche 2 :** Les voies métaboliques du β -Pinène par *Aspergillus niger* NCIM 612 et *Aspergillus niger*
- Planche 3 :** Regroupe les différents métabolites secondaires obtenus par la biotransformation de l' α -pinène par les souches bactériennes suivantes :
1. *Pseudomonas PL*; 2. *Bacillus pallidus* BR425; 3. *Pseudomonas PIN*;
4. *Pseudomonas PX1* ; 5. *Chrysosporium pannorum* A-1.
- Planche 4 :** Les voies métaboliques de la bioconversion de l' α -pinène par *Bacillus* S33
- Planche 5 :** Les voies métaboliques de la biodégradation del' α -pinène par *Bacillus* S33

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

La biotransformation est une technologie économique et écologiquement viable, qui a été depuis ces dernières années largement utilisée afin de modifier les structures de nombreuses classes de produits biologiquement actifs. Ainsi, la biotransformation microbienne est l'une des technologies les plus appropriées pour obtenir des composés naturels à valeur ajoutée dans des conditions respectueuses de l'environnement [1].

Les molécules de monoterpène sont la plus grande famille de métabolites secondaires d'origine végétale qui sont trouvés dans la nature comme principaux constituants de nombreuses huiles essentielles d'arômes [2].

Traditionnellement, les monoterpènes ont été largement utilisés dans l'industrie des parfums et des saveurs, mais les monoterpènes ont de plus en plus fait l'objet d'une attention commerciale en raison de leur rôle dans la prévention et la thérapie de plusieurs maladies. En raison de leur activité écologique en tant qu'insecticides naturels et agents antimicrobiens et aussi parce qu'ils sont utilisés comme solvants et peuvent constituer des composantes dans la synthèse de nombreux composés hautement valorisés.

La biotransformation est un outil précieux pour la production de monoterpènes stéréo- et régio spécifiques car elle permet de marquer les monoterpènes produits comme des composés « naturels ». Ces procédés sont réalisés par de nombreux microorganismes procaryotes et eucaryotes, qui convertissent les monoterpènes en plusieurs produits [2].

En outre, la force la plus importante du processus de biotransformation est la capacité à produire des composés non facilement préparés par des procédés chimiques.

Des problèmes spécifiques ont été rencontrés au cours de ces études et ont empêché la commercialisation des processus de biotransformation des monoterpènes. Parmi ces problèmes les plus importants étaient l'instabilité chimique des monoterpènes, la toxicité du substrat et du produit et la présence des voies de transformation multiples chez les microorganismes [3].

Le présent travail porte sur le métabolisme de l' α -pinène, qui est un composé organique de la classe des terpènes, l'un des deux isomères du pinène, Il s'agit d'un alcène et il contient un cycle réactif, hydrophobe et volatil.

Nous sommes intéressés donc par deux procédés microbiologiques : la bioconversion et la biodégradation de l' α -pinène par une souche bactérienne S33 du genre *Bacillus*. Il s'articule autour de deux parties principales :

1. La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique dans laquelle nous présentons les concepts de la biotransformation des terpènes (monoterpènes) par différents microorganismes.
2. La seconde partie est réservée à une étude expérimentale qui a pour objectif de tester l'efficacité d'une souche bactérienne S33 du genre *Bacillus* dans la biotransformation (bioconversion et la biodégradation) de α -pinène.

PARTIE I
Synthèse bibliographique

I. Introduction

La bioconversion est un processus biologique au cours duquel un substrat organique est converti en un métabolite par des réactions chimiques en un des sites ponctuels.

Dans cette partie d'une synthèse bibliographique nous allons regrouper l'ensemble des connaissances associées aux bioconversions (biotransformation), et ses avantages et inconvénients, dans la quelle nous décrivons brièvement le microorganisme du genre *Bacillus*, suivi des différents travaux antérieurs portant sur la bioconversion du α -Pinène par diverses souches.

Bien que les procédés physico-chimiques soient très efficaces, ils possèdent en revanche des inconvénients inhérents, en raison de leur tendance à former des produits intermédiaires toxiques et aussi du fait qu'ils sont très coûteux [4,5]. Pour remédier à ces problèmes et afin de neutraliser ces substances, les traitements biologiques sont souvent mis en œuvre. En effet, la biotransformation est considérée comme l'une des technologies les plus prometteuse et rentable pour sa simplicité, efficacité et coût relativement bas. Aussi, cette technique offre la possibilité d'une minéralisation complète du composé, ce qui permet de le considérer comme procédé respectueux de l'environnement [6, 7,8].

I.1 Notions générales sur la biotransformation

I.1.1 Définition de la bioconversion

La bioconversion ou la biotransformation est définie comme une transformation chimique catalysée par des micro-organismes ou leurs enzymes, elle fait partie du domaine de la biotechnologie qui a gagné une attention considérable [9]. La bioconversion, également appelées transformations microbiennes, peuvent être définies comme étant l'utilisation d'un catalyseur biologique pour convertir un substrat ou précurseur en un produit donné selon un nombre limité d'étapes enzymatiques [10], est l'une des technologies les plus appropriées pour obtenir des composés naturels à valeur ajoutée dans des conditions très favorables à l'environnement [11]. La transformation de la matière organique résultant de la croissance de micro-organismes, et consiste donc en la modification d'une substance organique en une ou plusieurs autres grâce à l'action d'organismes vivants, ou d'un système enzymatique.

Les bioconversions sont utilisées dans différentes domaines :

Par exemple

- La synthèse d'arômes alimentaires [12]. Pour obtenir un arôme naturel, les industries ont donc actuellement le choix entre deux systèmes de production que sont les procédés classiques d'extraction à partir de matières premières naturelles, et les bioconversions. Il est en effet possible de s'affranchir de facteurs incontrôlables (climatiques, géographiques) qui agissent sur la quantité et la qualité d'arômes extraits de matières premières [13].
- La production des molécules ayant un intérêt pharmaceutiques et aussi utilise en agroalimentaire [14].

On peut citer deux types différentes

- La transformation des xénobiotiques dans lequel le substrat est complètement étranger aux microorganismes.
- La transformation est génétiquement ciblée, également connu comme analogue de la biosynthèse, dans lequel le substrat est un analogue structurel d'un intermédiaire biosynthétique. Cette bioconversion repose sur la flexibilité du substrat de la voie enzymatique existante, responsable de la biosynthèse du métabolisme secondaire [15,16].

I.1.2 Facteur affectant la bioconversion

La bioconversion dépend de divers facteur comme : aspects physiologique , biochimique et les condition environnementales de la culture cellulaire[17] telle que : la composition chimique des milieux de culture ,la température ,l'intensité de la lumière ,la source de carbone dans le milieu, le pH ,le tempe d'incubation , les régulateurs de croissance.

I.1.3 Avantages et Inconvénients de la bioconversion

L'un des avantages majeurs des réactions de bioconversion résulte du fait que le milieu réactionnel des biocatalyseurs est l'eau. Ce dit avantage constitue l'une des principales limitations de ces réactions de bioconversion lorsqu'il s'agit de substances lipophiles non solubles dans l'eau [18]. Lorsqu'on les compare à des réactions chimiques ont l'avantage d'être régio et stéréo sélectives, ce qui conduit à des produits de forme énantiomérique donnée dont la demande dans les domaines :

- pharmaceutique ou agroalimentaire est importante.

Elles sont également très efficaces en terme d'énergie puisqu'elles peuvent avoir lieu à des :

- Température, une pression et un pH modérés.

La production des composés est généralement simplifiée par un nombre d'étapes plus restreint [19]. Les bioconversions sont de plus particulièrement adaptées aux nouvelles normes mondiales relatives au « développement durable » et au label « naturel » actuellement très recherchés par les institutions politiques et les consommateurs.

La mise en œuvre de réactions de bioconversion permet d'éliminer certaines faiblesses inhérentes aux techniques classiques d'extraction (par exemple extraction par solvant...). Les bioconversions permettent également une autonomie vis-à-vis de l'approvisionnement en matières premières fortement influencé par les saisons notamment dans le cas de végétaux aromatiques. Elles permettent aussi de diminuer les volumes des résidus d'extraction [13].

- La plupart des bioconversions des métabolites secondaires conduisent à des faibles rendements [19].
- Quelques métabolites secondaires sont des substrats toxiques, même à des cellules entières.
- Des métabolites secondaires par exemples les monoterpènes et les sesquiterpènes sont notamment très représentés dans les huiles essentielles [20]. Sont peu solubles dans l'eau.

I.1.4 Définition de la biodégradation

La biodégradation signifie tout simplement la transformation biologique d'un composé organique en une autre forme souvent assimilable [21]. Globalement, les termes liés à cette notion (biodégradation) sont définis à l'échelle moléculaire et non à l'échelle de macromoléculaire et concernent dans la plus part des cas des substrats organiques et il correspond à l'action de dégradation d'un composé organique par des agents biologiques [22].

La biodégradation est un processus par lequel des substances organiques sont décomposées par des microorganismes. Le produit chimique qui c'est décomposé de cette façon s'appelle

« Biodégradable » [23].

Lorsque on dit qu'un composé est biodégradable cela signifie habituellement qu'il peut être minéralisé (conversion en dioxyde de carbone, eau et différentes forme inorganiques).

Certaines substances peuvent se décomposer en molécules intermédiaires plus petites. Il s'agit de la dégradation primaire. Ces molécules sont généralement des intermédiaires dans le processus de la biodégradation finale. Mais elles peuvent, dans certains cas être plus rémanentes ou plus toxique que le produit initiale. Donc la biodégradation a lieu en deux étapes : Hydrolyse et catabolisme.

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 microorganismes 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. [24].

- Comme il existe trois éléments clés indispensables pour la biodégradation [25].

a) Microorganismes

La base de tout processus de biodégradation est l'existence de microorganismes capables de synthétiser les enzymes actives sur le substrat ciblé.

b) Environnement

Certain facteur sont indispensables au processus de biodégradation (La température, pH, NaCl sel, pression, oxygène). La biodégradation peut se produire dans des conditions aérobies (avec oxygène) et anaérobies (sans oxygène).

c) Substrat

La structure de la matière organique influe sur le processus de biodégradation [26].

I.1.5 Principe de la biodégradation

Biodégradation signifie la transformation biologique d'un composé organique d'une forme à une autre. Ce procédé peut donc convertir un composé inoffensif en composé offensif toxique, altérer la toxicité d'un composé donné, ou encore changer une substance

métabolisable en substance difficile à être métabolisée .Cependant, lorsqu'on juge un composé comme biodégradable, cela signifie qu'il peut être minéralisé [27].

Le terme « biodégradation » a été proposé pour décrire la dégradation ultime et le recyclage d'une molécule organique et ses constituants minéraux. Ceci est utilisé pour décrire la minéralisation complète du composé de départ au plus simples composés inorganiques tels que: H₂O, CO₂, H₂, NO₃, NH₃, CH₄[28, 29,30].

I.2 Généralités sur les Microorganismes marines

Dans les écosystèmes aquatiques, les organismes les plus nombreux sont les microorganismes, les bactéries forment la composante majoritaire. Leur rôle est fondamental dans l'équilibre écologique des milieux aquatiques, principalement par la régulation des cycles biogéochimique et énergétique [31].

Les bactéries marines diffèrent physiologiquement de celles qui ont des habitats non marins ; elles sont très adaptées aux conditions très spéciales offertes par le milieu marin (salinité, pH, oxygénation réduite, basses températures et des pressions souvent considérables)[32].

Dans le milieu marin, les bactéries servent de nourriture à de nombreux organismes marins, elles favorisent la fixation d'algues ou de larves sur certains substrats, elles permettent également la dégradation de certains polluants tels que naphthalène, pesticides, cellulose, hydrocarbures, etc. Cependant, leur effet peut être nuisible.

I.3 Bioconversion par les microorganismes

Les microorganismes possèdent également une enveloppe cellulaire ainsi que des constituants intracellulaires stabilisateurs permettant la protection des catalyseurs enzymatiques contre les phénomènes d'inactivation [33].

Les microorganismes ont longtemps été utilisés de manière empirique pour laproduction d'arômes par fermentation dans les produits alimentaires [34].

Actuellement, la technique de bioconversion la plus utilisée consiste à convertir un précurseur clairement défini par un microorganisme préalablement sélectionné et dont l'activité est orientée vers la production du composé souhaité [35].

Elle permet notamment la mise en œuvre de procédés de bioconversion utilisant des microorganismes non proliférants, ce qui est un avantage important lorsque le précurseur employé est toxique pour les cellules.

Deux procédures peuvent alors être utilisées :

- **La technique (1)** : Le précurseur ou substrat est ajouté directement au milieu de croissance au bout d'un temps déterminé de culture.
- **La technique (2)** : Conduit à la séparation de la biomasse dumilieu de croissance par filtration ou centrifugation suivie d'une remise en suspension dans un nouveau milieu réactionnel, conventionnel ou non, où elle sera utilisée pourbioconvertir le précurseur [13].

I.4 Etude de la bioconversion des métabolites secondaires par le Genre *Bacillus*

I.4.1 Description du genre *Bacillus*

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bacilles rectilignes à extrémités carrées ouarrondies, de taille variable (de 0,5 x 1,2 µm jusqu'à 2,5 x 10 µm), parfois sporulés, à Grampositif ou à Gram variable, mobiles grâce à une ciliature pérित्रиче parfois capsulés, aérobies ou aéro/anaérobies facultatif, le plus souvent catalase positive, donnant uneréponse variable au test de l'oxydase [36]. Les colonies de ce genre sont pas difficiles à identifier.

Le genre *Bacillus* appartient à la famille des *Bacillaceae*[37].

Les espèces du genre *Bacillus* possèdent une diversité physiologique et métabolique importante et des capacités étonnâtes qui leur permettent de survivre dans des habitats extrêmes, elles peuvent être thermophiles, psychrophiles, acidophiles, alcalophiles, halotolérants ou halophiles [38].

Tableau1 : Caractères bactériologiques du genre *Bacillus* [39].

Caractéristiques	<i>Bacillus</i>
Gram	Gram (+) ; Sont desgrands bacilles rectilignes à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable (de 0,5 x 1,2 µm jusqu'à 2,5 x 10 µm)
Type respiratoire	Aérobie stricte ou anaérobie facultative
Mobilité	Mobile ou immobile grâce à une ciliature pérित्रиче parfois capsulés
Sporulation	(+)
Catalase	(+)

I.4.2 Classification du genre *Bacillus*

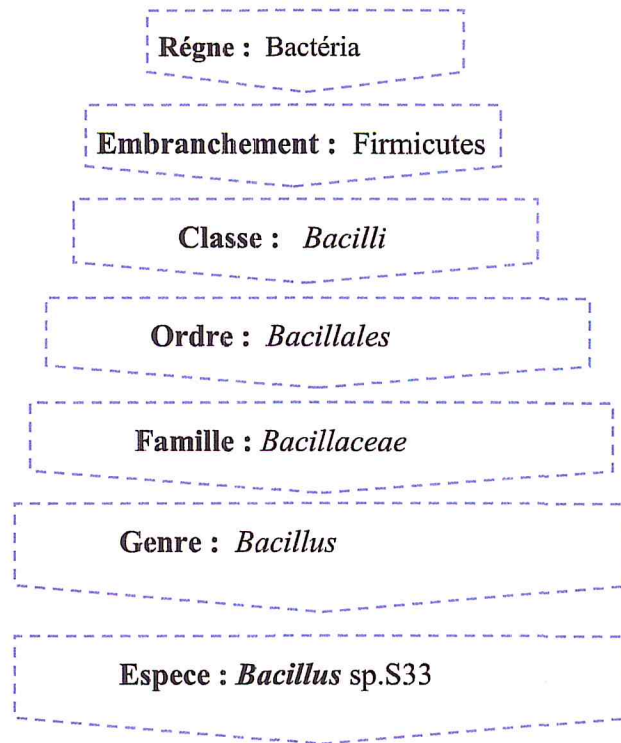
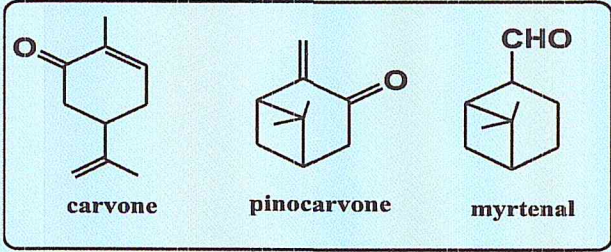
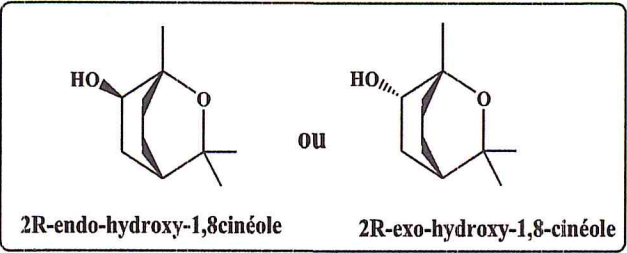
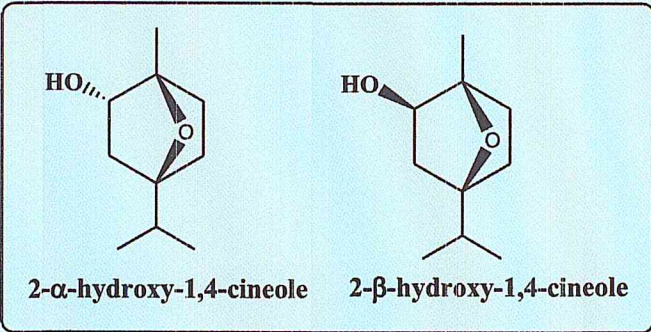
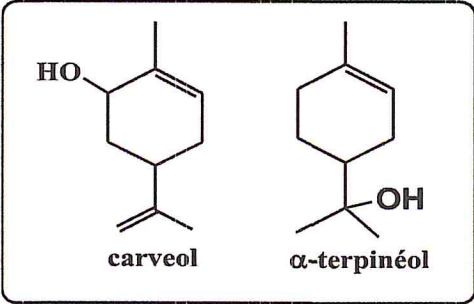
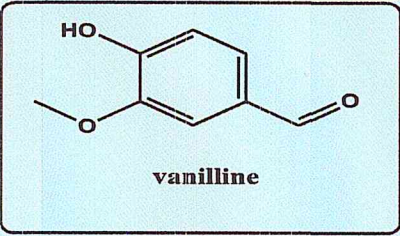


Figure 1 : Classification du genre *Bacillus*

I.4.3 Bioconversion des monoterpènes par le genre *Bacillus*

Tableau 2 : Bioconversion de quelques monoterpènes par le genre *Bacillus*

Microorganisme	Substrat	Produit avec structure	Réf
<i>Bacillus pallidus</i> BR 425	α -pinène et β -pinène	 <p>carvone pinocarvone myrtenal</p>	[40] [41]
<i>Bacillus cereus</i> UI-1477 (cytochrome P450 monooxygénase)	1,8-cineole	 <p>2R-endo-hydroxy-1,8-cinéole ou 2R-exo-hydroxy-1,8-cinéole</p>	[41] [42]
<i>Bacillus cereus</i>	1,4-cineole	 <p>2-α-hydroxy-1,4-cineole 2-β-hydroxy-1,4-cineole</p>	[41] [43]
<i>Bacillus stearothermophilus</i> BR388	D-limonène	 <p>carveol α-terpinéol</p>	[41] [44]
<i>Bacillus subtilis</i> HS8	Isoeugenol	 <p>vanilline</p>	[45]

I.4.4 Biotransformation des terpènes

La biotransformation des terpènes 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 [46].

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 CO₂ à partir des carbones issus des terpènes [47].

I.5 Etudes de la bioconversion de l' α -Pinène

I.5.1 Description chimique de l' α -Pinène

L' α -Pinène est un composé organique de la classe des terpènes, l'un des deux isomères du pinène [48]. Il s'agit d'un alcène et il contient un cycle réactif. On le trouve dans les huiles de nombreuses espèces de nombreux conifères, notamment le pin, également dans l'huile essentielle de romarin (*Rosmarinus officinalis*) et de *Satureja myrtifolia* (également appelée Zoufa dans certaines régions) [49,50]. L' α -pinène est présent avec une faible quantité dans les végétaux comme les *Rosmarinus*, *Salvia Meleleuca*. Il est reconnaissable par son parfum boisé, assimilable à l'odeur du pin, et est ainsi fréquemment utilisé dans les désodorisants, les parfums d'intérieurs ou encore les produits d'entretien. Il est obtenu industriellement par une distillation fractionnée de l'essence de térébenthine.

Les formes énantiomère de l' α -Pinène sont :

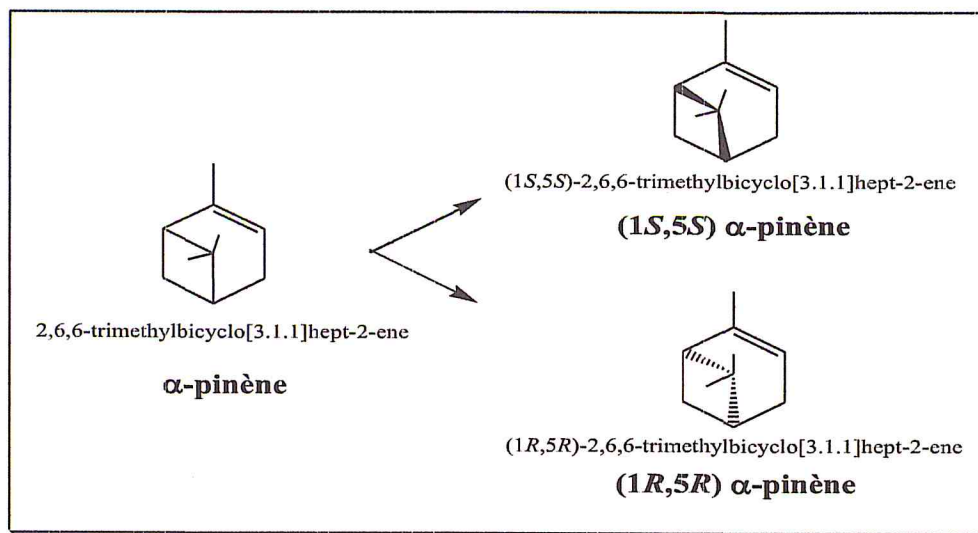


Figure 2 : Formes énantiomère de l' α -Pinène

I.5.2 Propriétés physiques et chimiques de l' α -Pinène

Tableau 3 : Propriétés physiques et chimiques [51, 52, 53,54].

Propriétés physiques		Propriétés chimiques
État physique	Liquide	Antibactérien
Densité	0,8582 g/ml à (20 °C)	Antiviral
Solubilité dans l'eau	Insoluble	Anti-inflammatoire
Point d'ébullition	155 °C	Efficace dans les bronchites aiguës
Masse moléculaire	136,23 g/mol	Bien absorbé par la peau, les intestins, les voies respiratoires

1.5.3 Travaux antérieur de la bioconversion des pinènes

1.5.3.1 Bioconversion par les champignons marines

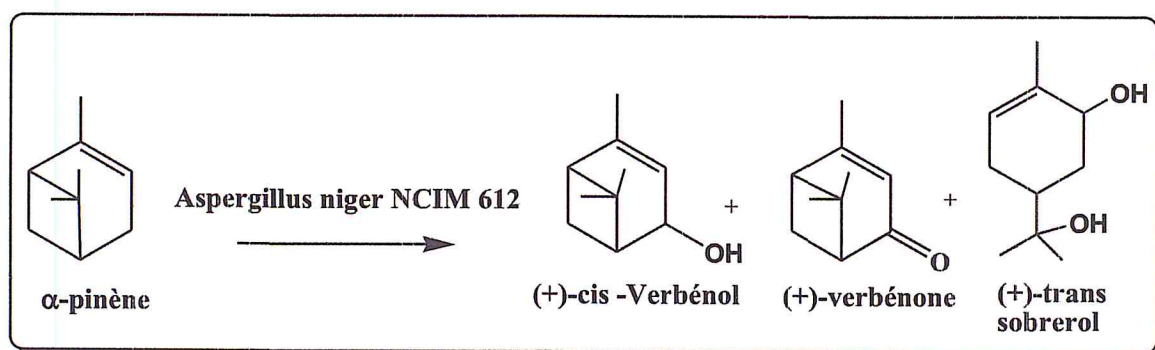


Planche 1 : Les voies métaboliques du l' α -Pinène par *Aspergillus niger* NCIM 612 [55].

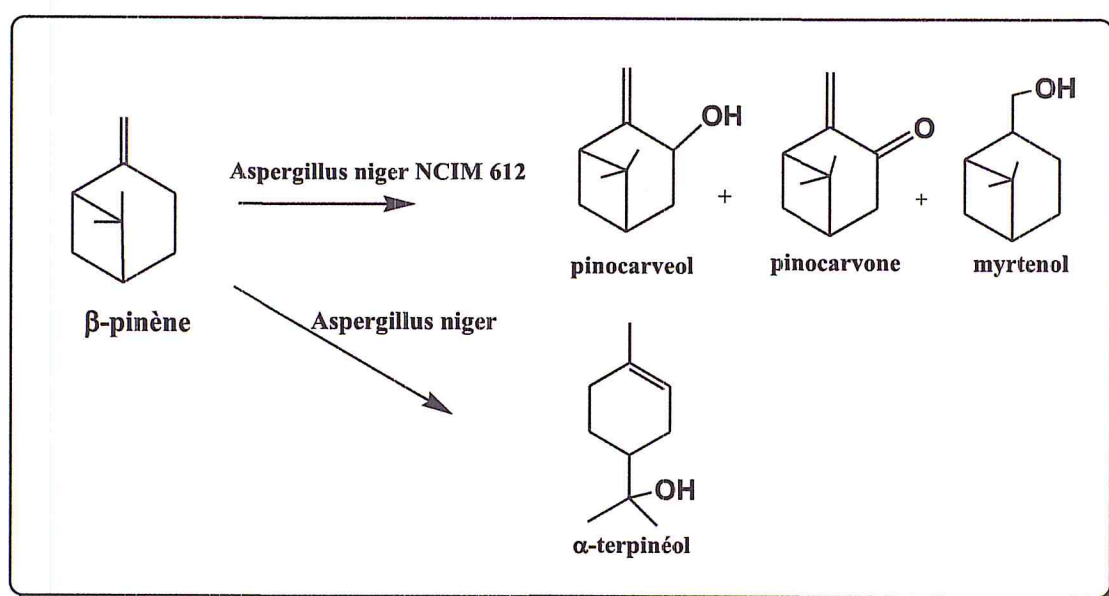


Planche 2 : Les voies métaboliques du β -Pinène par *Aspergillus niger* NCIM 612 et *Aspergillus niger*[56].

I.5.3.2 Bioconversion de l' α -pinène par divers microorganismes

La gamme de microorganismes qui participe à la biotransformation du l' α -pinène est large. Certaines bactéries, comme les *pseudomonas*, les *bacilles* et les *coques* transforment l' α -pinène en alcool perillylique en acide perillylique, en α -terpinéol, ou en acide cumique.

Plus de 160 000 tonnes d' α -pinène produite par an, il constitue la première source naturelle de terpènes présente sur le marché. De nombreux travaux ont permis de mettre en évidence sa bioconversion en terpénoïdes par différents microorganismes. Les principales voies de dégradation d' α -pinènes par des souches bactériennes proposées par différents auteurs sont représentées dans les organigrammes illustrés par la Planche 3.

La Planche 3 : Regroupe les différents métabolites secondaires obtenus par la biotransformation du l' α -pinène par les souches bactériennes suivantes : 1. *Pseudomonas PL* [57]; 2. *Bacillus pallidus* BR425 [40]; 3. *Pseudomonas PIN* [58]; 4. *Pseudomonas PX1* [59]; 5. *Chrysosporium pannorum* A-1 [60].

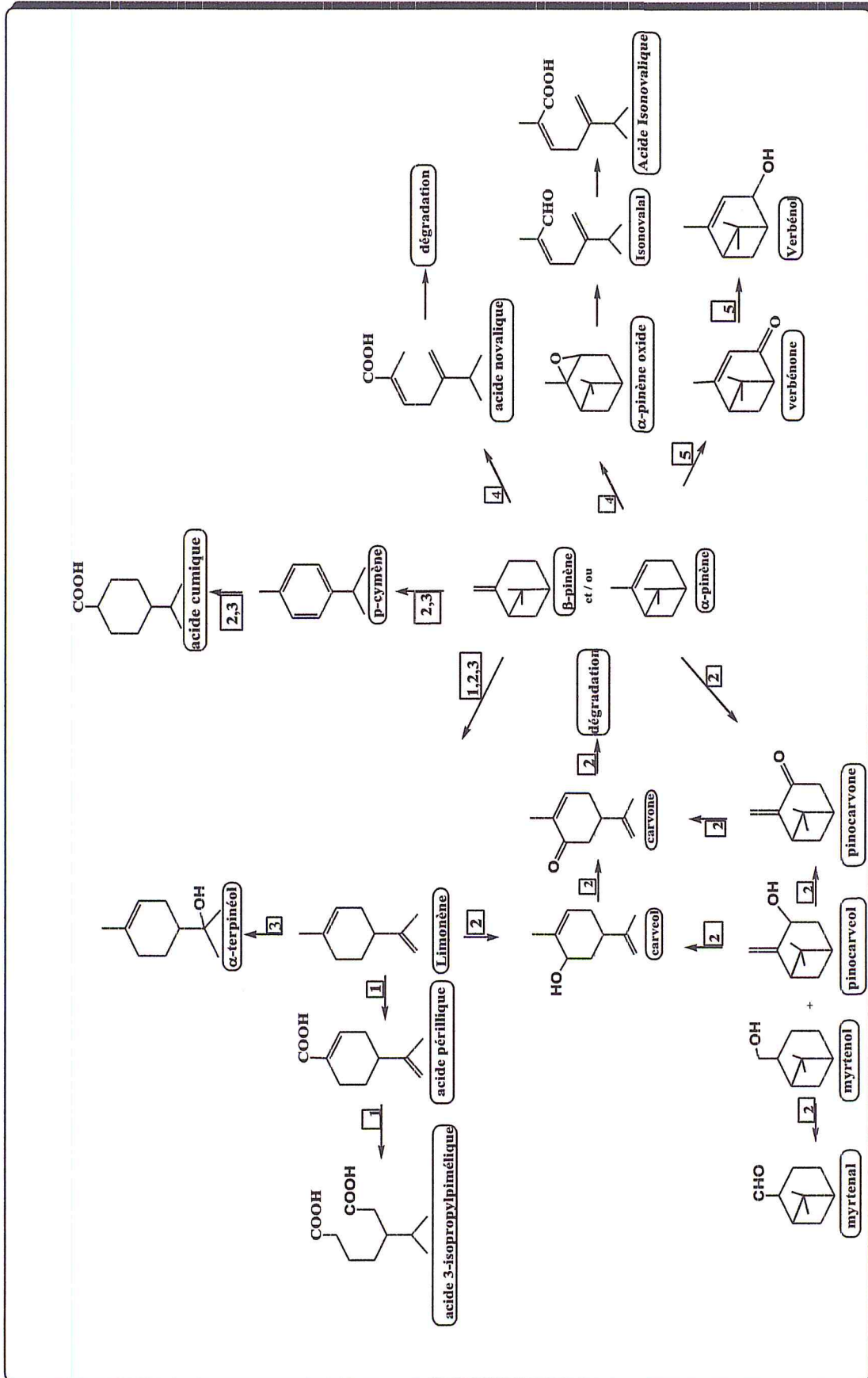


Planche 3 : Métabolites secondaires obtenus par la biotransformation de l' α -pinène par différentes souches bactériennes

PARTIE II
Etude expérimentale

II.1 Introduction

Cette partie expérimentale a été réservée à l'étude de la bioconversion et la biodégradation de l' α -pinène par une souche bactérienne S33 du genre *Bacillus*.

La méthodologie du travail est récapitulée dans l'organigramme représenté par la *figure 3*.

Elle s'articule autour de quatre grandes parties suivantes :

1. Caractérisation phénotypique de la souche bactérienne S33;
2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI;
3. Protocole de bioconversion et biodégradation ;
4. Analyse des métabolites obtenus.

La préparation des milieux de cultures et le déroulement des processus de bioconversion et de biodégradation ont été effectuées au sein du laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et Biomolécules (Département de Chimie), et au laboratoire microbiologie (Département de génie des procédés, Université de Blida 1). Concernant l'identification phénotypique de la souche S33 a été faite au niveau de Laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida.

L'analyse des métabolites obtenus par chromatographie en phase Gazeuse Couplée à la Spectrométrie de Masse a été effectuée au Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyse Physicochimique (CRAPC) à Bousmail.

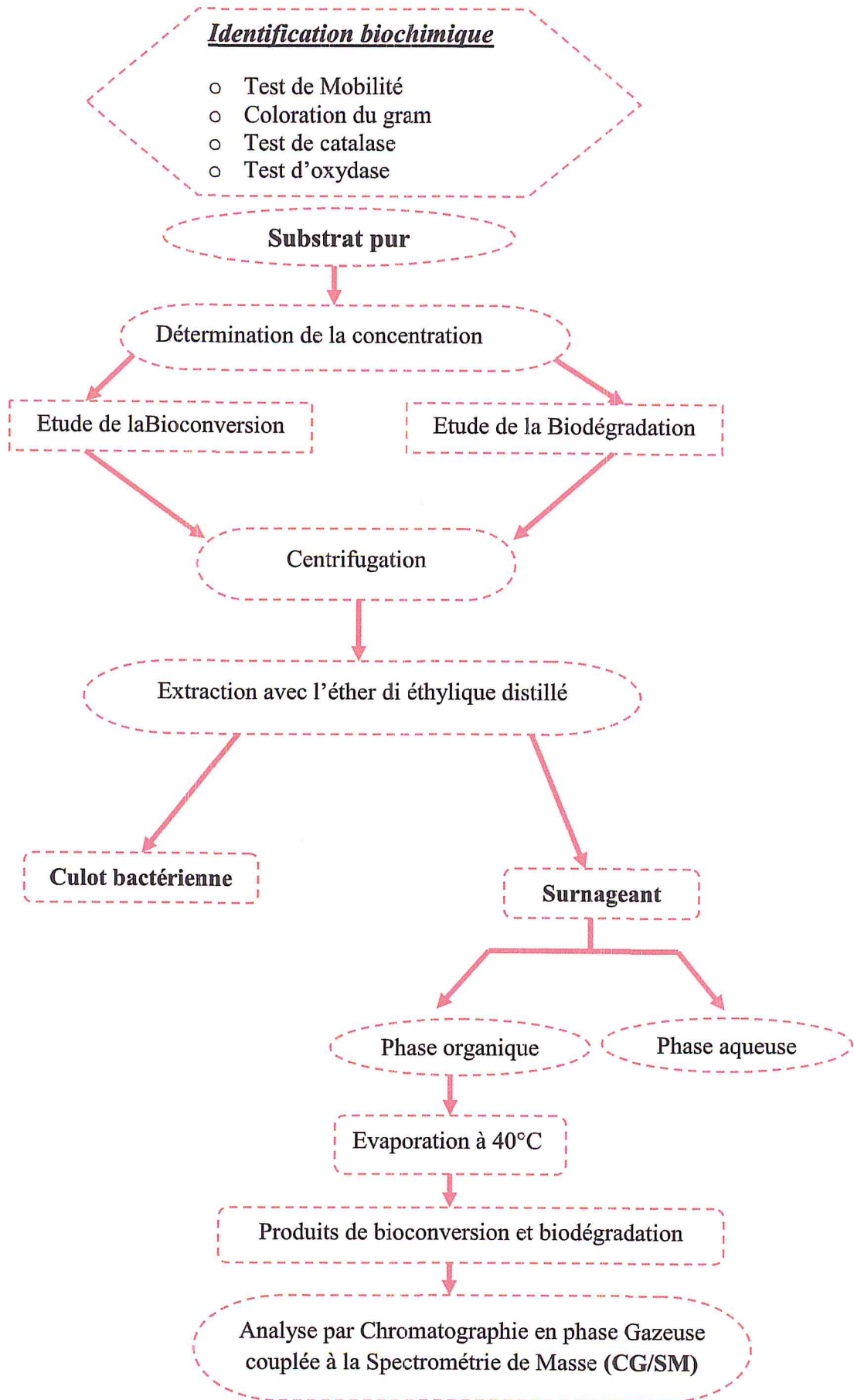


Figure 3 : Méthodologie expérimentale du travail

II.2 Matériel et méthodologie expérimentale

II.2.1 Origines de la souche

II.2.1.1 L'origine de la souche bactérienne S33

La souche bactérienne S33 a été nouvellement isolée à partir d'algue brune *Zonaria tournefortii* récoltée en février 2016 au niveau du site de la « Corne d'Or » à Tipaza, isolée dans le cadre des travaux de recherche du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSN-BioM) de l'Université de Blida1. La souche pure a été repiquée sur milieu VNSS solide (voir compositions en *tableau 4* ci-dessous).



Figure 4 : La souche bactérienne S33 isolée de l'algue brune *Zonaria tournefortii*

II.2.2 Purification

La purification consiste à réaliser des repiquages successifs sur des milieux solides VNNS et la préparation des précultures avec une incubation à 30°C pendant 48h jusqu'à l'obtention de colonies de même taille, même forme et même couleur renseignant sur la pureté de la souche qui est toujours confirmée par microscopie.

II.2.3 Préparation et composition des milieux de culture

Le tableau 4 résume la composition des milieux de cultures utilisés.

Tableau 4 : Composition chimique des milieux de culture utilisés

<i>Milieux</i>	<i>Composition</i>
<i>Milieu Luria Bertani (LB)</i>	Peptone (10g), extrait de levure (5g) et NaCl (10 g). Et pour un milieu solide, on ajoute 20g d'agar dans 1L d'eau distillée.
<i>Milieu (VNSS)</i> (Vaätanen Nine SaltSolution)	NaCl (17,6 g), extrait de levure (0,5g), glucose (0,5g), Peptone (1g), FeSO ₄ 7H ₂ O (0,01g), MgCl ₂ .6H ₂ O (1,87g), KCl (0,25g), KBr (0,04g), CaCl ₂ 2H ₂ O (0,41g), Na ₂ SO ₄ (1,47g), NaHCO ₃ (0,08g), SrCl ₂ 6H ₂ O (0,01g), H ₃ BO ₃ (0,01g), amidon soluble (0,5g), Na ₂ HPO ₄ (0,01g), Pour le milieu solide, on ajoute 20g d'agar dans 1L d'eau distillée.

La composition chimique des différents milieux de culture, de bioconversion et de biodégradation utilisés dans notre étude est donnée ci-après.

Les constituants des milieux ont été pesés et dissous dans de l'eau distillée. Le pH des milieux a été ajusté à 7,2 avant autoclavage avec de la soude à (1N) et le HCl (1N).

Les deux milieux ont été répartis dans des flacons de 250 ml de volume total. Le volume utile sera toujours de 50 ml. La stérilisation des milieux a été effectuée par autoclavage à 120°C pendant 20 min (voir *Annexe III*).

II.2.4 Caractéristique phénotypiques de la souche S33

II.2.4.1 Identification préliminaire de la souche S33

Les colonies subissent deux tests de différenciation, le premier test est la coloration de Gram et le deuxième est la recherche de l'enzyme catalase. Ainsi l'observation par microscope optique.

II.2.4.2 Test de mobilité

On peut voir la mobilité d'une bactérie en réalisant soit une culture à l'état frais suivie par observation par microscope, ou l'ensemencement par un piqueur central dans le milieu mannitol mobilité.

❖ Examen microscopique direct

a. Matériels

- ✓ Lame et lamelle.
- ✓ Microscope optique (*Annexe 1*)

b. Principe

- Prendre une lame stérile ;
- Déposer quelques gouttes d'eau physiologique ;
- Prendre une fraction de la colonie bactérienne d'une culture jeune par une pipette pasteur et mélanger avec les gouttes d'eau (*Annexe 2*).
- Recouvrir d'une lamelle et faire l'observation au microscope optique avec objectif X40.

c. Observation

Cet examen direct permet d'observer :

- La forme de la bactérie
- La mobilité de la bactérie

❖ Mobilité en utilisant le test mannitol-mobilité

Le mannitol est un polyalcool issu de la réduction du D-fructose. Sa dégradation conduit à la formation de fructose qui est attaqué en donnant des acides à chaînes courtes. Tous d'abord on prépare l'inoculum et on racle à l'aide d'une anse à raison de 3 à 5 colonies bien isolées, on ensemence par piqûre centrale du tube mannitol à l'aide du fil droit chargé de la culture à étudier (*Annexe 3*).

Observation

On observe une croissance de la souche étudiée sur les traces de la piqueur centrale et dehors de la piqueur ainsi il existe des bulles d'air au niveau du tube ceci indique la capacité de la souche à dégrader le mannitol par dégagement de gaz sous forme de CO₂.

II.2.4.3 Examen direct après coloration de Gram

a. Matériels et réactifs

Lamme stérile, becbenzen, pipete pasteur, violet de Gentiane, Lugol, Ethanol, Fuchsines, Microscope optique.

b. Principe

La technique de coloration qui est la plus utilisée dans l'étude et la classification des bactéries en deux grands groupes : les bactéries à Gram positif et à Gram négatif on étale les bactéries sur une lamme de verre, on les fixe par la chaleur ou l'alcool, puis on les colore successivement avec une solution de violet de gentiane et un mordant, la liqueur de Gram, ou solution de Lugol (mélange d'iode et d'iodure de potassium) ; la préparation est ensuite traitée avec un solvant organique, tel que l'alcool. La lame est lavée à l'eau distillée. Après séchage, on passe à l'observation microscopique. Certaines bactéries, dites à Gram positif, résistent à la décoloration par l'alcool. Les autres, appelées bactéries à Gram négatif, sont rapidement décolorées (*Annexe 4*).

c. Observation

L'apparition de couleur violet au microscope.

II.2. 4.4 Recherche de la catalase

Le test consiste à déposer sur une lamme une goutte d'eau oxygénée(H_2O_2) dans laquelle sera dissocié un petit prélèvement de la colonie. La souche examinée est dite catalase positive si un dégagement gazeux est observé et le contraire indique l'absence de l'enzyme catalase (*Annexe 5*).

Observation

Il y a formation de bulles d'air.

II.2.4.5 Test d'oxydase

a-Principe

Il existe plusieurs types de matériels pour vérifier le test de l'oxydase : disques, solution. Ce test se réalise aussi en boîte de Pétri. Dans une de ces boîtes, un disque oxydase est déposé sur un papier filtre (de type whatman par exemple). Une goutte d'eau est ajoutée sur le disque et il faut attendre que l'eau ait diffusé jusque sur le papier filtre. Une colonie, prélevée avec une

oëse stérile, est déposée sous forme d'un trait sur ce front de diffusion Si une coloration bleu-mauve apparaît, le test est positif. Si la bactérie a une oxydase négative, il n'y a pas de changement de couleur (*Annexe 6*).

b-Observation

Changement de la couleur de disque ver le violet.

II.2.4.6 Galerie API

Il existe deux types d'API (API E20 et API CH 50), pour notre souche on utilise la galerie API E20, cette galerie permet respectivement d'étudier le métabolisme général de la souche bactérienne et de faire rapidement une étude de ces capacités enzymatiques ou de déterminer ces capacités à dégrader 10 sucres différents(*Annexe 7*).

Observation

Un changement de couleur.

II.2.5 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en extrait pour laquelle, aucune croissance visible à l'oeil nu n'est observée. Elle a été déterminée par la méthode de dilution en milieu solide ; et qui consiste à disperser le substrat α -pinène à des concentrations variables dans le milieu(VNSS) avant sa solidification. Aussitôt, le mélange est réparti dans des boîtes de Pétri. Après solidification du milieu, l'ensemencement est exécuté par des taches à l'aide d'une pipette Pasteur. L'ensemble est incubé pendant 48h à 30 °C. Un témoin sans produit à tester est réalisé.

II.2.5.1 Lecture des résultats

La lecture des résultats a été faite à l'aide d'une observation visuelle de la croissance bactérienne vis-à-vis le substrat, plus l'apparition de la souche est grand, plus la bactérie est résistante et plus l'absence totale ou l'apparition de la souche est faible plus la souche est sensible à la substance testée.

II.2.5.2 Milieux de repiquage

Le travail s'effectue dans des conditions aseptiques, on prend soin de nettoyer la paillasse avec de l'alcool ou de l'eau de javel.

Le repiquage des souches est réalisé à l'aide d'une pipette Pasteur par ensemencement d'une colonie bien isolée sur des boîtes de Pétri contenant le milieu (LB) et (VNSS).



*Figure 5 : Repiquage sur milieu
LB
Orange foncé*



*Figure 6 : Repiquage sur milieu
VNSS
orange claire*

II.2.5.3 Milieux de préculture

A partir d'une culture pure de la souche S33 incubée pendant 48h, racler à l'aide d'une anse de platine 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques. Décharger l'anse dans une dans un flacon de 250 ml contenant 50 ml du milieu liquide (VNSS) (*Annexe II*).

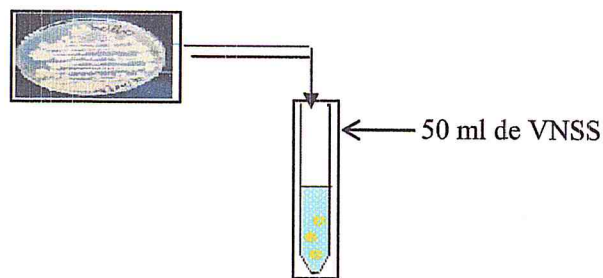


Figure 7 : Méthode de réalisation de l'inoculum

II.2.5.4 Préparation de la solution mère de l' α -pinène

Dans un flacon stérile contenant 100 ml d'eau distillée stérile on ajout 120 μ l de l' α -pinène de façon à avoir une concentration égale à 1g/l. Pour obtenir un mélange homogène on ajout une quantité de 200 μ l de tween 80.Cette solution mère est filtrée sous flamme, sur un micro filtre stérile de 0,45 μ m de diamètre de pores (*Annexe II*).

II.2.5.4.1 La gamme de concentration du substrat l' α -pinène

Tableau 5 :Gamme de concentration du substrat d' α -pinène

[Concentration] mg/l	10	50	100	200	250	300	400	500
Volume de la solution mère prélève (ml)	0,5	2,5	5	10	12,5	15	20	25

II.2.5.5 Préparation des solutions diluées

À partir de solution mère on prélève les volumes de (0,5; 2,5; 5; 10; 12,5; 15; 20; 25) ml et on verse dans des flacons de 250 ml contenant 50 ml du milieu (VNSS) solide, qui correspond à des concentration de (10, 50, 100, 200,250, 300, 400 et 500)mg/l qui doivent être bien agiter pour avoir des solutions homogènes.

II.3 Etude de la bioconversion et la biodégradation de l' α -pinène

II.3.1 Bioconversion par la souche S33

Un volume de 2 ml de préculture a été inoculé dans un flacon de 250 ml contenant 25 ml de VNSS riche en glucose. 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 500 mg/l du α -pinène dans le flacon de culture dans des conditions stériles (stérilisation par micro-seringue de 0,45 μ m). Ensuite, placés dans un incubateur statique pendant 6 jours à 30 °C.

II.3.2 Biodégradation par la souche S33

II.3.2.1 Biodégradation en milieu pauvre en glucose

Dans un flacon de 250ml contient 25ml du milieu de culture (VNSS) liquide pauvre en glucose (50mg/l), on ajoute 25ml d'une solution mère du substrat l' α -pinène (500mg/l) et on ajoute à l'aide d'une pipette stérile 2 ml d'une suspension bactérienne. L'incubation a été réalisée dans un incubateur statique à 30°C pendant 7 jours.

II.3.2.2 Biodégradation sans glucose

Dans un flacon de 250ml contient 25ml du milieu de culture (VNSS) liquide sans glucose (0 mg/l), on ajoute 25ml d'une solution mère du substrat l' α -pinène (500mg/L) et on ajoute à l'aide d'une pipette stérile 2 ml d'une suspension bactérienne, L'incubation a été réalisée dans un incubateur statique à 30°C pendant 7 jours(Annexe II)

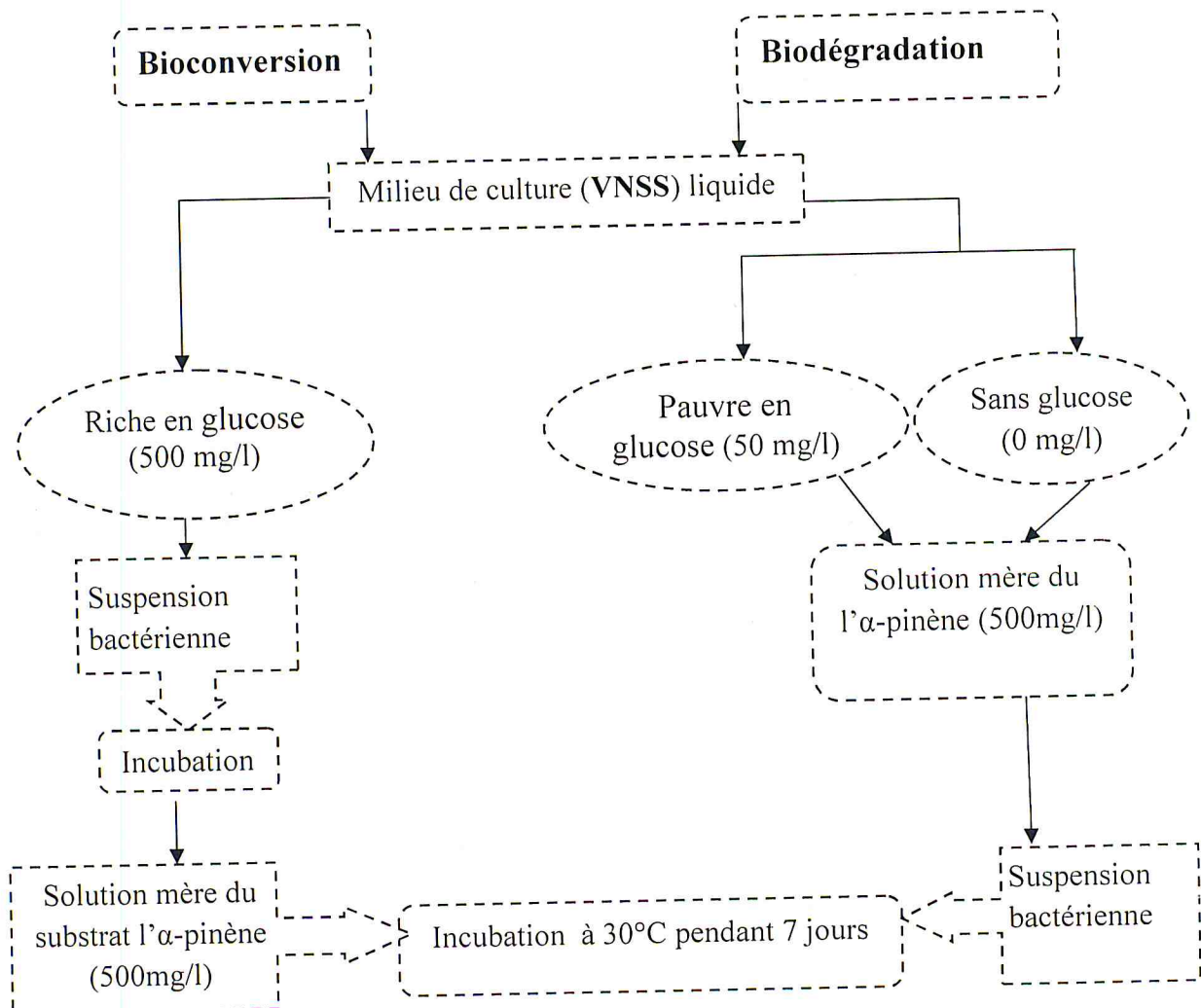


Figure 8 : Schéma représentant les étapes de la Bioconversion et la Biodégradation

II.4 Centrifugation de l'extrait de culture bactérienne

La centrifugation de l'extrait de culture bactérienne obtenu pour la souche S33 après 7 jours d'incubation a été réalisée à l'aide d'une centrifugeuse de type SIGMA à 6000 tour/min pendant 45 min. A l'issue de cette étape, un surnageant et un culot sont obtenus pour cette souche.

II.5 Extraction du surnageant

Le surnageant de culture a été récupéré par pipetage et extrait avec l'éther di-éthylique (1:1 ; v/v par rapport au volume du surnageant). Deux phases sont obtenues : une phase organique et une phase aqueuse. La phase organique a été alors séchée sur du sulfate de sodium et concentrée à l'aide de l'évaporateur rotatif (*Annexe II*), et ainsi la masse de l'extrait brut obtenu a été déterminée pour chaque procédé. Cette opération a été répétée deux fois afin d'épuiser complètement les composés désirés.

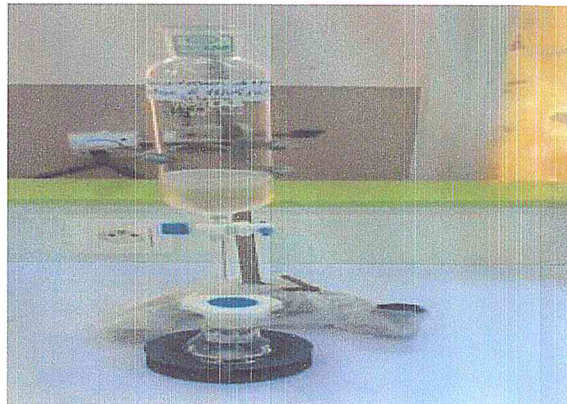


Figure 9 : Extraction du surnageant de culture bactérienne

II.6 Analyse par CG/SM

L'échantillon analysé est injecté à une concentration connue dans l'acétate d'éthyle. L'analyse est effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse HP 6800 couplée à un spectromètre de masse de type HP MSD 5973 (*Figure 10*), dans les conditions suivantes :

- T injecteur = 250 °C, Mode d'injection : Splitless (avec division) = 1/90, Volume injecté = 1 µl.
- Colonne : HP5- MS30 m x 0.25 mm (Diamètre interne) x 0.25 µm (épaisseur du film). T four : 100°C – 5°C– 220°C, Débit du gaz vecteur = 5 ml/min.
- Détecteur de masse : Mode d'analyse : Scan (34 à 450 amu), T interface = 280 °C, Type d'ionisation = Impact électronique (IE), Type d'analyseur : Quadripôle, T Quadripôle = 250 °C, T Source = 230°C.

L'identification des différents composés ou métabolites transformés a été faite en se basant sur les banques de données spectrales (Wiley 7n. 1, NBS 75k.1, Nist 02) ainsi que sur les données de la littérature.



Figure 10 :Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Résultats et discussions

III. Résultats et discussions

III.1 Caractéristique phénotypique de la souche bactérienne S33

III.1.1 Mobilité

Après l'observation par Microscope Optique et par le test du Mannitol, on a trouvé qu'elle est mobile, le 1^{ère} teste par le microscope optique indique que la souche bouge rapidement et pour le 2^{ème} test du Mannitol on observe une croissance de la souche en dehors de la piqueur centrale ainsi la présence des bulles d'air au niveau du tube ce résultat signifie que la souche a une capacité de dégrader le mannitol en dégagent le gaz sous forme de CO₂.

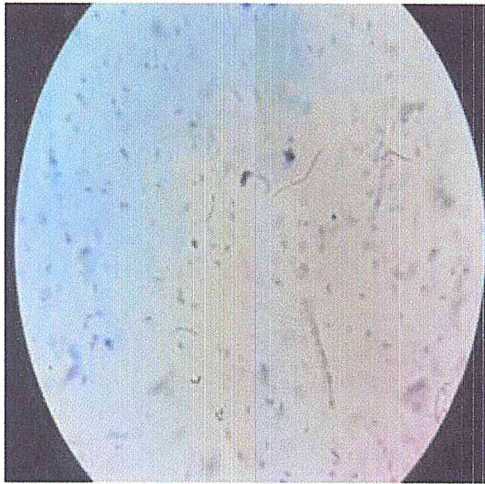


Figure 11 : L'état frais mobilité de la souche



Figure 12 : Test de mannitol-mobilité (test positif)

III.1.2 Coloration du Gram

Après l'observation au microscope optique par un grossissement X40, la bactérie apparaisse en violet, c'est-à-dire que notre bactérie est du Gram (+), donc elle a une capacité interdire à dissoudre de l'alcool dans ces parois et qui laisse la cellule colorée ce résultat explique la teneur élevée de leur paroi en l'acide corticoïde. Ainsi l'observation au microscope les forme des colonies (**Figure 13**) on accompagne que notre souche est du genre *Bacillus*.

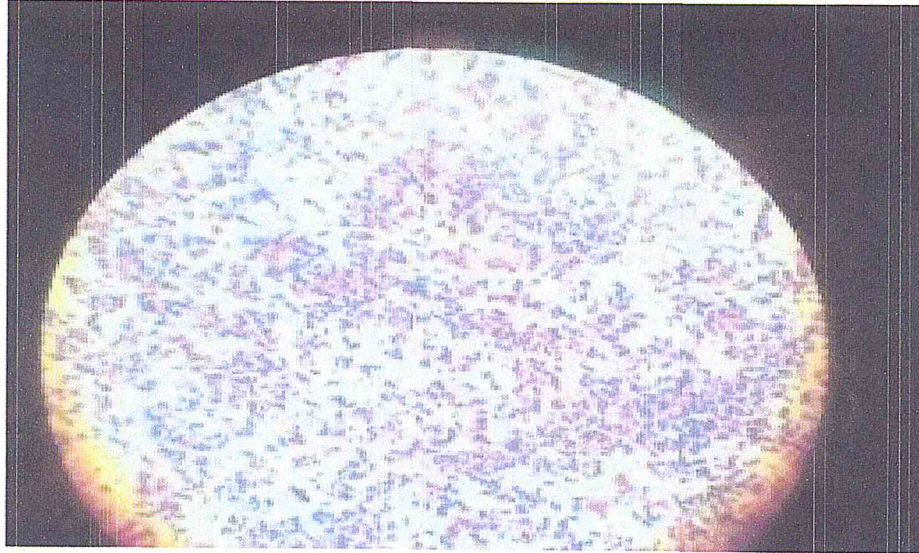


Figure 13 : Les formes bâtonnets de la souche S33 et colorée en violet en tant que Gram+

III.1.3 Test de catalase

Après la réalisation de toutes les étapes et les observations qu'on a constaté, la bactérie réduit l'eau oxygénée (H_2O_2) en eau avec dégagement d' O_2 ; Donc la bactérie est de catalase positive (+).

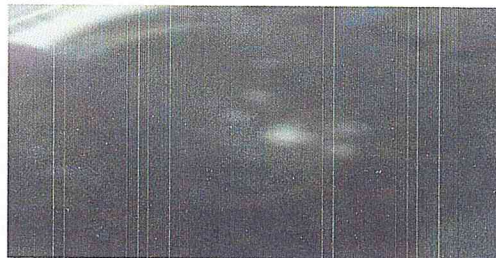


Figure 14 : Bactérie à catalase positive (+)

III.1.4 Test d'oxydase

Après la réalisation de ce test, il y'a la coloration du disque ver le violet donc notre souche est donc, elle est oxydase (+).

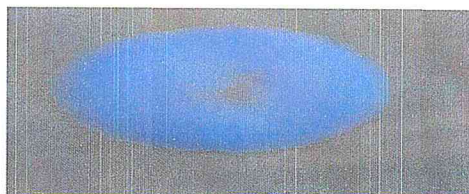


Figure 15 : Bactérie d'oxydase positive(+) concernant la souche S33

III.1.5 Résultats de la galerie API E20

Tableau 6 : Regroupe les sucres de galerie API E20

ONPG	<u>ADH</u>	<u>LDC</u>	<u>ODC</u>	<u>CiT</u>	<u>H₂S</u>	URE	TDA	IND	<u>VP</u>
Négatif (-)									
<u>GEL</u>	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
Négatif (-)									

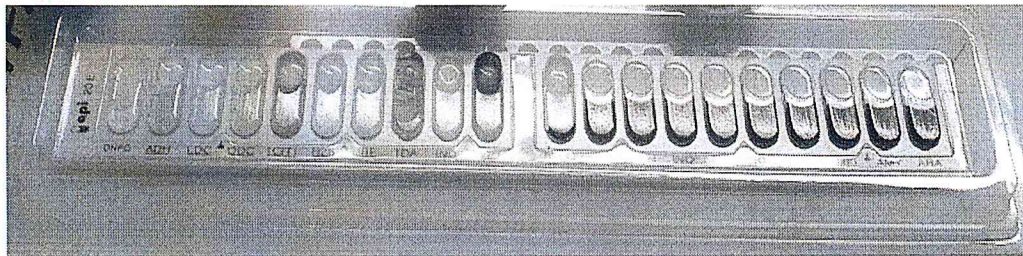


Figure 16 : Galerie API E20 de la souche S33

- Après les résultats obtenu dans cette expérience, On constate que notre souche codé S33 elle n'a pas utilisé les différentes sucres. Par conséquence ce résultat lié a des conditions opératoires.

Après la réalisation des différents tests d'identification « Coloration du Gram, mobilité, catalase, oxydase », on démontre les résultats qui sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 7 : Caractères bactériologiques de la souche S33.

Caractéristiques	Résultats
Gram	Gram (+)
Forme	Bâtonnet
Mobilité	Mobile
Catalase	(+)
Oxydase	(+)

Après les Résultats obtenues de la Caractérisations bactériologiques et à partir de l'aspect de cette souche qui codé S33 ; en peut dire que elle est appartienne au Genre *Bacillus*.

III.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI pour la bioconversion et la biodégradation

Nous avons choisi d'étudier l'effet de la concentration du substrat **l' α -Pinène** sur la croissance de la souche bactérienne S33.

Suite à des recherches bibliographiques nous avons sélectionné les concentrations du substrat l' α -Pinène comme indiqué dans le *tableau 5*.

Nous avons observé que pour cette gamme de concentration, la souche S33ensemencée par des taches est douée d'une bonne croissance sur toutes les boites de Pétri (*Figure 17*). Par voie de conséquence, la concentration minimale inhibitrice CMI ne pas permet de déterminer, la concentration qui pourrait être utilisées pour la bioconversion et la biodégradation est de 500 mg/l quia été donc choisie pour la suite du travail.

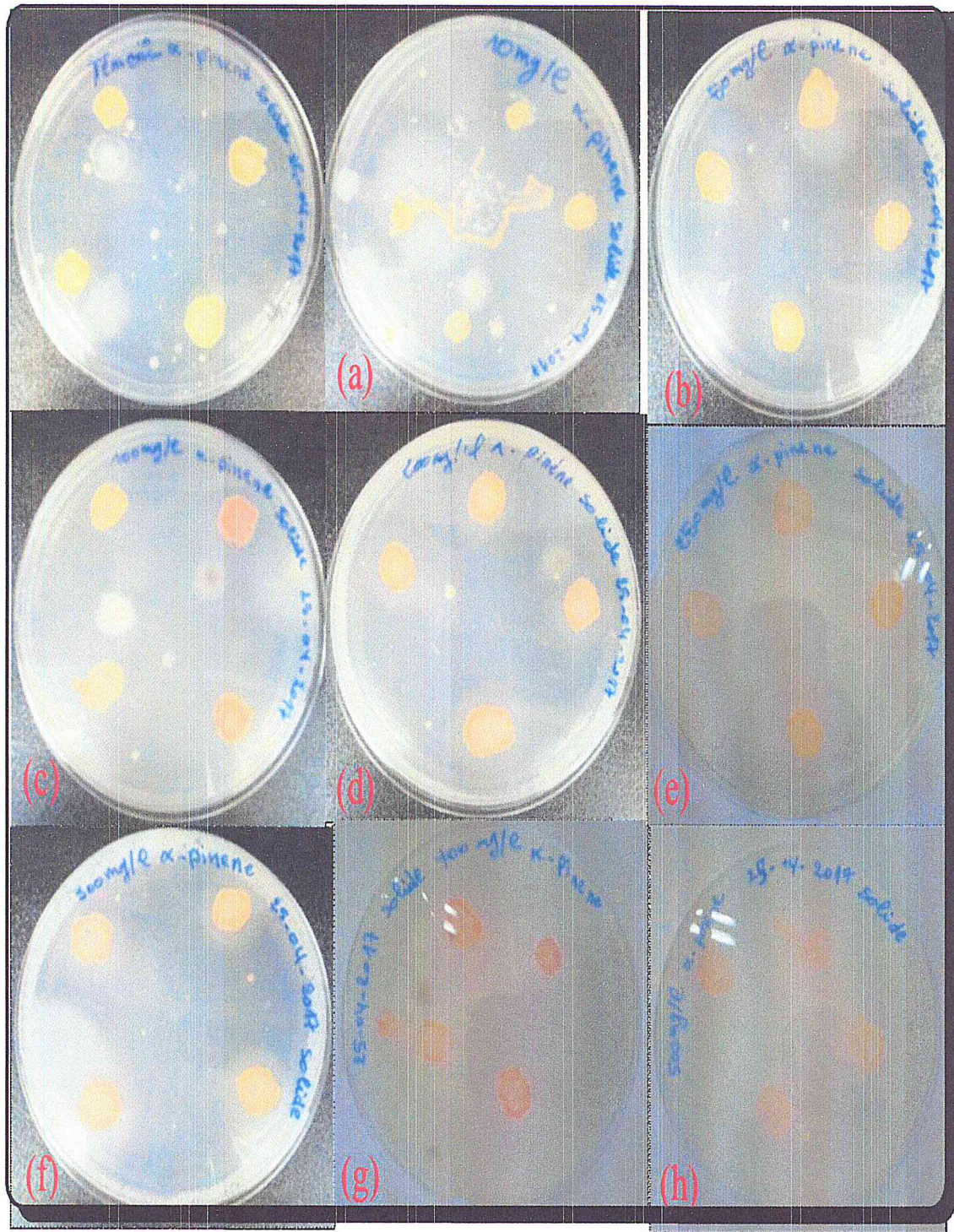


Figure 17 : Effet de concentration du l' α -Pinène sur la croissance de la souche S33.

[(a) = 10mg/l ;(b) = 50mg/l;(c) = 100mg/l; (d) = 200mg/l;(e) = 250mg/l, (f)=300mg/l, et (g)= 400mg/l, (h)=500mg/l].

III.3 Bioconversion et biodégradation de l' α -pinène par la souche S33

III.3.1 Bioconversion de l' α -pinène par la souche *Bacillus* S33

L' α -pinène soumis à des essais de bioconversion nous 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 (18). L'examen du chromatogramme, révèle la présence de plusieurs métabolites représentant les produits de bioconversion l' α -pinène par la souche *Bacillus* S33. L'identification des différents produits a été faite en se basant sur les banques de données spectrales (Wiley, NIST02, 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 8.

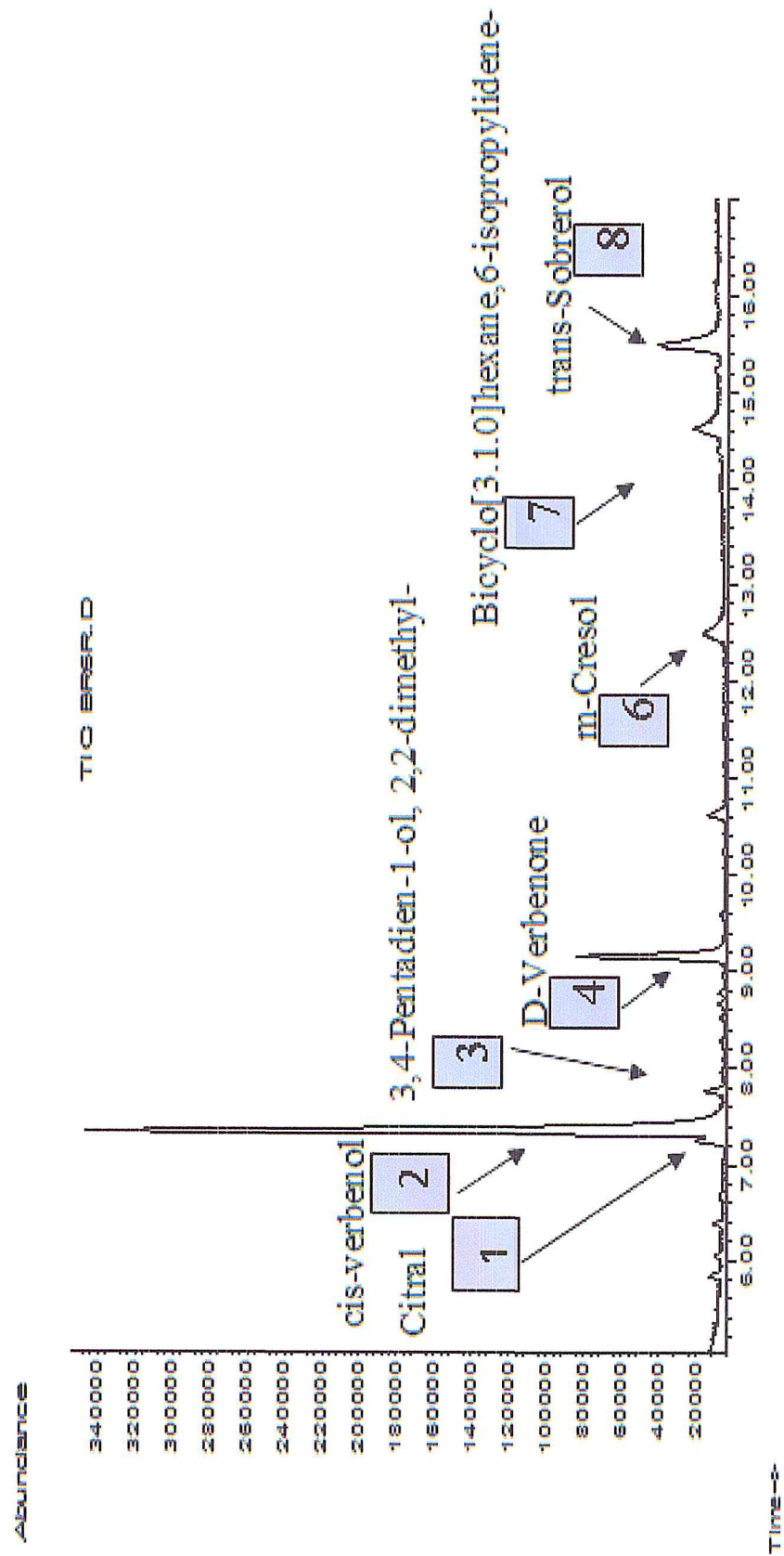
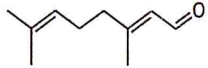
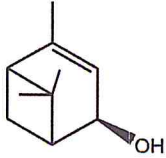
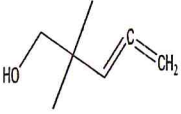
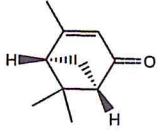
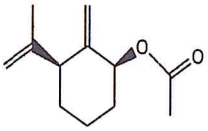
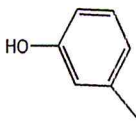
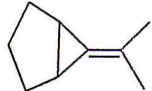
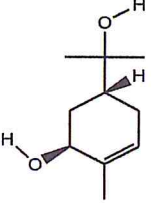


Figure 18 : Profil chromatographique d'analyse CG-SM de la bioconversion de l' α -pinène par la souche *Bacillus* S33.

Tableau 8 : Métabolites issus de la bioconversion de l' α -pinène par la souche *Bacillus* S33

N°	Produit	Nom trivial	Tr min	%	Formule	Structure
1	3,7-diméthyl-2,6-octadienal	Citral (isomer 1) cis, trans-	7.25	47	C ₁₀ H ₁₆ O	
2	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol, 4,6,6-triméthyl-	cis-verbenol	7.33	58	C ₁₀ H ₁₆ O	
3	3,4-Pentadien-1-ol, 2,2-diméthyl-	3,4-Pentadien-1-ol, 2,2-diméthyl-	7.77	64	C ₇ H ₁₂ O	
4	D-Verbenone	D-Verbenone	9.16	87	C ₁₀ H ₁₄ O	
5	Cyclohexanol, 2-méthylène-3-(1-méthyléthényl)-, acetate, cis-	(Z)-2-Méthylène-3-(1-méthyléthényl) cyclohexyl acetate	10.62	27	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	
6	Phenol, 3-méthyl-	m-Cresol	12.50	46	C ₇ H ₈ O	
7	Bicyclo[3.1.0]hexane, 6-isopropylidène-	Bicyclo[3.1.0]hexane, 6-isopropylidène-	14.62	43	C ₉ H ₁₄	
8	trans-Sobrerol	trans-Sobrerol	15.50	90	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	

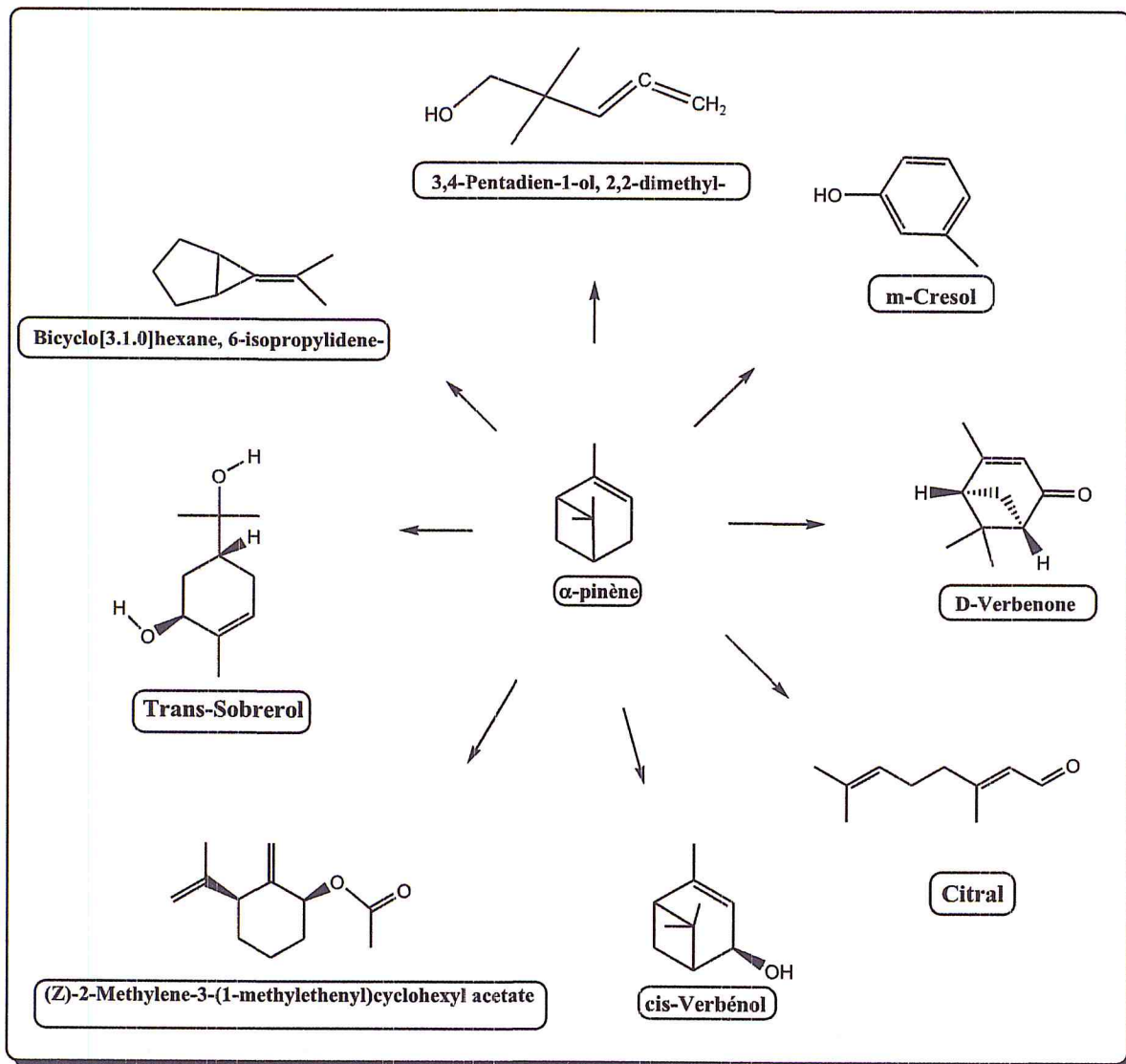


Planche 4 : Les voies métaboliques de la bioconversion de l' α -pinène par la souche *Bacillus* S33.

III.3.2 Biodégradation en milieu pauvre de l' α -pinène par la souche *Bacillus* S33

D'autre part, la biodégradation en milieu pauvre de l' α -pinène par la souche *Bacillus* S33 conduit aussi à la production d'un mélange de monoterpènes donnés par la planche 5 et le tableau 9, qui ont été identifiés par CG/SM (Figure 19) :

Les principaux produits obtenus à partir de la biodégradation pauvre de l' α -pinène par la souche *Bacillus* S33 sont regroupés dans le tableau 9 et la planche 5 :

Tableau 9 : Les principaux produits de la biodégradation pauvre de l' α -pinène par la souche

N°	Produit	Nom trivial	Tr min	%	Formule	Structure
1	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol, 4,6,6-triméthyl-, [1S-(1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)]	cis-Verbenol	7.34	49	C ₁₀ H ₁₆ O	
2	3-Cyclohexène-1-méthanol, .alpha.,.alpha.4-triméthyl	α -Terpineol	8.65	50	C ₁₀ H ₁₈ O	
3	trans-Sobrerol	trans-Sobrerol	15.38	91	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	
4	Eugenol	Eugenol	20.52	95	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	
5	Phénol, 2-méthoxy-4-(1-propényl)-	cis-Isoeugenol	20.52	91	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	
6	Phénol, 2-méthoxy-4-(2-propényl)-, acetate	Eugenyl acetate	20.56	97	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	

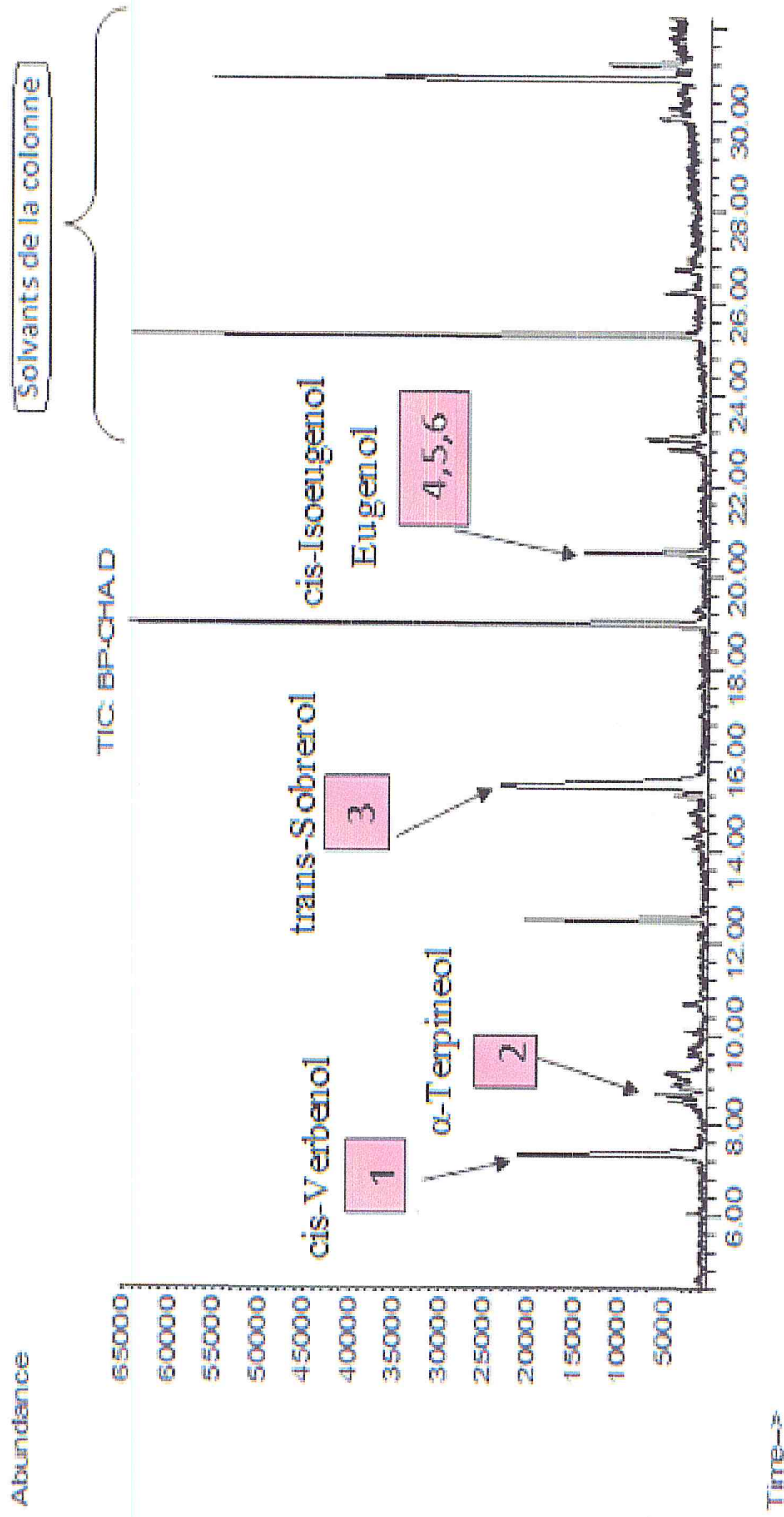


Figure 19 : Profil chromatographique d'analyse CG-SM de la biodégradation pauvre de l' α -pinène par la souche *Bacillus* S33.

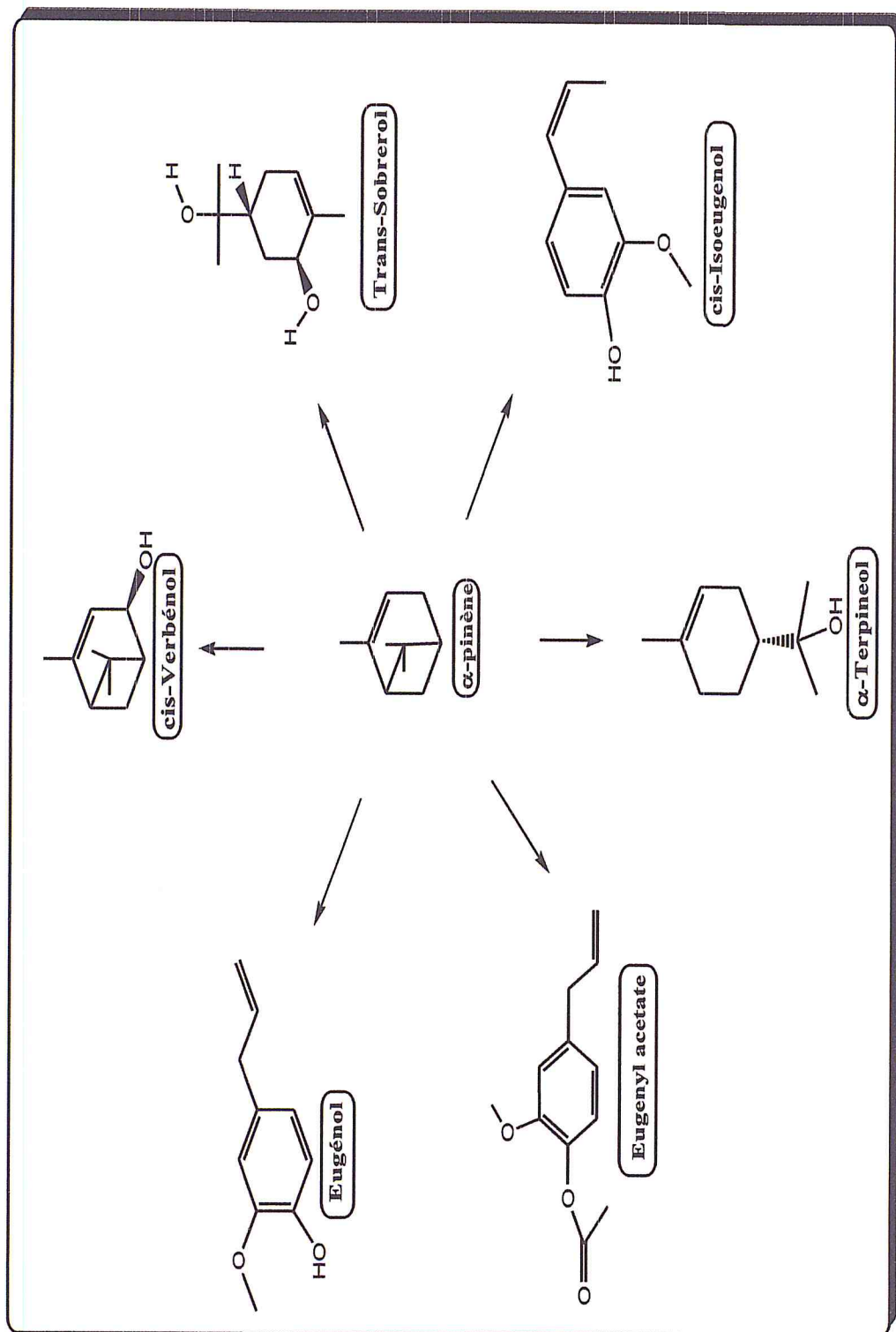


Planche 5 : Les voies métaboliques de la biodégradation de l' α -pinène par la souche bacillus S33

La bioconversion de l' α -pinène par la souche S33 a conduit à un mélange de métabolites, notamment, Citral, cis-verbenol, D-Verbenone, 3,4-Pentadien-1-ol, 2,2-diméthyl-, (Z)-2-Méthylène-3-(1-méthylethényl) cyclohexyl acetate, m-Cresol, Bicyclo[3.1.0]hexane,6-isopropylidène-, trans-Sobrerol, alors que la biodégradation de l' α -pinène a mené à des mélanges de d'autres métabolites, cis-Verbenol, α -Terpineol, trans-Sobrerol, Eugenol, cis-Isoeugenol, Eugenyl acetate.

L'examen des tableaux 8 et 9 ainsi que les planches 4 et 5 , révèle que l' α -pinène a subi au cours de la bioconversion et la biodégradation par la souche *Bacillus* S33 une dégradation totale. En se basant sur les données de la littérature on se rend compte que des produits comme cis-verbenol, cis verbénone, trans-sobrerol obtenus dans le présent travail, ont été également constatés lors de bioconversion de l' α -pinène en utilisant *Aspergillus niger* NCIM 612 [55]. Isoeugenol et ont relevé la présence des mêmes métabolites dans la bioconversion de l' α -pinène par la souche *Bacillus subtilis* HS8. D'autre part, les données de la bibliographie repartent, comme métabolites de la bioconversion de l' α -pinène l'obtention de pinocarvéol, pinocarvone, myrténal, myrténol, acide cumique, limonène par les différentes souches suivantes : *Pseudomonas* PL [57], *Bacillus pallidus* BR425 [40], *Pseudomonas* PIN [58] et *Chrysosporium pannorum*A-1 [60].

Il y a lieu de souligner que le cis-verbenol, D-verbénone, trans-sobrerol, Eugenyl-acétate, cis-iseueugenol, α -Terpineol, citral ont été identifiés pour la première fois, comme produits de bioconversion et biodégradation de l' α -pinène par les souches marines comme notre cas avec la souche *Bacillus* S33.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Le présent travail a été consacré à l'étude de la bioconversion et la biodégradation de l' α -pinène par la souche bactérienne S33 nouvellement isolée d'une algue marine.

Il a porté également sur l'étude de la caractérisation morphologique de la souche S33 par la détermination de la coloration de Gram, test de mobilité, test d'oxydase, test de la catalase. Ces tests nous a permis de rattacher cette souche au genre *Bacillus*.

Afin de déterminer la concentration du substrat utilisé dans les essais de la bioconversion et de la biodégradation, nous avons réalisé une série de tests d'activité qui nous a permis d'estimer une concentration adéquate de 500mg/l. Cette dernière concentration a été utilisée pour la suite de nos expériences sur la bioconversion et la biodégradation.

La bioconversion de l' α -pinène par la souche S33 a conduit à un mélange de métabolites, notamment des monoterpènes, comme: Citral, cis-verbenol, D-Verbenone, alors que la biodégradation de l' α -pinène a mené à des mélanges de d'autres métabolites, comme : cis-Verbenol, α -Terpineol, trans-Sobrerol, Eugenol, cis-Isoeugenol.

Sur la base de cette présente étude nous pouvons comprendre, d'estimer et d'évaluer l'importance du choix de la souche bactérienne S33 comme catalyseur biologique dans ce type de travaux mais aussi l'élaborer les conditions optimales de bioconversion et/ou de biodégradation.

En perspectives notre étude de la bioconversion des métabolites secondaires par une souche bactérienne isolée localement à partir d'algue marine en vu de son application industrielle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

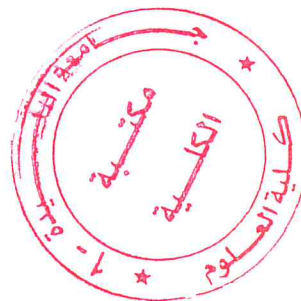
1. **T. Chatterjee, D.K. Bhattacharyya**, «Biotransformation of limonene by *Pseudomonas putida* », *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 55(5), 541-546, (2001).
2. **S.R. Amini & E.F. Abadi & Y. Ghasemi**, « Biotransformation of monoterpenes by immobilized microalgae, Received : 5 June (2010) / Revised and accepted: 1 November (2010) / Published online: 16 November (2010).
3. **H. Bousaab**, « Bioconversion éco-compatible de triterpénoïdes par des bactéries immobilisées sur *Luffa cylindrica* », Thèse de doctorat, Université de Haute Alsace-Mulhouse, France, (2011).
4. **B. Marrot, A. Barrios-Martinez, P. Moulin, N. Roche**, « Biodegradation of highphenol concentration by activated sludge in an immersed membrane bioreactor », *Biochemical Engineering Journal*, v (30), 174–183, (2006).
5. **V. Sridevi, M.V.V.C. Lakshmi, M. Manasa, M. Sravani**, « Metabolic pathways for the biodegradation of phenol, *International journal of engineering science & advanced technology* », 2(3): 695 – 705, (2012).
6. **M.H. El-Naas, A.S. Al-Muhtaseb, S. Makhoulf**, « Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel, *journal of Hazardous Materials* », 164: 720–725, (2009).
7. **A. Ullhyan et U.K. Ghosh**, « Biodegradation of phenol with immobilized *Pseudomonas putida* activated carbon packed bio-filter tower », *African Journal of Biotechnology*, 11(85): 15160-15167, (2012).
8. **D. Das**, « Treatment of industrial effluents using mixed culture of microorganisms in a bioreactor. Thesis of master », departement of biotechnology and medical engineering, National Institute of Technology, Rourkela, (2010).
9. **I.G. Collado**, «Stereoselective biotransformation using fungi biocatalysts », *Tetrahedron-Asymmetry* ,20,385-397,(2009).
10. **C. Larroche, J.B. Gros, P. Fontanille**, « Microbial processes. Dans: Flavours and fragrances: Chemistry, biprocessing and sustainability, R.G.Berger (Ed), Springer -Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 575-597, (2007).
11. **T.Chatterjee, And D.K.Bhattacharyya**, « biotransformation of limonene by *pseudomonas putida* ». *Appl. Microbiol Biotechnol*. 541-546, (2001).

12. **U. Krings, R.G. Berger**, « Biotechnological production of flavours and fragrances ».*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49 : 1-8, (1998).
13. **D. Linares**, « Etudes sur la voie de dégradation de l'a-pinène chez *Pseudomonas rhodesiae* en milieu biphasique liquide-liquide » Thèse de doctorat, Génie de procédés Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne-Clermont-Ferrand I, (2008).
14. **M.L. Fauconnier, A. MPAMBARA, J. DELCARTE, P. JACQUES, P. THONART, M. MARLIER**, « Conversion of green note aldehydes into alcohols by yeast alcohol dehydrogenase. *Biotechnol. Lett.*, 21 : 629-633, (1999).
15. **H.Y. Alfarrar and M. Nor Omar**, « Microbial Transformation of Natural Products », *Biological Sciences*, 3, 10, 357- 364, (2013).
16. **Z.A. Siddiqui**, « Biotransformational studies on bioactive secondary metabolites of plant origin », Thèse de doctorat, university of Karachi, Pakistan, (2007).
17. **V. Dave, P. Khirwadkar, K. Dashora**, « A review on biotransformation », *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology* ,2,2,1136-1140,(2014).
18. **H.B. Saab**, « Bioconversion éco-compatible de triterpénoides par des bactéries immobilisées sur *Luffa cylindrica* », Thèse de doctorat, Université de Haute Alsace - Mulhouse, (2011).
19. **J.M.S. CABRAL, C. Ratledge, & B. Kristiansen**, « Biotransformations: Basic Biotechnology », (Eds), *Cambridge University Press*, pp 471-501, (2001).
20. **P.J. TESSEIRE**, « Chimie des substances odorantes ». Tech & doc, Lavoisier, Paris, pp 3-23, (1991).
21. **C.P.L. Grady**, « Biodegradation: its measurement and micro biological basis » ;*Biotechnol. Bioeng.* pp 660-674, (1985).
22. **R. Gourdon-laepsi**, « Aide à la définition des déchets dits biodégradables, fermentescibles, méthanisables ,composables»;(INSA de LYON);RE.CO.R.D,(2002).
23. **J. Labanowski**, « Matière organique naturelle et anthropique: vers une meilleure compréhension de sa réactivité et de sa caractérisation »; Thèse de doctorat, Université de LIMOGES, Faculté des Sciences et Techniques, (2004).
24. **F.Z. Mesbaiah**, « 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)

25. **Philippe, Namour**, « Auto_Epuration des rejets organiques domestiques: Nature et effet de la matière organique résiduaire en rivière »; Thèse de doctorat, Paris, France, (2004).
26. **S. Grima**, « biodégradation de matériaux polymères à usage agricole : étude et mise au point d'une nouvelle méthode de test, Analyse des produits de dégradation et impacte environnementale. »; Thèse de doctorat de l'institut nationale polytechnique de Toulouse .spécialité : science des agro ressources, p17, (2002).
27. **M.H. Labrecque**, « Etude de la capacité de deux souches de levure à dégrader le xylène ». Mémoire magistère .Université Laval (Québec), (2003).
28. **C.I. Nair, K. Jayachandran et S. Hashidhar**, « Biodegradation of phenol », African Journal of Biotechnology, 7 (25): 4951-4958, (2008).
29. **V. Sridevi, M. V. V. C. Lakshmi, M. Manasa, M. Sravani**, « Metabolic pathways for the biodegradation of phenol, International journal of engineering science & advanced technology », 2(3): 695 – 705, (2012).
30. **A.A. Krastanov, Zlatka et H. Yemendzhiev**, « Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives, Engineering in Life Sciences », 13(1): 76-87, (2013).
31. **M. Bianchi, D. Marthy, J.C. Bertrand, P. Caumette, M. Gauthier**, « Les microorganismes du domaine océanique ». Edit. Masson.p 447, (1989).
32. **R.Y. Morita, et R. COLWELL**, « Effect of the ocean environment on microbial activities ». Edit. Colwell et Morita. Univ. Park Press, Baltimore.p 587, (1974).
33. **M.R. Leroux, R. Melki, B. Gordon, G. Batelier, E.P.M. Candido**, « Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. J. Biol. Chem », 272 : 24646-24656, (1997).
34. **G. Matheis**, « Raw materials for flavourings. Dans : Flavourings,E. Ziegler . & H.Ziegler . (Eds), VCH-Wiley, Weinheim », pp 125-142, (1998).
35. **J. Schrader**, « Microbial flavour production. Dans : Flavours and fragrances :Chemistry, bioprocessing and sustainability,R.G. Berger ».(Ed), Springer-Verlag, Berlin,Heidelberg, pp 508-513, (2007).
36. **J.G. Holt, N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley et S.T. Williams**, « Bergey's Manual of Determinative Bacteriology », 9th Edn, Williams and Wilkins, Baltimore, pp: 518-537, (1994).
37. **W .Fitch**, «Toward defining the course of evolution: minimum change ». *for a specific tree topology. Syst. Zool.* 406 -416, (1971).

38. M. Awais, A.S. Aamer, H. Abdul and H. Fariha, « Isolation, identification and optimization of bacitracin produced by *Bacillus* sp », Pakistan Journal of Botany, 39,4, 1303-1312, (2007).
39. N.B. Jansen, G.T. Tsao, «Production of optically active 2, 3-butanediol by *Bacillus polymyxa*», Biotechnol.Bioeng, 31(4),366-377,(1988).
40. N. Savithiry, D. Gage, W. Fu, P. Oriel, « Degradation of Pinene by *Bacillus pallidus* BR425 », Biodegradation, 9, 337-341, (1998).
41. K.H.C. Baser, G. Buchbauer, « Handbook of essential oils: science, technology, and applications », Ed by Taylor and Francis Group, LLC, an informa business, Boca Raton London New York, (2010).
42. R. Marmulla and J. Harder, « Microbial monoterpene transformations - areview », Frontiers in Microbiology, 5, 3, (2014).
43. W.Liu, A. Goswami, R.P. Steffek, R.L. Chemman, F.S. Sariaslani, J.J. Steffens, and J.P.N. Rosazza, « Stereochemistry of microbiological hydroxylations of 1,4-cineole », Organic Chemistry, 53, 5700–5704, (1988).
44. A.Z.M. Badee, A.H. Shahinaz, F.S.M. Nashwa, « Utilisation of orange peel in the production of a-terpineol by *Penicillium digitatum* (NRRL 1202) », Food Chemistry, 126, 849–854, (2011).
45. M. Zhang, P. Xu, S. Han, H.Q. Yan, C.Q. Ma, « Metabolism of isoeugenol via isoeugenol-diol by a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* HS8 », Applied Microbiology and Biotechnology, 73, 771-779, (2006).
46. 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).
47. 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).
48. J.L. Simonsen, « The Terpenes. Cambridge:Cambridge University Press », pp 105-191, (2nd Edition) Vol (2), (1957).
49. Herbal Medicine. Montvale, NJ: Medical Economics Company. p. 1100
50. Zebib, Bachar, Beyrouthy, E.L. Marc, Sarfi, Carl, Merah, Othmane, « Chemical Composition of the Essential Oil of *Satureja myrtifolia* (Boiss. & Hohen.) from Lebanon ». Journal of essential oil-bearing plants JEOP. 18 (1): 248–254.

51. M. Hmamouchi, J. Hamamouchi, M. Zouhdi, J.M. Bessiere, « Chemical and Antimicrobial Properties of Essential Oils of Five Moroccan Pinaceae ». *Journal of Essential Oil Research* [*J. Essent. Oil Res.*]. Vol (13), no. 4, pp. 298-302, Jul-Aug (2001).
52. A. Astani, J. Reichling, P. Schnitzler, « Comparative study on the antiviral activity of selected monoterpenes derived from essential oils ». *Phytother Res*;24(5):673-9, May (2010).
53. A. Gillissen, T. Wittig, M.Ehmen, H.G. Krezdorn, de C.A. Mey multi-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial on the efficacy and tolerability of GeloMyrtol forte in acute bronchitis. *Drug Res (Stuttg)*,63(1):19-27,Jan (2013).
54. G.D. Clayton, and F. E. Clayton, « Patty's Industrial Hygiene and Toxicology » Volume (2A, 2B, 2C): Toxicology. 3rd Ed. New York: John Wiley Sons,p. 3243, (1981-1982).
55. B.R. prema and P.K. Bhattacharyya, « Microbial Transformation of Terpenes II.Transformation of α -Pinène Applied Microbiology », 10,524-528, (1962 a).
56. P.K. Bhattacharyya, K. Ganapathy, « microbiological transformations of terpenes : part VI-Studies on the mechanism of some fungal hydroxylation reaction with the aid of model systems *Indian journal of Biochemistry* », 2,137-145, (1965).
57. O.P. Shukla, P.K. Battacharyya, « Microbial transformations of terpenes: Part X- Pathways of degradation of α - and β -pinenes in a soil pseudomonad (PL- strain) ». *Indian J.Biochem*, 5 : 92-101, (1968).
58. S.K. Yoo, D.F. Day, « Bacterial metabolism of α and β -pinene and related monoterpenes by *Pseudomonas* sp. strain PIN », *Process Biochem*, 37:739–745, (2002).
59. G.H. Gibbon, S.J. Pirt, « Degradation of α -Pinene by *Pseudomonas* PX1. FEBS » *Lett*, 18 : 103-105,(1971).
60. M. Trytek, K. Jedrzejewski, J. Fiedurek, « Bioconversion of α -pinene by a novel cold-adapted fungus *Chrysosporium pannorum* », *Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42, 181–188, (2015).

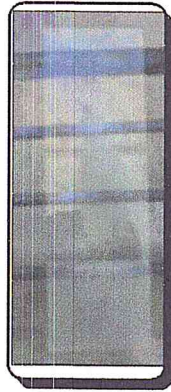


ANNEXES

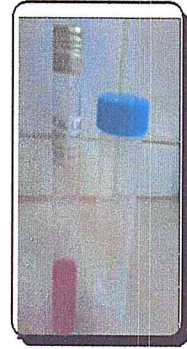
Annexe I : Caractérisation de la souche bactérienne



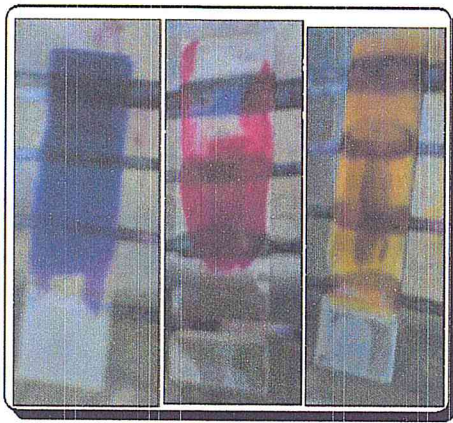
Annexe 1 : Microscope optique



Annexe 2 : L'état frais



Annexe 3: Test de mannitol- mobilité



Annexe 4: Coloration de Gram par différents réactifs



Réactifs de coloration du Gram



Annexe 5: Recherche de la catalase



Annexe 6: Test d'oxydase

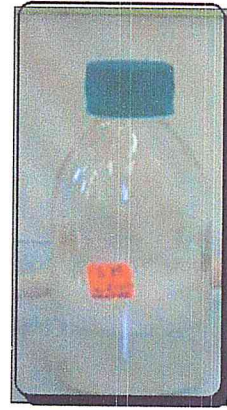


Annexe 7: Galerie API 20

Annexe II : préparations expérimentales



Préculture : Milieu (VNSS) liquide avec la souche S33



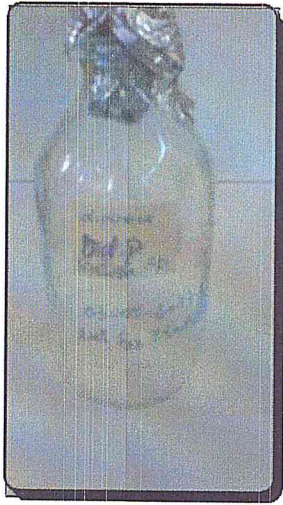
Solution mère de l' α -pinène 1 g/l



Filtration de la solution mère



Solution de la biodégradation sans glucose 50 ml



Solution de la biodégradation pauvre en glucose 50 ml



Solution de la bioconversion riche 50 ml



Centrifugation de l'extrait de bioconversion riche



Centrifugation de l'extrait de biodégradation sans et pauvre glucose

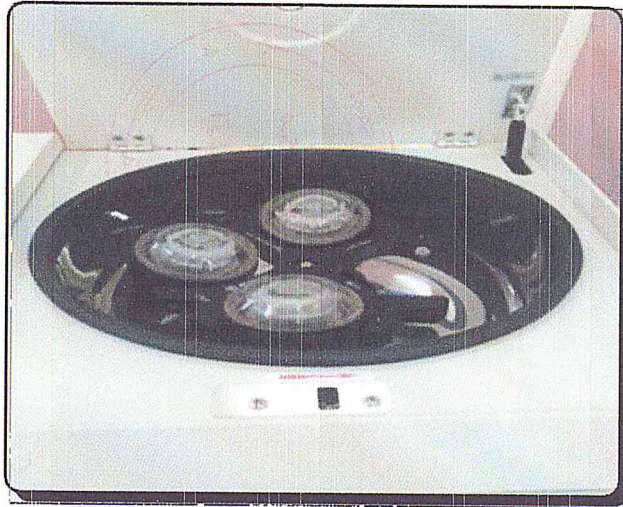
Annexe III : Matérielles



L'évaporateur rotatif



Autoclave



Centrifugeuse

