

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

BENORIF Oumhani

En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Sciences de la matière

Filière : Chimie

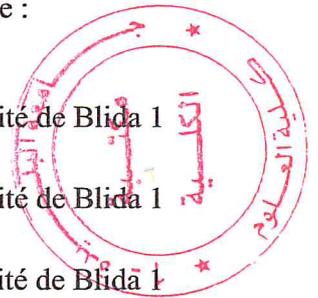
Option : Chimie des Produits Naturelles

Titre

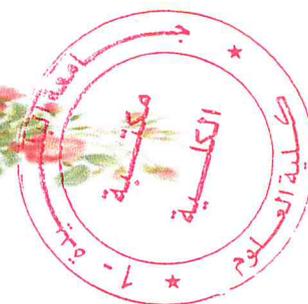
Etude de la bioconversion des monoterpènes par des souches d'origines marines

Soutenu publiquement le 03/07/2017 devant le jury composé de :

O.Touafek	MCA	Présidente	Université de Blida 1
F.Z. Ferradji	MCB	Examinatrice	Université de Blida 1
M. El Hattab	Pr	Promoteur	Université de Blida 1



Promotion 2016-2017



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 Travail.

Je tiens à remercier très sincèrement mon promoteur le professeur EL HATTAB Mohamed. 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. BADIS Abdelmalek, Je tiens à lui témoigner ma gratitude pour ses encouragements, sa disponibilité, sa patience avec moi, sa gentillesse et ces qualités scientifiques et humaines et aussi Je le remercie vivement pour le choix du sujet qui est intéressant et d'actualité.

Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à Mme Oussila Touafek Maître de conférences à l'Université de Blida 1, de m'avoir fait honneur de présider ce jury.

J'adresse mes sincères remerciements F.Z.Ferradji, maître de conférences qui m'a fait l'honneur de juger ce travail.

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

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

J'adresse également mes sincères remerciements à Madame le professeur BOUCHNEFA Naima pour sa gentillesse et leur aide durant mon dernier semestre d'étude.

Mes sincère remerciement pour les doctorantes du laboratoire de chimie des substances naturelles et de biomolécule (LCSN-BioM) Melle SAIDANI Fatiha et BEICHI Medjda pour leur gentillesse et leur aide et suivi au long de l'établissement de notre travail.

J'adresse également mes sincères remerciements au Chef du Département de Chimie industrielle, Monsieur le professeur Cheknen.

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

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

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

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

MERCI

OUMHANI





Dédicaces

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 produits naturelles je le porterai fièrement et je vous le dédie tout particulièrement

A mes très chers frères et sœur Aboubaker, Riad, Driss, Zohra, Djamilia et Naziha.

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

A mes très chères amies

Roufaida, Nadia, Ryma, Khadidja et Sabrina

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

OUMHANI



ملخص

يرتكز هذا العمل على دراسة التحويل البيولوجي و تحليل لليمونين من قبل السلالة البكتيرية المشفرة ب S16' المعزولة حديثا من الطحالب البنية البحرية *zonaria tourneforti*. كما ان تحليل الكيمياء الحيوية سمحت لنا بمعرفة نوع السلالة المستخدمة المتمثلة في *Bacillus.sp*.

تحديد التركيزات سمح لنا بترسيم مجال تثبيط الليمونيين لسلالة *bacillus.sp* بحيث بلغ هذا التركيز 500 ملغ/لتر .

تنفيذ التحويل و تحول البيولوجي لليمونين من طرف السلالة *bacillus.sp* باستخدام على التوالي الوسط المملح VNSS الغنية، المنعدمة والفقيرة من الجلوكوز.

سمح لنا التحويل البيولوجي لليمونين من طرف السلالة *bacillus.sp* و على وجه الخصوص بالحصول على *Trans-(+)-carvéol* كمنتج رئيسي كما ان التحلل البيولوجي سمح لنا بالحصول على خليط من *monoterpènes* من بين هذا الخليط تحصلنا على المادة (E), 2-penten-1-ol,2-méthyl.

كلمات مفتاحية: اليمونين، ، التحويل البيولوجي، التحلل البيولوجي، *Trans-(+)-carvéol*، و (E), 2-penten-1-ol,2-méthyl .

Résumé

Le présent travail porte sur l'étude de la bioconversion et la biodégradation du D-Limonène par la souche bactérienne marine codée S16, nouvellement isolée à partir de l'algue brune *Zonaria tournifortii*. L'identification biochimique de la souche utilisée a permis d'indiquer qu'elle est du genre *Bacillus.sp.*

La détermination des concentrations permettant de délimiter le domaine d'inhibition vis-à-vis du D-Limonène a été effectuée sur notre souche. Cette concentration a été déterminée comme étant égale à 500 mg/l.

La bioconversion et la biodégradation du D-Limonène par la souche *Bacillus.sp.* a été menée en utilisant, respectivement, le milieu VNSS riche et VNSS sans et pauvre en glucose.

La bioconversion du D-Limonène par la souche *Bacillus.sp.*, a permis notamment l'obtention du Trans-(+)-carvéol comme produit majoritaire. La biodégradation a mené vers un mélange des monoterpènes comportant notamment (E), 2-penten-1-ol, 2-méthyl.

Mots clés : D-Limonène, bioconversion, biodégradation, *Bacillus.sp.*

Abstract

The present work focuses on the study of the bioconversion and the biodegradation of D-Limonene by the newly isolated marine bacterial strain S16' from the brown alga *Zonaria tournifortii*. The biochemical identification of the used strain indicated that it belongs to the genus *Bacillus.sp.*

The determination of the concentrations for delineating the area of inhibition toward limonene was performed on the strains. The concentration was found to be equal to 500mg / l.

The bioconversion and biodegradation of D-Limonene by the strain *Bacillus.sp.* was conducted using, VNSS rich, without and poor of glucose, respectively.

The bioconversion of D-Limonene by *Bacillus.sp.* has given Trans-(+)-carveol as a major product. The biodegradation gave a mixture of monoterpenes including in particular (R)-5-isopropyl-2-methylcyclohex-2-enone.

Keywords : D-Limonene, bioconversion, biodegradation, *Bacillus.sp.*

Liste des abréviations

ADH	: Arginine Dihydrolase
AMY	: Amygdaline
API 20E	: Application et Procédé d'Identification par 20 Elément
ARA	: Arabinose
°C	: Unité du temps Degré Celsius
[C]	: Concentration
CIT	: Citrate
CG-SM	: Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
CMI	: Concentration Minimale d'Inhibition
GEL	: Gelatine
GLU	: Glucose
h	: Heure
H ₂ S	: Thiosulfate de sodium
IND	: Tryptophane
INO	: Inositol
LDC	: Lysine
MAN	: Mannitol
MEL	: Melibiose
ODC	: Ornithine
ONPG	: Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside
PH	: potentiel Hydrogène
RHA	: Rhamnose
SAC	: Saccharose
SM	: Solution Mère
SOR	: Sorbitol
Sp	: Souche non identifier
TDA	: Tryptophane
URE	: Urée
VNSS	: Milieu de culture Vaatanen Nine Salt Solution
VP	: Pyruvate de sodium

Liste des figures

Figure 1	: Forme énantiomérique du Limonène	5
Figure 2	: Classification systématique	7
Figure 3	: Métabolites secondaires obtenus par la biotransformation du D-Limonène par différent microorganisme	11
Figure 4	: Méthodologie expérimentale	14
Figure 5	: Galerie API 20 E	18
Figure 6	: Repiquage de la souche	19
Figure 7	: Préculture	20
Figure 8	: Solution mère	20
Figure 9	: Préparation de la Gamme de Concentration	21
Figure 10	: Extrait cellule bactérienne	23
Figure 11	: Extraction liquide-liquide	24
Figure 12	: Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS)	25
Figure 13	: Observation par microscope optique grossissement 10	26
Figure 14	: Observation par microscope optique grossissement 50	26
Figure 15	: Observation par microscope optique grossissent 05	26
Figure 16	: Tube mannitol	26
Figure 17	: Galerie API 20 E	27
Figure 18	: Effet de concentration du D-Limonène sur la croissance de <i>Bacillus.sp...</i>	29
Figure 19	: Profil chromatographique d'analyse de la bioconversion du D-Limonène par <i>Bacillus.sp</i>	33
Figure 20	: Profil chromatographique d'analyse de la biodégradation du D-Limonène par <i>Bacillus.sp</i>	35
Figure 21	: Agrandissement de la zone A	35
Figure 22	: Agrandissement de la zone B	36

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Caractères bactériologiques du genre Bacillus	6
Tableau 2 :	Composition chimique du milieu de culture VNSS	15
Tableau 3 :	Volume prélevé du solution mère (ml) pour chaque concentration	21
Tableau 4 :	Résultat de la galerie API 20 E	28
Tableau 5 :	Rendement de la biotransformation du D-Limonène par Bacillus.sp	30
Tableau 6 :	Les principaux produits de la bioconversion du D-Limonène par Bacillus.sp	31
Tableau 7 :	Les différents produits de la biodégradation du D-Limonène par Bacillus.sp	34

Liste des planches

Planche 1	: Biotransformation du D-Limonène par <i>Penicillium digitatum</i> et <i>Pleurotus sapidus</i>	8
Planche 2	: Biotransformation du D-Limonène par <i>Xantholobacter.sp</i>	8
Planche 3	: Biotransformation du D-Limonène par <i>Bacillus stearthermophilus</i> et <i>pseudomonas putida</i>	9
Planche 4	: Biotransformation du D-Limonène par <i>Rhodococcus globrulus</i> et <i>Bacillus pallidus</i>	9
Planche 5	: Biotransformation du D-Limonène par <i>Rhodococcus erythropolis</i>	10
Planche 6	: Biotransformation du D-limonène par <i>Hormonema.sp</i>	10
Planche 7	: Les voies métaboliques possibles de la bioconversion du D-Limonène par <i>Bacillus.sp</i>	32
Planche 8	: Les voies métaboliques possibles de la biodégradation du D-Limonène par <i>Bacillus.sp</i>	34

Sommaire

Remerciement	i
Dédicaces	iii
ملخص	iv
Résumés	v
Abstract	vi
Liste des abréviations	vii
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	ix
Liste des planches	x
Introduction générale	1

Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique

I.	Introduction	3
II.	Biotransformation	3
II.1.	Définition bioconversion	3
II.2.	Facteur affectant la biotransformation	3
II.3.	Avantage de la biotransformation	4
II.4.	Inconvénient de la biotransformation	4
II.5.	Biocatalyseur	4
II.6.	Biodégradation	4
III.	Travaux antérieurs de la biotransformation du D-Limonène par le genre <i>Bacillus</i> et d'autre microorganismes marins et terrestre	5
III.1.	Description chimique du limonène	5
III.2.	Propriétés et utilisation du D-Limonène	6
III.3.	Biotransformation du D-Limonène par le genre <i>Bacillus</i>	6
III.3.1.	Caractéristiques bactériologiques du genre <i>Bacillus</i>	6
III.3.2.	Classification systématique	7
III.4.	Biotransformation du D-Limonène par quelques microorganisme	7
III.5.	Biotransformation du D-Limonène par diverses souches	7
III.5.1.	Biotransformation du D-Limonène par des espèces du genre <i>Penicillium</i> et <i>pleurotus</i>	7
III.5.2.	Biotransformation du D-Limonène par l'espèce du genre <i>Xantholobacter.sp</i>	8
III.5.3.	Biotransformation du D-Limonène par des espèces du genre <i>Pseudomonas putida</i> et <i>Bacillus stearothermophilus</i>	8
III.5.4.	Biotransformation du D-Limonène par des espèces du genre <i>Rhodococcus</i> et <i>Bacillus</i>	9
III.5.5.	Biotransformation du D-Limonène par l'espèce du genre <i>Rhodococcus</i>	9
III.5.6.	Biotransformation du D-Limonène par l'espèce du genre <i>Hormonema</i>	10
	Conclusion	12

Chapitre 2 : Etude Expérimentale

I.	Introduction	13
II.	Matériels et méthodologie expérimentale	15
II.1.	Culture de la souche marine	15
II.1.1.	Souche bactérienne	15
II.1.2.	Milieu de culture	15
II.1.3.	Condition de culture	16
II.1.4.	Conservation de la souche	16
II.2.	Caractéristiques de la souche bactérienne	16
II.2.1.	Coloration de gram	16
II.2.2.	Microscope optique	17
II.2.3.	Mobilité	17
II.2.4.	Galerie API 20 E	17
II.2.5.	Test d'oxydase	18
II.3.	Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) en milieu solide	18
II.3.1.	Principe de la méthode	18
II.3.2.	Repiquage de la souche	19
II.3.3.	Préparation de la préculture	19
II.3.4.	Préparation de la solution mère	20
II.3.5.	Procédure générale de la détermination de la concentration minimale d'inhibition (CMI)	20
II.3.5.1.	Préparation de la gamme de concentration	21
II.3.5.2.	Dépôt du substrat	21
II.3.5.3.	Dépôt de la souche bactérienne	22
II.3.5.4.	Incubation	22
II.3.5.5.	Lecture des résultats	22
II.4.	Etude de la Bioconversion et la Biodégradation du D-Limonène par <i>Bacillus.sp</i>	22
II.4.1.	Procédure de la bioconversion et la biodégradation	22
II.4.1.1.	Bioconversion du D-Limonène	22
II.4.1.2.	Biodégradation du D-Limonène	23
II.4.1.3.	Centrifugation de l'extrait de culture bactérienne	23
II.4.1.4.	Extraction Liquide-Liquide de surnagent obtenu	23
II.4.1.5.	Analyse par Chromatographie en phase Gazeuse couplé à la Spectrométrie de Masse	24
II.5.	Résultats et Discussion	25
II.5.1.	Caractéristique de la souche bactérienne <i>Bacillus.sp</i>	25
II.5.1.1.	Coloration du Gram et Genre	25

II.5.1.2.	Mobilité de la souche	26
II.5.1.3.	Appareillage et procédé d'extraction (API 20 E)	27
II.5.1.4.	Test d'oxydase	28
II.5.2.	Détermination de la Concentration Minimale d'Inhibition (CMI)	29
II.5.3.	Bioconversion et Biodégradation du D-Limonène	31
	Conclusion Générale	37
	Références bibliographiques	38
	Annexes	

Introduction générale

Introduction Générale

Les organismes végétaux produisent différents types de métabolites secondaires, qui ont été exploités par les humains pour leur rôle bénéfique dans un large éventail d'applications [1]. Les métabolites secondaires ne sont pas directement impliqués dans la croissance, le développement ou la reproduction normale d'une plante et, contrairement aux métabolites primaires, l'absence de métabolites secondaires n'entraîne pas une mort immédiate mais plutôt une atteinte à long terme de la survie, de la fécondité ou de l'apparition de l'organisme, Ou peut-être pas de changement significatif du tout. Les métabolites secondaires jouent souvent un rôle important dans la défense des plantes contre les herbivores et autres défenses interspécifiques [2]. En raison de leur importance en tant que médicaments et additifs alimentaires naturels, ils ont été une zone fertile d'investigation chimique pendant de nombreuses années, stimulant le développement de la chimie analytique et de nouvelles réactions de synthèse et des méthodologies [3].

Les terpénoïdes sont des hydrocarbures insaturés dérivés d'unités isoprénique notamment Les monoterpénoïdes. Qui représentent la classe la plus grandes et la plus diverses des métabolites secondaires des végétaux [3, 4]. Les industries pharmaceutique, alimentaire, agricole et chimique les ont exploitées respectivement pour leur potentiel et leur efficacité en tant que médicaments, exhausteurs de saveur, pesticides et produits chimiques fins [5].

La Biotransformation est une discipline fondamentalement pratique dont l'objectif est d'utiliser des enzymes et des cellules entières comme catalyseurs pour la conversion des substrats organiques, dans des conditions de pH et de température modérées. L'avantage principal des voies de bioconversion par rapport à la synthèse chimique classique est l'obtention d'excès énantiomériques importants [6]. La synthèse chimique classique présente plusieurs inconvénients : nombreuses étapes, des catalyseurs souvent écotoxiques, rendements faibles, un temps de préparation long et une non-spécificité de certaine réaction [7,8]. Diverses souches microbiennes ont été utilisées dans ce cadre. Des résultats très intéressants ont été obtenus à travers les voies de bioconversion, biodégradation notamment en termes de régio et stéro sélectivité et de rendement de réaction et qui s'adapte parfaitement avec la protection de l'environnement.

Le limonène constitue le principal monoterpène des huiles essentielles des hespéridés. Il représente plus de 90% dans les essences d'orange et de citron. Il a fait l'objet de plusieurs

travaux de biotransformation par diverses souches, ayant mené notamment à des monoterpènes oxygénés comme le carvéol, la carvone, limonène1, 2diol, ...

Le présent travail est un grand chapitre intégrant de cette large thématique et porte sur la biotransformation du D-Limonène par une souche du genre *Bacillus* isolé d'une algue marine. Il s'articule autour de deux chapitres principaux :

1. Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique dans laquelle nous présentons les concepts fondamentaux de la biotransformation (bioconversion et biodégradation) du limonène par différents microorganismes marins et terrestres.
2. Le deuxième chapitre est réservé à une étude expérimentale qui a pour objet de tester l'efficacité de la souche bactérienne *Bacillus SP* dans la bioconversion et la biodégradation du Limonène.

Chapitre 1 :
Synthèse
Bibliographique

I. Introduction

La biotransformation des composés bioactifs est une alternative intéressante permettant d'empêcher l'utilisation des composés toxiques tels que les solvants organiques dans la synthèse. L'idée de la biotransformation 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 [9]. En 1980, deux mises au point sur les voies de biotransformation ont été réalisées indépendamment par Staba et par Reinhard et Alferman [10].

Dans cette synthèse bibliographique 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 biotransformation du D-Limonène, 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 biotransformation du D-Limonène.

II. Biotransformation (Bioconversion et Biodégradation)

II.1. Définition de la bioconversion

La bioconversion peut être définie comme la modification chimique d'un substrat par l'utilisation d'un catalyseur biologique comme une enzyme, ou un microorganisme entier (qui contient une enzyme ou plusieurs enzymes), selon un nombre limité d'étapes enzymatiques. Une certaine molécule est modifiée par la transformation de ses groupes fonctionnels avec ou sans dégradation de son squelette carboné. Ces modifications conduisent à la formation des composés bioactifs nouveaux qui ne sont pas préparés par des procédés chimiques.

La bioconversion est utilisée aussi bien pour la synthèse d'arômes alimentaires, que pour la production des molécules ayant un intérêt pharmaceutique.

II.2. Facteurs affectant la bioconversion

La bioconversion dépend de divers facteurs : aspect biochimiques, physiologiques et les conditions environnementales de la culture cellulaire telle que [11] :

- ✓ Composition chimique des milieux de culture ;
- ✓ La source de carbone dans le milieu ;
- ✓ Température ;
- ✓ PH ;
- ✓ Intensité de la lumière et le temps d'incubation.

II.3. Avantages de la biotransformation

- ✓ Réalisation à un PH presque neutre, à la température ambiante et à la pression atmosphérique ;
- ✓ Production des composés biodégradables (naturels) ;
- ✓ Elimination de certaine faiblesse inhérente aux techniques classiques de synthèse ;
- ✓ Diminution des volumes des résidus d'extraction.

II.4. Inconvénients de la biotransformation

- ✓ Nécessité d'un équipement de laboratoire spécifique et la formation sur les techniques microbiennes ;
- ✓ Si le microorganisme utilise le substrat en tant que source d'énergie, aucun produit désiré n'est susceptible d'être récupéré.

II.5. Biocatalyseurs

La biocatalyse est un grand type de bioconversion qui implique l'action d'enzymes dans la conversion d'un composé à l'autre [12].

Le biocatalyseur employé peut être une cellule entière d'origine animale, végétale ou microbienne. Dans ce dernier cas, il est possible d'utiliser des microorganismes eucaryotes comme les champignons filamenteux et les levures ou des organismes procaryotes comme les bactéries [13,14]. Le biocatalyseur peut également être une enzyme déterminée, présente au sein d'un extrait cellulaire ou sous forme purifiée.

II.6. Biodégradation

Le terme biodégradation est généralement retenu dans la littérature scientifique comme correspond à une action de dégradation d'un composé organique par des agents biologiques (généralement microbiens) avec comme seuls rejets, des produits simples tels que H₂O, CO₂, CH₄, H₂, Cl₂, mais encore des produits organiques simples (métabolites) tels que des acides organiques etc [15]. D'une manière plus spécifique, la notion de « biodégradation » est définie comme étant « un type de dégradation engendrée par une activité biologique, particulièrement des attaques enzymatiques, entraînant un changement significatif dans la structure chimique du matériau » [16].

III. Travaux antérieurs de la biotransformation du D-Limonène par le genre *Bacillus* et d'autres microorganismes marins et terrestre

III.1. Description chimique du limonène

Le limonène (C₁₀H₁₆) (1-méthyl(4-prop-1-èn-2-yl)cyclohexène) est un monoterpène monocyclique hydrocarboné, liquide incolore à température ambiante, qui est responsable de l'odeur caractéristique des agrumes, il est l'un des terpènes les plus largement répandu dans la nature [17]. Le limonène possède deux énantiomères (Figure 1). 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 perillyle), 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' α -terpinéol, la carvone et le menthol [18], Les propriétés organoleptiques (arôme 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 [19]. Au cours des dernières années, beaucoup de travaux ont été réalisés sur la bioconversion du limonène et ont relevé de faibles rendements en raison de la volatilité et la toxicité du limonène vis-à-vis de plusieurs micro-organismes [18].

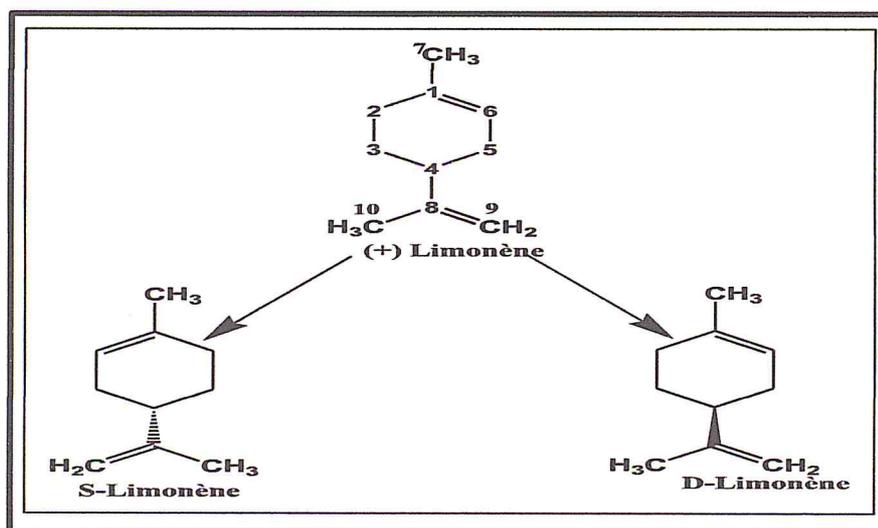


Figure 1 : Formes énantiomères du limonène

III.2. Propriétés et utilisations du limonène

Le limonène possède les propriétés suivantes : [18]

- ✓ 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 ;
- ✓ Agent de thérapie anticancéreuse.

III.3. Biotransformation du D-Limonène par le genre *Bacillus*

III.3.1 Caractéristiques bactériologiques du genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* appartient à la famille des *Bacillaceae* [20]. Les bactéries de cette famille sont de grands bacilles en forme de bâtonnets à Gram positif, groupées en chaînettes, formant des spores mobiles. 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* [21]

Caractéristiques	<i>Bacillus</i>
Gram	Gram + 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)
Oxydase	-
Type respiratoire	Aérobic stricte où Aéroanaérobic facultative
Mobilité	+ ou - grâce à une ciliature péritriche Parfois capsulés

III.3.2 Classification Systématique

Le genre *Bacillus* est omniprésent dans la nature, il est classé comme décrit par la figure 2 [22] :

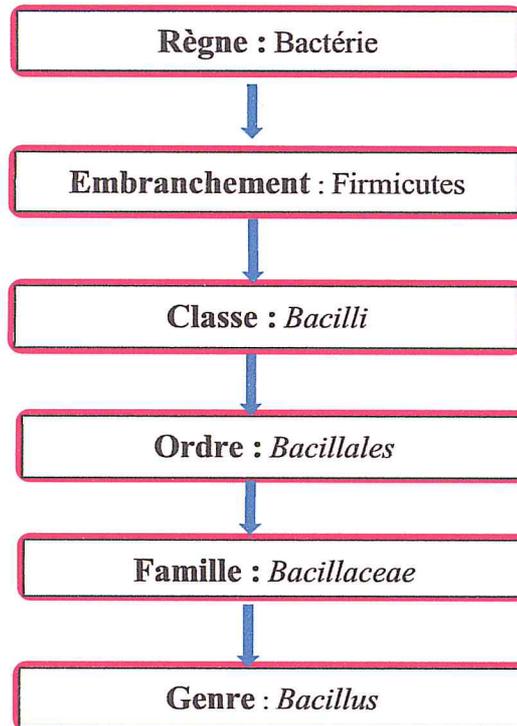


Figure 2 : Classification systématique

III.4. Biotransformation du D-Limonène par quelques microorganismes

Nous allons reporter à titre d'illustration non exhaustive l'utilisation des microorganismes marin et terrestre dans la biotransformation du limonène.

La littérature rapporte un nombre impressionnant de biotransformation du limonène par des souches bactériennes terrestres et marines.

III.5. Biotransformation du D-Limonène par diverses souches

III.5.1. Biotransformation du D-Limonène par des espèces du genre *Penicillium* et *pleurotus*

La transformation bactérienne de D-Limonène [23,24] par l'espèce *penicillium digitatum* et *Pleurotus sapidus* permet d'obtenir la carvone, il s'agit d'une oxydation allylique en position 6.

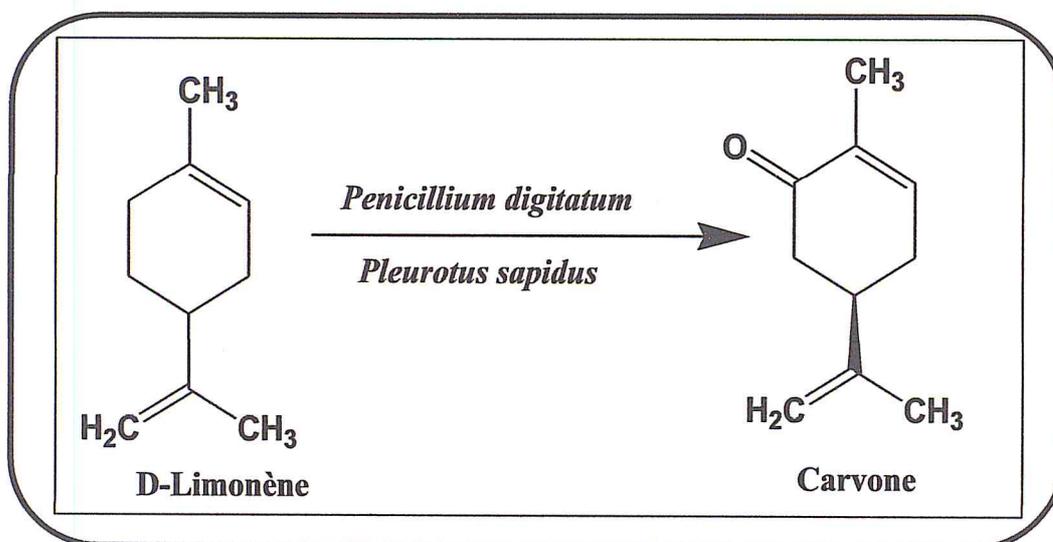


Planche 1 : Biotransformation du limonène par *Penicillium digitatum* et *pleurotus sapidus* [23,24].

III.5.2 Biotransformation du D-Limonène par l'espèce du genre *Xantholobacter.sp*

L'action de l'espèce *Xantholobacter.sp* sur le D-Limonène [25] a permis d'effectuer une réaction d'époxydation régio-sélective très intéressante sur la double liaison (carbone C8-C9), on obtient alors l'époxyde 8-9 limonène.

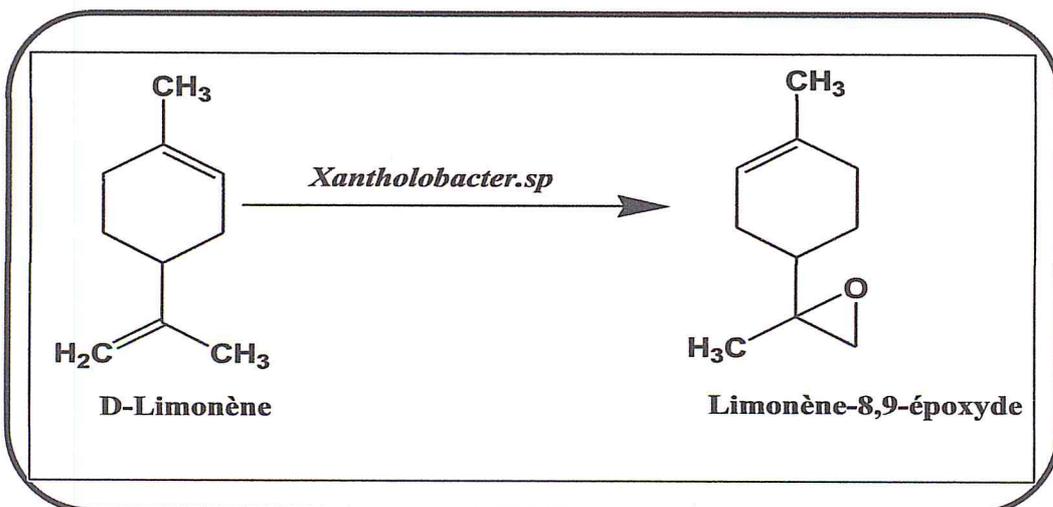


Planche 2 : Biotransformation du limonène par *Xantolobacter.sp* [25]

III.5.3 Biotransformation du D-Limonène par des espèces du genre *Bacillus* et *Pseudomonas*

La biotransformation du D-Limonène [13] par les espèces *Pseudomonas putida* et *Bacillus stearothermophilus* a permis d'obtenir l'acide périllique, il s'agit d'une réaction d'oxydation du méthyl en position 7.

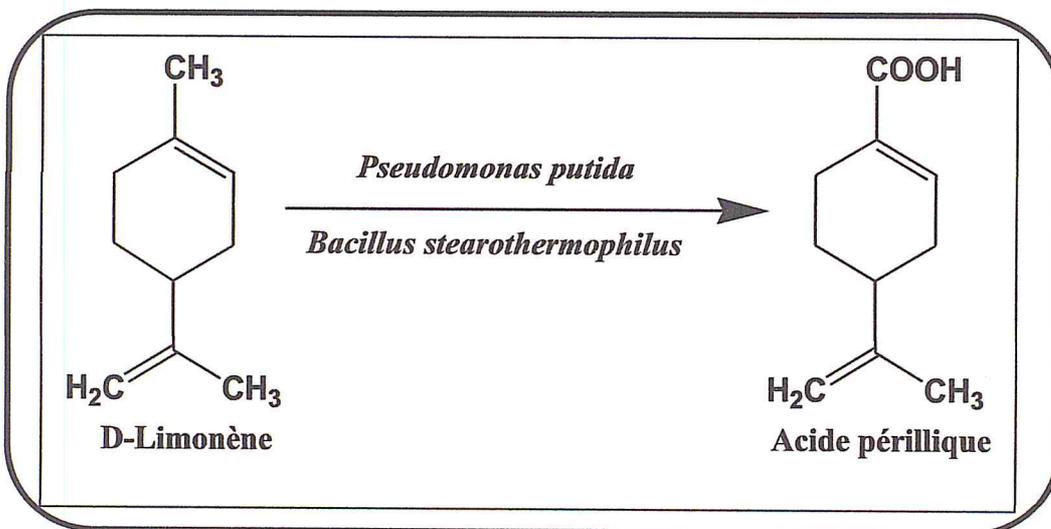


Planche 3 : Biotransformation du limonène par *Bacillus stearothermophilus* et *Pseudomonas putida* [13]

III.5.4 Biotransformation du D-Limonène par des espèces du genre *Bacillus* et *Rhodococcus*

La transformation bactérienne de D-Limonène [13] par les espèces *Rhodococcus globrulus* et *Bacillus pallidus* a permis d'obtenir le carvéol, elle consiste en une hydroxylation sur le carbone numéro 2.

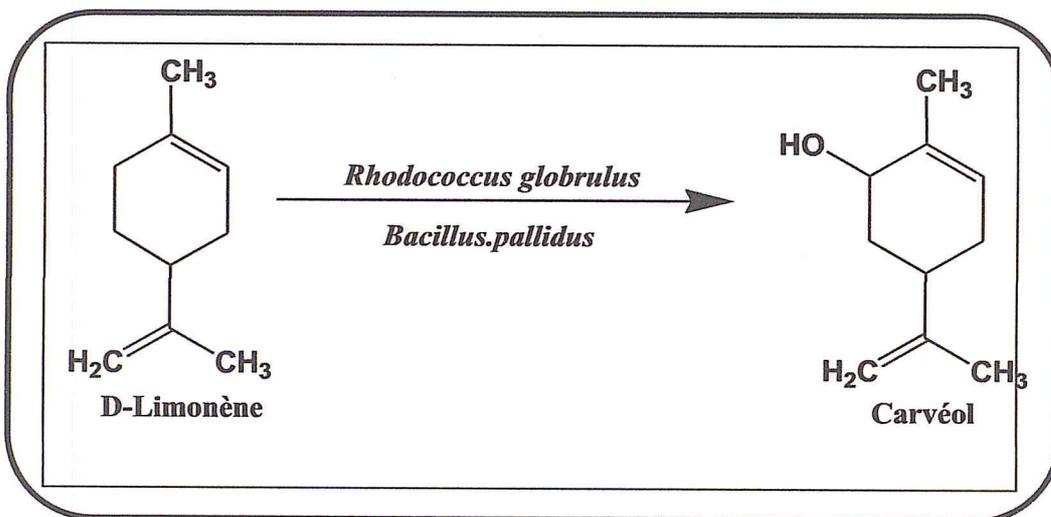


Planche 4 : Biotransformation du limonène par *Bacillus pallidus* et *Rhodococcus globrulus* [13]

III.5.5. Biotransformation du D-Limonène par l'espèces du genre *Rhodococcus*

La transformation bactérienne de D-Limonène [13] par l'espèce *Rhodococcus erythropolis* a permis d'obtenir le Limonène-1,2-diol, elle consiste en une hydroxylation sur les deux carbones numéros 1 et 2.

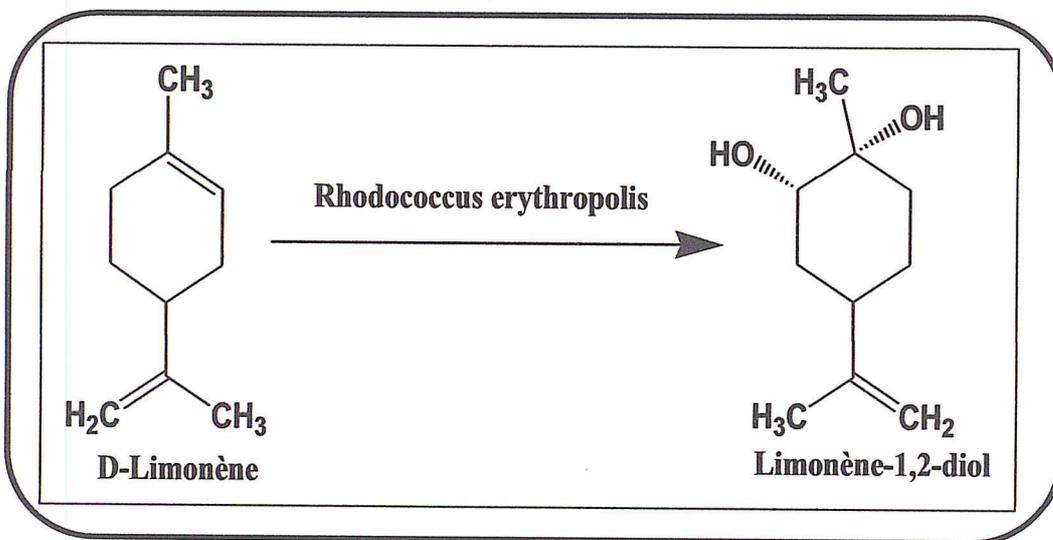


Planche 5 : Biotransformation du limonène par *Rhodococcus erythropolis* [13]

III.5.6. Biotransformation du D-Limonène par l'espèce du genre

Hormonema

La biotransformation de D-Limonène par l'espèce *Hormonema.sp* [13] a permis d'obtenir l'isopipériténol, la biotransformation mène à une hydroxylation sur le carbone numéro 5.

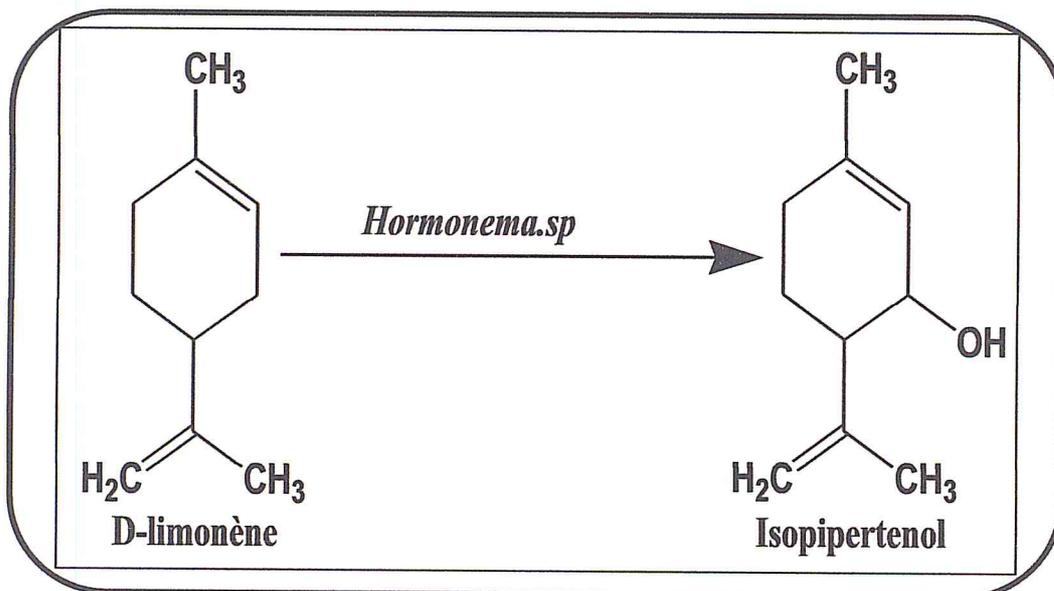


Planche 6 : biotransformation du limonène par *Hormonema.sp* [13]

Les biotransformations du D-Limonène sont reportées par la figure 3 :

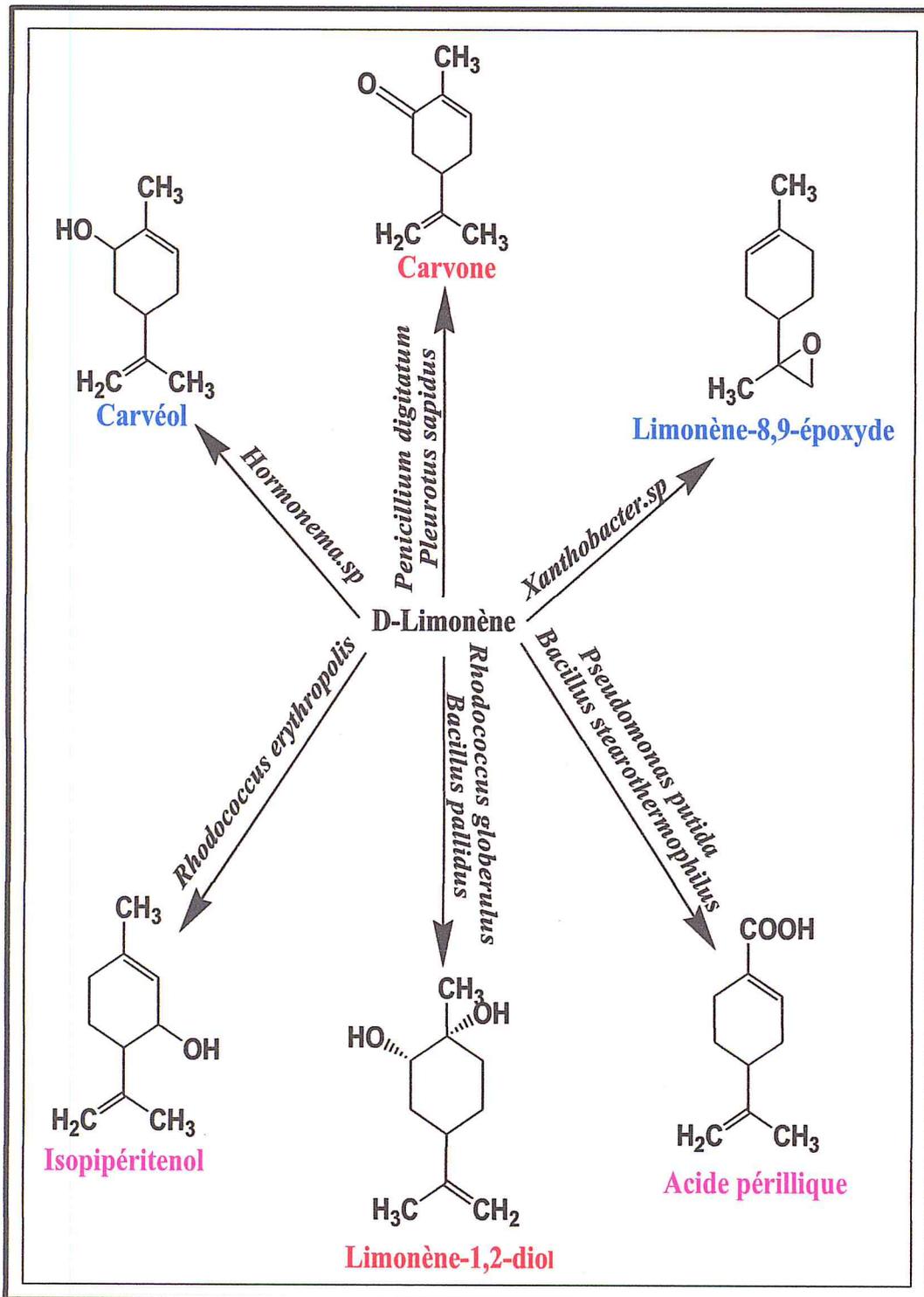


Figure 3 : Métabolites secondaires obtenus par la biotransformation du D-Limonène par différent microorganisme

Conclusion

La présente synthèse bibliographique a été consacrée à l'étude de la biotransformation du D-Limonène par différents micro-organismes marins et terrestres. Cette revue bibliographique a montré l'intérêt de la biotransformation dans l'obtention des dérivés monoterpéniques, très intéressants du limonène, comme la carvone, le carvéol et l'acide périllique.

Nous avons constaté que les microorganismes peuvent être différents mais les voies métaboliques sont relativement similaires avec des réactions identiques.

Nous avons noté l'émergence de deux voies métaboliques principales, il s'agit des réactions d'hydroxylation et d'époxydation.

Bien que ces réactions soient toujours mal adaptées à l'exploitation à l'échelle industrielle, elles offrent la possibilité d'obtenir en une seule étape des produits qui peuvent ensuite être testés pour déterminer leurs propriétés olfactives ou biologiques. Les produits de bio-oxydation et hydroxylation pourraient devenir des cibles intéressantes pour la synthèse organique.

Chapitre 2 :

Etude

Expérimentale

I. Introduction

Notre travail expérimental porte sur l'étude de la biotransformation (bioconversion et biodégradation) du limonène par une souche bactérienne d'origine marine du genre *Bacillus*.

La méthodologie du travail expérimental est récapitulée dans l'organigramme représenté par la figure 3. Elle s'articule autour des quatre grandes parties suivantes :

- Culture de la souche marine (*Bacillus sp*) ;
- Caractéristiques de la souche bactérienne ;
- Détermination de la concentration assimilable non inhibitrice du D-Limonène en milieu solide pour la bioconversion et la biodégradation ;
- Etude de la bioconversion et la biodégradation du D-Limonène par une souche bactérienne d'origine marine du genre *Bacillus* ;
- Analyse et identification par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM) des produits ou métabolites obtenus.

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

L'identification biochimique au niveau de Laboratoire d'hygiène Alimentaire Ferouja la wilaya de Blida.

L'observation par Microscopie Optique a été effectué au Laboratoire de recherche « Physique Fondamentale et Appliquée (FUNDAPL) », Université de Blida 1.

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

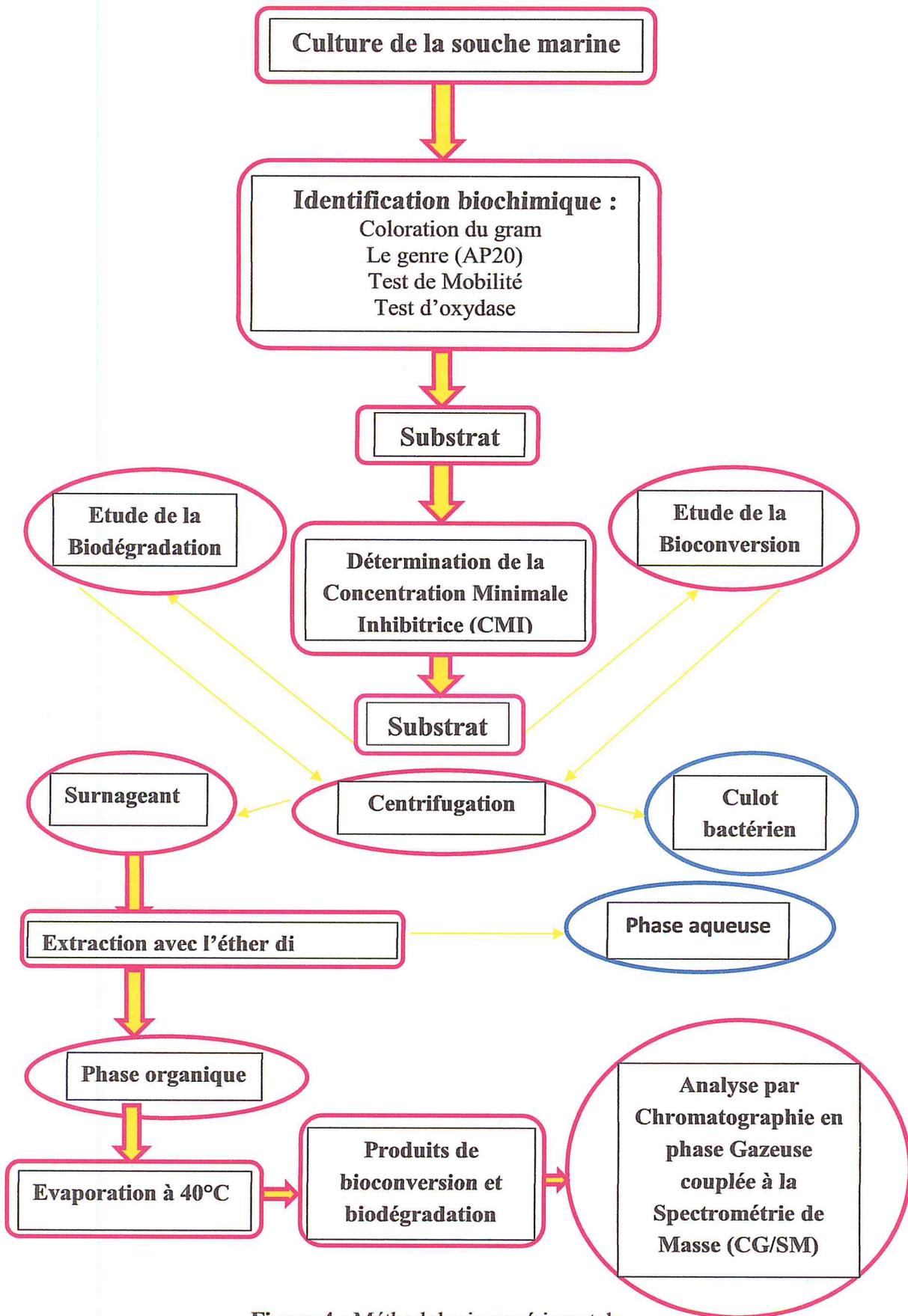


Figure 4 : Méthodologie expérimentale

II. Matériel et méthodologie expérimentale

II.1. Culture de la souche marine

II.1.1. Souche bactérienne

La souche bactérienne a été nouvellement isolée à partir l'algue brune *Zonaria tournefortii* récoltée en février 2016 au niveau du site la « Corne d'Or » à Tipaza (Algérie), isolée dans le cadre des travaux de recherche du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSN-BioM) de l'Université de Blida 1, la souche S16' est productrice de protéase.

II.1.2. Milieu de culture

-Vaätanen Nine Salt Solution (VNSS)

Ce milieu est le seul à être préparé, la composition de ce milieu est décrite dans le Tableau 2. Avant utilisation, il a été stérilisé à l'autoclave (20 min à 121°C). Avons stérilisation son pH était de 7,2. Ce milieu (Annexe 1) est spécifique aux bactéries marines. L'ensemble des pré-cultures et cultures ont été réalisés dans ce milieu.

Tableau 2 : Composition chimique du milieu de culture VNSS

Produit	Masse (g)
NaCl	17,600
Na ₂ SO ₄	1,470
NaHCO ₃	0,008
KCl	0,250
KBr	0,040
MgCl ₂ .6 H ₂ O	1,870
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,410
SrCl ₂ .6 H ₂ O	0,010
H ₃ BO ₃	0,010
Peptone	1,000
Extrait de levure	0,500
Glucose	0,500
Amidon soluble	0,500
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,010
Na ₂ HPO ₄	0,010

II.1.3. Condition de culture

La souche bactérienne a été conservée au laboratoire dans des boîtes de pétrie contenant 15 ml du milieu VNSS solide (VNSS liquide+ 20g d'Agar), le milieu doit être bien séché dans les boîtes de pétris pour éviter la formation des gouttelettes d'eau, elles sont de suite fermées pour éviter toute sorte de contamination.

II.1.4. Conservation de la souche

Conservation de courte durée : La souche pure a été repiquée sur milieu VNSS solide et conservée à +4 °C.

Conservation à longue durée : A partir d'une culture en fin de phase exponentielle de croissance, la souche est conservée dans le milieu VNSS liquide en présence de 30 % de glycérol à - 80 °C.

II.2. Caractéristique de la souche bactérienne

II.2.1 Coloration de gram

Il existe deux grands groupes de bactéries basés sur les différences structurales de la paroi cellulaire. La coloration de Gram permet de distinguer ces deux groupes.

Le principe de cette méthode est le suivant :

- On étale les bactéries sur une lame de verre, ensuite on les fixe par la chaleur ou l'alcool, puis on les colore successivement avec une solution de violet de gentiane (on laisse agir de 30 secondes à 1 minute), puis rincez à l'eau, après on les fixe avec une solution de Lugol (mélange d'iode et d'iodure de potassium, laissez agir le même temps que le violet de gentiane puis rincez à l'eau) ; la préparation est ensuite traitée avec un solvant organique, tel que l'alcool. Certaines bactéries, dites à Gram positif, résistent à la décoloration par l'alcool. Les autres, appelées bactéries à Gram négatif, sont rapidement décolorées. Après, la Contre coloration avec de la Fuchsine : laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Les bactéries à Gram positif apparaissent alors en violet, tandis que les bactéries à Gram négatif, qui acceptent le contre-colorant, sont roses.

Cette méthode de coloration repose sur une différence fondamentale entre la composition chimique des parois des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. En effet, la paroi s'interpose comme une barrière pour empêcher l'accès du cytoplasme (sur lequel se fixerait le colorant) aux agents décolorants et à l'éluion du complexe coloré. L'incapacité des cellules à Gram négatif à interdire cet accès résulte de la teneur élevée de leurs parois en lipides qui sont facilement dissous dans l'alcool ; celui-ci passe alors facilement à travers la membrane cellulaire, dissout le complexe coloré, l'élimine et laisse la cellule incolore.

Enfin, la lame a été observée au microscope avec un grossissement de 10 et 50 [26].

II.2.2 Microscopie optique

L'observation par microscopie optique, et selon les formes des colonies on peut distinguer le genre de la souche étudiée.

II.2.3 Mobilité

Pour déterminer la mobilité de la souche, on effectue les deux tests suivant :

1-La microscopie optique à l'état frais de notre souche nous permet de voir comment les bactéries se mouvoient, on racle à l'aide d'une pipette pasteur une ou 2 colonies qui sont ensuite déposées sur une lame de verre, elles sont fixées par une goutte de vaseline, et on visualise la stabilité de la souche autrement dit, la mobilité de la souche.

2-On réalise le test de Mobilité en utilisant le mannitol (glucose), il faut préparer tout d'abord l'inoculum (suspension bactérienne), à l'aide d'une anse de platine on racle 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques. Ensuite, l'anse est déchargée dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9%, la solution est bien homogénéisée. Un volume de la suspension bactérienne est prélevé à l'aide d'une pipette pasteur stérile et l'on met une piqure centrale dans le tube mannitol (Annexe 2), ensuite incubé à 30 C° pendant 24h.

II.2.4 Galerie Appareillage et procédé d'identification (API 20)

Une Galerie API 20 E est une Galerie de 20 microtubes prêts à l'emploi, Chaque tube contient un substrat différent sur lequel le micro-organisme recherché va réagir, il existe différents types d'API (API 20, API 50, ...). Pour notre souche la galerie API 50 est la mieux adaptée, toute fois pour des considérations de moyens, nous avons utilisé la galerie API 20 (figure 5), cette galerie permet respectivement d'étudier le métabolisme général de la souche bactérienne (*Bacillus*), de faire une rapide étude de leurs capacités enzymatiques ou de déterminer leur capacité à dégrader 10 sucres et 10 acides aminés de la galerie.

L'expérience se déroule selon les étapes suivantes :

- ✓ Nettoyage de la paillasse par l'eau de javel ou de l'alcool (endroit stérile), avec l'utilisation des gants ;
- ✓ Préparation de la suspension bactérienne ;
- ✓ Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile ouverte, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles ;

- ✓ Remplissage des tubes de suspension et les substrats dont le sigle est souligné, la cupule doit être remplie d'huile de paraffine pour maintenir en solution les ions volatils produits par la réaction et ainsi assurer le virage de l'indicateur coloré de PH ou bien pour créer l'anaérobiose et Les substrats dont le sigle est encadré, la cupule doit aussi être remplie de manière à créer un ménisque.
- ✓ Fermer le couvercle et incubation à 30°C pendant 24 h ;
- ✓ Après 24 h on dépose les réactifs (Annexe 12) microtube.

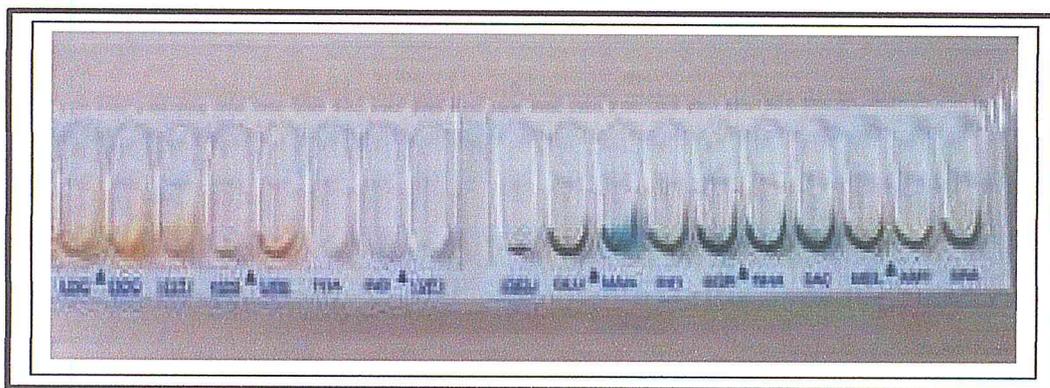


Figure 5 : Galerie API 20 E avant utilisation

II.2.5. Test d'oxydase

Ce test permet de révéler si la souche possède une enzyme ou inversement. Sur une lame en verre, on dépose un disque oxydase stérile sur lequel on met une goutte d'huile de vaseline pendant quelques secondes puis on dépose la souche sur le disque, la lecture se fait après 10 min au maximum. L'apparition d'une coloration mauve, veut dire que notre souche est oxydase (+), et s'il n'y a aucune coloration, notre souche est oxydase (-).

II.3. Détermination de la concentration minimale Inhibitrice (CMI) en milieu solide

L'optimisation des concentrations se fait dans le but de déterminer la gamme de concentration assimilable non inhibitrice du substrat utilisé dans la bioconversion et la biodégradation.

II.3.1. Principe de la méthode

La technique consiste à utiliser la substance à tester avec le milieu VNSS solide. La souche étudiée est déposée à la surface du milieu uniformément sous forme d'un cercle (disque). La souche utilisée au sein du milieu (VNSS + Substance étudiée) y détermine un gradient de concentration qui est inversement proportionnel à la croissance

bactérienne. Une zone circulaire indemne des colonies bactériennes sous forme d'un cercle. Plus l'apparition de la souche est grande, 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.

II.3.2. Repiquage de la souche

Tous d'abord, il faut prendre soin de nettoyer avec l'alcool ou de l'eau de javel la paillasse, de stériliser les flacons et les milieux avec une obligation de travailler par des gants stériles. Le milieu de culture solide VNSS est coulé aseptiquement dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre à raison de 15 ml par boîte, puis laisser refroidir et solidifier sous la paillasse (Annexe 3). La souche bactérienne *Bacillus.sp* a été ensemencée à l'aide d'une pipette pasteur sur la boîte de Pétri et incubée à 30°C pendant 24 h (figure 6).

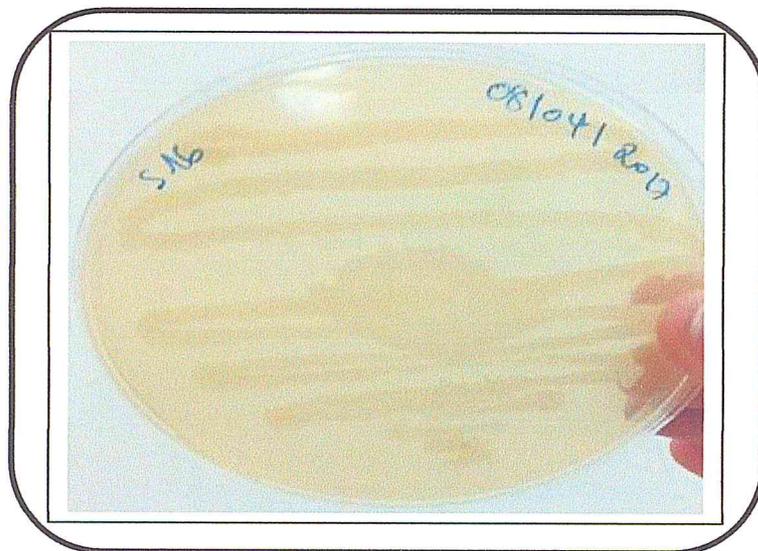


Figure 6 : Repiquage de la souche

II.3.3. Préparation de la préculture

Cette étape consiste à préparer une suspension bactérienne, en prélevant 2 à 3 colonies bien isolées et identiques à partir d'une culture bactérienne de 24 h et les introduire dans un flacon de 25 ml (figure 7) de milieu de culture liquide (VNSS liquide) stérilisé dans l'autoclave à 120 °C pendant 20 min, puis agiter au vortex pendant quelques secondes et incuber à 30 C° pendant 24h.

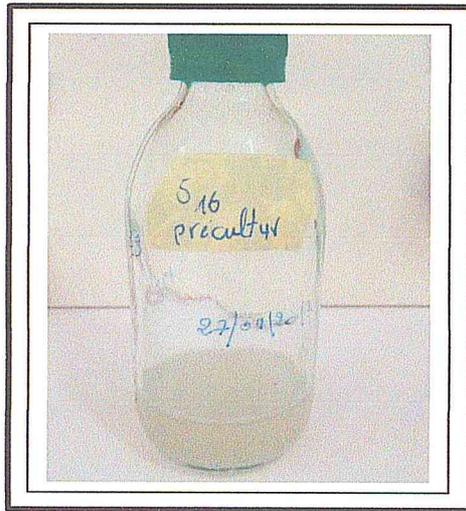


Figure 7 : Préculture

II.3.4. Préparation de la solution mère

Dans un flacon de 250 ml, on verse 150 ml d'eau distillé stérile, 3 ml de Tween 80 et 0.12 ml de substrat (D-Limonène), en suite, on agite à l'aide d'un vortex jusqu'à la dissolution totale du substrat (figure 8), puis stériliser par filtration sur un filtre poreux stérile de 0,45 μm de diamètre (Annexe 4), la solution est mise dans le réfrigérant 24 h avant la manipulation.

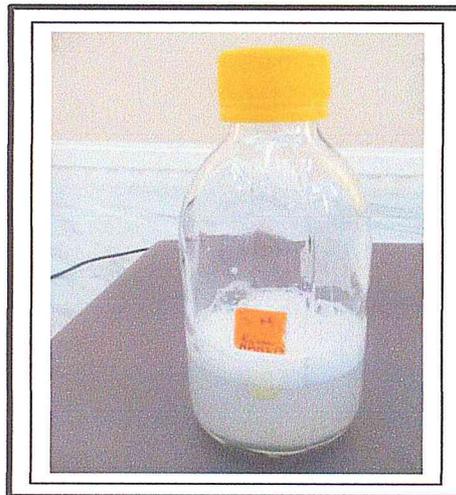


Figure 8 : solution mère

II.3.5. Procédure générale de détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Le travail s'effectue dans des conditions d'asepsie, il faut prendre soin de nettoyer avec l'alcool ou de l'eau de javel la paille, de stériliser les flacons et le milieu et sans oublier de travailler avec des gants stériles.

II.3.5.1. Préparation de la gamme de concentration du limonène

Une gamme de concentration du substrat étudié (limonène) allant de : 10mg/l, 20, 50, 100, 200, 250, 300 et 500 mg/l a été préparée (figure 9) à partir de la solution mère de 1g/L et 50 ml de volume total pour chaque flacon, tableau 3 et Annexe 5 présentes les différentes ces différentes concentrations.

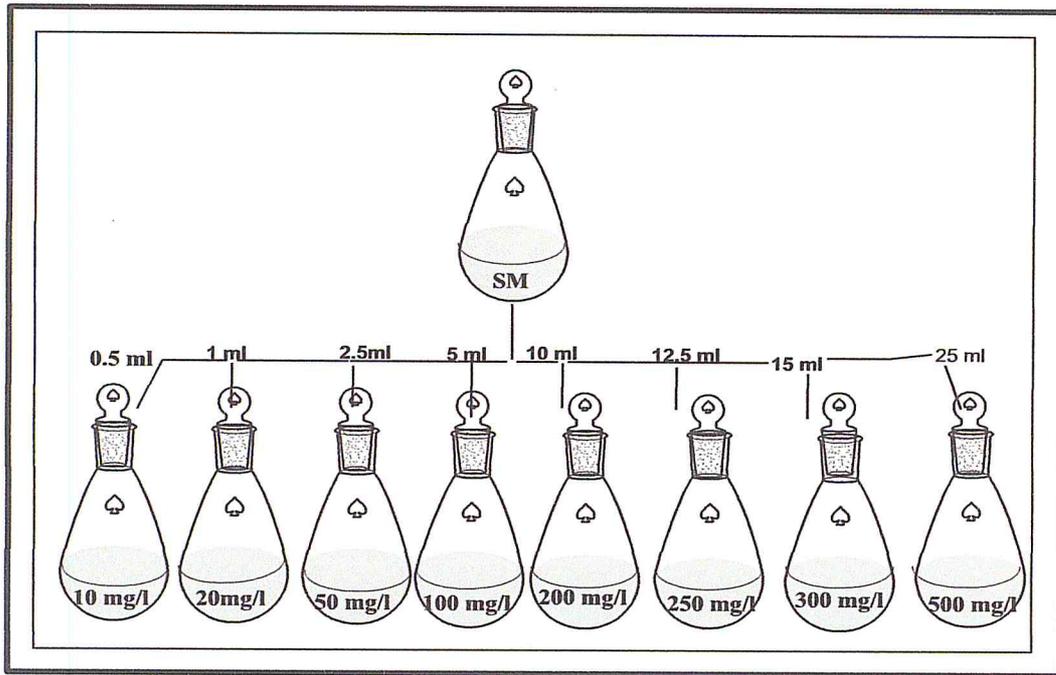


Figure 9 : Préparation de la gamme de concentration

Tableau 3 : volume prélevé du solution mère (ml) pour chaque concentration (mg/l)

[C](mg/l)	10	20	50	100	200	250	300	500
V (ml)	0.5	1	2.5	5	10	12.5	15	25

II.3.5.2. Dépôt du substrat

Les différentes étapes effectuées sont les suivantes :

- Faire fondre les sept flacons de 250 ml du milieu de culture dans un bain marie réglé à 95°C ;
- Déposer dans chaque flacon un volume de solution mère qui correspond à la concentration de substrat étudiée et ce dernier doit être bien agité en utilisant le vortex, l'agitation doit être gardée quelques minutes jusqu'à l'homogénéité totale ;

- Couler aseptiquement les milieux de culture dans des boites de Pétri de 90 mm de diamètre à raison de 15 ml par boite ;
- Laisser refroidir et solidifier sur la paille ;
- Les boites de Pétri sont séchées pendant quelques minutes à température ambiante ;
- Les couvercles des boites doivent être maintenus fermés.

II.3.5.3. Dépôt de la souche bactérienne

A partir d'une culture pure de *Bacillus.sp* après 24h sur milieu VNSS solide, racler à l'aide d'une pipette pasteur 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques. Décharger la pipette pasteur dans les boites de pétris et la déposer sous forme de cercle (disque).

II.3.5.4. Incubation

Incuber les boites de Pétri à 30 °C pendant 24 h (Annexe 6).

II.3.5.5. Lecture des résultats

La lecture des résultats a été faite à l'aide d'une observation visuelle de la croissance bactérienne vis- vis du 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.

II.4. Etude de la Bioconversion et la Biodégradation du D-Limonène par *Bacillus.sp*

Le protocole général utilisé dans notre étude pour la bioconversion du D-Limonène est le même que celui utilisé pour la biodégradation à l'exception des milieux de culture. En effet, la bioconversion du D-limonène a été effectuée dans un milieu VNSS riche, alors que la biodégradation est réalisée dans un milieu VNSS pauvre et sans glucose. Les échantillons sont incubés en mode statique et sous agitation.

II.4.1. Procédure de la bioconversion et la biodégradation

II.4.1.1. Bioconversion du D-Limonène

Une quantité bien définie de suspension bactérienne (2 ml) a été ajouté à l'aide d'une pipette pasteur stérile à 25 ml du milieu de culture VNSS liquide et introduite dans un flacon de 250 ml. L'incubation a été réalisé à 30 C° pendant 7 jours, ensuite on ajoute directement 23 ml de la solution mère à la concentration de 500 mg/l dans le flacon de culture et dans des conditions stériles. Le flacon a été placer par la suite dans un incubateur à 30 C° pendant une semaine en mode agitation et statique.

II.4.1.2. Biodégradation du D-Limonène

L'expérience de la biodégradation a été réalisée en suivant les mêmes étapes que celles de la bioconversion, la seule différence est dans l'ajout de substrat, il est ajouté à la fois avec la suspension bactérienne ainsi que leur milieu de culture. Le suivi de la cinétique de la biodégradation est assuré pendant une semaine avec une croissance de la souche bactérienne en mode agitation et statique.

II.4.1.3. Centrifugation de l'extrait de culture bactérienne

La centrifugation de l'extrait de culture bactérienne obtenu pour la souche après 7 jours d'incubation pour la biodégradation et 14 jours pour la bioconversion ont été réalisées à l'aide d'une centrifugeuse de type Sigma (Annexe 7) à 6000 tour/min pendant 45min. A l'issue de cette étape, un surnageant et un culot sont obtenus pour chaque souche (Figure 10).

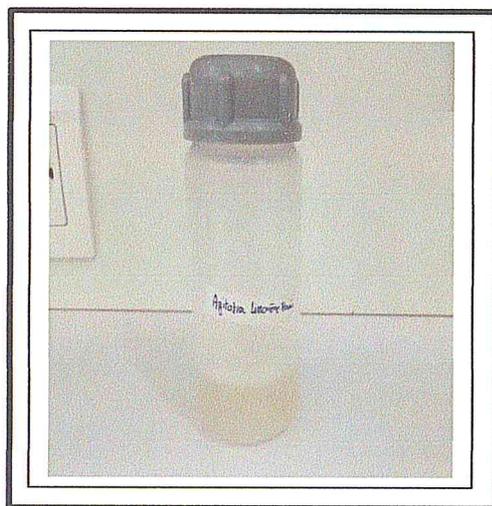


Figure 10 : Extrait cellule bactérienne

II.4.1.4. Extraction liquide- liquide du surnageant obtenu

Le surnageant de culture a été récupéré pour les deux modes par pipetage et extrait avec l'éther diéthylique (1 :1 ; v/v par rapport au volume du surnageant). Deux phases sont obtenues : une phase organique et une phase aqueuse (Figure 11). La phase organique a été alors échée sur du sulfate de sodium et concentrée à l'aide de l'évaporateur rotatif (Annexe 8), ainsi la masse de l'extrait brut obtenu a été déterminée pour chaque procédé. Cette opération a été répétée deux fois afin d'épuiser les composés désirés. Le rendement d'extraction est calculé selon la relation suivante :

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

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

m Finale: Masse finale en gramme.

m Initial : Masse initiale du menthol utilisé en gramme.

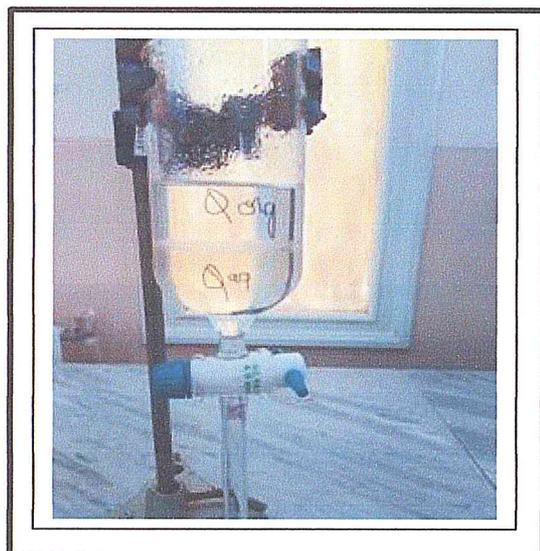


Figure 11 : Extraction liquide -liquide

II.4.1.5. Analyse par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM)

A. Description de l'appareil

L'analyse qualitative du D-Limonène a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse « CG-SM » (figure 12). L'identification des différents composés a été effectuée en se basant sur les banques de données spectrales Wiley 7n et NBS 75k.l. (comprenant, respectivement, des spectres de masse de 250000 et 75000 molécules), avec un taux de similitude supérieure ou égal à 90%.

A. Conditions opératoires

L'échantillon analysé est injecté à une concentration de 500 mg/l dans l'acétate d'éthyle. L'analyse est effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse HP 6800 couplée à un spectromètre de masse de type HP MSD 5973, dans les conditions suivantes :

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

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

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

Les différents échantillons obtenus par les différentes voies et mode de dégradation et bioconversion du D-Limonène, ont été soumis à une analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. 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 12 : Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS)

II.5. Résultats et discussion

II.5.1. Caractéristiques de la souche bactérienne (*Bacillus.sp*)

II.5.1.1. Coloration du Gram et Genre

Après la réalisation de la dernière étape de la coloration du Gram et à l'observation au microscope optique (Annexe 10) par un grossissement de 10 et 50 (figure 13,14), les bactéries apparaissent en violet ce qui indique que notre souche (*Bacillus.sp*) est Gram +, ceci est interprété par la capacité de la cellule à interdire le passage de l'alcool dans ces parois et laisse la cellule colorée, cet accès résulte de la teneur élevée de leur paroi en Acide Tichoïque. L'observation au microscope et selon les formes des colonies qui sont représentés (figure 13,14) on déduit que notre souche est du genre *bacillus*.

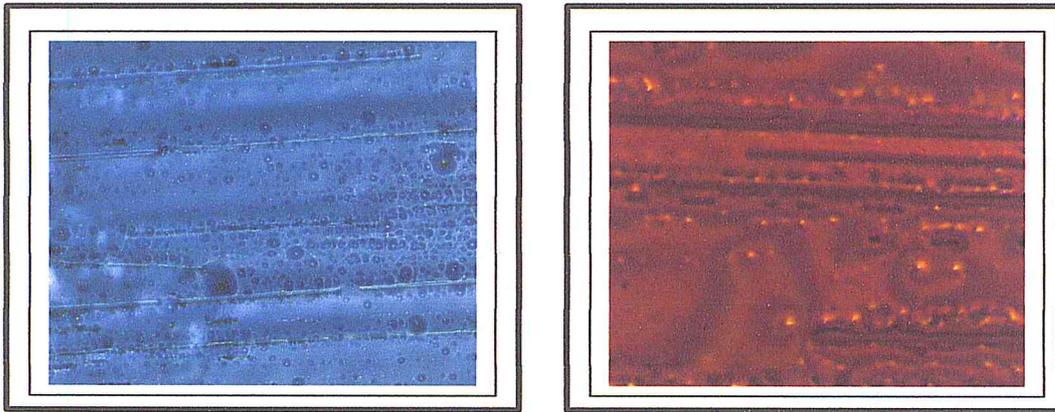


Figure 13 : Observation par microscope optique grossissement 10

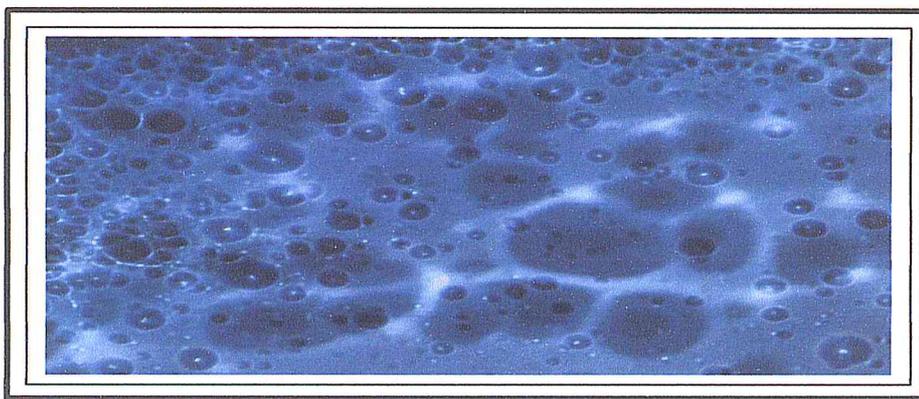


Figure 14 : Observation par microscope optique grossissement 50

II.5.1.2. Mobilité de la souche

Les deux tests, observation par Microscope Optique (figure 15) et le test du Mannitol (figure 16), sont effectués sur notre souche *Bacillus.sp*, nous avons constaté que la souche est mobile, pour le microscope optique (observation visuelle), la souche se déplace rapidement et avec une souplesse, par contre au test du Mannitol on observe une croissance de la souche au niveau et en dehors de la piqure centrale (figure 16). Nous avons remarqué qu'il y a des bulles d'air au niveau du tube qui résulte de la capacité de la souche à dégradé le mannitol sous forme de CO₂.

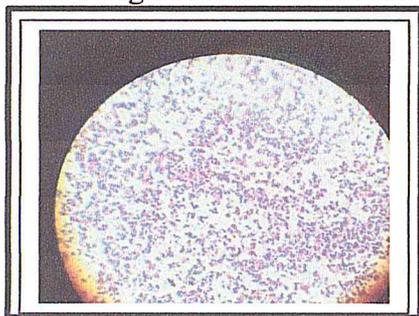


Figure 15 : observation par Microscopie

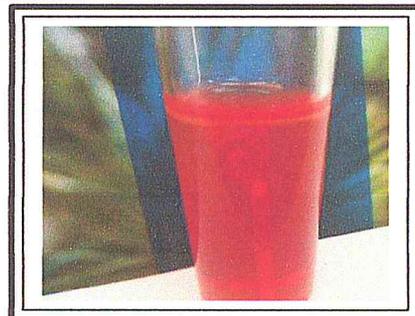


Figure 16 : Tube mannitol

II.5.1.3. Appareillage et Procédé d'Identification (API 20 E)

Après le dépôt de la suspension bactérienne dans les petits tubes de la galerie API 20 et incubation à 30 °C pendant 24 h, le lendemain on dépose dans les microtubes de TDA, Kovacs et VP quelques gouttes de réactif (Annexe 11), on laisse réagir pendant 15 à 20 min (figure 17) suivi de la lecture qui se fait à l'aide d'une table (Annexe 12). Les résultats sont représentés dans le tableau 3. L'intégration des informations par un logiciel (Annexe 13), nous a permis de connaître à 50% la nature de notre souche et de 70 % le genre, les résultats indiquent que notre souche est du genre *Bacillus.sp.*

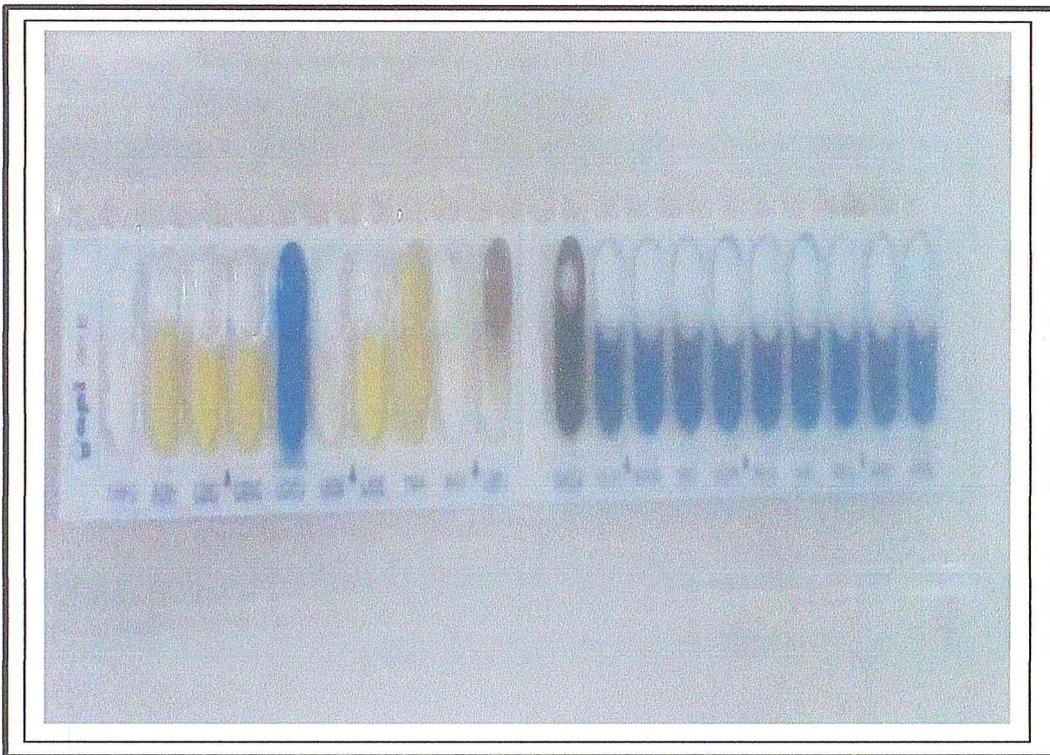


Figure 17 : Galerie API 20

Tableau 4 : Résultats de la galerie AP I20

Composés	Résultats
ONPG	-
ADH	-
LDC	-
CIT	+
H ₂ S	-
URE	-
TDA	-
IND	-
VP	-
Gel	+
GLU	-
MAN	-
INO	-
SOR	-
RHA	-
SAC	-
MEL	-
AMY	-
ARA	-

II.5.1.4. Test d'oxydase

Après la réalisation de toutes les étapes et après quelques secondes, il y'a absence de coloration sur le disque et confirme que notre souche *Bcillus.sp* est oxydase (-).

II.5.2. Détermination de la concentration minimale Inhibitrice (CMI) en milieu solide pour la bioconversion et la biodégradation

Différentes concentrations du substrat (limonène) à savoir 10, 20, 50, 100, 200, 250, 300 et 500 mg/l ont été testées dans le but de déterminer la concentration assimilable non inhibitrice du substrat (limonène) permettant d'estimer la sensibilité de la souche *Bacillus.sp* vis-à-vis du limonène. Ceci (figure18) montre la résistance de la souche vis-à-vis des différentes concentrations testées, et exprime ainsi l'absence de toxicité du substrat vis-à-vis de la souche.

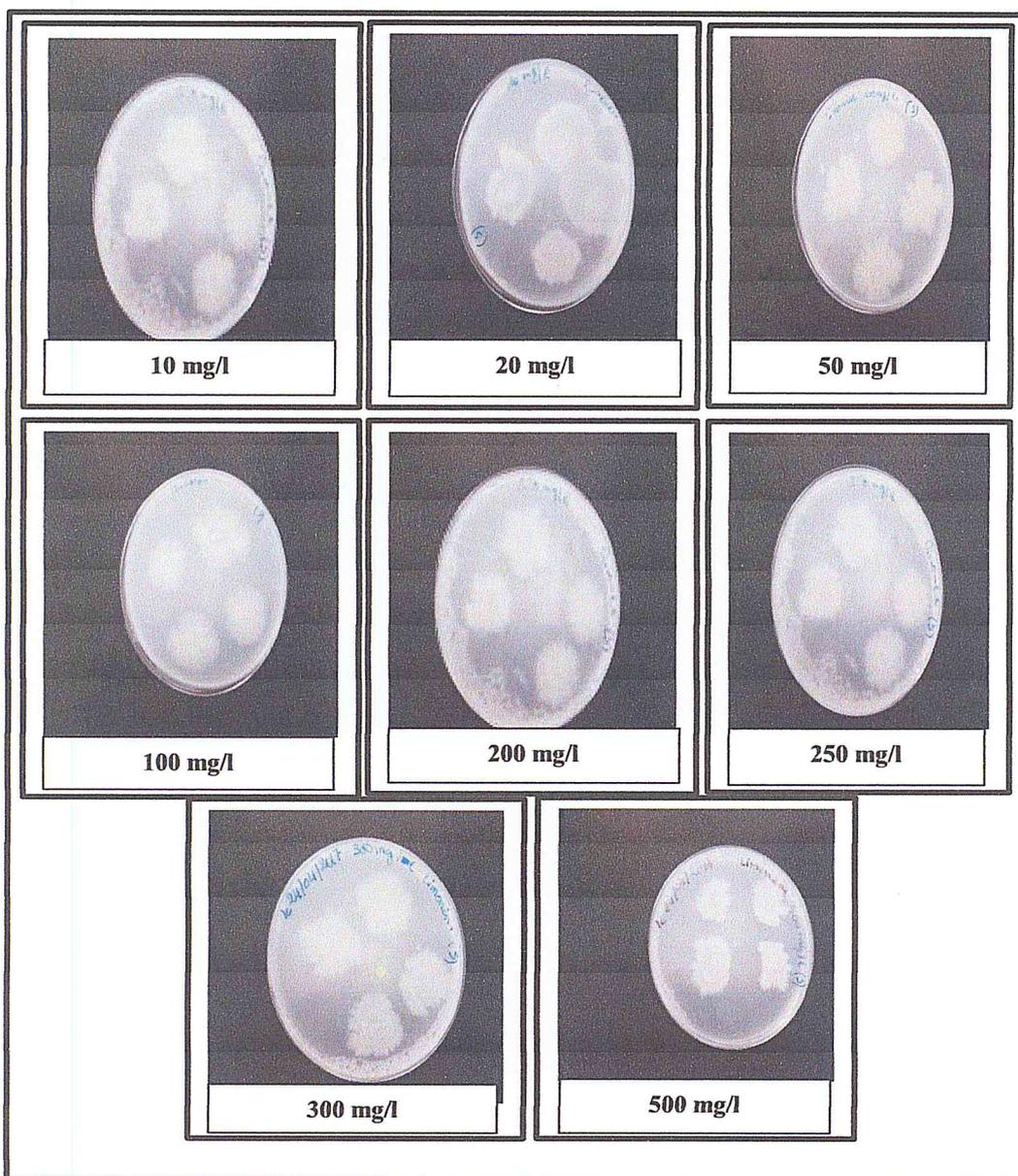


Figure 18 : Effet de concentration du D-Limonène sur la croissance de *Bacillus.sp*

II.5.3. Bioconversion et Biodégradation du D-Limonène

La bioconversion et la biodégradation du D-Limonène par *Bacillus.sp* ont été réalisées dans les mêmes conditions de pH = 7.2, Température d'incubation = 30 °C, Temps d'incubation = 7 jours pour la biodégradation et 14 jours pour la bioconversion et avec la même concentration du D-Limonène de 500mg/L et le même mode (agitation + statique). La seule différence entre les deux procédés réside dans le milieu de culture, la bioconversion a été réalisée sur milieu VNSS riche et la biodégradation sur milieu VNSS sans et pauvre en glucose, ainsi les deux modes qui sont traités pour chaque milieu ont développés une croissance totale de la souche et cela est remarqué par le trouble qui est présent pour chaque flacon, dont un trouble léger pour l'une (en mode statique) et un trouble beaucoup plus prononcé d'aspect opaque et laiteux pour l'autre (en mode agitation) (Annexe14 et 15).

La souche de *Bacillus.sp* a prouvé son efficacité dans la biotransformation du D-Limonène pendant les jours d'incubation, les différents produits ont été identifiés par CG/SM (Figure 18, 19 et 20) et identifiés en se basant sur les banques de données spectrales.

Calcul des rendements :

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

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

Tableau 5 : Rendement de la biotransformation du D-Limonène par *Bacillus.sp*

	Masse Initiale	Masse Finale	%
Bioconversion	0,12	0.10	83,33
Biodégradation	0,12	0.11	91,67

Les principaux produits obtenus à partir de la bioconversion du D-limonène sont regroupés dans le tableau 6 et la planche 7, qui ont été identifiés par CG/SM (Figure 19).

Tableau 6 : Les principaux produits de la bioconversion du D-Limonène par *Bacillus.sp*

N°	Tr (min)	Nom du composé	Formule	%
1	6,11	Bêta-Myrcène	C ₁₀ H ₁₆	16
2	6,12	3-méthyl-2-Buten-1-ol	C ₅ H ₁₀ O	17
3	6,74	(R)-5-isopropyl-2-methylcyclohex-2-enone	C ₁₀ H ₁₆ O	97
4	7,08	Cis- Limonene oxide	C ₁₀ H ₁₆ O	43
5	7,12	(1s,4s)-1-méthyl-4-(prop-1-en-2-yl) cyclohexanol	C ₁₀ H ₁₆ O	76
6	8.29	1,8-menthadien-4-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	96
7	9,00	3-méthyl-2-Butenal	C ₅ H ₈ O	64
8	9,03	2,3-dihydro-4-méthyl- Furan	C ₅ H ₈ O	72
9	9,04	6-isopropyl-3-methylcyclohex-3-ene-1,2-diol	C ₅ H ₈ O	64
10	9,55	1-Cyclopenten-4-ol	C ₅ H ₈ O	38
11	9.62	Trans-(+)-carvéol	C ₁₀ H ₁₆ O	98
12	10,02	Cis-Carvéol	C ₁₀ H ₁₆ O	91
13	10,34	Carvone	C ₁₀ H ₁₄ O	97
14	14,00	Limonène-diol	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	64

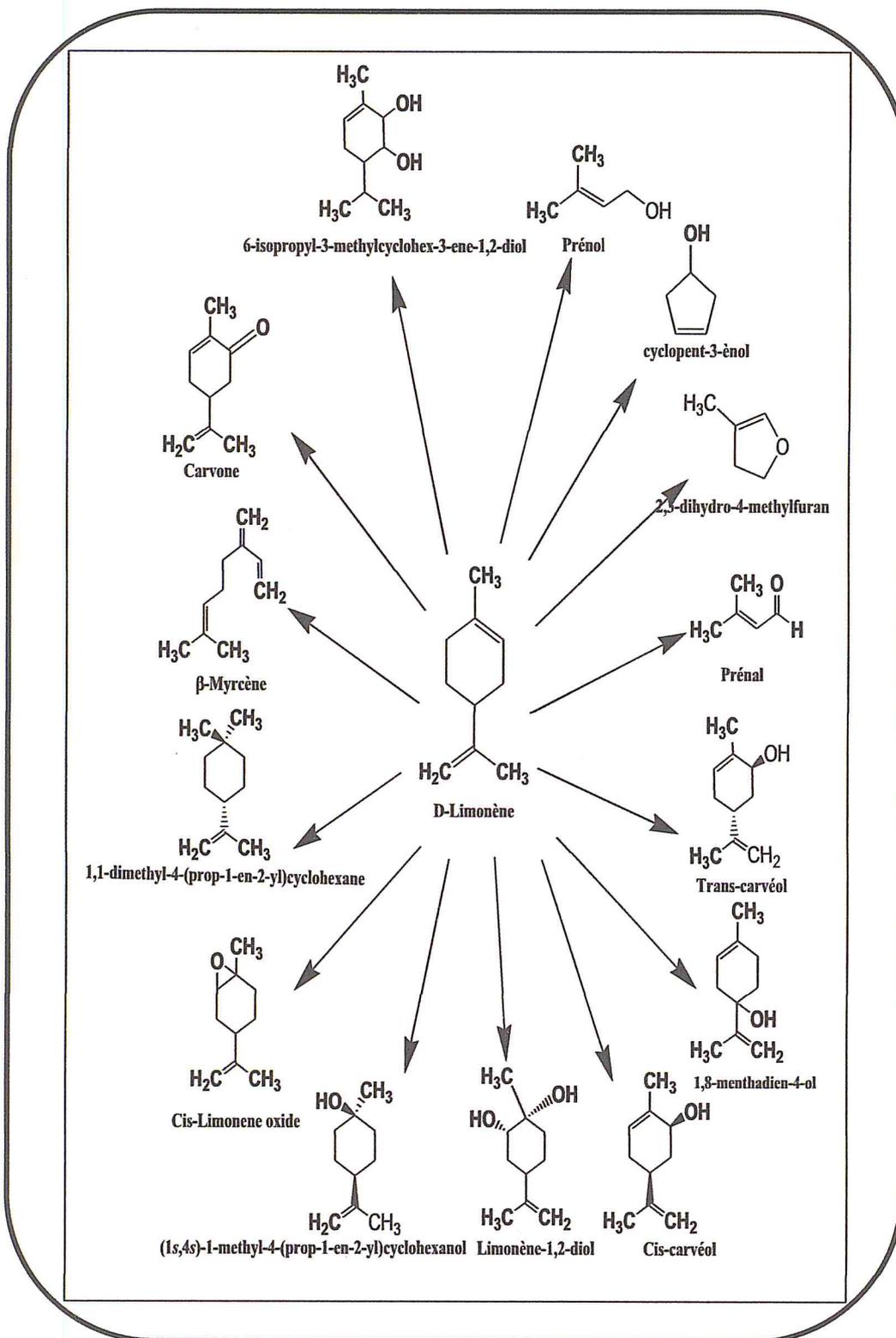


Planche 7 : Les voies métaboliques possibles de la bioconversion du D-Limonène par *Bacillus.sp*

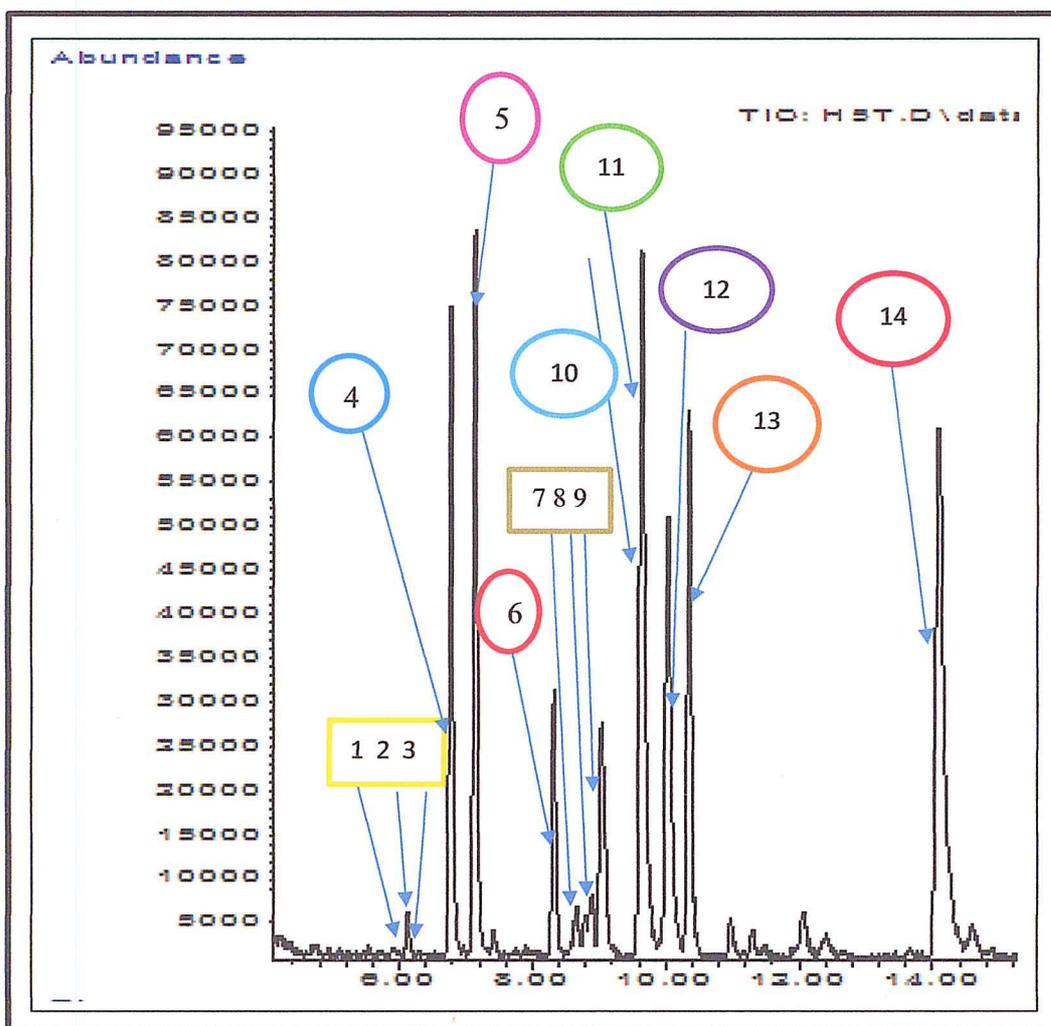


Figure 19 : Profil chromatographique d'analyse de la bioconversion du D-Limonène par *Bacillus.sp*

D'autre part, la biodégradation du D-Limonène conduit aussi à la production d'un mélange de monoterpènes donnés par la planche 8 et le tableau 7, qui ont été identifiés par CG/SM (Figure 20,21 et 22).

Tableau 7 : Les différents produits de la biodégradation du D-Limonène par *Bacillus.s*

N°	Tr (min)	Nom du composé	Formule	%
1	6,67	1,2-diethenyl, Cyclohexane	C ₁₀ H ₁₆	42
2	6,69	Cis-verbénol	C ₁₀ H ₁₆ O	47
3	9,53	Cis-carvéol	C ₁₀ H ₁₆ O	78
4	9,89	Néral	C ₁₀ H ₁₆ O	42
5	9,95	2,5-dihydro-3-méthyl, Furan	C ₅ H ₈ O	46
6	10,25	(R)-5-isopropyl-2-methylcyclohex-2-enone	C ₁₀ H ₁₄ O	95
7	14,05	(E), 2-méthyl-2-penten-1-ol	C ₅ H ₁₂ O	38
8	14,26	1-cyclobutyl éthanol	C ₆ H ₁₂ O	32
9	16,14	2,3,3-triméthyl-1,4-pentadiène	C ₈ H ₁₄	23

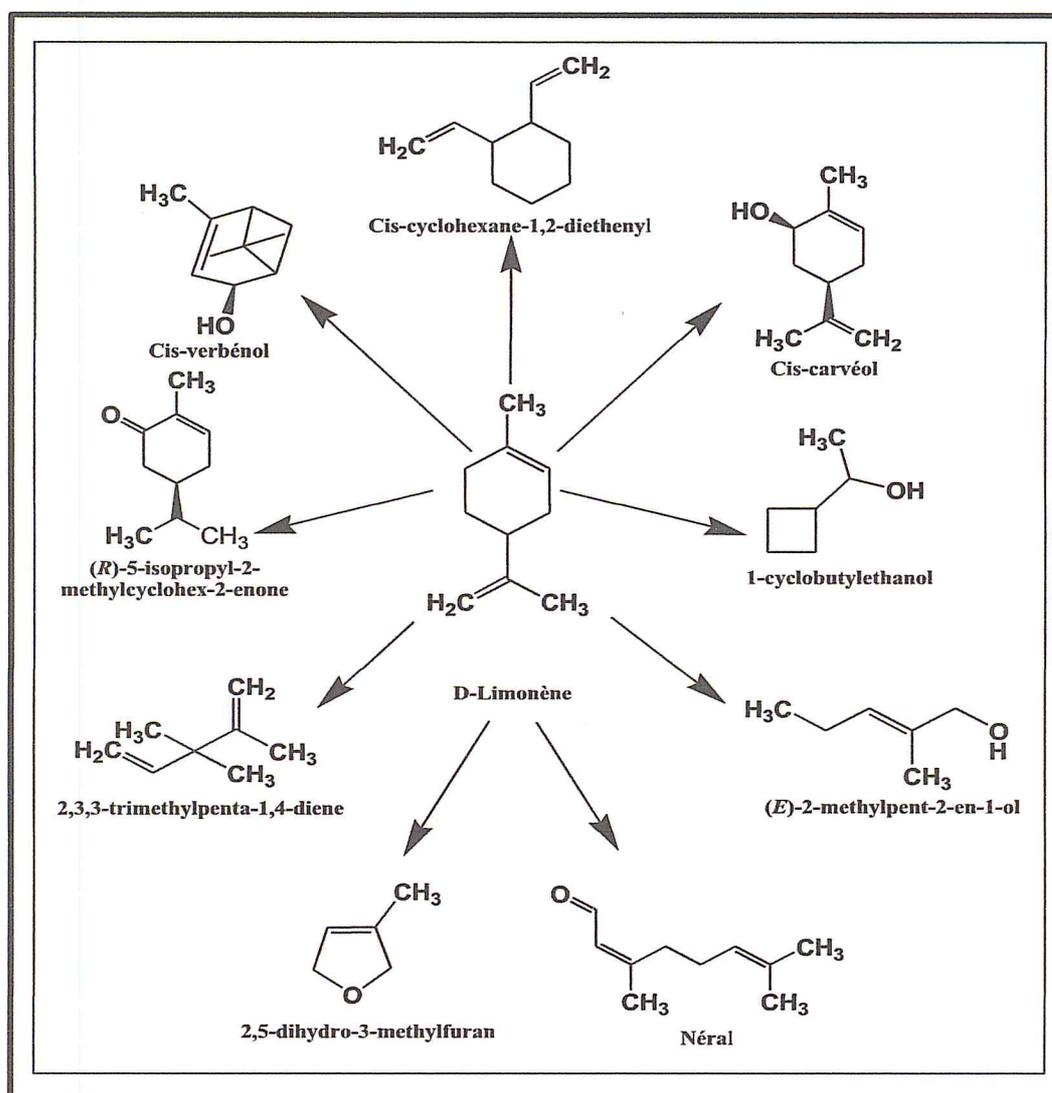


Planche 8 : Les voies métaboliques possibles de la biodégradation du D-Limonène par *Bacillus.sp*

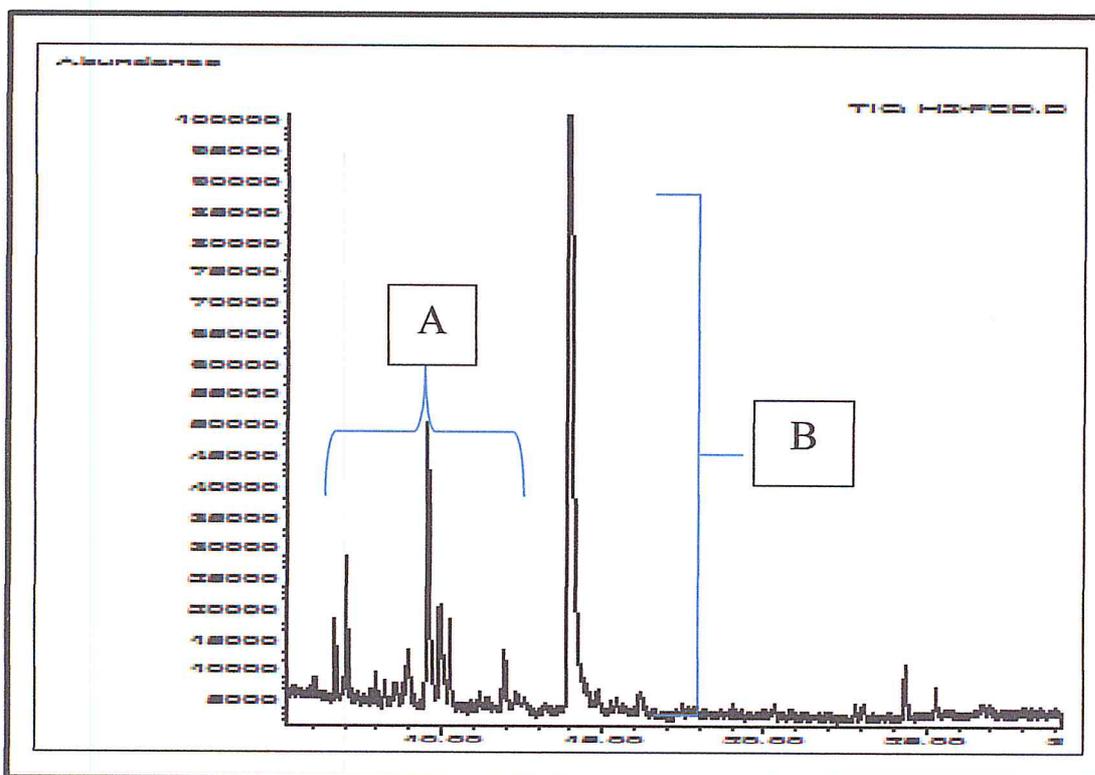


Figure 20 : Profil chromatographique d'analyse de la biodégradation du D-Limonène par *Bacillus.sp*

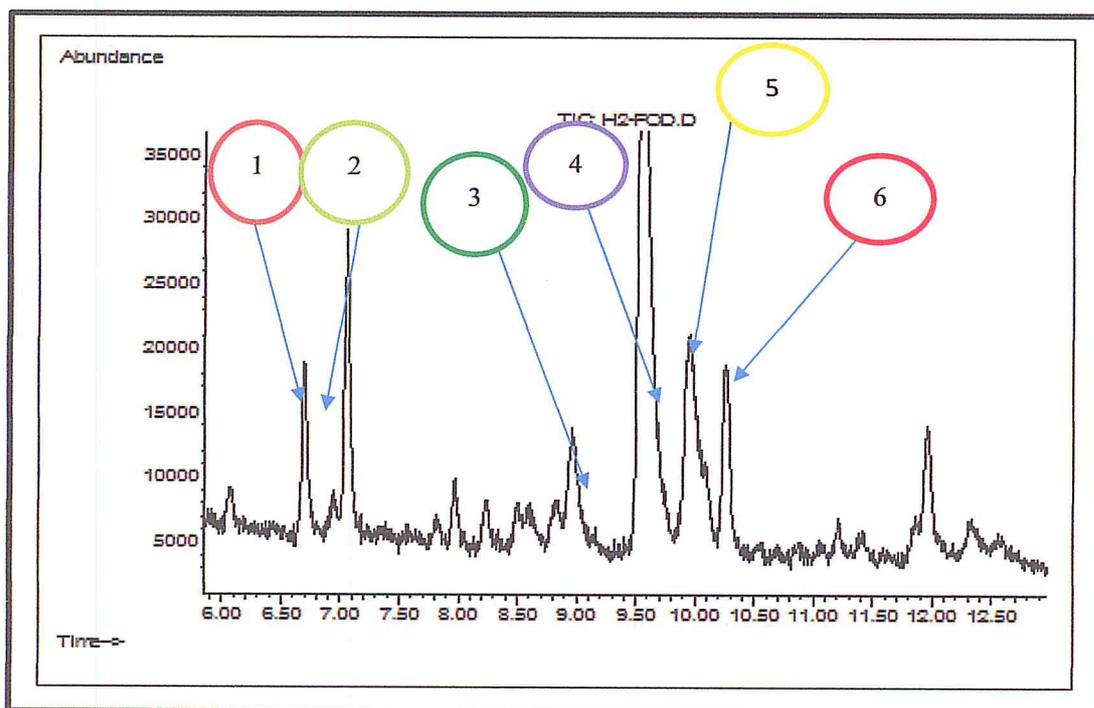


Figure 21 : Agrandissement de la zone A

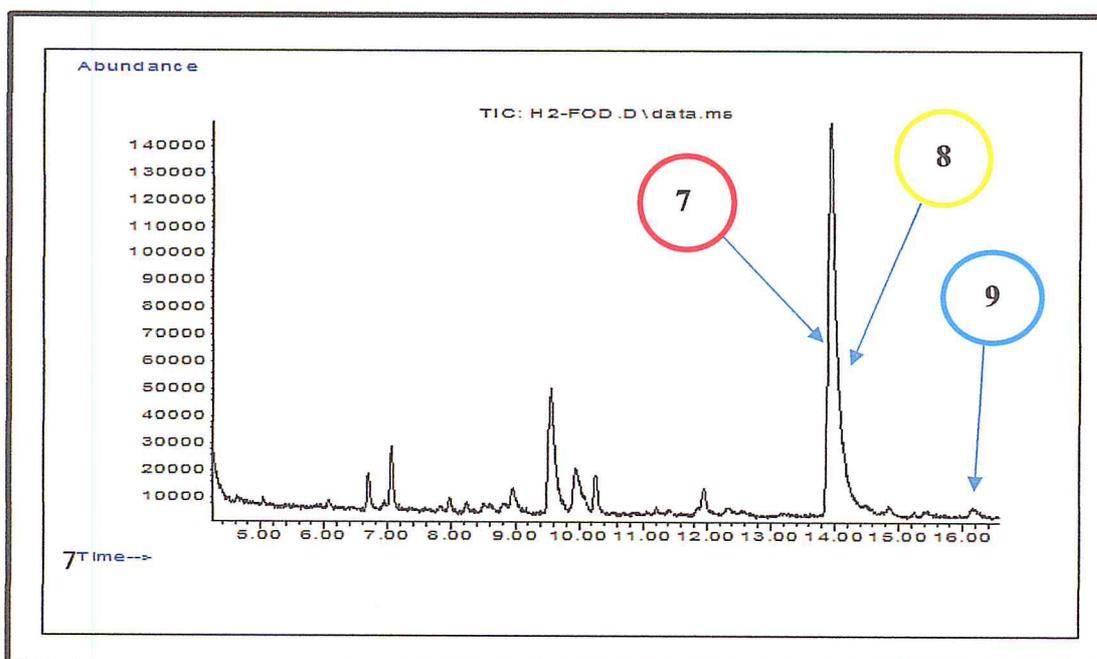


Figure 22 : Agrandissement de la zone B

La bioconversion du limonène (planche 7) a permis l'obtention de dérivés hydrocarbonés et oxygénés du limonène. Dans ce cadre, nous avons relevé notamment la présence de métabolites comme le β -myrcène résultant de l'ouverture du cycle cyclohexanique du limonène.

Nous avons toutefois noté la présence de plusieurs composés oxygénés résultant de réaction d'hydrolyse de la double liaison endocyclique et exocyclique du limonène. Les produits obtenus sont notamment la carvone, le limonène diol, le carvéol.

Nous avons noté la présence du préinol et du préнал correspondant à la décomposition du limonène en deux unités isopréniques suivi de la réaction d'oxydation.

Concernant la biodégradation (planche 8), nous avons constaté la présence de métabolites correspondant à des dérivés oxygénés du limonène mais surtout des produits de biodégradation du limonène, dans ce cadre on peut citer la présence du 2,5-dihydro-3-methylfuran, 2-methylpent-2-en-1-ol et le 2,3,3-trimethylpenta-1,4-diene.

Conclusion générale

Conclusion Générale

Le présent travail a porté sur la biotransformation (bioconversion et biodégradation) du limonène par une souche du genre *Bacillus* d'origine marine, isolée à partir d'une algue brune.

Nous avons déterminé les caractéristiques de la souche bactérienne et déterminer la concentration assimilable non inhibitrice du D-Limonène en milieu solide pour la bioconversion et la biodégradation.

Nous avons ensuite réalisé la bioconversion et la biodégradation du limonène en utilisant un protocole bien adapté et qui est identique pour les deux réactions et similaire sauf à l'exception des milieux de culture. En effet, la bioconversion du D-limonène a été effectuée dans un milieu VNSS riche, alors que la biodégradation est réalisée dans un milieu VNSS pauvre et sans glucose. Les échantillons sont incubés en mode statique et sous agitation.

Après centrifugation et extraction liquide-liquide, les produits de la biotransformation sont séparés et analysés par CG/SM.

Le profil chromatographique de la bioconversion et la biodégradation révèle la présence de dérivés hydrocarbonés et oxygénés du limonène comme le β -myrcène, la carvone, le carvéol, le limonène diol et des produits résultats de la biodégradation du limonène, dont les plus importants sont ceux correspondants à la décomposition du limonène en deux unités isopréniques à l'image du 1-cyclobutyl ethanol et du (E), 2-méthyl-2-penten-1-ol .

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

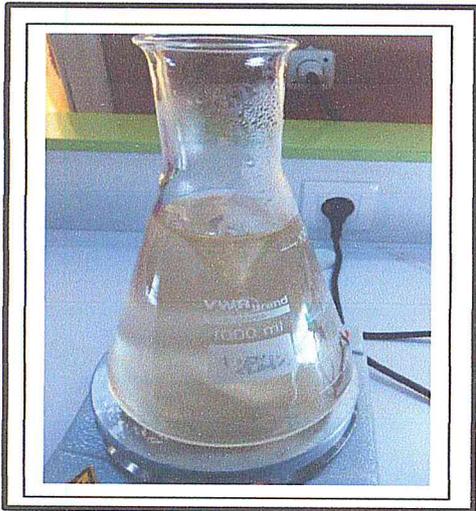
1. F.M. Balandrin, J.A. Klocke, E.S. Wutele, W. Bollinger, <<Natural plant chemical : Sources of industrial and medicinal materials >>, *Science*, 228, 1154–1160, (1985).
2. E. Pichersky, J. Gershenzon, <<The formation and function of plants volatiles : Perfumes for pollinator attraction and defense>>, *Curr. Opin. Plant Biol*, 5, 237–243, (2002).
3. T.J. Maimone, P.S. Baran, << Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes >>, *Nat. Chem. Biol*, 3, 396–407, (2007).
4. S. Zwenger, C. Basu, << Plant terpenoids : Applications and future potentials. *Biotechnol* >>, *Mol. Biol. Rev*, 3, 1–7, (2008).
5. V. J. J. Martin, D.J. Pitera, S.T. Withers, J.D. Newmann et al, <<Engineering the mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids>>, *Nat. Biotechnol*, 21, 796–802, (2003).
6. G. Molina, D.M. Pinheiro, M.R. Pimentel, R. dos Ssanros, and G.M. Pastore « Monoterpene Bioconversion for the Production of Aroma Compounds by Fungi Isolated from Brazilian Fruits », *Food Science Biotechnology*, 22(4), 999-1006, (2013).
7. H. Bousaab, « Bioconversion éco-compatible de triterpénoïdes par des bactéries immobilisées sur *Luffa cylindrica* », Thèse de doctorat, Université de Haute Alsace-Mulhouse, French, (2011).
8. A. Schmid, J.S. Dordick, B. Haue, A. Kiener, M. Wubbolts and B. Witholt, « Industrial biocataly is today and tomorrow », *Nature*, 409, 258-268, (2001).
9. J.V. Madeira Junior, C.B. Teixeira and G.A. Macedo, « Biotransformation and bioconversion of phenolic compounds obtainment : an overview », *Critical Reviews in Biotechnology*, 35, 1, 75-81, (2013).
10. F. Bister-Miel, C. Agier, M. Bury, C. Viel and J.L. Guignard, « Biotransformations comparées de benzyloquinoléines par des suspensions cellulaires végétales non productrices d'alcaloïde », *Bulletin de la Société Botanique de France. Lettres Botaniques*, 135, 1, 57-70, (1988).
11. V. Dave, P. Khirwadkar, K. Dashora, « A review on biotransformation », *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, 2, 2, 1136-1140, (2014).
12. K.M. Raval, P.S. Vaswani and D.R. Majumder, « Microbial biotransformation : Pharmaceutical peptides », *Biological and Food Science Research*, 1, 1-14, (2012).

13. D. Linares, « Etudes sur la voie de dégradation de l' α -pinène chez *Pseudomonas rhodesiae* en milieu biphasique liquide-liquide », Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand II, (2008).
14. P. Schreier, « Biotechnology and flavour production », Proc. 8Th International Biotechnology Symposium, 2, Paris, France, 869-883, (1988).
15. F. Mesbaiah, « Etude de la biodégradabilité d'un hydrocarbure aromatique polycyclique "Naphthalène" et optimisation de la performance bactérienne en milieu PCN », Mémoire de MAGISTER, Université Blida 1, Algérie, (2011).
16. Z. Saadi, « Etude de la dégradation fongique des polymères : cinétique de dégradation des polymères et caractérisation des sous-produits de dégradation, Etude de l'écotoxicité de ces polymères », Thèse de doctorat, Université du MAINE, France, (2008).
17. 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, (1979).
18. C. Carvalho, 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).
19. J. B. Hinou, C. E. Harvala, And E. B. Hinou, « Antimicrobial activity screening of 32 common constituents of essential oil », Pharmazie, 302-303, (1989).
20. W. Fitch « Toward defining the course of evolution: minimum change », for a specific tree topology, Syst, Zool, 406 -416, (1971).
21. N. B. Jansen, G. T. Tsao, « Production of optically active 2, 3-butanediol by *Bacillus polymyxa* », Biotechnol. Bioeng, 366-377, (1988).
22. 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).
23. MJ, Van der Werf, JAM, DeBon, « Screening for microorganisms converting limonene into carvone », New frontiers in screening for microbial biocatalysts. Elsevier, pp 231-234, (1998).
24. RS, Dhavalikar, PK, Bhattacharyya, « Microbiological transformations of terpenes. Fermentation of limonene in a soil pseudomonad », Indian J Biochem 3, 144-157, (1966).

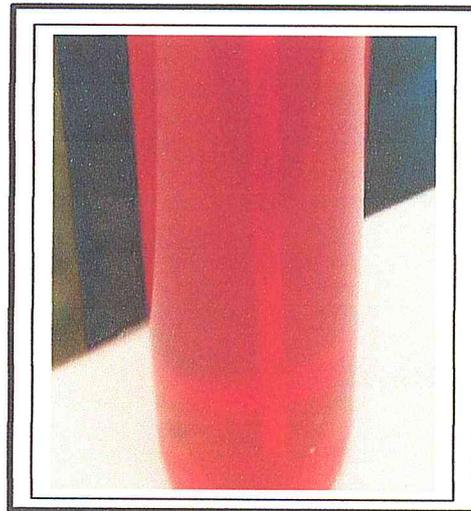
25. M.J. VanDerWerf, H.J. Swarts, and J.A., DeBont, <<Rhodococcus erythropolis DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene >>, Appl Environ Microbiol, 65, 2092–2102, (1999).

26.F.B.JAISON, << Identification et caractérisation des exopolymères de biofilms de bactéries marines >>, Thèse de doctorat, université de Toulon, Français, (2014).

Annexes



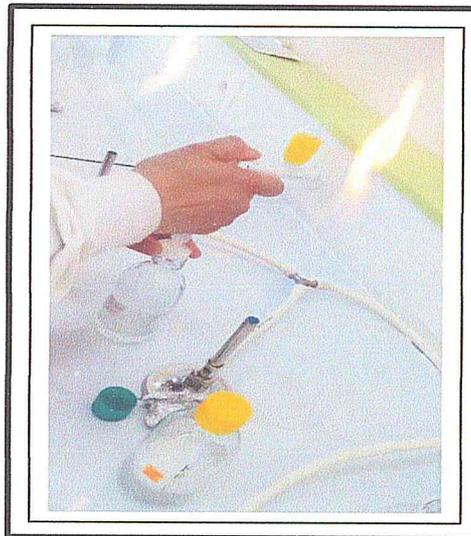
Annexe 1 : Préparation du milieu de culture



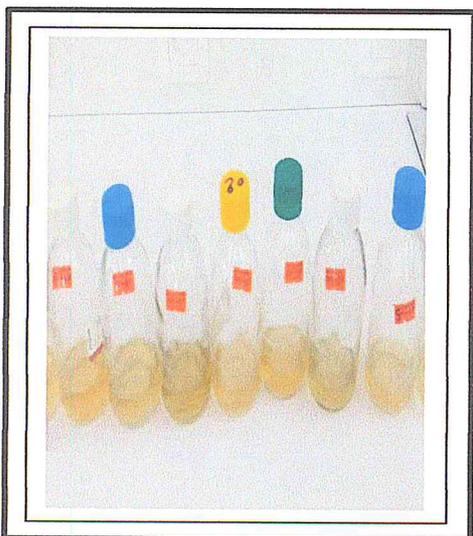
Annexe 2 : Pique centrale



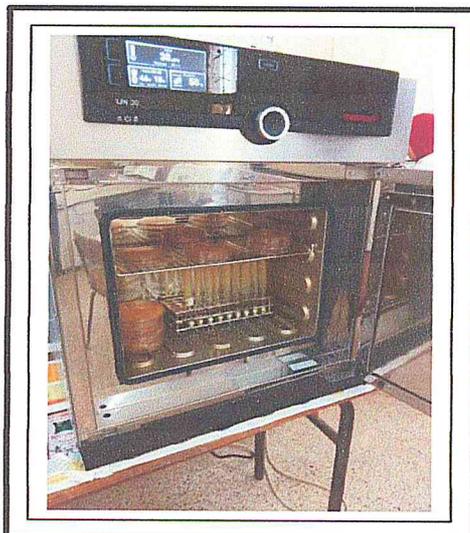
Annexe 3 : Séchage du milieu



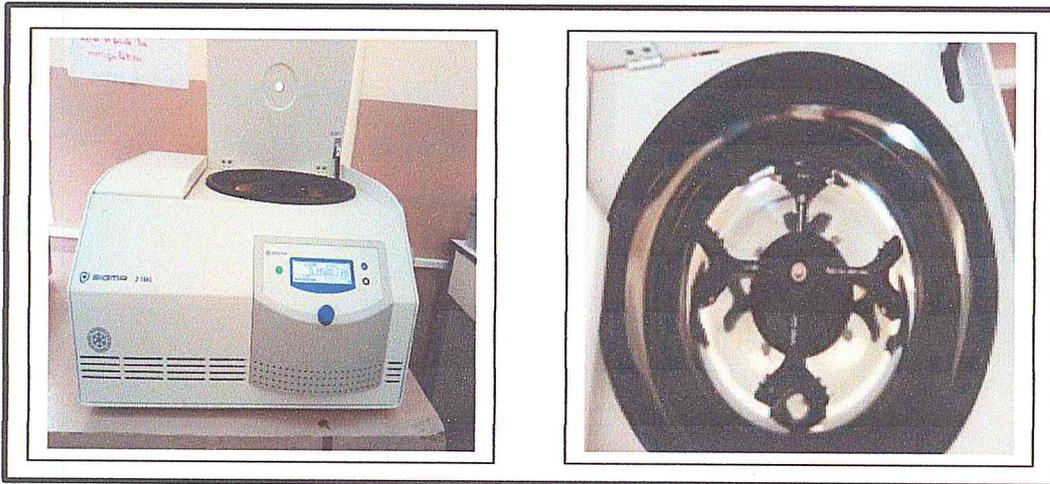
Annexe 4 : Préparation de la solution mère



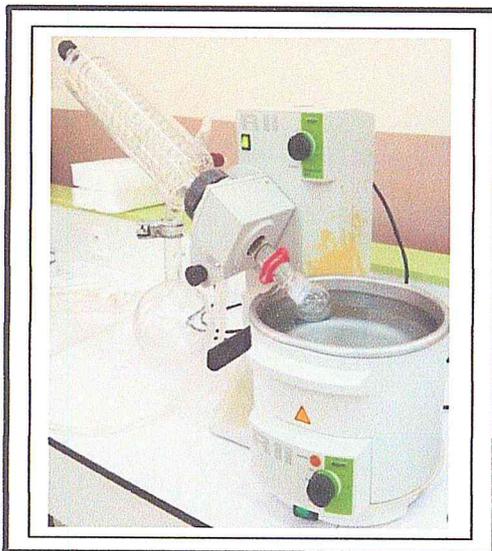
Annexe 5 : Solution files



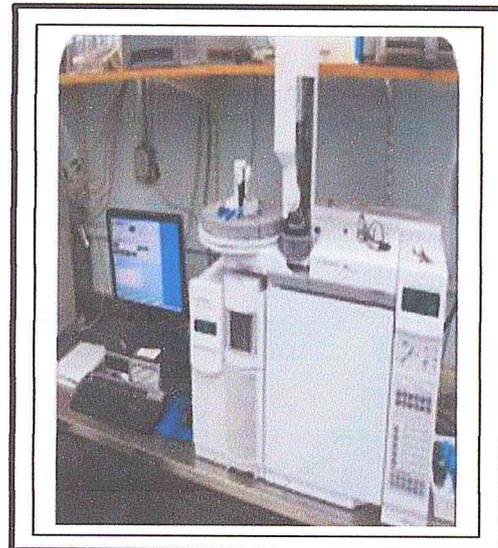
Annexe 6 : l'Etuve



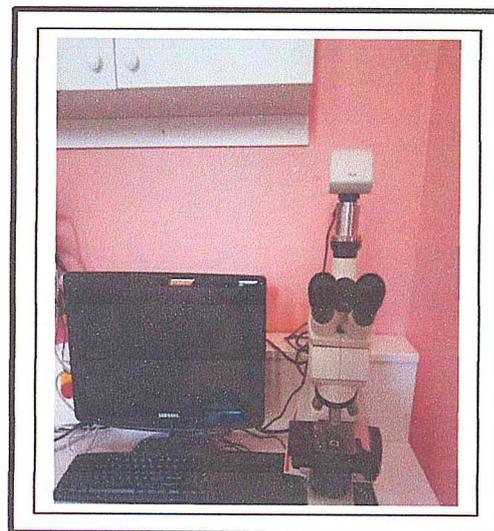
Annexe 7 : Centrifugeuse



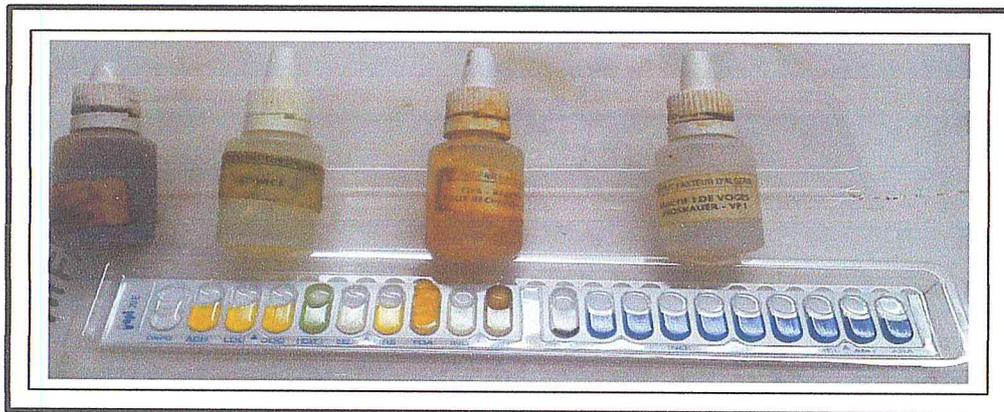
Annexe 8 : Evaporateur rotatif



Annexe 9 : Appareil de (CG/MS)



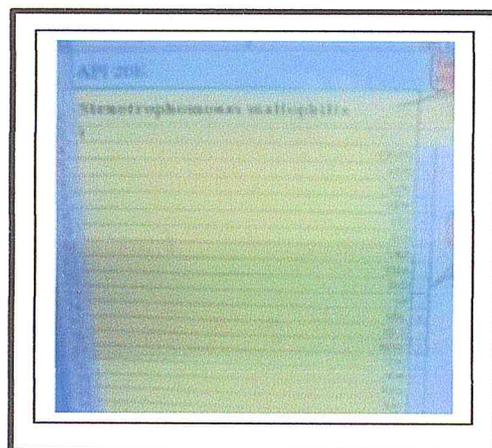
Annexe 10 : Microscope optique



Annexe 11 : Galerie API 20E dépôt des réactifs

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO ₃	potassium nitrate	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	NITR → NIT2 → NIT3	
			réduction desNitrates en azote	incolors	rose/rouge
TRP	L-tryptophane	0,0	formation indole (Tryptophane)	AMER / immédiat	
			fermentation (D-Glucose)	jaune	orange / rose / rouge
GLU	D-glucose	1,52		jaune	jaune
ARG	L-arginine	1,92	Arginine D-aminolase	jaune	orange / rose / rouge
URE	urée	0,75	URCase	jaune	orange / rose / rouge
EGG	égguline sulfate de fer	0,25 0,072	Hydrolyse (β-glucosidase) (EGGuline)	jaune	gris / marron / noir
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPO	4-nitrophényl-D- galactopyranoside	0,22	β-Galactosidase (Para-NitroPhényl-β-D- Galactopyranosidase)	incolors	jaune
[GLU]	D-glucose	1,55	assimilation (D-Glucose)	transparence	trouble
[ARA]	L-arabinose	1,4	assimilation (L-Arabinose)	transparence	trouble
[MNE]	D-mannose	1,4	assimilation (D-Mannose)	transparence	trouble
[MAN]	D-mannitol	1,35	assimilation (D-Mannitol)	transparence	trouble
[NAG]	N-acetylglucosamine	1,25	assimilation (N-Acetylglucosamine)	transparence	trouble
[MAL]	D-maltose	1,4	assimilation (D-Maltose)	transparence	trouble
[GNT]	potassium gluconate	1,84	assimilation (potassium Gluconate)	transparence	trouble
[CAR]	acide carbonique	0,75	assimilation (acide CARbonique)	transparence	trouble
[ADI]	acide adipique	1,12	assimilation (acide ADIppique)	transparence	trouble
[MUT]	acide malique	1,55	assimilation (acide MALIque)	transparence	trouble
[CIT]	trisodium citrate	0,25	assimilation (trisodium CITrate)	transparence	trouble
[PAC]	acide péroxyacétique	0,5	assimilation (acide PéroxyAcétique)	transparence	trouble
OX	(voir notice du test oxydase)	-	Cytocrome-oxylase	(voir notice du test oxydase)	

Annexe 12 : tableau de lecture de la galerie miniaturisés API 20E



Annexe 13 : Logiciel d'API 20 E



Annexe 14 : D-Limonène avant et après la bioconversion



Annexe 15 : D-Limonène avant et après la biodégradation

