



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique Et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique



Université Constantine 1 Frères Mentouri  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري  
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Moléculaire des Microorganismes

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

## Production des polyhydroxyalcanoates (PHAs) par fermentation bactérienne

---

Présenté par : ZIBOUCHE Hana

Le : 19/06/2024

KHELLAFI Roumeissa

BENELOUEZZANE Soulef

Jury d'évaluation :

**Président** : MEZIANI Meriem (Maître de conférences B – UFM Constantine1).

**Encadrant** : SEKHRI-ARAFI Nedjoudja (Maître de conférences A – UFM Constantine1).

**Examineur** : MEGHNOUS Ouissem (Maître de conférences B – UFM Constantine1).

Année universitaire  
2023 – 2024

# Remerciements

Tout d'abord, nous tenons à manifester notre gratitude envers **Allah**, le Tout Miséricordieux, qui nous a accordé la force, la volonté et la patience nécessaires pour mener à bien notre parcours scientifique et réaliser ce modeste travail.

Dans un premier temps, nous exprimons notre sincère gratitude envers **docteur Sekhri-Arafa Nedjouda maître de conférences A**, notre directrice de mémoire, dont l'aide, le soutien actif et les précieux conseils ont été indispensables à la réalisation de ce travail. Sa présence constante et son dévouement envers notre réussite ont été une source d'inspiration tout au long de ces deux dernières années. Nous lui sommes profondément reconnaissantes pour son encadrement exceptionnel.

Nous exprimons également nos sincères remerciements aux membres du jury, Docteur Abdelaziz Ouided et notre enseignante Docteur Meghnous Ouissem, pour avoir consacré leur temps à l'évaluation de notre travail et pour avoir pris cette responsabilité à cœur.

Aussi, nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance envers Monsieur Selmania Abderrahmane, responsable du département Prospective Analysis of Biotechnology, Biosafety, and Biosecurity au CRBt de Constantine, pour nous avoir accueillies dans son laboratoire de microbiologie. Sa bienveillance nous a permis d'effectuer un stage enrichissant.

Nous remercions tout le personnel du laboratoire pour leur soutien constant.

Nous remercions également Monsieur le Docteur Rahhab Hamza, maître de recherche B, pour son soutien moral et son aide tout au long de notre séjour.

Enfin, c'est avec plaisir que nous consacrons cette page en signe de gratitude et de profonde reconnaissance à tous ceux qui nous ont aidés, ainsi qu'à tous les enseignants que nous avons eu l'honneur d'avoir durant notre parcours universitaire.

## *Dédicace*

À la mémoire de mon cher grand-père, dont la sagesse et l'amour continuent d'inspirer chacun de mes pas. Tu resteras à jamais dans mon cœur. Qu'Allah te bénisse.

À mes parents, aimants et dévoués pour leur soutien indéfectible, leur amour inconditionnel et leurs encouragements constants. Vous m'avez donné les ailes pour voler et la force de persévérer.

Maman, pour tes sacrifices silencieux et ta tendresse infinie, tu es le pilier sur lequel je me repose. Papa, pour ta sagesse, ton travail acharné et tes précieux conseils, tu m'as montré la valeur de la détermination et du courage. Ensemble, vous m'avez inculqué des valeurs profondes et précieuses qui me guideront toute ma vie et je vous en suis éternellement reconnaissante

À mes frères, chers et formidables pour leur complicité, leur amitié sincère et les rires partagés. Vous avez été mes premiers amis et mes compagnons de chaque instant. Adel, pour ton soutien et ta présence rassurante, Imed, pour ta capacité à toujours me faire rire et à alléger les moments difficiles. Votre amour fraternel inébranlable et chaleureux, m'a apporté la force et la joie nécessaires pour surmonter les défis

À mes chères collègues Hana et Soulef, Ce mémoire est le fruit d'une collaboration riche et inspirante. Merci pour votre engagement et votre amitié. Ensemble, nous avons surmonté les défis et célébré chaque succès. Ce travail n'aurait pas été possible sans votre précieuse contribution.

Avec toute ma gratitude et mon affection,



***Khellafi Roumeissa***

## *Dédicace*

*À Allah le Tout-Puissant, qui m'a inspiré et guidé sur le bon chemin.*

*À mes chers parents : aucune expression ne saurait exprimer toute l'affection et tout l'amour que je vous porte.*

*Que ce travail soit l'exaucement de vos vœux et le fruit de vos innombrables sacrifices.*

*Un grand merci à mon cher frère Nadir et à mes chères sœurs Meriem et Amina pour leur soutien moral et leurs encouragements tout au long de mes études, ainsi qu'à notre petit prince Djoud, que Dieu le protège.*

*Au corps enseignant qui nous a donné une très bonne formation pendant le cursus universitaire.*

*À mes chers amis Manel, Aya, Nadjjet, Simo, Djalil, Meriem, Malek, Ahlem, et Latifa : je vous remercie pour tous les moments et les souvenirs que nous avons partagé.*

*À la mémoire de mes grands-parents, de mes grands-mères, de mes oncles, et de mes tantes, pour nous avoir toujours accompagnés.*

*À mes collègues Roumeissa et Soulef : merci pour vos efforts déployés avec assiduité et persévérance tout au long de ces trois ans.*

*À vous tous, je dédie mon modeste travail et mon parcours.*



**Zibouche Hana**

## *Dédicace*

À mes parents, qui m'ont inculqué l'amour du savoir et dont le soutien et les sacrifices ont éclairé chacune de mes journées. Votre foi inébranlable en moi a été la force motrice derrière chaque défi que j'ai relevé. Aucun mot ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mon amour.

Puisse Allah leur accorder santé, prospérité et longue vie.

À mon âme sœur, l'homme de ma vie, mon mari Adlen qui m'a toujours encouragé, qui remplit chacun de mes jours de bonheur et d'amour. Tu es mon roc, mon refuge, et mon éternel amour.

Qu'Allah te garde et te protège, pour moi et pour nos enfants.

Àux prunelles de mes yeux mes enfants : Mohamed Achraf, Mohamed Amdjed, Haoua Ghosn Elbene, Mohamed Abdelmaoula et Mohamed Siradj Eddine Ayhem pour leur soutien et leur aide.  
Je leur souhaite plein de réussite.

À mon frère Djalel Eddine et mes sœurs Oumeya, Amel, Iness, Affaf et leurs enfants.

À mes filles et *collègues* Hana et Roumeissa pour leur sérieux et leur implication pour mener à bien ce modeste travail. Je leur souhaite plein de réussite.



**Benelouezzane Soulef**

## Table des matières

Introduction .....	1
<b>Partie I: Revue bibliographique</b>	
<b>Chapitre I : Bioplastique .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Généralités sur le Bioplastique .....</b>	<b>4</b>
<b>2. Les polyhydroxyalcanoates (PHAs).....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Historique .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Définition des PHA .....</b>	<b>5</b>
<b>2.3. Structure des PHA .....</b>	<b>5</b>
Les PHA à chaîne courte (SCL).....	7
Les PHA à chaîne longue (MCL).....	7
Les copolymères (SCL-MCL).....	7
<b>2.4. Classification des PHA .....</b>	<b>8</b>
<b>2.5. Caractéristiques des PHA .....</b>	<b>10</b>
<b>2.6. Applications des PHAs .....</b>	<b>11</b>
Agriculture .....	11
Produits d'hygiène .....	11
Emballages .....	11
Autres.....	11
<b>Chapitre II : Microorganismes producteurs des PHAs .....</b>	<b>13</b>
<b>1. <i>Pseudomonas</i>.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1. Généralités.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2. Historique .....</b>	<b>15</b>
<b>1.3. Classification des <i>Pseudomonas</i>.....</b>	<b>17</b>
<b>1.4. Caractéristiques générales des <i>Pseudomonas</i>.....</b>	<b>18</b>
1.4.1. Caractéristiques culturelles.....	18
1.4.2. Caractéristiques morphologiques .....	18
1.4.3. Caractéristiques physiologiques.....	19
1.4.4. Caractéristiques biochimiques .....	19
1.4.5. Caractéristiques métaboliques .....	19
<b>2. Potentiel de production.....</b>	<b>20</b>
<b>3. <i>Pseudomonas putida</i> .....</b>	<b>21</b>
Voie II (Associée au métabolisme des acides gras) .....	23
Voie III (Utilise des substrats simples) .....	23

<b>Chapitre III : Procédé de production de Polyhydroxyalcanoates (PHAs)</b> .....	24
1- <b>Production de bioplastique</b> .....	25
2- <b>Souches, mécanismes et rôle des microorganismes productrices des PHA</b> .....	26
3- <b>Stratégies de fermentation</b> .....	28
3.1 <b>Cultures en discontinu</b> .....	30
3.2 <b>Culture en lots alimentés</b> .....	32
3.3 <b>Culture continue</b> .....	33
4- <b>Méthodes d'extraction des PHA de la biomasse microbienne</b> .....	36
4.1 <b>Extraction par solvant</b> .....	36
4.2 <b>Flottaison</b> .....	37
4.3 <b>Extraction par fluide supercritique</b> .....	37
4.4 <b>Extraction aqueuse à deux phases (ATPE)</b> .....	38
4.5 <b>Digestion chimique et enzymatique</b> .....	39
5- <b>Purification des PHAs</b> .....	39
6- <b>Techniques de Coloration pour la Détection et l'Analyse de l'Accumulation des PHAs</b> .....	42
6.1 <b>Méthode de coloration au noir de Soudan</b> .....	42
6.2. <b>Essai sur les colonies viables</b> .....	42
6.3. <b>Méthode de coloration au rouge du Nil</b> .....	43
<b>Partie II : Matériel et méthodes</b>	
1 . <b>Objectif de travail</b> .....	46
2. <b>Centre de recherche</b> .....	46
3. <b>Echantillonnage</b> .....	46
4. <b>Isolement</b> .....	47
4.1. <b>Préparation des dilutions décimales</b> .....	47
4.2. <b>Isolement sélectif sur gélose contenant l'antibiotique cétrimide (milieu CN)</b> ....	47
4.3. <b>Ensemencement</b> .....	47
4.4 <b>Incubation</b> .....	48
5. <b>Repiquage et purification</b> .....	48
<b>Méthode 1 : Dilution dans des tubes Eppendorf</b> .....	49
<b>Technique</b> .....	49
<b>Principe</b> .....	49
<b>Méthode 2 : Transfert sur gélose CN</b> .....	49
<b>Technique</b> .....	49
<b>Principe</b> .....	49

6.	L'identification macroscopique .....	50
7.	L'identification microscopique .....	50
7.1.	Coloration de Gram : .....	50
8.	Identification biochimique .....	51
8.1.	Recherche de la catalase.....	51
8.2.	Recherche de l'oxydase .....	52
8.3.	Les galeries Api 20NE.....	53
	Objet du test.....	53
	Principe.....	53
	Matériel et réactifs nécessaires .....	53
	Préparation de la galerie .....	53
	Préparation de l'inoculum .....	54
	Inoculation de la galerie .....	54
9.	Identification moléculaire des souches productrices des PHAs.....	56
9.1.	Extraction et purification de l'ADN génomique bactérien .....	56
1.	Matériel et réactifs.....	56
2.	Méthode .....	56
9.2.	Evaluation de la pureté par le Nano Drop.....	57
9.3.	Réaction de polymérisation en chaine (PCR).....	58
9.3.1.	Matériel .....	58
9.3.2.	Méthode.....	58
9.4.	Electrophorèse.....	59
	Principe.....	59
	Préparation du gel d'électrophorèse.....	60
	Mise en place de l'appareil à gel et séparation des fragments d'ADN.....	61
10.	Fermentation.....	63
10.1.	Fermentation à l'échelle erlenmeyer .....	64
10.1.1.	Préparation de pré-culture .....	64
10.1.2.	Détermination du poids sec cellulaire.....	64
10.2.	Criblage et sélection des souches potentiellement productrices des PHAss....	65
11.	Fermentation à l'échelle semi-pilote « scale up » .....	66
11.1.	Description des appareils .....	66
11.2.	Processus de fermentation .....	66
11.2.1.	Up Stream .....	66
11.2.3.	Préparation de l'inoculum.....	67

11.3.2. Middle Stream (lancement de la fermentation).....	68
11.3.3. Down stream .....	69
12. Extraction des polyhydroxyalcanoates (PHAs) .....	69
13. Purification des PHAs .....	71
14. Lyophilisation des souches productrices des PHAs.....	71
14.1. Méthode .....	73
<b>Partie III : Résultats et discussion</b>	
1. Isolement .....	75
2. Purification et identification du genre .....	77
2.1. Aspect macroscopique .....	78
2.2. Aspect microscopique.....	81
2.3. Mise en évidence de l'oxydase .....	82
2.4. Mise en évidence de la catalase.....	82
2.5. Identification des souches par API 20NE .....	85
3. Identification moléculaire des souches sélectionnes.....	88
4. Fermentation.....	89
4.1 Fermentation à l'échelle erlenmeyer.....	89
4.2 Criblage et sélection des souches potentiellement productrices des PHAss.....	90
4.3. Fermentation à l'échelle semi-pilote « scale up ».....	92
5. Extraction des polyhydroxyalcanoates (PHAs) .....	95
6. Purification des PHAs.....	95
7. Lyophilisation .....	96
7.1. Test de viabilité.....	97
Conclusion.....	99
Références bibliographiques .....	101
Annexes .....	114

## Liste des abréviations

---

PHA :	Poly(hydroxyalcanoates).
PVA :	Poly (alcool vinylique).
PCL :	Poly( $\epsilon$ -caprolactone).
PEA :	Poly (ester amide).
PBSA :	Poly (butylène succinate adipate).
PBAT :	Poly (butylène adipate téréphtalate).
PLA :	Poly (acide lactique).
PHB :	Poly (hydroxybutyrate).
PHBV:	Poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalérate).
SCL-PHA:	Short-chain-length PHA.
MCL-PHA:	Medium-chain-length PHA.
3HA :	3-hydroxyacyl.
ACP :	Protéine porteuse d'acyle (ACP).
P (3HB) :	Poly (3-hydroxybutyrate).
CSTR :	Réacteur continu à cuve agitée.
SBR :	Système de séquençage par lots
Prod :	Productivité.
CT :	Temps de culture.
STR :	Réacteur à cuve agitée.
Conc :	Concentration.
CDW% :	Pourcentage de poids sec des cellules.
Mw (kDa) :	Poids moléculaire moyen en masse (en Kilodaltons).
Mn (kDa) :	Poids moléculaire moyen en nombre (en Kilodaltons).
Tm (°C) :	Température de Fusion.

## Liste des abréviations

---

g (°C) : Température de Transition Vitreuse.

ND : Non Détecté.

(THF) : Tétrahydrofurane.

DCM : Dichlorométhane.

CN : Gélose cétrimide.

μl : Microlitre.

TBE : Tris-Borate-EDTA.

rpm : Rotations per minute.

MMC : Cultures microbiennes mixtes.

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Illustration schématique de la structure granulaire des PHAs avec les protéines associées aux granules. ....	06
<b>Figure 02</b> : Structure générale des polyhydroxyalcanoates .....	06
<b>Figure 03</b> : PHA intracellulaire et classification de ses monomères.....	08
<b>Figure 04</b> : Matrice des bioplastiques .....	09
<b>Figure 05</b> : Classification des bioplastiques .....	10
<b>Figure 06</b> : Diverses applications des PHAs.....	12
<b>Figure 07</b> : Les 5 groupes d'homologie d'ARN ribosomal constituant le genre ...	17
<b>Figure 08</b> : Les trois principales voies métaboliques de la biosynthèse des PHA...	22
<b>Figure 09</b> : Schéma d'une cellule microbienne riche en PHAs dans un bioréacteur schématique et structure chimique générale du PHAs.....	29
<b>Figure 10</b> : Schémas des régimes de processus décrits pour la biosynthèse des PHAs dans des bioréacteurs exploités .....	34
<b>Figure 11</b> : Synthèse des biopolymères .....	35
<b>Figure 12</b> : Les différentes étapes de la production des PHAs bactérien .....	42
<b>Figure 13</b> : Dépistage des bactéries productrices des PHAs par la méthode des colonies viables et la coloration au noir de Soudan B. ....	43
<b>Figure 14</b> : Granules fluorescents des PHAs après coloration au rouge du Nil de la souche <i>Pseudomonas mediterranea</i> . ....	44
<b>Figure 15</b> : Représentation schématique du processus global de production des PHAs bactériens .....	44
<b>Figure 16</b> : La localisation de l'échantillonnage à partir de la station d'épuration des eaux usées.....	46
<b>Figure 17 et 18</b> : Préparation des dilutions décimales.....	47
<b>Figure 19</b> : Ensemencement par étalement .....	48
<b>Figure 20</b> : Incubation des boîtes ensemencées .....	48
<b>Figure 21 et 22</b> : Repiquage des colonies sur des tubes Eppendorf.....	49
<b>Figure 23</b> : Observation macroscopique des colonies bactériennes.....	50

<b>Figure 24</b> : Observation microscopique des cellules bactériennes.....	<b>51</b>
<b>Figure 25 et 26</b> : Détection de l'activité catalase dans les souches bactériennes isolées par le test de peroxyde d'Hydrogène.....	<b>52</b>
<b>Figure 27</b> : Détection de l'activité cytochrome-oxydase dans les souches bactériennes isolées par le test de coloration au réactif d'oxydase.....	<b>52</b>
<b>Figure 28 et 29</b> : Préparation de la Galerie pour l'incubation bactérienne.....	<b>54</b>
<b>Figure 30 et 31</b> : Préparation de l'inoculum par prélèvement des colonies de cultures jeunes.....	<b>54</b>
<b>Figure 32 et 33</b> : Préparation d'une suspension bactérienne à une Turbidité de 0,5 McFarland .....	<b>54</b>
<b>Figure 34</b> : Inoculation de la galerie pour les tests biochimiques.....	<b>55</b>
<b>Figure 35 et 36</b> : Application d'huile de paraffine pour former un ménisque convexe dans les cupules des tests GLU, ADH, URE.....	<b>55</b>
<b>Figure 37 et 38</b> Incubation de la galerie à 30°C pendant 24 heures dans la boîte d'incubation .....	<b>56</b>
<b>Figure 39 et 40</b> : Préparation de la Suspension .....	<b>57</b>
<b>Figure 41 et 42</b> : Chauffage et centrifugation de la suspension.....	<b>57</b>
<b>Figure 43</b> : L'évaluation de la pureté de l'ADN par le Nano Drop.....	<b>58</b>
<b>Figure 44 et 45</b> : Préparation du gel d'agarose.....	<b>61</b>
<b>Figure 46 et 47</b> : Préparation de la matrice du gel .....	<b>61</b>
<b>Figure 48</b> : Ajout du colorant aux échantillons d'ADN à séparer.....	<b>62</b>
<b>Figure 49</b> : Dépôt des échantillons d'ADN dans le gel d'électrophorèse .....	<b>63</b>
<b>Figure 50 et 51</b> : Préparation de la cuve d'électrophorèse .....	<b>63</b>
<b>Figure 52 et 53</b> : Dépôt du gel dans la cuve et début de la migration .....	<b>64</b>
<b>Figure 54 et 55</b> : Fermentation en erlenmeyers .....	<b>65</b>
<b>Figure 56 et 57</b> : Centrifugation et estimation de la biomasse après séchage .....	<b>65</b>
<b>Figure 58 et 59</b> : la coloration au noir Soudan B .....	<b>66</b>
<b>Figure 60</b> : Fermentation à l'échelle semi-pilote dans un bioréacteur BIOSTAT® Aplus de 4 L.....	<b>67</b>
<b>Figure 61 et 62</b> : Préparation du milieu de fermentation.....	<b>68</b>
<b>Figure 63 et 64</b> : Préparation de l'inoculum.....	<b>68</b>

<b>Figure 65 et 67</b> : Préparation des différents composants pour le lancement de la fermentation .....	<b>69</b>
<b>Figure 68</b> : Réglage des différents paramètres.....	<b>70</b>
<b>Figure 69 et 70</b> : Lyse mécanique et chimique des cellules .....	<b>71</b>
<b>Figure 71 et 72</b> : Chauffage au bain- marie et filtration avec le papier Whatman n° 1.....	<b>72</b>
<b>Figure 73</b> : Schéma montrant les étapes de la lyophilisation.....	<b>73</b>
<b>Figure 74</b> : DiaGramme représentatif des changements d'états de l'eau .....	<b>73</b>
<b>Figure 75 et 76</b> : Préparation et lyophilisation des souches productrices des PHAs.....	<b>75</b>
<b>Figure 77 et 78 et 79</b> : Observation macroscopique des souches <b>C10 (A)</b> , <b>C13 (B)</b> , <b>C8 (C)</b> .....	<b>80</b>
<b>Figure 80</b> : L'observation microscopique de la souche <b>C 12</b> après coloration de Gram au grossissement x100.....	<b>83</b>
<b>Figure 81 et 82</b> : Mise en évidence de la catalase des souches : <b>C 1-11 (A)</b> , <b>C12-18 (B)</b> .....	<b>84</b>
<b>Figure 83</b> : Profils d'identification des souches 10, 12 et 13 de <i>Pseudomonas</i> par la galerie API 20NE.....	<b>87</b>
<b>Figure 84</b> : Identification biochimique de la souche <b>C10</b> de <i>Pseudomonas putida</i> par la galerie API 20NE.....	<b>88</b>
<b>Figure 85</b> : Identification biochimique de la souche 12 de <i>Pseudomonas putida</i> par la galerie API 20NE.....	<b>89</b>
<b>Figure 86</b> : Identification biochimique de la souche 12 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par la galerie API 20NE.....	<b>90</b>
<b>Figure 87</b> : Profil électrophorétique de l'amplification des fragments d'ADN du gène Ribosomal 16S sur gel d'agarose de 1,5 %.....	<b>91</b>
<b>Figure 88</b> : Les résultats de la centrifugation des souches <b>C3, C10, C11, C12, C16 et C18</b> .....	<b>91</b>
<b>Figure 89 et 90</b> : Coloration de la souche productrice <b>(A)</b> , non productrice <b>(B)</b> avec le noir Soudan B ×100 .....	<b>93</b>

<b>Figure 91</b> : Courbe de l'évolution des différents paramètres au cours du processus de fermentation.....	<b>95</b>
<b>Figure 92</b> : Mesure de la stabilité du pH pendant la fermentation.....	<b>95</b>
<b>Figure 93</b> : Down Stream (Arrêt de la fermentation) .....	<b>96</b>
<b>Figure 94</b> : Purification des PHAs et collecte en tubes Coniques.....	<b>98</b>
<b>Figure 95</b> : Aspect physique des souches de <i>Pseudomonas</i> après lyophilisation...	<b>99</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Types des PHAs .....	<b>08</b>
<b>Tableau 02</b> : Espèces saprophytes de <i>Pseudomonas</i> et source d'isolement.....	<b>15</b>
<b>Tableau 03</b> : Quelques caractères différentiels des espèces du genre <i>Pseudomonas</i> .....	<b>19</b>
<b>Tableau 04</b> : Comparaison de différentes souches de <i>Pseudomonas</i> productrices des PHAs utilisant différentes sources de carbone .....	<b>20</b>
<b>Tableau 05</b> : Comparaison des processus actuels utilisés pour la production de <i>Pseudomonas</i> .....	<b>25</b>
<b>Tableau 06</b> : Souches bactériennes impliquées dans la production des PHAs en utilisant une gamme variée de sources de carbone .....	<b>27</b>
<b>Tableau 07</b> : Résumé des résultats des différentes stratégies de fermentation pour la production des PHAs par <i>Pseudomonas sp</i> .....	<b>30</b>
<b>Tableau 08</b> : Un bref résumé des différentes méthodes utilisées pour l'extraction et la purification des PHAs .....	<b>40</b>
<b>Tableau 09</b> : Les cultures des souches sur milieu cetrimide.....	<b>77</b>
<b>Tableau 10</b> : Observation macroscopique des colonies bactériennes par microscope trinoculaire.....	<b>81</b>
<b>Tableau 11</b> : Mise en évidence de l'oxydase des 18 souches.....	<b>85</b>
<b>Tableau 12</b> : Détermination du poids sec cellulaire des 18 souches .....	<b>92</b>
<b>Tableau 13</b> : Test de viabilité des souches C10, C11, C12, C13, C14, C16 et C18 de <i>Pseudomonas</i> après lyophilisation et reconstitution sur milieu Mueller-Hinton.	<b>100</b>

## Résumé

Avec une production annuelle de plus de 368 millions de tonnes de plastique, la gestion de leur accumulation ne cesse de se poser. Effectivement, les plastiques pétrochimiques conventionnels sont soit détruits après leur utilisation, produisant des fumées toxiques et polluantes, soit accumulés dans l'environnement, notamment dans les océans. Ainsi, l'intérêt pour la fabrication de plastiques biodégradables est de plus en plus grand. **Les polyhydroxyalcanoates (PHAs)** sont un type de polymères biosourcés et biodégradables particulièrement intéressant en raison de leur variété structurale et de leur ressemblance avec les plastiques classiques. Néanmoins, leur fabrication biologique est actuellement basée sur la fermentation à l'aide de cultures pures microbiennes, naturelles ou recombinantes. Les espèces de *Pseudomonas* ont été choisies comme productrices des PHAs dans de nombreuses études récentes. Être métaboliquement polyvalentes et possédant une tolérance remarquable à un large éventail de sources de carbone, ces bactéries sont devenues une usine de cellules pour la production des PHAs. Dans la présente étude, des souches du genre *Pseudomonas* caractérisées par leurs capacités à synthétiser des lipides intracellulaires ont été isolées à partir d'échantillons d'eaux usées. Sur l'ensemble des dix-huit (18) isolats, 12 sont criblées avec une coloration spécifique au Noir Soudan B, 08 souches ont un potentiel élevé pour la production des PHAs. Dans le cadre de la production et l'extraction des PHAs, une fermentation en batch a été lancée avec la colonie 12 pendant 18 heures et la biomasse récupérée par centrifugation. Une extraction des polymères avec du chloroforme est réalisée, ensuite les souches criblées sont lyophilisées. Pour une production durable, il est essentiel de réduire les coûts des sources de carbone et d'améliorer l'efficacité des procédés, en utilisant notamment des déchets comme substrat de la fermentation.

**Mots clés :** Bioplastique, **Polyhydroxyalcanoates (PHAs)**, Batch, *Pseudomonas putida*, Biodégradable.

## **Abstract**

With over 368 million tonnes of plastic produced each year, the issue of plastic waste is an ongoing concern. Conventional petrochemical plastics are either destroyed after use, releasing toxins and polluting fumes, or they accumulate in the environment, particularly in the oceans. As a result, there is growing interest in the production of biodegradable plastics. **Polyhydroxyalkanoates (PHAs)** are a particularly interesting type of biodegradable polymer due to their structural diversity and similarity to conventional plastics. However, their biological production is currently based on fermentation using pure microbial cultures, either natural or recombinant. *Pseudomonas* species have been selected as PHA producers in many recent studies. Due to their metabolic versatility and remarkable tolerance to a wide range of carbon sources, these bacteria have become a cell factory for PHA production. In the present study, strains of the genus *Pseudomonas* characterized by their ability to synthesize intracellular lipids were isolated from wastewater samples. Of the eighteen (18) isolates, 12 were screened with a specific Sudan Black B stain and 08 strains were found to have a high potential for PHA production. For PHA production and extraction, a batch fermentation was performed with colony 12 for 18 h and the biomass was recovered by centrifugation. The polymers were then extracted with chloroform, then the screened strains were lyophilized. For sustainable production, it is essential to reduce the cost of carbon sources and improve process efficiency, in particular by using waste as a substrate for fermentation.

**Key words:** Bioplastic, **Polyhydroxyalkanoates (PHAs)**, Batch, *Pseudomonas putida*, Biodegradable.

## المخلص

مع إنتاج سنوي يزيد عن 368 مليون طن من البلاستيك تثار باستمرار مسألة تراكمه، فالبلاستيك البتروكيماوي التقليدي إما أن يتم تدميره بعد الاستخدام، مما ينتج عنه أبخرة سامة وملوثة أو يتراكم في البيئة وخاصة في المحيطات. ونتيجة لذلك، يتزايد الاهتمام بتصنيع المواد البلاستيكية القابلة للتحلل الحيوي. ويعد **polyhydroxyalcanoates (PHAs)** نوعاً من المركبات الكيميائية ذات المصدر الحيوي التي تعتبر مثيرة للاهتمام بشكل خاص بسبب تنوعها الهيكلي وتشابهها مع البلاستيك التقليدي. غير أن إنتاجها البيولوجي يعتمد حاليًا على التخمير باستخدام مستنبتات ميكروبية نقية، سواء كانت طبيعية أو معدلة وراثيًا. وقد اختيرت أنواع *Pseudomonas* كمنتج للPHA في العديد من الدراسات الحديثة. وباعتبارها متعددة الاستخدامات الأيضية وتمتلك قدرة تخمير ملحوظة لمجموعة واسعة من مصادر الكربون، فقد أصبحت هذه البكتيريا مصنعًا خلويًا لإنتاج الPHA. في هذه الدراسة، تم عزل سلالات من جنس *Pseudomonas* التي تتميز بقدرتها على تصنيع الدهون داخل الخلايا من عينات مياه الصرف الصحي. ومن بين الثمانية عشر (18) مستعمرة، تم انتقاء 12 سلالة منها باستخدام صبغة (Noir soudan B)، وتم الحصول على 08 سلالات لها قدرة عالية على إنتاج الPHA. ولإنتاج واستخلاص ال (PHAs) استعملت في عملية التخمير، المستعمرة 12 لمدة 18 ساعة واستخلصت الكتلة الحيوية بالطرد المركزي، ثم تم استخلاص الPHA باستخدام محلول الكلوروفورم. وأخيرًا، تم تجفيف السلالات التي تم اختيارها بالتجفيد. من أجل الإنتاج المستدام، من الضروري تقليل تكلفة مصادر الكربون وتحسين كفاءة العمليات، ولا سيما باستخدام النفايات كركيزة للتخمير.

**الكلمات المفتاحية:** التخمير، *Pseudomonas putida*، البلاستيك الحيوي، **Polyhydroxyalcanoates (PHAs)**، قابل للتحلل الحيوي.

# **Introduction**

Le plastique est omniprésent dans nos vies, avec une production mondiale de 311 millions de tonnes en 2014, qui devrait encore doubler dans les 20 prochaines années. Environ la moitié de cette production est destinée à un usage unique, ce qui signifie que les objets ou emballages sont jetés immédiatement après utilisation, finissant souvent en décharge où ils mettent jusqu'à 1000 ans à se décomposer, posant ainsi un problème majeur à l'échelle de la planète **(Carbiolice, 2023)**. En raison de leurs excellentes propriétés, les plastiques à base de pétrole sont intensivement utilisés dans la vie quotidienne, remplaçant le verre, le bois et le métal dans de nombreuses applications industrielles et médicales **(Vladu, Petrescu et al., 2019)**. Cependant, étant non biodégradables, les plastiques synthétiques persistent dans l'environnement, menaçant la biodiversité marine et terrestre ainsi que la santé humaine **(Ciesielska et al., 2019)**.

Il n'y a pas de solution miracle à la crise du plastique. La réduction, la réutilisation, le recyclage et le compostage sont des moyens complémentaires qui ne permettront pas de voir la fin de la pollution plastique **(Le Figaro, 2014)**. Alors, comment pouvons-nous mettre en œuvre des stratégies innovantes pour réduire l'impact des plastiques sur notre environnement afin de préserver notre planète pour les générations futures ?

Notre solution : les bioplastiques. Ils représentent une alternative durable et biodégradable aux plastiques traditionnels, contribuant ainsi à la réduction de la pollution plastique et à la préservation de notre santé et des écosystèmes marins et terrestres. En utilisant des sources renouvelables comme les plantes et les microorganismes, notre projet réduit la dépendance aux combustibles fossiles non renouvelables, favorisant ainsi la durabilité à long terme. En diminuant les émissions associées à la production et à l'élimination des plastiques, il contribue à atténuer le changement climatique. En offrant ces avantages, notre projet de bioplastiques joue un rôle crucial dans la transition vers une économie circulaire et une société plus durable. Le marché des bioplastiques offre une alternative au plastique pétro-sourcé, réduisant les effets néfastes sur l'environnement et la dépendance au pétrole, dont les réserves diminuent.

Les polyhydroxyalcanoates (PHAs) sont des polymères biodégradables particulièrement prometteurs en raison de leur biodégradabilité, non-toxicité et biocompatibilité. Produits par des microorganismes comme les bactéries à Gram positif et négatif, les PHAs servent de réserves de carbone et d'énergie **(Louis Paul et Antony Paladino, 2009)**. Ils sont commercialisés sous forme de granulés ou de poudre et utilisés dans diverses applications, dont les additifs pour PVC et PLA, les cosmétiques, les sutures et les films médicaux **(Jehan Mohamed et al., 2016)**.

Les PHAs sont produits par des microorganismes qui peuvent les synthétiser dans des conditions de carence en certains nutriments et une surabondance de carbone, ou durant leur phase de croissance sans besoin de limiter les nutriments (Siteli, 2020 ; Ciesielska et al., 2019). Ils peuvent être obtenus à partir de divers substrats, y compris des ressources renouvelables, des sous-produits, des acides organiques, des ressources fossiles et des déchets (Siteli, 2020).

Les souches de *Pseudomonas*, métaboliquement polyvalentes, sont particulièrement étudiées pour la production de biopolymères utilisés dans divers secteurs, des biens de consommation à la médecine (Ciesielska et al., 2019).

Dans cette optique, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- 1 / Isolement et identification des bactéries appartenant au genre *Pseudomonas*.
- 2 / Réalisation d'une synthèse bibliographique sur les connaissances actuelles concernant la production de polyhydroxyalcanoates (PHAs) à partir de souches microbiennes.
- 3 / Élaboration d'un protocole de production des PHAs à partir de souches de *Pseudomonas* isolées. Ce protocole prendra en compte des paramètres critiques tels que la source de carbone, les conditions de culture incluant la fermentation en batch, ainsi que les méthodes d'extraction et de purification du polymère. Enfin, nous aborderons la lyophilisation des souches productrices des PHAs pour assurer leur conservation à long terme.

# **Chapitre I :**

# **Bioplastique**

### 1. Généralités sur le Bioplastique

Les biopolymères sont des composés polymériques obtenus à partir d'organismes vivants ou synthétisés à partir de matières premières renouvelables. Selon la définition de l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie (ADEME) en France, le terme "biopolymère" se rapporte aux polymères de la catégorie des bioproduits, ce qui signifie qu'ils sont fabriqués à partir de ressources biologiques renouvelables plutôt que par des procédés de biotechnologie. Les bioproduits désignent des produits non alimentaires issus de la biomasse, comprenant des matériaux provenant de plantes, d'algues, de cultures, d'arbres, d'organismes marins et de déchets biologiques générés par les activités domestiques, la production alimentaire et l'élevage (**Bewa, 2006**). Les biopolymères possèdent la caractéristique d'être biodégradables, bien que cette propriété puisse parfois prêter à confusion, notamment en raison de l'existence de polymères dérivés de ressources fossiles qui sont également biodégradables.

Les polymères biodégradables dérivent soit de ressources fossiles, notamment le pétrole, parmi lesquels on trouve le poly (alcool vinylique) (PVA), le poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), le poly (butylène succinate adipate) (PBSA), le poly (ester amide) (PEA) et le poly (butylène adipate téréphtalate) (PBAT), soit de ressources renouvelables, également désignées sous le terme d'agro-matériaux ou biopolymères, tels que les polysaccharides, les protéines ou les lignines. Il existe également des polymères issus des biotechnologies, tel que le PLA (Poly (Acide Lactique)), résultant de la polymérisation d'acide lactique (**Gaudin, 2008**).

En outre, il existe des polymères d'origine microbienne, qui sont des polyesters synthétisés au cours de la fermentation de matières premières d'origine naturelle par des microorganismes. Cette famille comprend principalement les poly (hydroxyalcanoates) (PHAs), un homopolymère, le poly(hydroxybutyrate) (PHB) et différents copolyesters tels que les poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalérate) (PHBV) (**Gaudin, 2008**).

### 2. Les polyhydroxyalcanoates (PHAs)

#### 2.1. Historique

En 1926, le scientifique français Maurice Lemoigne a fait une découverte majeure en identifiant la présence d'un constituant granulaire, un polyester aliphatique, chez *Bacillus megaterium* (**Lemoigne, 1926**), révélant ainsi l'existence du polyhydroxybutyrate (PHB).

Ce polymère était alors considéré comme le seul représentant des polyhydroxyalcanoates (PHAs) jusqu'en 1974, lorsque Wallen et Rohwedder ont mis en évidence d'autres hydroxyalcanoates, y compris le  $\beta$ -hydroxybutyrate (**Wallen et Rohwedder, 1974**).

Vers la fin des années 1980, un large éventail de microorganismes était reconnu pour leur capacité à stocker du PHB ou des PHAs, incluant non seulement des microorganismes Gram négatif, mais également certaines bactéries à Gram positif, aérobies et anaérobies (**Byrom, 1987**).

### 2.2. Définition des PHAs

Les polyhydroxyalcanoates (PHAs) sont des polymères biologiques synthétisés par des processus de fermentation microbienne sous forme de corps d'inclusion, servant de réserves de stockage de carbone et d'énergie à l'intérieur des cellules végétatives (**Marang, Loosdrecht et Kleerebezem, 2018 ; Santiago, Antonio, Alba, et Bernabe, 2018**). (Voir figure 01)

Il a été prouvé que la fonction biologique des PHAs est bien plus vaste. (**Obruca et al., 2018**) ont récemment discuté et résumé l'implication des PHAs dans la résistance au stress des cellules microbiennes. Des études récentes ont révélé que la présence des PHAs dans les cellules bactériennes aide à préserver l'intégrité cellulaire face à des déséquilibres osmotiques soudains (**Sedlacek et al., 2019**).

De plus, les granules des PHAs peuvent servir de cryoprotecteurs efficaces contre les effets néfastes des cycles de congélation-décongélation (**Obruca et al., 2016**).

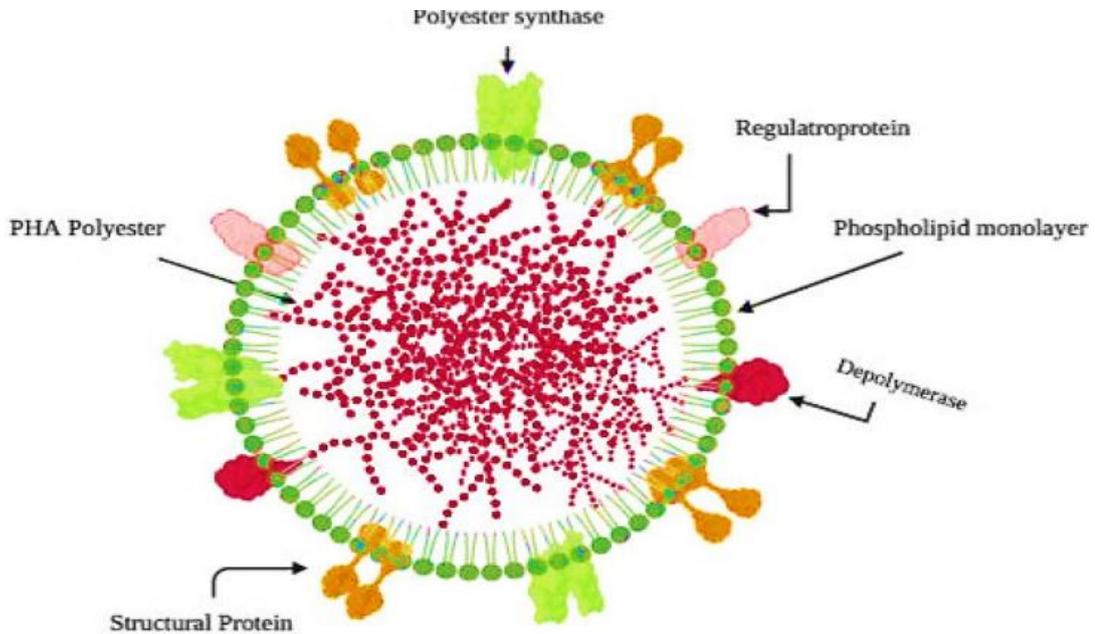
Ils ont suscité un intérêt croissant en tant qu'alternative aux plastiques dérivés de la pétrochimie en raison de leur biodégradabilité, de leur caractère renouvelable, de leur biocompatibilité et de leur faible impact environnemental (**Amache, et al., 2013**).

Leur production peut être réalisée à partir de diverses ressources renouvelables, dans des conditions environnementales variées, ce qui contribue à réduire les coûts de fabrication (**Huang et al., 2018 ; Raza, Abida, & Banat, 2018**).

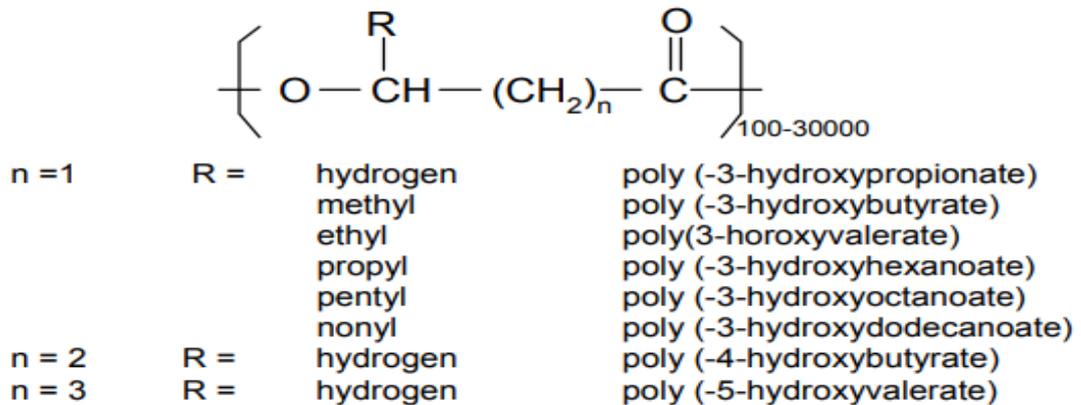
### 2.3. Structure des PHAs

De manière générale, les polyhydroxyalcanoates (PHAs) se composent de répétitions du même monomère, avec une diversité de près de 150 types de monomères incorporés, comprenant des unités hydroxyalcanoates substituées par une variété de groupes

fonctionnels tels que des groupes alkyle, aryle, alcényle, cyano, époxy, éther et acide) (Reddy, Ghai, Rashmi et Kalia, 2003 ; Khanna et Srivastava, 2005). (Voir figure 02)



**Figure 01** : Illustration schématique de la structure granulaire des PHAs avec les protéines associées aux granules. Le polyester synthase est PhaC, tandis que PhaZ et PhaD sont représentées ensemble sous le nom de dépolymérase en raison de leur activité dépolymérisante. PhaF ou phasin est protéine structurale en raison du soutien structurel qu'elle apporte aux granules de Granule des PHAs (Faizan et al., 2020).



**Figure 02** : Structure générale des polyhydroxyalcanoates (Ojumu et al., 2003).

En règle générale, la composition et les propriétés physiques des PHAs produits par les micro-organismes dépendent de la source de carbone utilisée (Knoll et al., 2009). Les PHAs sont des polymères linéaires d'acides (R)-3-hydroxy dans lesquels le groupe carboxyle d'un monomère forme une liaison ester avec le groupe hydroxyle du monomère suivant (voir figure 02). Selon la longueur de la chaîne carbonée, les PHAs sont généralement classés en trois groupes :

### ➤ Les PHAs à chaîne courte (SCL)

Ces polymères se composent de monomères (R)-hydroxyalcanoate comprenant de 3 à 5 carbones. Ils se caractérisent par une cristallinité élevée, formant des cristaux rigides qui les rendent moins flexibles.

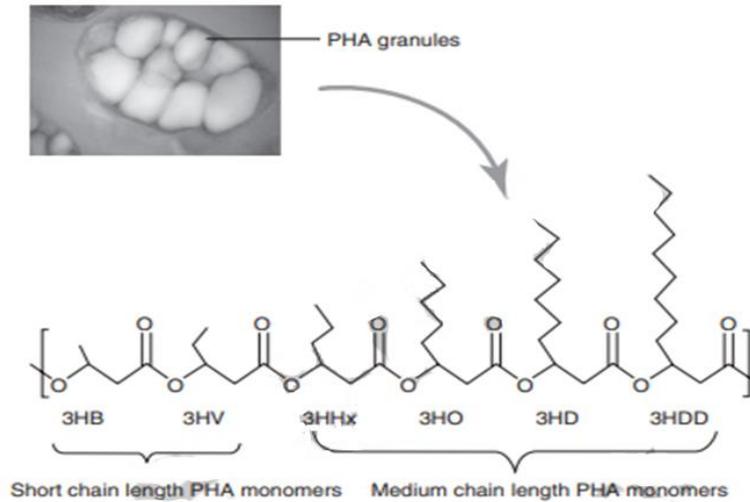
### ➤ Les PHAs à chaîne longue (MCL)

Ces polymères sont constitués de monomères (R)-hydroxyalcanoate ayant une longueur de chaîne comprise entre 6 et 14 carbones. Ils peuvent être aliphatiques ou aromatiques et présentent généralement des propriétés mécaniques intéressantes, une faible cristallinité, une résilience élevée et une faible température de fusion. Comme tous les PHAs, ils sont biodégradables et biocompatibles.

### ➤ Les copolymères (SCL-MCL)

Ces polymères sont composés de monomères ayant une longueur de chaîne variant de 4 à 14 carbones et présentent une gamme de propriétés physiques dépendant du pourcentage molaire des différents monomères incorporés dans le polymère. Les copolymères avec un faible pourcentage de monomères SCL présentent une plus grande élasticité (**Ushimaru et al.,2014**).

**Singh et Mallick** ont également proposé d'autres catégories pour les cultures de *Pseudomonas aeruginosa*, telles que les PHAs à longue chaîne (LCL), les copolymères SCL-MCL-PHA et les SCL-LCL-PHA (**Singh et Mallick, 2009 ; Kumar et al.,2015**)



**Figure 03** : PHA intracellulaire et classification de ses monomères. Les granules blancs sont des PHA accumulés dans les bactéries. 3HB, 3-hydroxybutyrate ; 3HV, 3-hydroxyvalérate ; 3HHx, 3-hydroxyhexanoate ; 3HO, 3-hydroxyoctanoate ; 3HD, 3-hydroxydécanoate ; 3HDD, 3-hydroxydodécanoate (Wang et Chen, 2017).

**Tableau 1** : Types des PHAs (Shrivastav et al., 2011).

PHAs	Nombre d'atomes de carbone dans les monomères de PHA	Exemples
PHA à chaîne courte (scl-PHA)	3 – 5	P(3HB) P(4HB)
PHA à chaîne moyenne (mcl-PHA)	6 – 14	P(3HHx) P(3HO) P(3HHx-co-3HO)

#### 2.4. Classification des PHAs

Les bioplastiques peuvent être classifiés selon divers critères. Ils sont regroupés en fonction de leur composition chimique, de leurs méthodes de synthèse, de leurs procédés de fabrication, de leur importance économique ou leurs applications (Smith, 2005).

Une autre approche consiste à les classifier en fonction de l'origine des ressources utilisées (renouvelables ou non renouvelables) ainsi que sur la gestion en fin de vie

## Chapitre I : Bioplastique

(Biodégradable ou non biodégradable) est représenté par la figure ci-dessous :

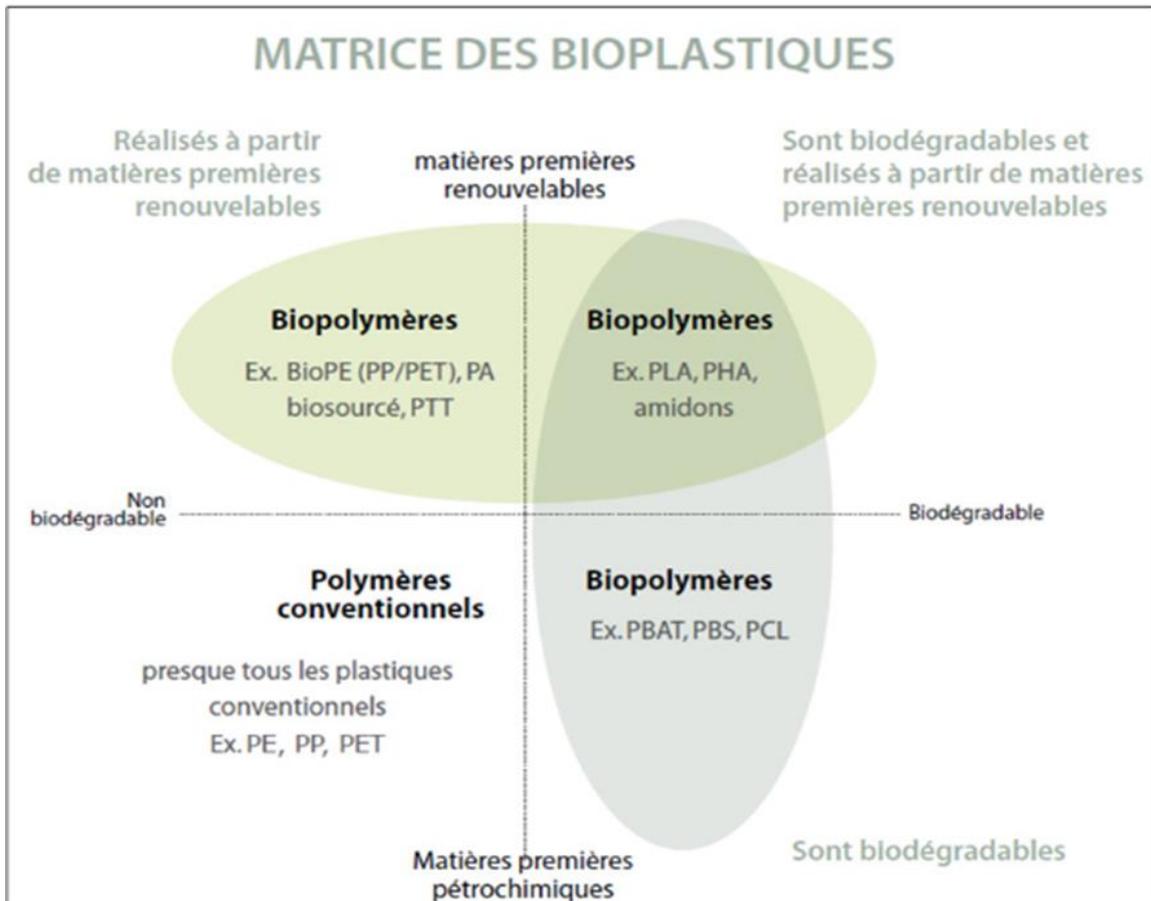


Figure 04 : Matrice des bioplastiques (Preventpack, 2012).

Dans cette étude, l'accent a été mis sur la classification basée sur les procédés de fabrication afin d'expliquer les différents types de bioplastiques. La figure 5 illustre les quatre groupes classifiés :

- Groupe 1 : Les bioplastiques naturels issus directement de la biomasse.
- Groupe 2 : Les bioplastiques issus des microorganismes par fermentation microbienne.
- Groupe 3 : Les bioplastiques obtenus par synthèse à partir de monomères renouvelables.
- Groupe 4 : Les bioplastiques pétrochimiques biodégradables.

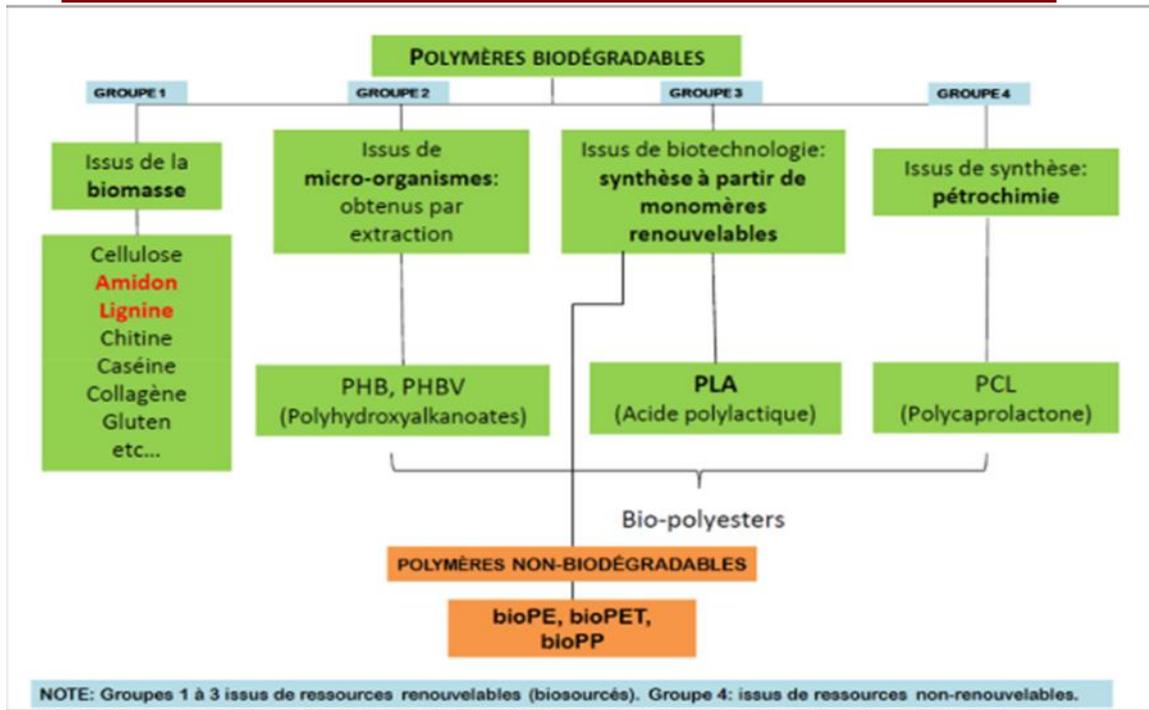


Figure 05 : Classification des bioplastiques (Modifié de Legros et al., 2011).

### 2.5. Caractéristiques des PHA s

Les polyhydroxyalcanoates (PHAs) constituent une catégorie de polymères d'origine biologique présentant des caractéristiques qui sont étroitement comparables à celles des plastiques synthétiques prédominants sur le marché actuel (Verlinden et al., 2007).

Les PHAs sont des thermoplastiques biodégradables, écologiques et biocompatibles. Plus ou moins résistants et flexibles selon leur formulation. Ils peuvent être utilisés soit sous forme pure, soit comme additifs aux plastiques dérivés du pétrole tels que le polyéthylène (Verlinden et al., 2007).

Les PHAs sont des polymères polyvalents pouvant être utilisés dans diverses applications, allant des produits d'emballage rigides aux matériaux hautement élastiques pour les revêtements. De plus, une caractéristique qui distingue les PHAs des plastiques conventionnels est leur biodégradabilité complète dans l'environnement (Bentancourt, 2008).

Par ailleurs, les PHAs sont renouvelables par nature, ils pourraient être produits à partir de ressources renouvelables telles que les huiles végétales (Arshad, 2007), les sucres, et le dioxyde de carbone.

### 2.6. Applications des PHAs

En raison de leur caractère biocompatible et biodégradable, les biopolymères peuvent être exploités pour améliorer l'efficacité d'autres molécules biologiquement actives dans un produit. Ils sont également sujets à des modifications pour répondre à diverses applications potentielles, (**Koller, et Mukherjee, 2020**) notamment dans les principaux domaines suivants :

- **Agriculture**

Libération contrôlée d'insecticides, d'herbicides et d'engrais ((NODAX) utilisé comme revêtement pour les engrais à base d'urée utilisés dans les rizières) (**Sathya1 et al., 2018**). (Voir figure 06).

- **Produits d'hygiène**

Couches, serviettes hygiéniques, culottes d'entraînement, bandage médical, matériel d'échafaudage, plaques osseuses, matériaux d'ostéosynthèse, sutures chirurgicales, tampons, matériaux de pansement pour la chirurgie, patchs péricardiques, prothèses artérielles, stents cardiologiques, greffes vasculaires, valves cardiaques, implants, libération contrôlée de médicaments et d'hormones (**Sathya1 et al., 2018**). (Voir figure 06)

- **Emballages**

Emballages alimentaires, bouteilles de boissons en plastique, papier et carton résistant à l'eau, feuilles, films et diaphragmes (**Sathya1 et al., 2018**). (Voir figure 06).

- **Autres**

Additifs alimentaires, capteurs de pression pour claviers, instruments de mesure de l'étirement et de l'accélération, essais de matériaux, capteurs d'ondes de choc, briquets, briquets à gaz, microphones, détecteurs ultrasoniques, instruments de mesure de la pression acoustique, écouteurs, haut-parleurs, substrat pour la dénitrification des eaux usées, matières premières pour d'autres produits chimiques (**Sathya1 et al., 2018**).

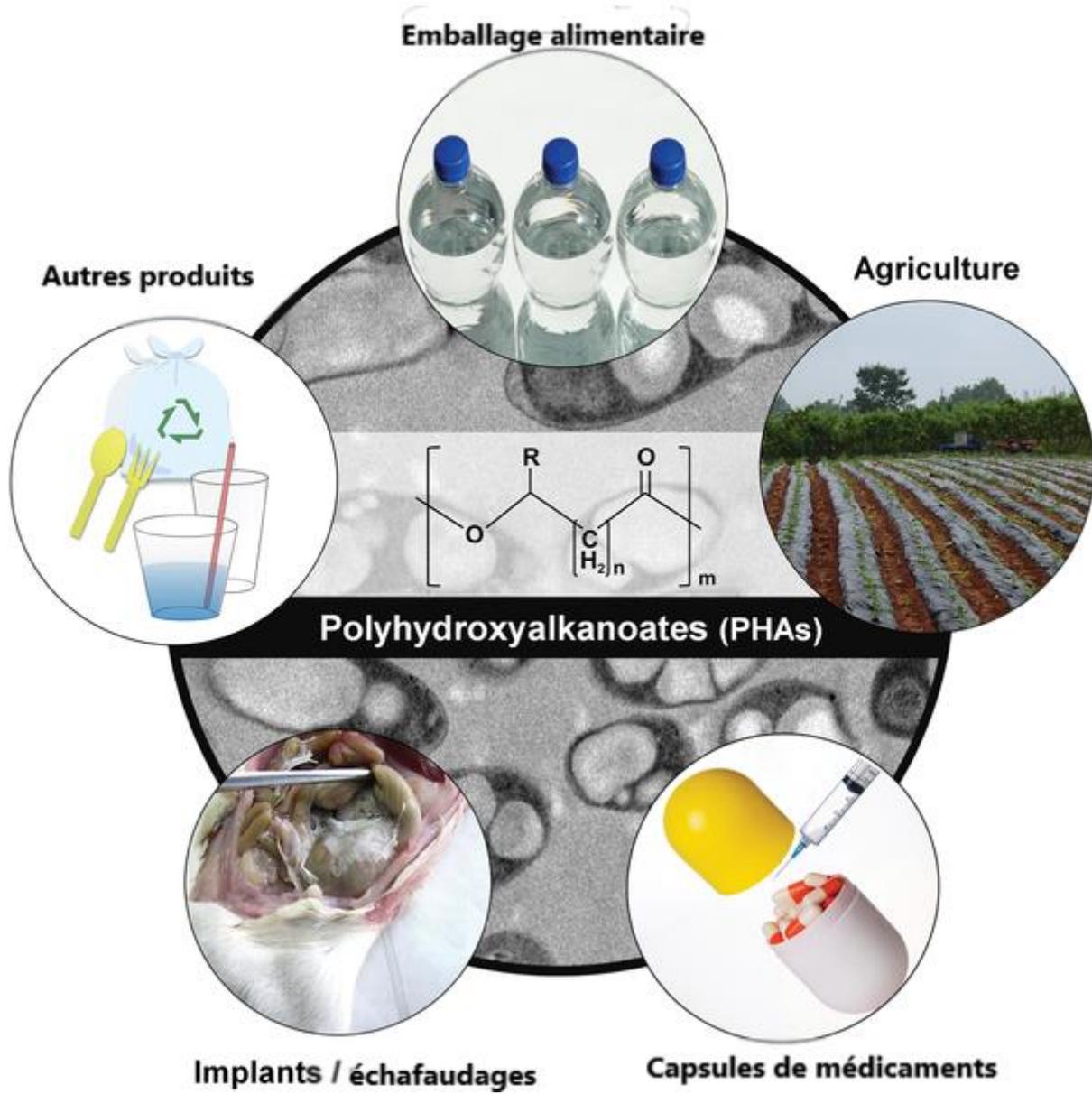


Figure 06 : Diverses applications des PHAs (Choi et al., 2020).

**Chapitre II :**  
**Microorganismes**  
**producteurs des PHAs**

À ce jour, plus de 300 espèces de micro-organismes capables d'accumuler des granules de PHAs dans leurs cellules ont été identifiées, et de nombreuses autres sont en cours d'investigation (**Park et al., 2020**).

Ces micro-organismes accumulent les PHAs en tant que réserves d'énergie et/ou de carbone lorsqu'ils se trouvent dans des conditions de carence en éléments tels que l'azote, le phosphore, le potassium, l'oxygène, le magnésium et le soufre, tout en disposant d'un excès de sources de carbone (**Chen, 2009**).

Parmi les micro-organismes les mieux étudiés figurent *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Halomonas*, *Burkholderia* et *Rhodospirillum*, qui peuvent utiliser diverses sources de carbone pour produire différents types des PHAs (**Sathiyarayanan et al., 2017 ; Park et al., 2020**).

En fonction de leurs besoins en nutriments, du stress nutritionnel et de leur mode de croissance, les bactéries accumulant des PHAs sont divisées en deux groupes (**kumar et al., 2020**).

Le premier groupe comprend des bactéries telles que *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas oleovorans* et *Pseudomonas putida*. Ces bactéries nécessitent une limitation en nutriments comme le phosphore (P), l'azote (N), l'oxygène (O) et le magnésium (Mg) pour stocker les PHAs et ne peuvent pas biosynthétiser les PHAs pendant leur phase de croissance (**Guzik et al., 2014**).

À l'inverse, le second groupe, qui inclut des bactéries telles qu'*Alcaligenes latus*, une souche mutante d'*Azotobacter vinelandii* et *Escherichia coli* recombinante, peut accumuler des PHAs indépendamment de la limitation en nutriments et est capable de les stocker durant sa phase de croissance (**Nitschke et al., 2011 ; Mohammadi et al., 2015**).

Dans cette revue bibliographique nous nous sommes limités au genre *Pseudomonas* pour leur polyvalence métabolique dans la production de composés à valeur ajoutée (**Poblete-Castro et al., 2014**).

### 1. *Pseudomonas*

#### 1.1. Généralités

Le genre *Pseudomonas*, décrit pour la première fois en 1894, est l'un des genres bactériens les plus diversifiés et ubiquitaires. Les espèces appartenant à ce genre ont été isolées dans une variété d'environnements à travers le monde, allant de l'Antarctique aux Tropiques. On les retrouve dans les sédiments, les échantillons cliniques, les spécimens d'animaux malades, ainsi

## Chapitre II : Microorganismes producteurs des PHAs

que dans l'eau, le sol, la rhizosphère des plantes, les milieux marins et les déserts (Peix et al., 2009). (Voir tableau 2).

Il comprend un grand nombre d'espèces, avec plus de 270 espèces nommées dans la taxonomie actuelle (Mulet et al., 2024).

C'est l'un des genres bactériens les plus complexes et détient actuellement le record du nombre d'espèces parmi les bactéries à Gram négatif. En effet, le nombre d'espèces appartenant à ce genre ne cesse de croître chaque année, (10 nouvelles espèces en 2013 et de 6 en octobre 2014.) (Gomila et al., 2015).

**Tableau 02** : Espèces saprophytes de *Pseudomonas* et source d'isolement. (Peix et al., 2009)

Espèces	Source d'isolement de la souche type	Espèces	Source d'isolement de la souche type
<i>P. mendocina</i>	Sol, eau et échantillons cliniques	<i>P. amygdali</i>	Prunus dulcis (Amandier)
<i>P. alcaligenes</i>	Eau de piscine.	<i>P. lutea</i>	La rhizosphère des Graminées en Espagne.
<i>P. alcaliphila</i>	Eau de mer.	<i>P. panipatensis</i>	Sol contaminé par le pétrole de la raffinerie de Panipat, Inde.
<i>P. fragi</i>	Lait, produits laitiers, eau	<i>P. proteolytica</i>	Échantillons de tapis cyanobactériens en Antarctique
<i>P. aeruginosa</i>	Echantillon clinique.	<i>P. stutzeri</i>	Appareil respiratoire des oiseaux.
<i>P. putida</i>	Sol et eau	<i>P. syringae</i>	Syringa vulgaris (Lilas)
<i>P. balearica</i>	Sédiments marins.	<i>P. veronii</i>	Eau minérale naturelle.
<i>P. fluorescens</i>	Réservoirs de préfiltration, boues activées et aliments	<i>P. xinjiangensis</i>	Un désert en Chine

### 1.2. Historique

Le nom *Pseudomonas a* été proposé par le professeur Migula, un botaniste de l'Institut de Karlsruhe en Allemagne à la fin du XIXe siècle. Sa description du nouveau genre était succincte : « Cellules avec des organes polaires de motilité ». La formation de spores se produit chez certaines espèces, mais elle est rare (par exemple : *Pseudomonas violacea*).

Aujourd'hui, il est établi que les souches de *Pseudomonas* ne produisent pas de spores, et il est possible que Migula ait observé des granules réfractiles de matériaux de réserve, souvent

confondus avec des spores. L'étymologie du terme *Pseudomonas* a ensuite été interprétée par les taxonomistes comme dérivant des mots grecs signifiant "faux" et "unité", bien qu'il soit plausible que Migula ait voulu indiquer "faux Monas", en référence à la ressemblance avec les nanoflagellés. Mais la description de Migula était insuffisante pour permettre une identification correcte (**Palleroni, 2010**).

**Orla-Jensen (1909)** a proposé au début du XXe siècle d'utiliser les caractéristiques physiologiques comme critère de base dans la taxonomie bactérienne (**Peix et al., 2009**).

Pendant de nombreuses années, le genre *Pseudomonas* a englobé un ensemble d'espèces souvent mal caractérisées. Cependant, les travaux de **Stanier et al. (1966)**, ont marqué un tournant majeur. Leurs travaux ont établi de manière précise les propriétés physiologiques et biochimiques nécessaires pour une identification taxonomique précise des espèces appartenant à ce genre. Devenant ainsi une référence en taxonomie bactérienne. Simultanément, les progrès dans l'extraction et la renaturation de l'ADN ont permis des comparaisons génétiques en taxonomie. Les études sur la composition des bases de l'ADN et l'hybridation ADN-ADN ont confirmé les classifications phénotypiques. (**Peix et al., 2009**)

En 1970, des recherches fondamentales en hybridation ARNr-ADN ont révélé que la classification traditionnelle du genre *Pseudomonas* nécessitait une réévaluation. Ces études ont mis en lumière la diversité taxonomique, révélant qu'il se compose en réalité de plusieurs genres distincts regroupés en cinq groupes d'homologie basés sur l'ARNr (**Hesse et al., 2018**). (Voir figure 07).

Actuellement, l'ARNr 16S est considéré comme la molécule fondamentale sur laquelle repose la taxonomie bactérienne, permettant ainsi une classification phylogénétique précise des *Pseudomonas* (**Gomila et al., 2015**). La comparaison de 1073 nucléotides a permis de les classées en 7 classes distinctes :

- Le groupe des *P. syringae*.
- Le groupe des *P. chlororaphis*.
- Le groupe des *P. fluorescens*.
- Le groupe des *P. putida*.
- Le groupe des *P. stutzeri*.
- Le groupe des *P. aeruginosa*.

Et le groupe des *P. pertucinogena*.

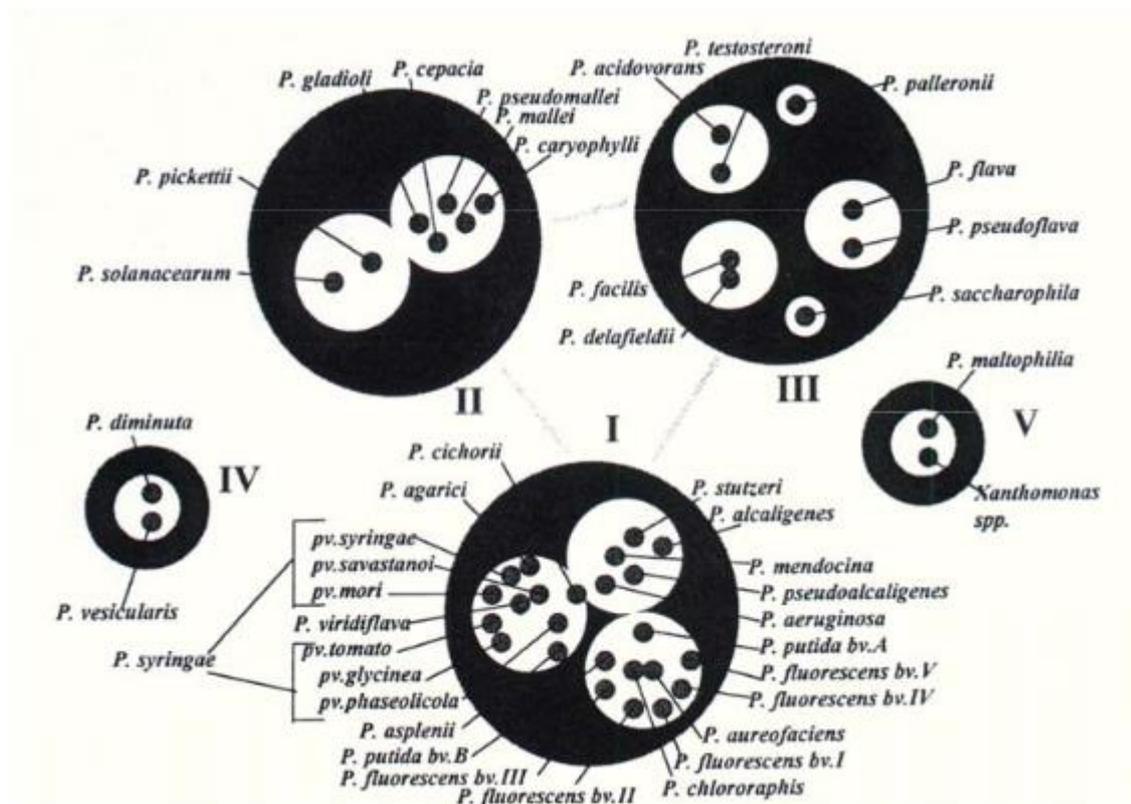


Figure 07 : Les 5 groupes d'homologie d'ARN ribosomal constituant le genre *Pseudomonas* (palleroni 1973).

### 1.3. Classification des *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* a été initialement décrit par Migula en 1894. La première classification des *Pseudomonas* a été introduite dans l'édition de 1923 du Manuel de Bergey (Das et al., 2020).

Domaine :	Bactéries
Embranchement :	Prokaryota
Phylum :	Proteobacteria
Classe :	Gammaproteobacteria
Ordre :	Pseudomonadales
Famille :	Pseudomonadaceae
Genre :	<i>Pseudomonas</i>

### 1.4. Caractéristiques générales des *Pseudomonas*

#### 1.4.1. Caractéristiques culturelles

Ces bactéries peuvent être facilement cultivées, qu'elles produisent ou non des pigments, sur des milieux minéraux synthétiques contenant une source de carbone simple, telle que l'acétate ou le pyruvate. Elles peuvent également être cultivées sur des milieux sélectifs à base de cétrimide, auxquels on peut ajouter de l'acide nalidixique (Avril et al., 2000).

Quelques espèces de ce genre se caractérisent par la production de deux pigments fluorescents, la pyoverdine de couleur jaune-vert qui peut être observée à une longueur d'onde d'excitation maximale de 370nm, elle est détectée dans le milieu de King B (composé de phosphate, sulfate, glycérol et peptone), où sa production est inhibée par les ions sodium et favorisée par les milieux pauvres en fer. (Voir tableau 3).

En plus, la pyocyanine de couleur bleue, une caractéristique unique de *P. aeruginosa*, étant la seule espèce à le produire. Elle exerce également une action bactériostatique sur certaines bactéries, en particulier les bactéries à Gram positif. Sa présence est détectée dans le milieu A de King, qui est caractérisé par une faible teneur en sels minéraux, du glycérol et de la peptone pepsique (Avril et al., 2000). (Voir Tableau 3).

#### 1.4.2. Caractéristiques morphologiques

Ce sont des bâtonnets à Gram négatif, non sporulés, droits ou légèrement incurvés mais non hélicoïdaux, de 0,5-1,0  $\mu\text{m}$  de diamètre et 1,5-5,0  $\mu\text{m}$  de longueur. Les *Pseudomonas* sont généralement mobiles à l'aide d'un ou plusieurs flagelles polaires monotriche, lophotriche ou multitriche, bien que certaines espèces soient rarement non mobiles. De plus, certaines espèces peuvent également développer des flagelles latéraux (Garrity, 2005).

Plusieurs espèces ou souches de *Pseudomonas* ne se développent pas à 37°C, tandis que la température de 30°C est adaptée à toutes, qu'elles soient pathogènes ou saprophytes (Avril et al., 2000).

#### 1.4.3. Caractéristiques physiologiques

Ces microorganismes présentent une faible longévité lorsqu'ils sont cultivés, même à une température de 4°C (Avril et al., 2000).

Diverses techniques de séchage sont adoptées, notamment la cryoconservation, l'atomisation, la fluidisation et la lyophilisation (Alonso, 2016 ; Jain et al., 2020).

### 1.4.4. Caractéristiques biochimiques

La plupart des espèces, voire toutes, ne parviennent pas à croître dans des conditions acides (pH 4,5 ou inférieur). La majorité des espèces ne nécessitent pas de facteurs de croissance organiques. Elles peuvent être oxydase positives ou négatives et sont catalase positives (Garrity, 2005). (Voir tableau 3).

### 1.4.5. Caractéristiques métaboliques

En conditions aérobies, ces bactéries chimio-organotrophes présentent un métabolisme strictement respiratoire, utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons. Cependant, dans certains cas, le nitrate peut servir d'accepteur alternatif d'électrons, ce qui permet une croissance en anaérobiose. (Garrity, 2005 et Avril et al., 2000).

**Tableau 03** : Quelques caractères différentiels des espèces du genre *Pseudomonas* (Avril et al., 2000 ; Lelliot et al., 1966).

Caractère	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. syringae</i>	<i>P. stutzeri</i>
Oxydase	+	+	+	+	+
Croissance à 4° C	-	+	V	V	-
Croissance à 41° C	+	-	-	-	+
Croissance sur KingA	+	-	-	+	-
Croissance sur KingB	+	V	V	+	-
Pyocyanine	+	-	-	+	-
Pyoverdine	+	+	+	+	-
Gélatinase	+	+	-	+v	-
Nitrate réductase	+	-	-	-	+

(+) : présence (-) : absence (V) : Variable

De plus, un autre critère morphologique est employé pour distinguer les membres du genre *Pseudomonas* des autres pseudomonades aérobies réside dans leur incapacité à accumuler des granules endocellulaires de poly-b-hydroxybutyrate (PHB) lorsqu'ils se développent dans des milieux à faible teneur en azote sur diverses sources de carbone. Plus récemment, il a été observé que les membres fluorescents de *Pseudomonas* peuvent accumuler des polyhydroxyalcanoates (PHAs) constitués de monomères de longueur de chaîne moyenne (C6 à C12) lorsqu'ils sont cultivés sur des sources de carbone telles que le gluconate, les alcanes et

les alcènes (Huisman et al., 1989 ; Anderson and Dawes, 1990 ; Steinbüchel and Valentin, 1995).

## 2. Potentiel de production

Les souches de *Pseudomonas* sont particulièrement étudiées pour leur polyvalence métabolique, les rendant efficaces comme usines cellulaires pour la production de composés à valeur ajoutée (Poblete-Castro et al., 2014).

Grâce à leur capacité de dégradation et à l'utilisation d'une large gamme de sources de carbone, elles sont considérées comme des candidates prometteuses pour diverses applications biotechnologiques. Les biopolymères extraits de ces bactéries trouvent des utilisations dans de nombreux domaines, allant des biens de consommation à la médecine. (Naveen et al., 2015 ; Pereira et al., 2019).

Parmi ces biopolymères, les polyhydroxyalcanoates (PHAs) qui se trouvent sous forme de granules insolubles principalement synthétisés par des espèces de *Pseudomonas* (Mozejko-Ciesielska et al., 2019).

La production des polyhydroxyalcanoates (PHAs) par les bactéries dépend de nombreux paramètres, notamment le rapport carbone/azote, la durée de culture, la température, le pH, ainsi que la disponibilité des macro-éléments et des micro-éléments (Lee, et al., 2004).

Cependant, le facteur clé est la capacité de l'espèce bactérienne à accumuler ces biopolymères. Le producteur industriel des PHAs doit pouvoir métaboliser des sources de carbone brut, atteindre un taux de croissance élevé et accumuler une grande quantité de biopolymères dans les cellules. Plusieurs espèces de *Pseudomonas* ont été reconnues pour leur capacité à synthétiser des polyhydroxyalcanoates en quantités importantes et à faible coût (Chanprateep, 2010). Le tableau 04 montre la teneur des souches de *Pseudomonas* en PHA.

**Tableau 04** : Comparaison de différentes souches de *Pseudomonas* productrices des PHAs utilisant différentes sources de carbone (Poblete-Castro, 2014 ; Kumar, 2020)

Souche bactérienne	Source de carbone	Biomasse (g/l)	Teneur en PHA (%)	Références
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	Heptadécanoïque	1.6	9.81	Impallomeni et al., 2018
<i>P. corrugata</i>	Mélasse de soja	1.5	17.0	Solaiman et al., 2006
<i>P. fluorescens</i>	Fructose	4.0	25.5	Lee, et al., 2001
<i>P. mendocina</i>	Liquide dérivé du biocarburant	3.65	77	Chanasit et al., 2016

## Chapitre II : Microorganismes producteurs des PHAs

<i>P. mosselii</i> TO7	Huile de palmiste	4.31	47.10	<b>Chen, et al., 2014</b>
<i>P. putida</i>	Glucose	61.8	67.1	<b>Poblete-Castro et al., 2014</b>
<i>Ps. mediterranea</i>	Glycérol brut	4.77	61.4	<b>Palmeri et al., 2012</b>

Les souches de *Pseudomonas putida* sont particulièrement prometteuses en tant que producteurs industriels efficaces de mcl-PHA. Elles peuvent accumuler de grandes quantités de polyesters même dans des conditions non optimales pour l'accumulation des PHAs (**Poblete-Castro, et al., 2012 b**).

### 3. *Pseudomonas putida*

*Pseudomonas putida* est un hôte idéal pour les applications biotechnologiques en raison de son taux de croissance rapide, de ses faibles besoins nutritionnels, de son métabolisme exceptionnellement diversifié et de sa forte capacité à générer du pouvoir réducteur. Ces qualités font de *Pseudomonas putida* un candidat très attractif pour diverses applications industrielles (**Ahmad, et al., 2023**).

De plus, cette espèce tolère une large gamme de conditions opérationnelles, y compris une vaste plage de pH, des températures élevées et des quantités importantes de produits chimiques dangereux et de solvants organiques. En raison de leur flexibilité métabolique étendue, les membres de cette espèce peuvent s'adapter à divers environnements et conditions nutritionnelles (**Poblete-Castro, et al., 2017**).

Au-delà de son utilisation initiale dans la dégradation de substances nocives, *Pseudomonas putida* est désormais exploitée avec succès dans la production de polymères biosourcés et divers composés. L'optimisation de cette bactérie en tant qu'usine cellulaire flexible pour les applications bio-industrielles repose sur le séquençage de son génome et la modélisation des voies métaboliques. Les variations génétiques et phénotypiques observées entre les souches de *P. putida* offrent un large éventail de possibilités pour des applications industrielles (**Poblete-Castro, et al., 2012 a**).

Cette bactérie produit spontanément des mcl-PHAs endogènes dans des conditions spécifiques, telles qu'un excès de carbone associé à une limitation en nutriments (N, O<sub>2</sub>, P, S), ces molécules servant de réserve d'énergie et de carbone. Parmi les produits les plus étudiés chez les espèces de *Pseudomonas* figurent les polyesters de la famille des PHAs.

## Chapitre II : Microorganismes producteurs des PHAs

Récemment, une souche proGrammée de *P. putida* KT2440, dotée d'un mécanisme de lyse cellulaire réagissant aux conditions de pression osmotique, a permis de récupérer environ 94% du mcl-PHA produit après 3 heures de disruption cellulaire. Ces avancées récentes ouvrent la voie à une réduction supplémentaire des coûts des processus de traitement en aval et des choix de matières premières (Ahmad, et al., 2023).

Le type de polyhydroxyalcanoates synthétisé varie en fonction de la voie métabolique empruntée par la bactérie. Les bactéries métabolisent les sources de carbone de manière différente.

Dans le cas des bactéries du genre *Pseudomonas*, deux voies métaboliques sont utilisées pour produire des précurseurs nécessaires à la synthèse des mcl-PHA. Comme le montre la figure ci-dessous :

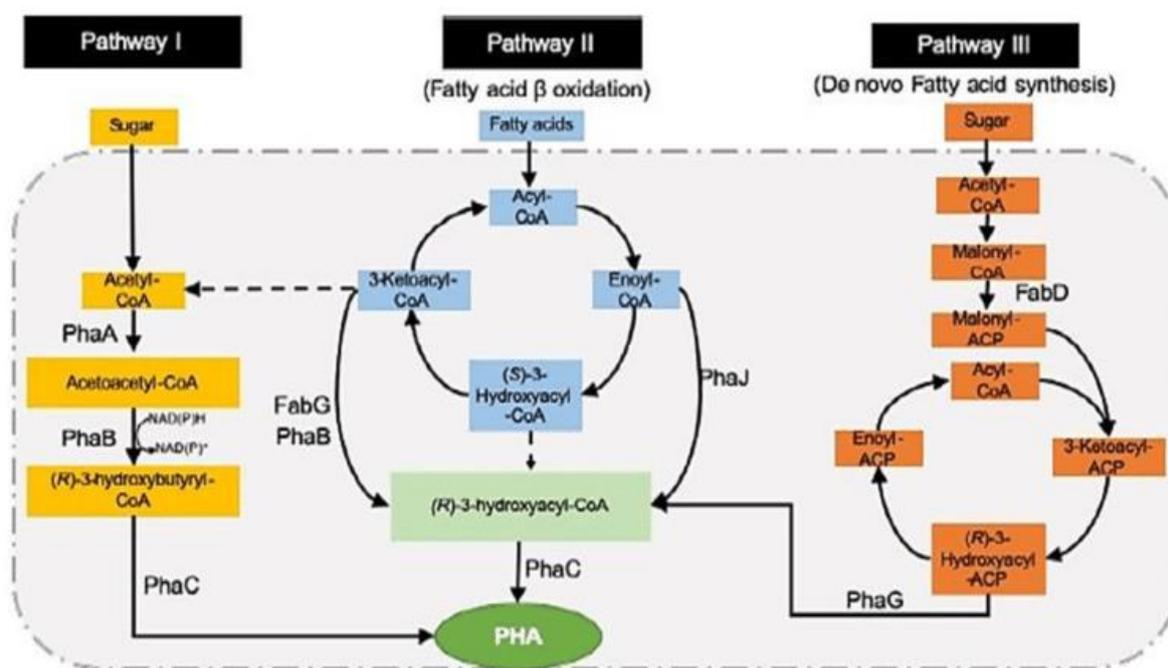


Figure 08 : Les trois principales voies métaboliques de la biosynthèse des PHAs. (Khatami et al., 2020).

**PhaA** est la  $\beta$ -cétotliolase ; **PhaB** est l'acétoacétyl coenzyme A(CoA) réductase ; **PhaC** est la PHA synthase ; **FabG** est la 3-kétoacyl acyl carrier protein (ACP) réductase ; **PhaG** est l'acyl-ACP-CoA transacylase ; **PhaJ** est l'énolyl-C.

Chaque voie utilise un substrat distinct pour fournir des précurseurs 3-hydroxyacyl (3HA), qui sont ensuite utilisés pour synthétiser les mcl-PHA :

### ✓ Voie II (Associée au métabolisme des acides gras)

Les pseudomonades dégradent les sources de carbone aliphatiques, comme les acides gras, via le processus de  $\beta$ -oxydation. Ce processus implique l'oxydation des acides gras en enoyl-CoA, (S)-3-hydroxyacyl-CoA et (R)-3-cétoacyl-CoA, qui sont ensuite convertis en (R)-3-hydroxyacyl-CoA.

### ✓ Voie III (Utilise des substrats simples)

Les espèces de ce genre peuvent également utiliser la voie de synthèse *de novo* des acides gras pour produire des monomères de mcl-PHA à partir de sources de carbone non apparentées telles que le glucose, le gluconate ou l'éthanol. Dans ce processus, ces substrats sont oxydés en acétyl-CoA, puis convertis par une série de réactions en malonyl-CoA, qui est ensuite activé par transacylation en (R)-3HA-protéine porteuse d'acyle (ACP). Les intermédiaires acyl-ACP et malonyl-ACP sont transformés en (R)-3-hydroxyacyl-ACP, qui est ensuite allongé par des unités successives de deux carbones. Dans la plupart des pseudomonades, l'enzyme spécifique PhaG transacylase convertit les intermédiaires acyl-ACP en (R)-3-hydroxyacyl-CoA.

La première voie métabolique de synthèse des PHAs a été bien étudiée chez d'autres genres bactériens tel que *Cupriavidus necator*. Cette voie commence par la production de monomères de 3HB via le cycle de Krebs, où l'enzyme bêta-céto-thiolase catalyse la condensation de deux molécules d'acétyl-CoA pour former de l'acétoacétyl-CoA. La formation de 3-hydroxybutyryl-CoA résulte de l'action de l'acétoacétyl-CoA réductase sur l'acétoacétyl-CoA. Finalement, la synthèse de P(3HB) est catalysée par la PHA synthase, qui polymérise le 3-hydroxybutyryl-CoA en P(3HB) par estérification (Verlinden et al., 2007).

L'ingénierie métabolique et les avancées récentes en protéomique, génomique, génie génétique et outils biologiques synthétiques ont créé une plate-forme commune qui permet d'intégrer diverses technologies multidisciplinaires pour la modification des voies biochimiques afin de manipuler et optimiser la production des PHAs, avec pour objectif principal de les rendre plus compétitifs sur le marché (Kumar et al., 2017, 2018 ; Khatami, et al., 2020).

L'étude protéomique de *P. putida* KT2440 menée par Mozejko-Ciesielska et Mostek, (2019) a montré que cette souche pourrait être utile pour accroître l'efficacité de la production des PHAs et améliorer la rentabilité.

**Chapitre III : Procédé de  
production de  
Polyhydroxyalcanoates  
(PHAs).**

**1- Production de bioplastique**

Le choix de la stratégie opérationnelle pour la production des polyhydroxyalcanoates (PHAs) bactériens dépend de divers facteurs, incluant la source de carbone (par exemple, des substrats définis comme le glucose ou des substrats complexes tels que les déchets), le type de culture (pure ou mixte), le mode de fermentation (discontinu, discontinu alimenté, continu), ainsi que le type de bioréacteur utilisé (réacteur à air ou réacteur à cuve agitée continue (CSTR)). La fermentation peut être réalisée en une seule étape ou en plusieurs étapes dans un système de séquençage par lots (SBR). Le tableau 5 présente un récapitulatif de divers procédés récemment employés en tenant compte des facteurs susmentionnés, en le comparant en termes de concentration cellulaire, de concentration en PHAs et de productivité (Amache et al., 2013).

**Tableau 05 :** Comparaison des processus actuels utilisés pour la production de *Pseudomonas* (Amache R et al., 2013).

Organisme	Source de Carbon	Bioréacteur (V/WV)	CT (h)	Les étapes	Fermentation / Type de Procède	Cellule Conc (g/L)	Prod (g/L/h)	Références
<i>P. aeruginosa</i>	Mélasse de canne à sucre	7.5/2.5L STR	54	Unique	Batch	7.32	0.61	(Tripathi et al., 2012)
<i>P. putida</i>	Huile de maïs hydrolysée	Fermenteur en bocal de 30 L	46	Unique	Fed-Batch	103	0.45	(Shang et al., 2008)
<i>B.megaterium</i>	Mélasse de canne à sucre	Fermenteur à bocal de 5/3 L	12	Unique	Batch	8.87	0.61	(Kulpreecha et al., 2009)
<i>C. necator</i>	Glycérol	3/2L STR	60	Unique	Fed-Batch	75	0.11	(Tanadchangsang et Yu, 2012)

**Prod=productivité, (v/wv) volume/volume de travail, CT= temps de culture (h), STR= réacteur à cuve agitée.**

La fermentation discontinue pour la production des PHAs est une approche couramment utilisée en raison de sa flexibilité et de ses coûts d'exploitation relativement faibles. Cependant, elle présente l'inconvénient d'une productivité en PHAs limitée, car après l'épuisement de la

source de carbone, les cellules bactériennes commencent à dégrader les PHAs accumulés, diminuant ainsi la teneur en PHAs (Zinn et al., 2001).

Le coût des matières premières, en particulier des sources de carbone, constitue l'un des facteurs les plus déterminants pour l'économie générale de la production des polyhydroxyalcanoates (PHAs), notamment pour les procédés à grande échelle (Castilho et al., 2009). Par conséquent, la faisabilité économique de la production des PHAs en grande quantité est intrinsèquement liée au développement de processus de fermentation efficaces utilisant des sources de carbone peu coûteuses. L'utilisation de déchets comme sources de carbone présente l'avantage supplémentaire de réduire simultanément les coûts d'élimination des déchets et de produire des produits à valeur ajoutée (Du et al., 2012).

#### 2- Souches, mécanismes et rôle des microorganismes productrices des PHAs

La production des polyhydroxyalcanoates (PHAs) à partir de cultures bactériennes est plus économique que celle réalisée à partir d'autres organismes vivants, tels que les plantes, en raison de leur capacité supérieure à accumuler ces polymères (Verlinden et al., 2007). Les espèces bactériennes les plus couramment étudiées pour la biosynthèse et la production des PHAs sont *Cupriavidus necator* (également connu sous les noms de *R. eutropha* ou *A. eutropha*) (Vandamme et Coenye, 2004 ; Vanechoutte et al., 2004). Ces souches ont été initialement utilisées par la société Imperial Chemical Industries pour produire un copolymère des PHAs, le poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) (PHBV), commercialisé sous le nom de Biopol. La production des PHAs via le procédé de fermentation utilisant *C. necator* est plus économique que d'autres procédés. Récemment, de nouveaux procédés et technologies ont été développés pour produire des PHAs à moindre coût, tout en utilisant également les gènes de la PHA synthase de *C. necator*. De plus, d'autres souches bactériennes potentielles ont été récemment étudiées pour la production des PHAs en fonction de leur rendement, telles que *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Aeromonas hydrophila*, *RhodoPseudomonas palustris*, *Burkholderia sacchari* et *Halomonas boliviensis* (Voir tableau 6).

De nombreux groupes d'organismes vivants sont capables de synthétiser des polyhydroxyalcanoates (PHAs) et de les stocker sous forme de granules intracellulaires. La production des PHAs à l'échelle industrielle a été réalisée à l'aide de systèmes végétaux et bactériens. En raison des limitations physiologiques inhérentes au système végétal, celui-ci ne peut stocker les PHAs qu'à hauteur d'environ 10 % de sa biomasse sèche, au-delà de quoi cela

### Chapitre III : Procédé de production de Polyhydroxyalcanoates (PHAs).

impacte négativement la croissance de la plante (Verlinden et al., 2007). Ce problème persiste actuellement dans le système végétal, rendant la production des PHAs à partir de plantes non rentables.

**Tableau 06** : Souches bactériennes impliquées dans la production des PHAs en utilisant une gamme variée de sources de carbone (Kumar et al., 2020).

Souche bactérienne	Source de carbone	PHAs CDW% (w/w)	PHAs (g/L)	Type de polymère	Référence
<i>P. putida</i> Bet001	Acids grass	49.7-68.9	10.1 -5.45	mcl	(Gumel et al., 2014)
<i>P. putida</i> GO16	Acide téréphtalique	27.0	0.250	mcl	(Kenny et al., 2008)
<i>P. fluorescens</i> A2a5	Liqueur de canne à sucre	70,0	22.0	Scl	(Jiang et al., 2008)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Produits pétroliers et cires issus de la de la pyrolyse du polyéthylène (PE)	25.0	—	d mcl-PHA	(Guzik et al., 2014)
<i>Pseudomonas putida</i>	Saindoux et huile de coco	0.9--1.6	—	PHA	(Solaiman et al., 1999)
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Acide 4-Hydroxyhexanoïque, Glucose	25.3-29.8, 32.1	—	mcl-PHA	Sun et al. (2007) ; Davis et al. (2013)
<i>Pseudomonas</i> sp. PS1	Huile de cuisson	—	2.30	—	(Prasad et Seth, 2013)

Cependant, l'accumulation de polyhydroxyalcanoates (PHAs) dans les systèmes bactériens est un mécanisme intrinsèque permettant aux bactéries de s'ajuster aux fluctuations environnementales et aux déséquilibres nutritionnels (Kumar et Thakur, 2018). Ces polymères biologiques s'accumulent à l'intérieur des bactéries en présence d'une abondance de sources de carbone dans le milieu de culture, tandis que les nutriments essentiels tels que l'azote, le

phosphore et l'oxygène sont limités (**Mozejko-Ciesielska et Kiewisz, 2016**). Du fait de leur insolubilité dans l'eau, cette accumulation intracellulaire des PHAs confère un avantage adaptatif aux bactéries en tant que réserve de carbone, pouvant être mobilisée pour fournir de l'énergie lors de périodes de privation nutritionnelle (**Raza et al., 2018**).

La polymérisation des précurseurs de polyhydroxyalcanoates (PHAs) solubles en polymères des PHAs insolubles se produit à l'intérieur du système bactérien et ne perturbe pas l'équilibre osmotique des cellules bactériennes. Ce mécanisme présente un avantage pour le système bactérien en prévenant la libération des PHAs de l'intérieur vers l'extérieur des cellules, tout en maintenant la disponibilité de la source de carbone et d'énergie à un coût de maintenance réduit (**Potter et al., 2002**).

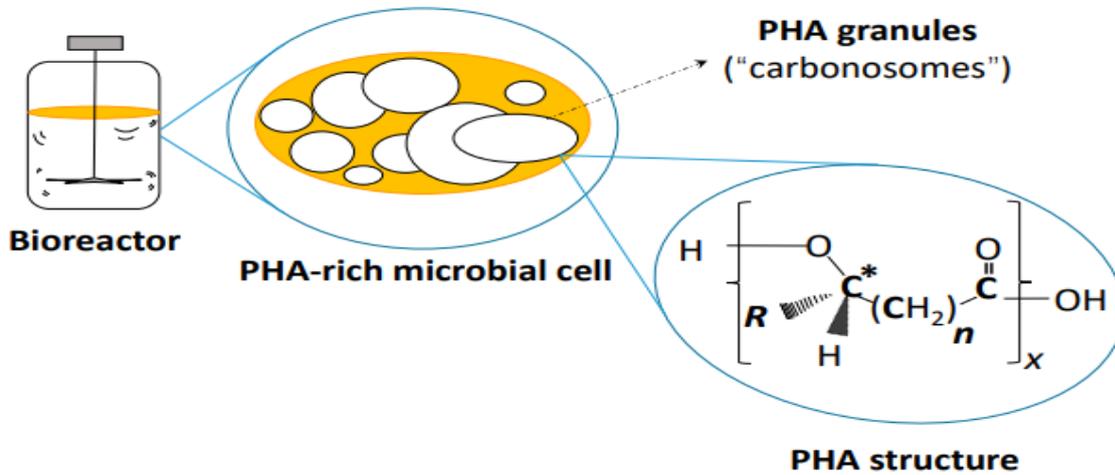
### 3- Stratégies de fermentation

La productivité des polyhydroxyalcanoates (PHAs) par les bactéries est influencée par divers facteurs, tels que le rapport source de carbone/source d'azote, la durée de culture, la température, le pH, ainsi que la présence de macro et microéléments essentiels (**Lee et al., 2004**). Cependant, le facteur le plus crucial est l'espèce bactérienne capable d'accumuler ces biopolymères. Bien que de nombreux micro-organismes aient été examinés pour la synthèse des PHAs, la majorité ne présente pas une capacité prometteuse pour la production et l'accumulation de ces biopolyesters. Un producteur industriel des PHAs doit répondre à plusieurs critères, tels que la capacité à métaboliser des sources de carbone économiques, pour garantir un taux de croissance élevé et une teneur élevée en biopolymères au sein des cellules bactériennes.

Plusieurs espèces de *Pseudomonas* ont été identifiées comme capables de synthétiser des PHAs en quantités significatives et à moindre coût (**Chanprateep, 2010**). La productivité en PHAs des bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* peut être aussi élevée que celle obtenue avec d'autres genres bactériens tels que *Cupriavidus*, *Burkholderia* et *Haloferax*. Les procédés de fermentation utilisant ces procaryotes ont été largement étudiés (**Mozejko-Ciesielska et Kiewisz, 2016**). Pour optimiser le rendement en PHAs, différentes stratégies de fermentation ont été employées, y compris les procédés par batch et les processus continus. Afin d'augmenter la productivité en polymères des bactéries dans un délai court, les cultures peuvent être effectuées sous des conditions variées. Le tableau 7 présente un aperçu des

### Chapitre III : Procédé de production de Polyhydroxyalcanoates (PHAs).

résultats obtenus en utilisant diverses stratégies de culture et différentes espèces de *Pseudomonas* comme producteurs des PHAs.



**Figure 09** : Schéma d'une cellule microbienne riche en PHAs dans un bioréacteur schématique et structure chimique générale du PHA.

X : Degré de polymérisation (nombre de monomères) ; R : chaîne latérale des monomères ; n : Nombre de groupes méthylène dans le squelette du monomère ; \* : atome de carbone asymétrique de la plupart des monomères (exception : 4HB). 3-hydroxybutyrate (3HB), R = CH<sub>3</sub>, n = 1, (scl-PHA) ; 3-hydroxyvalérate (3HV), R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, n = 1, (scl-PHA) ; 4-hydroxybutyrate (4HB), R = H, n = 2, (scl-PHA ; achiral) ; 3-hydroxyhexanoate (3HHx), R = C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, n = 1, (mcl-PHA) ; 3-hydroxyoctanoate (3HO), R = C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, n = 1, (mcl-PHA) (**Martin, 2018**).

## Chapitre III : Procédé de production de Polyhydroxyalcanoates (PHAs).

**Tableau 07** : Résumé des résultats des différentes stratégies de fermentation pour la production des PHAs par *Pseudomonas sp* (Justyna Mozejko et al., 2019).

Souche microbienne	Sources de carbone	Biomass (g l <sup>-1</sup> )	PHA content (%)	Mw (kDa)	Mn (kDa)	Tm (°C)	Tg (°C)	References
<b>Fermentation en discontinu</b>								
<i>Ps. putida</i> GO16	Acide téréphtalique	1.0	27.0	7.4	3.7	35	-53	(Kenny et al., 2008)
<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 27853	Acide oléique	0.38	15	57	26	50	-52	(Impallomeni et al., 2011)
	Acide érucique	0.866	9.3	122	63	50	46	
	Acide nervonique	0.416	10	114	56	50	-43	
<i>Ps. putida</i> KT2442	Acide décanoïque	5.78	15.2	ND	ND	ND	ND	(Liu et al., 2011)
	Acide dodécanoïque	6.96	14.9	100.0	80.0	53	-44	
	Acide tétradécanoïque	2.74	21.82	ND	ND	ND	ND	
<b>Fermentation en fed-batch</b>								
<i>Ps. Putida</i> KT2440	Glucose	2.0	1.7	ND	ND	ND	ND	(Wang et Nomura, 2010)
	Glycérol	1.4	1.6	ND	ND	ND	ND	
	Citrate	1.8	0.4	ND	ND	ND	ND	
<i>Ps. putida</i> KTQQ20	Acide décanoïque	0.94	4.61	361.4	284.6	72.2	37.21	(Liu et al., 2011)
	Acide dodécanoïque	1.03	9.19	155.5	119.4	77.62	32.94	
<b>Fermentation continue</b>								
<i>Ps. putida</i> KT2440	Octanoate de potassium, 10-undécénoate	ND	42	ND	ND	ND	ND	(Follonier et al., 2012)

### 3.1 Cultures en discontinu

En raison de leur coût de production raisonnable, les procédés de fermentation en mode batch sont couramment utilisés dans l'industrie de la fermentation. Cette stratégie de culture fermée repose sur l'ajout initial d'une source de carbone dans le milieu de culture, suivi de la récupération du bio polymère à la fin du processus. Le système est maintenu dans des conditions

constantes et non perturbées (Kaur et Roy, 2015). Deux approches peuvent être employées dans la fermentation en batch : la culture en une étape et la culture en deux étapes (Kimet *al.*, (1997).

Dans le processus en une étape, la croissance cellulaire, la synthèse et l'accumulation des biopolymères se déroulent simultanément. À l'inverse, le processus en deux étapes comporte deux phases distinctes : la croissance microbienne et l'accumulation des biopolymères (Chee *et al.*, 2010). Au cours de la première phase, les conditions de culture sont optimisées pour assurer une concentration cellulaire bactérienne suffisante. Durant la seconde (phase de limitation des nutriments), bien que le taux de croissance bactérienne reste stable, les cellules commencent à accumuler les PHAs de manière intracellulaire (Lee, 1996).

Cependant, la fermentation en batch peut parfois aboutir à un rendement en polyhydroxyalcanoates inférieur en raison de la dégradation des PHAs accumulés, utilisés par les cellules comme source de carbone et d'énergie une fois le substrat entièrement consommé. Cette dégradation peut entraîner une diminution de la quantité finale de produit (Zinn *et al.*, 2001).

La fermentation discontinue a été utilisée pour l'étude et l'optimisation des homopolymères de mcl-PHA synthétisés par les espèces de *Pseudomonas* (Rai *et al.*, 2011). Par exemple, la production discontinue de 3-hydroxyoctanoate [P(3HO)] par *Pseudomonas mendocina*, cultivé sur de l'octanoate de sodium, a permis d'obtenir un rendement de 31,38 % de cet homopolymère. De plus, il a été rapporté que des espèces de *Pseudomonas* peuvent utiliser des hydrocarbures aromatiques comme matière première pour produire des mcl-PHA avec différentes compositions monomériques.

Des recherches utilisant des fermentations discontinues de substrats mono-aromatiques ont démontré que les souches de *Pseudomonas* étaient capables de synthétiser jusqu'à 19,2 % de la masse cellulaire sèche (CDW) lorsqu'elles étaient cultivées sur de l'o-xylène et du 3-méthylphénol. Les mcl-PHA produits contenaient principalement du 3-hydroxyoctanoate (3HO), du 3-hydroxydécanoate (3HD) et du 3-hydroxydodécanoate (3HDD), avec une petite quantité de 3-hydroxyhexanoate (3HHx). De plus, une composition monomérique similaire a été observée lorsque *Pseudomonas sp. TN301* a été cultivé sur du naphthalène, atteignant une productivité en PHAs de 22,9 mg/g CDW (Narancic *et al.*, 2012).

En revanche, une concentration plus faible de mcl-PHA a été obtenue lors de la culture par batch en deux étapes de *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853* utilisant les acides oléique,

éricique et nervonique. Dans ces cas, les PHAs étaient composés de cinq monomères, avec une prédominance de 3-hydroxyoctanoate et de 3-hydroxydécanoate, et des quantités moindres de 3-hydroxyhexanoate, 3-hydroxydodécanoate et 3-hydroxy-5-tétradécénoate (**Impallomeni et al, 2018**).

Des extrêmophiles du genre *Pseudomonas* ont également été utilisés pour la synthèse des PHAs. Par exemple, *Pseudomonas sp. SG4502*, une bactérie thermophile, a produit jusqu'à 40% de mcl-PHA en poids sec cellulaire à partir de sous-produits de biodiesel comme source de carbone (**Satoh et al., 2011**). Goh et Tan (**Goh et Tan, 2012**) ont démontré que des souches de *Pseudomonas* isolées des sols de l'Antarctique étaient capables de synthétiser des mcl-PHA, atteignant une teneur maximale de 48 % du CDW avec *Pseudomonas sp. UMAB-40* cultivé sur octanoate. Les biopolyesters accumulés contenaient principalement du 3-hydroxyhexanoate et du 3-hydroxyoctanoate, ainsi qu'une petite quantité de 3-hydroxydécanoate.

*Pseudomonas extremaustralis 14-3b*, une bactérie hautement résistante au stress et isolée de l'Antarctique, a été largement étudiée pour son potentiel de synthèse des PHAs. Cette souche a montré une capacité d'accumulation significative de PHB et de petites quantités de mcl-PHA lorsqu'elle est cultivée avec de l'octanoate ou du glucose comme source de carbone (**Catone et al., 2014**).

### 3.2 Culture en lots alimentés

La culture en fed-batch est un processus plus efficace que la culture en batch, car elle permet d'obtenir une densité cellulaire bactérienne élevée ainsi qu'une concentration maximale de bioproduits (**Chee, et al (2010), Kaur, et al (2012)**). Lors de la fermentation Fed-batch, le milieu de croissance est complété par des portions supplémentaires de substrat. Cette stratégie de bioprocédé assure une régulation constante des nutriments, évite les limitations en carbone, et favorise la croissance optimale des micro-organismes ainsi que l'accumulation de bioproduits (**Kaur et al., 2012**). Ce type de culture est considéré comme la méthode la plus efficace pour la production industrielle des PHAs.

Il a été démontré que la Co-alimentation dans les cultures Fed-batch pouvait améliorer la production des PHAs. Selon Jiang et al. (**Jiang et al., (2013)**), *Pseudomonas putida KT2440* est capable d'accumuler une plus grande quantité de mcl-PHA en utilisant l'acide acrylique en combinaison avec de l'acide nonanoïque et du glucose comme Co-substrats dans une culture Fed-batch. Les auteurs ont constaté que cette bactérie synthétisait 75,5 % des PHAs avec 89 % en mole de HN, à un rapport de masse acide nonanoïque/glucose/acide acrylique de 1,25 :1

:0,05 et un taux de croissance spécifique de  $0,15 \text{ h}^{-1}$ . Une teneur plus faible en mcl-PHA (32 % de la CDW) a été rapportée par Davis et al. (Davis et al., 2014) lorsque de l'acide nonanoïque était fourni aux cellules cultivées sur glucose sans apport d'oxygène pur ou d'air enrichi en oxygène. Des résultats prometteurs ont également été publiés par Chen et al. (Chen et al., 2014) ont démontré qu'une souche nouvellement isolée, TO7, appartenant à *Pseudomonas mosselii*, cultivée sur de l'huile de palmiste, était capable d'accumuler des mcl-PHA à une concentration de 47,1 % de la masse cellulaire sèche (CDW). Cependant, l'utilisation d'huile de soja a réduit la teneur en biopolymères dans ces cellules bactériennes à 28,6 % de la CDW (Liu et al., 2018).

### 3.3 Culture continue

La culture continue est reconnue pour améliorer la productivité et garantir une grande constance et uniformité de la qualité du produit, tout en assurant la stabilité génétique à long terme de l'organisme (Lillo et Rodriguez-Valera, 1990). Une fois les conditions d'équilibre atteintes, la concentration de biomasse active, la teneur en PHAs et les substrats sont maintenus constants. La récolte des cellules se fait également en continu sous ces conditions (Koller et Muhr, 2014). Toutefois, l'utilisation de cette stratégie de culture pour la production des PHAs à l'aide de *Pseudomonas sp.* a été limitée à quelques exemples seulement.

L'un des principaux inconvénients de cette technique réside dans le risque de contamination microbienne, qui peut compromettre des lots de fermentation entiers et entraîner ainsi des pertes économiques considérables (Koller et Braunegg, 2015). La première biosynthèse continue de mcl-PHA a été réalisée à l'aide de *Pseudomonas putida GPol* (Ramsay et al., 1991). Les auteurs ont confirmé que la culture en continu permettait de fournir aux cellules bactériennes un substrat suffisant sans atteindre des concentrations inhibitrices dans le milieu de culture.

Avec un taux de dilution de  $0,24 \text{ h}^{-1}$  et un rapport carbone/azote croissant, le pourcentage des PHAs dans la biomasse restait constant (13 % de la CDW). Lorsque le taux de croissance spécifique était inférieur au taux de croissance spécifique maximal de  $0,3 \text{ h}^{-1}$ , les PHAs extraits présentaient une proportion constante de monomères avec un ratio 3HB/3Hx/3HO/3HD de 0,1 :1,7 :20,7 :1,0. En raison des concentrations plus élevées d'octanoate non métabolisé dans le fermenteur, une augmentation de la  $\mu_{\text{max}}$  a été observée, entraînant une diminution du pourcentage de 3HO avec une augmentation concomitante des monomères 3HD.

*Pseudomonas oleovorans ATCC 29347*, cultivé sur de l'octane gazeux, forme également des mcl-PHA de manière efficace à des taux de croissance inférieurs au taux de croissance spécifique maximal dans un système continu à deux étapes.

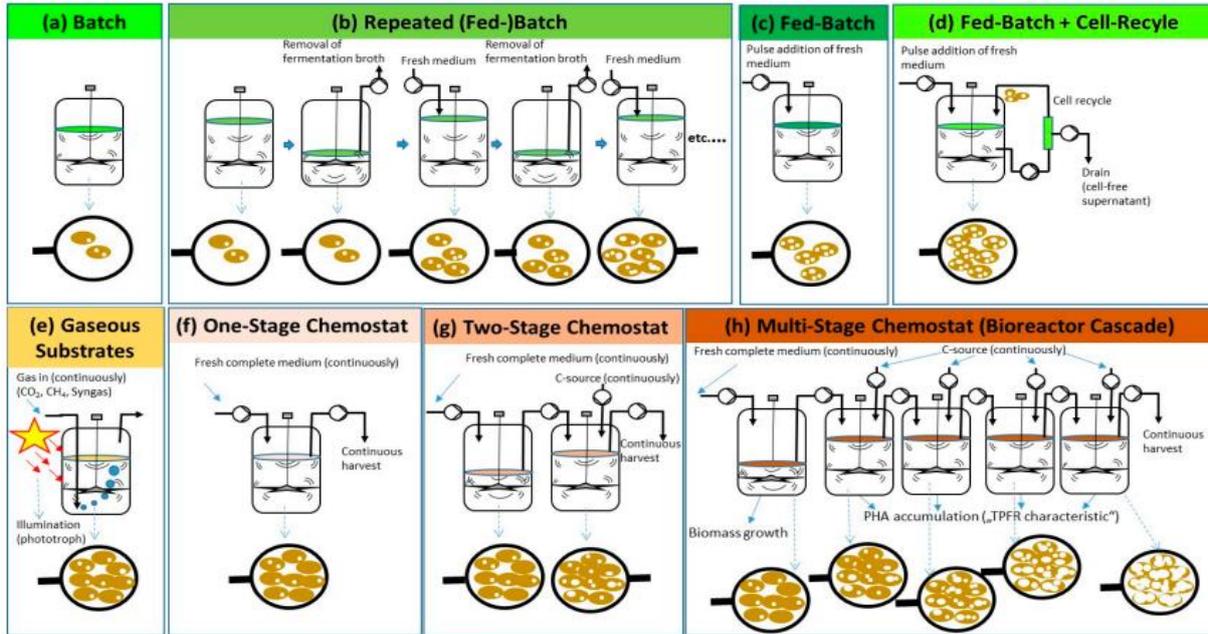
### Chapitre III : Procédé de production de Polyhydroxyalcanoates (PHAs).

---

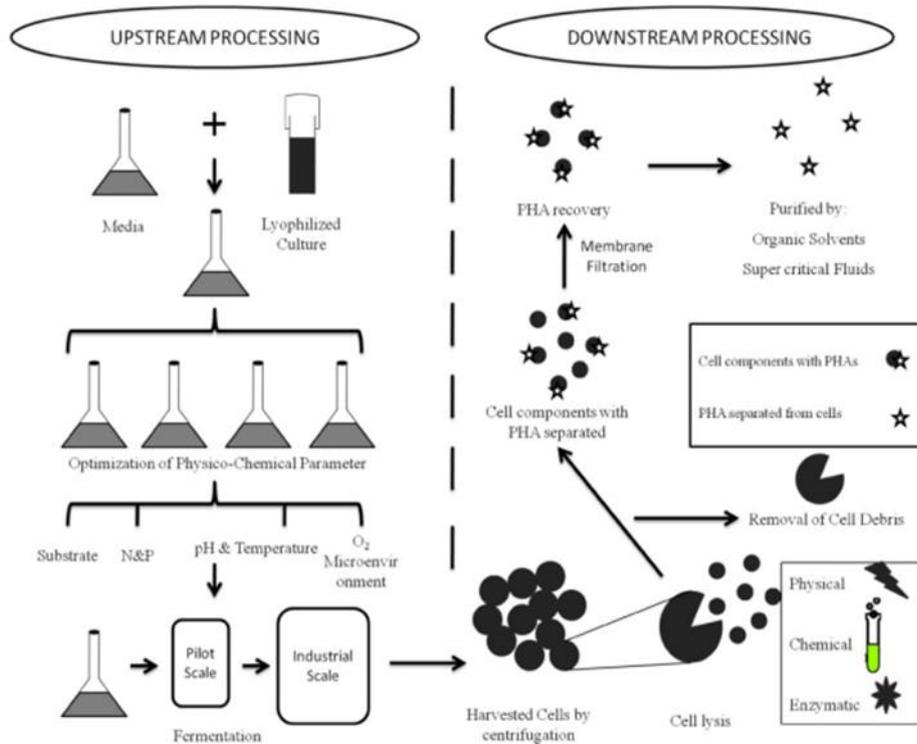
La connexion en série de deux biofermenteurs a été confirmée comme une approche efficace pour obtenir un taux de croissance spécifique optimal des bactéries dans le premier compartiment, ce qui conduit à une production accrue des PHAs dans le second compartiment. Dans les conditions expérimentales appliquées, les cellules de *Pseudomonas oleovorans* ont synthétisé 63 % des PHAs par rapport à la masse cellulaire sèche (CDW) dans l'effluent du second fermenteur. En raison des cinétiques de croissance cellulaire et d'accumulation de mcl-PHA différentes, le bioprocédé en deux étapes mentionnées ci-dessus semble être plus efficace qu'une installation à une seule étape. L'accumulation maximale de mcl-PHA est atteinte lorsque les cellules croissent à un taux spécifique maximal ( $\mu_{max}$ ) de  $0,21 \text{ h}^{-1}$ , tandis que le  $\mu_{max}$  de *Pseudomonas oleovorans* est de  $0,48 \text{ h}^{-1}$ , comme cela a été démontré dans les cultures en chemostat à une étape.

Récemment, Follonier et al (**Follonier et al., 2012**). Ont réalisé une culture continue en trois étapes pour la production de mcl-PHA à l'aide de *Pseudomonas putida KT2440* sous haute pression. Les données montrent que la teneur en mcl-PHA, le rendement sur le substrat et la productivité volumétrique augmentent simultanément sous haute pression. Il a été estimé que l'apport d'oxygène sous haute pression au milieu de culture serait suffisant pour tripler la productivité du mcl-PHA dans le système chemostat, passant de  $3,4 \text{ g/l/h}$  à  $11 \text{ g/l/h}$ .

## Chapitre III : Procédé de production de Polyhydroxyalcanoates (PHAs).



**Figure 10 :** Schémas des régimes de processus décrits pour la biosynthèse des PHAs dans des bioréacteurs exploités différemment : (a-d) : processus discontinus ; (a) batch ; (b) fed-batch répété ; (c) fed-batch ;(d) fed-batch avec recyclage des cellules pour la rétention de la biomasse ; (e) production des PHAs sur des substrats gazeux (CO<sub>2</sub> CH<sub>4</sub>, gaz de synthèse) ; l'illumination est indiquée pour les processus photoautotrophes sur CO<sub>2</sub> (cyanobactéries) ou gaz de synthèse (*Rhodospirillum rubrum*) ; (f-h) : processus continu ; (f) processus chemostat à une étape,(g) processus chemostat à deux étapes ; (h) processus continu à plusieurs étapes dans un bioréacteur en cascade (Koller, 2018).



**Figure 11 :** Synthèse des biopolymères (Girdhar et al., 2013).

#### 4- Méthodes d'extraction des PHA de la biomasse microbienne

L'extraction des polyhydroxyalcanoates (PHAs) à partir de la biomasse cellulaire ainsi que leur traitement subséquent constituent des processus complexes et onéreux, en raison de leur nature de matériaux de stockage intracellulaire (**Mohammadi et al., 2012**). Diverses méthodes d'extraction et de traitement en aval des PHAs ont été rapportées dans la littérature, chacune présentant des avantages et des inconvénients distincts.

Les techniques couramment utilisées pour l'extraction et la récupération des PHAs à partir de la biomasse sont décrites en détail ci-dessous (voir tableau 8).

##### ➤ 4.1 Extraction par solvant

L'extraction des polyhydroxyalcanoates (PHAs) à partir de la biomasse via l'utilisation de solvants représente la méthode la plus répandue et la plus complète, en raison de sa praticité et de sa simplicité (**Kumar et al., 2018a**). Ce processus comprend plusieurs étapes, débutant par la disruption des cellules bactériennes pour libérer les molécules des PHAs stockées. Par la suite, ces molécules sont dissoutes dans un solvant approprié, puis les granules des PHAs dissous sont précipités à l'aide d'un non-solvant. Des solvants chlorés tels que le chloroforme, le carbonate de propylène, le dichlorométhane, l'acétone et le carbonate d'éthylène sont couramment employés pour solubiliser les granules des PHAs issus de la biomasse bactérienne rompue. Les formes solubilisées des granules des PHAs sont typiquement précipitées à l'aide de méthanol ou d'éthanol refroidis. Cette méthode d'extraction par solvant est préférée lorsque le polymère PHAs est nécessaire sous une forme pure, car elle maintient les propriétés des polymères intacts et élimine les toxines bactériennes (endotoxines) associées aux polymères PHAs (**Jacquel et al., 2008**). Les solvants non chlorés, comme le carbonate de 1,2 propylène, sont préférables en raison de leur moindre toxicité par rapport aux solvants chlorés.

D'autres solvants tels que le 2-propanol, l'acétate d'éthyle, l'acétone, le n-hexane, le chlorure de méthylène et le tétrahydrofurane (THF) ont également été utilisés pour extraire les PHAs de la biomasse cellulaire. Parmi les solvants mentionnés, le chlorure de méthylène a permis d'obtenir un rendement de 86 % de la masse cellulaire sèche à température ambiante (**Furrer et al. 2007**). Les produits récupérés par l'acétone et l'acétate d'éthyle contiennent moins de 10 % de contaminants, et la précipitation de ces produits à l'aide de méthanol refroidi conduit à une pureté de 100 %. La température de travail est un facteur crucial dans le processus d'extraction des PHAs par la méthode du solvant. Par exemple, le n-hexane montre une efficacité accrue à une température proche de 50 °C, mais cette efficacité diminue avec une

augmentation simultanée de la pureté du produit récupéré lorsque la température se situe autour de 40 °C (Furrer et al. 2007).

#### ➤ 4.2 Flottaison

Pour minimiser la consommation de solvants, une approche alternative appelée méthode de flottaison, dérivée de l'extraction chimique, est employée. Cette méthode intègre l'utilisation de solvants respectueux de l'environnement pour extraire les polyhydroxyalcanoates (PHAs) de la biomasse cellulaire. La séparation des débris cellulaires est ensuite effectuée via un processus d'auto-flottaison. Dans cette démarche, les cellules microbiennes sont traitées à 30°C avec du chloroforme pendant une période de 72 heures. Par la suite, le mélange est laissé à température ambiante pendant 12 heures afin de permettre la séparation des débris cellulaires par auto-flottaison. Cette méthode a démontré une efficacité de récupération atteignant jusqu'à 85 % (poids/poids) de la masse cellulaire sèche, avec des PHAs d'une pureté de 98 % (Ibrahim et Steinbüchel, 2009). La réduction de la génération de déchets et l'utilisation de solvants respectueux de l'environnement figurent parmi les autres avantages inhérents à cette approche.

#### ➤ 4.3 Extraction par fluide supercritique

L'utilisation de fluides supercritiques pour extraire les polyhydroxyalcanoates (PHAs) à partir de la biomasse bactérienne représente une approche récente, économiquement avantageuse et écologiquement plus sûre. Parmi ces fluides, le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) est privilégié en raison de ses propriétés thermodynamiques adaptées. Les caractéristiques telles qu'une viscosité réduite, une tension de surface négligeable et une diffusion accrue rendent les fluides supercritiques plus efficaces que les liquides et les solvants traditionnels pour l'extraction des PHAs. Cependant, il convient de contrôler avec précision la température et la pression, car des conditions excessives peuvent altérer la structure membranaire cellulaire, compromettant ainsi la récupération des PHAs.

La solubilité des molécules de polyhydroxybutyrate (PHB) dans le CO<sub>2</sub> supercritique est fortement influencée par les paramètres de température et de pression, comme l'ont souligné (Khosravi-Darani et al., 2003). Malgré les avantages de cette méthode, il est important de noter que des impuretés telles que les endotoxines bactériennes peuvent persister avec les PHAs après l'extraction par solvant, ce qui peut présenter des risques allergiques dans des applications biomédicales (Koller et al., 2013 a, b).

**Hejazi et al. (2003)** ont démontré une récupération des PHAs allant jusqu'à 89 % de la masse cellulaire sèche à partir de la biomasse de *R. eutropha* en utilisant la méthode du fluide supercritique. **(Hampson et Ashby, 1999)** ont également rapporté une récupération significative de mcl-PHA, atteignant 42,4 % de la masse cellulaire sèche, en utilisant du CO<sub>2</sub> supercritique en combinaison avec du chloroforme à partir de la biomasse de *P. resinovorans* cultivée sur des sources de carbone telles que du suif et du saindoux.

Outre le CO<sub>2</sub>, d'autres fluides supercritiques tels que l'ammoniac et le méthanol ont été explorés pour la récupération des PHAs, en complément du CO<sub>2</sub> **(Kunasundari et Sudesh, 2011)**. Comparée aux méthodes d'extraction classiques, l'extraction par solvant supercritique se révèle plus efficace pour la récupération des PHAs, en particulier dans le contexte des applications biomédicales. Cette méthode permet d'obtenir des produits d'une pureté d'environ 100 %, ce qui est essentiel pour l'utilisation des PHAs dans le domaine biomédical **(Williams et al., 2005)**.

#### ➤ 4.4 Extraction aqueuse à deux phases (ATPE)

L'ATPE (Système de Partage des PHAs Aqueuses) se caractérise par la présence de deux phases distinctes et hétérogènes, l'une étant aqueuse et l'autre composée d'un liquide non volatil. Comparée aux procédés traditionnels d'extraction par solvant, l'ATPE émerge comme une méthode avancée et écologiquement favorable **(Leong et al., 2017)**.

La phase aqueuse de l'ATPE facilite l'isolement, la purification et la récupération des polyhydroxyalcanoates (PHAs) à partir des cellules. La couche de polyéthylène glycol joue un rôle crucial dans le système ATPE, permettant le transfert des PHAs vers cette couche tandis que les débris cellulaires non désirés se déposent dans la partie inférieure du système. Ainsi, l'ATPE se distingue comme un système sans solvant efficace pour l'extraction des PHAs purifiés à partir de la biomasse **(Leong et al., 2017)**.

Par ailleurs, l'ATPE est reconnu pour son efficacité dans l'élimination des contaminants indésirables du produit final souhaité **(Kepka et al., 2003)**. **Divyashree et al. (2009)** ont documenté une récupération des PHAs pouvant atteindre 51 % (poids/poids) à partir de la biomasse de la bactérie *Bacillus flexus*, en utilisant une concentration de 12 % (p/v) de polyéthylène glycol et une concentration de 9,7 % (p/v) de phosphate de potassium dans un système ATPE.

#### ➤ 4.5 Digestion chimique et enzymatique

Pour extraire les polyhydroxyalcanoates (PHAs) des cellules bactériennes, différentes méthodes sont mises en œuvre en remplacement de l'extraction traditionnelle par solvant. Les cellules sont lysées à l'aide de solvants ou de biocatalyseurs (enzymes) pour libérer les granules des PHAs. Ces approches chimiques et enzymatiques permettent la rupture des cellules microbiennes et facilitent ainsi l'extraction des granules des PHAs (**Kumar et al., 2018a**). Typiquement, des agents chimiques tels que l'hypochlorite de sodium ou des surfactants sont utilisés pour faciliter l'extraction des granules des PHAs de la biomasse bactérienne. Parmi les surfactants, le dodécyl sulfate de sodium, le Triton X-100, la palmitoylcarnitine et la bêtaïne, ainsi que l'hypochlorite de sodium, sont utilisés pour limiter la dégradation des molécules des PHAs (**Koller, 2016**). Cependant, l'utilisation exclusive d'hypochlorite de sodium dans le processus de lyse cellulaire peut altérer la qualité du produit en entraînant une dégradation du polymère pouvant atteindre 50 %. L'efficacité de récupération diminue lorsque l'hypochlorite de sodium et les surfactants sont appliqués séparément ; c'est pourquoi une combinaison de ces produits chimiques est étudiée pour améliorer l'efficacité de récupération (**Don et al., 2000**).

Divers produits chimiques, tels que le chloroforme, le propylène, le dichlorométhane (DCM), le chlorure de méthylène et le carbonate, sont couramment utilisés pour extraire les PHAs de la biomasse cellulaire, malgré leur toxicité. Comparée à d'autres méthodes telles que la méthode de dispersion (1,1 g/L) et la méthode d'extraction au chloroforme (0,63 g/L), l'extraction chimique et enzymatique a permis d'atteindre un rendement en polyhydroxybutyrate (PHB) de 5,6 g/L (**Sayed et al., 2009**). L'extraction des PHAs de la biomasse cellulaire par digestion enzymatique est un processus complexe comprenant plusieurs étapes, telles que le traitement thermique, l'hydrolyse, le lavage par surfactant, et enfin la récupération du produit. La spécificité des enzymes permet de maximiser la récupération des PHAs (**Jacquel et al., 2008**).

#### 5-Purification des PHAs

Dans le cadre de la purification partielle des PHAs, une stratégie spécifique a été mise en place. Du sulfate d'ammonium a été ajouté progressivement à 50 ml d'eau tout en agitant le mélange avec un agitateur magnétique jusqu'à ce que la solution atteigne une saturation de 100%. Étant donné que la saturation nécessaire pour précipiter l'enzyme était de 80 %, un ajustement a été réalisé en retirant 10 ml de la solution pour atteindre cette concentration, suivi

### Chapitre III : Procédé de production de Polyhydroxyalcanoates (PHAs).

de l'ajout de 10 ml d'eau pour maintenir le volume initial. Ensuite, le précipité a été réhydraté dans une solution saline de phosphate 0,02 M (pH 8,0) et dessalé à travers un sac de dialyse contre la même solution. Le résidu obtenu suite à la précipitation par le sulfate d'ammonium a ensuite été soumis à une dialyse supplémentaire à travers une membrane de dialyse. Par la suite, le sac de dialyse a été immergé dans un bécher contenant 500 ml de tampon A (pH 7,4) et conservé à une température de 4 °C pendant une nuit. Le précipité récupéré dans le sac de dialyse (dialysat) a ensuite été transféré dans un récipient hermétique et stocké à 4 °C en vue d'une utilisation ultérieure (**Chitte et Dey ,2000**).

**Tableau 08** : Un bref résumé des différentes méthodes utilisées pour l'extraction et la purification des PHAs (**Faizan, 2020**).

Méthodes d'extraction	Bref résumé	Bénéfices	Limitations	Reference(s)
<b>Extraction par solvant</b>	Les cellules sont prétraitées pour se rompre et rendre accessibles les granules des PHAs. Les granules des PHAs. Ces granules sont ensuite rendus solubles dans un solvant approprié (Chloroforme, acétone, carbonate d'éthylène, etc.). La précipitation se fait avec une solution sans solvant.	Polymère intact de haute pureté, éliminant les endotoxines	Une température basse (inférieure à 40 °C) peut affecter les taux de récupération.	<b>(Raza et al,2019), Furrer al., 2007), Jacquel et al., 2008)</b>
<b>Méthode de flottation</b>	Version modifiée de l'extraction par solvant. Les débris cellulaires moussent à la surface du solvant d'extraction lorsqu'ils sont laissés pendant 72 h à 30 °C dans du chloroforme.	Grande pureté (98%) avec une efficacité de récupération de 85%, réduction des pertes de polymères lors de l'extraction.	Lent et fastidieux	<b>(Ibrahim et Steinbüchel, 2010)</b>
<b>Méthode de digestion</b>	La masse cellulaire non-PHA est digérée par voie chimique ou enzymatique. L'hypochlorite de sodium et des surfactants sont utilisés pour la récupération du PHA dans la digestion chimique,	Les enzymes sont spécifiques à la cible, ce qui permet d'obtenir une bonne récupération des PHA.	La digestion à l'hypochlorite de sodium a montré une dégradation du PHA, ce qui affecte la récupération.	<b>(Koller et Niebelschüt, 2013), Haddadi, et al., 2019)</b>

### Chapitre III : Procédé de production de Polyhydroxyalcanoates (PHAs).

	alors que dans la digestion enzymatique, une série d'étapes telles que le traitement thermique, l'hydrolyse enzymatique et le lavage avec des tensioactifs.		Dégradation du PHA, ce qui a un effet sur la récupération et la qualité.	
<b>Extraction supercritique des fluides</b>	Le Co <sub>2</sub> gazeux, l'ammoniac et le méthanol sont utilisés pour l'extraction des fluides supercritiques. La température et les pressions de fonctionnement sont des facteurs clés qui modifient le comportement de la membrane cellulaire pour extraire Les PHAs	PHA de la plus haute pureté (99,99 %) obtenus à des fins médicales.	Complexe par rapport à l'extraction par solvant et à la méthode de digestion.	<b>(Kunasundari et Sudesh, 2011), Hejazi et al., 2003)</b>
<b>Extraction aqueuse en deux phases</b>	Utilise deux phases pour l'extraction des PHA. L'une de ces phases est l'eau et l'autre est une phase non volatile. Phase est l'eau, tandis que l'autre est la phase non volatile. La partie non organique se dépose dans l'eau tandis que la partie organique se déplace dans la partie non volatile.	Le taux de récupération de la PHA est de 2 % (w/v). Méthode efficace pour l'isolement du PHA à partir de Bactéries	Taux de récupération limités. Les impuretés peuvent inclure dans le produit final.	<b>(Haddadi et al., 2019), Divyashree et al., 2009)</b>

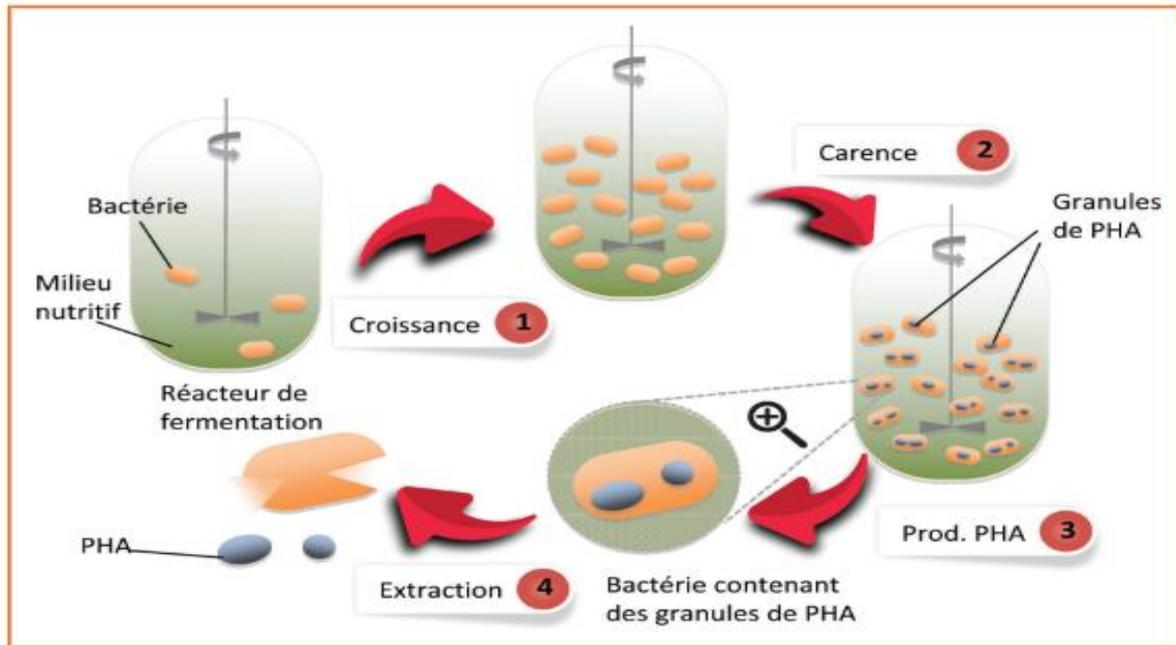


Figure 12 : Les différentes étapes de la production des PHAs bactériens (Audic *et al.*, 2017).

## 6- Techniques de Coloration pour la Détection et l'Analyse de l'Accumulation des PHAs

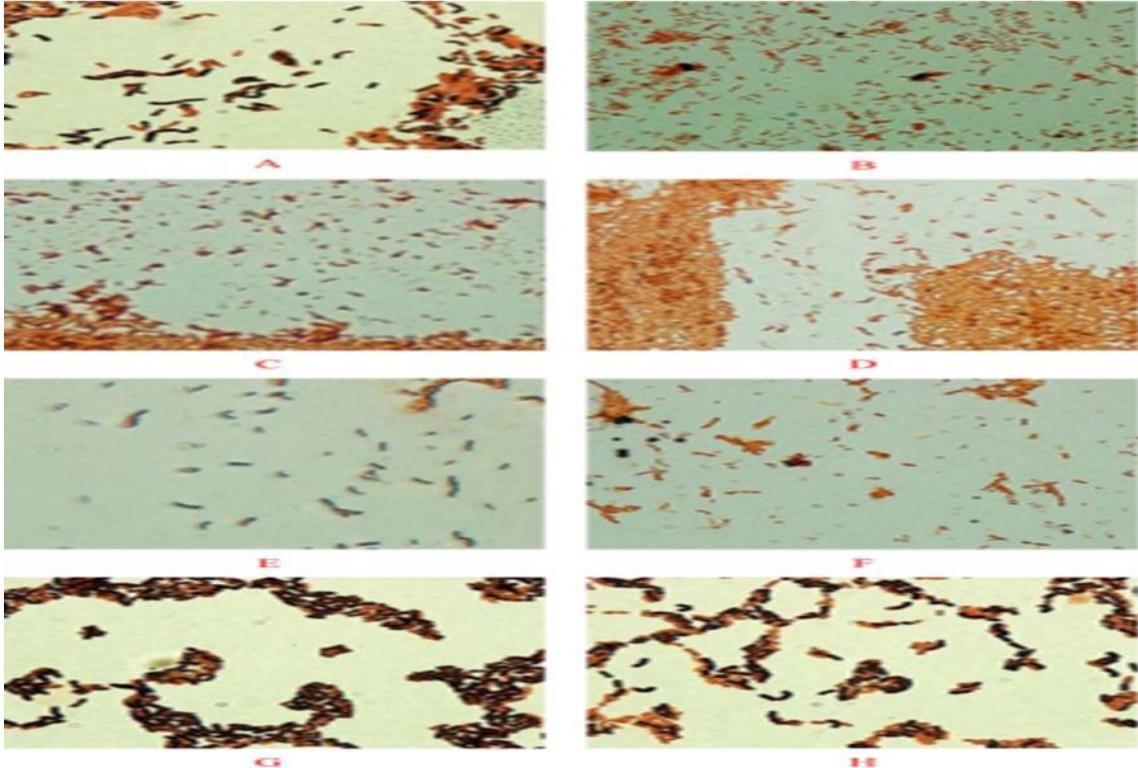
### • 6.1 Méthode de coloration au noir Soudan B

Dans cette méthode, les isolats bactériens ont été inoculés dans des milieux spécifiques pour la production des PHAs, incubés à 37°C pendant 24 heures. À la fin de l'incubation, une fine pellicule bactérienne a été préparée et fixée par la chaleur. Le frottis bactérien a ensuite été coloré avec une solution de noir de Soudan à 0,3 % pendant 10 minutes, puis traité avec de l'éthanol pendant quelques secondes et lavé délicatement à l'eau distillée. Pour la coloration de contraste, le film a été recouvert d'une solution de safranine à 0,5 % pendant 30 secondes et rincé doucement à l'eau pour éliminer l'excès de colorant. Enfin, le film bactérien séché à l'air a été examiné au microscope à l'aide d'un objectif à immersion dans l'huile. Les particules des PHAs apparaissent sous forme d'inclusions bleu-noir dans des cellules roses (Murray *et al.*, 2015).

### 6.2. Essai sur les colonies viables

Dans cette expérience, tous les candidats bactériens ont été soumis à une analyse qualitative de l'accumulation des PHAs en utilisant la technique de criblage des colonies viables avec le colorant noir de Soudan. Pour ce faire, des plaques de gélose nutritive contenant 1 % de

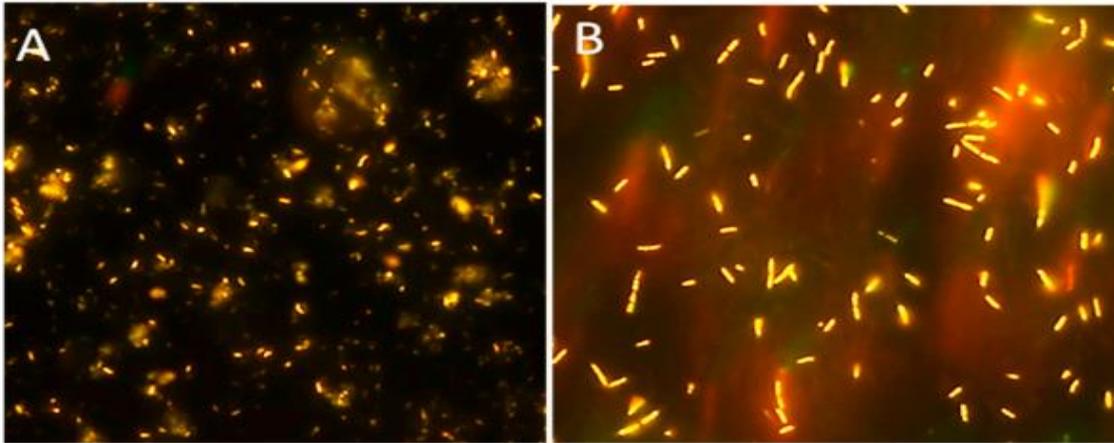
glucose et une solution éthanolique de 0,3 % de colorant noir de Soudan ont été utilisés. Les isolats bactériens ont été inoculés sur ces plaques et incubés pendant 24 heures à 37°C. Les colonies colorées en bleu-noir à violet avec le colorant noir de Soudan indiquent un résultat positif pour la production des PHAs, tandis que les colonies non colorées indiquent un résultat négatif (Panigrahi et al., 2014).



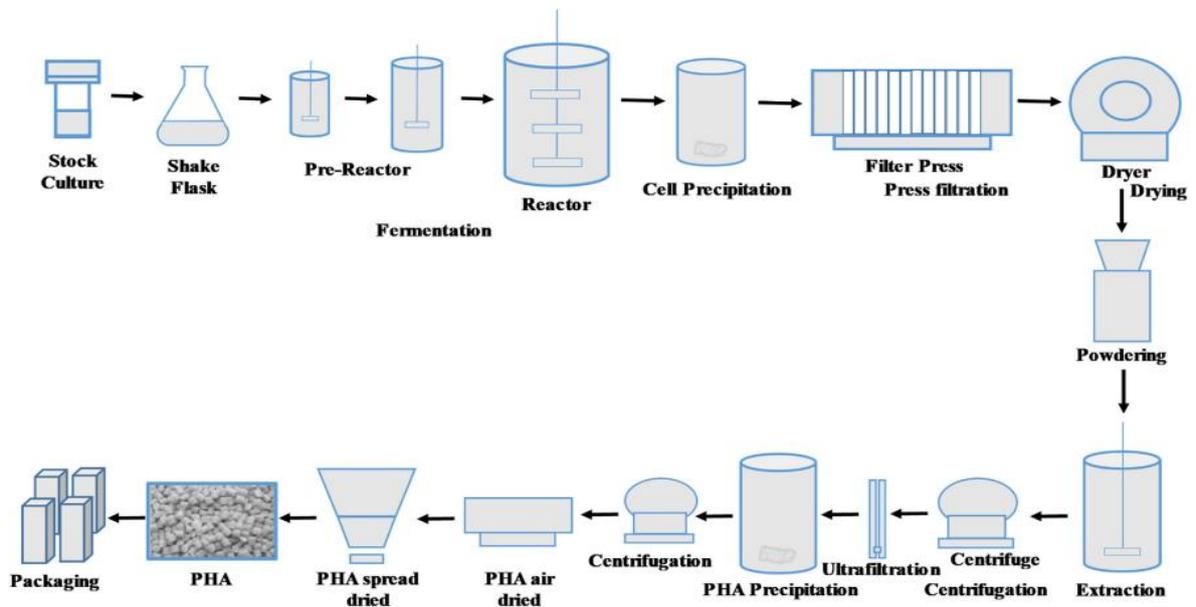
**Figure 13 :** Dépistage des bactéries productrices des PHAs par la méthode des colonies viables et la coloration au noir de Soudan. B (grossissement 100X) pour *Bacillus sp.* Souche-6 (A.), *Pseudomonas sp.* Souche-16 (B), *Bacillus sp.* Souche-7 (C), *Bacillus altitudinis* Strain-8 (D), *Bacillus pumilus* Stain10 (E), *Bacillus licheniformis* Strain-4 (F), *Bacillus sp.* Strain-23 (G) et *Bacillus sp.* Strain-25 (H) (Aljuraifani et al 2018).

### 6.3. Méthode de coloration au rouge du Nil

Dans une autre expérience de criblage des isolats bactériens pour l'accumulation des PHAs, la coloration au rouge du Nil a été employée. Pour ce processus, un frottis bactérien a été préparé et coloré avec du rouge du Nil A pendant 20 minutes. Ensuite, le frottis a été nettoyé avec de l'eau stérile, laissé sécher et observé au microscope à fluorescence à une longueur d'onde de 490 nm. Les particules des PHAs accumulées apparaissent sous forme de ségrégât bactériens présentant une couleur orange jaunâtre brillante (Bhuwal et al., 2013).



**Figure 14** : Granules fluorescents des PHAs après coloration au rouge du Nil de la souche *Pseudomonas mediterranea* 9.1 de type sauvage (A) et de la souche recombinante VVC1GI (B) cultivées sur du glycérol de haute qualité ( $\geq 99\%$ ) comme source de carbone et dans des conditions d'azote limitées après 66 h d'incubation (Licciardello et al., 2019).



**Figure 15** : Représentation schématique du processus global de production des PHAs bactériens (Kumar et al., 2020).

# **Partie II : Matériel et méthodes**

### 1. Objectif de travail

L'objectif de ce mémoire de master est d'isoler des espèces du genre *Pseudomonas* à partir d'eaux usées, supposées capables d'accumuler des polyhydroxyalcanoates (PHA). En suivant un processus comprenant l'identification des souches de *Pseudomonas putida*, le criblage et l'identification de celles capables de produire des PHAs par fermentation et l'extraction de ces derniers.

### 2. Centre de recherche

La recherche a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie du Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt) de Constantine.

La localisation : <https://maps.app.goo.gl/Da6t3L9DKkf31aGX9>

### 3. Echantillonnage

Nous avons effectué des prélèvements dans l'agglomération d'Ain Smara de la wilaya de Constantine (voir figure 16), où des échantillons d'eau usée ont été collectés à une profondeur de 10 à 15 cm, dans des flacons en verre stériles. Ils ont été ensuite acheminés au laboratoire dans une glacière, puis conservés à une température de 4°C afin de garantir leur préservation jusqu'à leur analyse ultérieure.



Figure 16 : La localisation de l'échantillonnage à partir des eaux usées.

Le lien : <https://maps.app.goo.gl/uiLTNSENyMRLjik6>.

### 4. Isolement

#### 4.1. Préparation des dilutions décimales

À partir de la solution mère contenant les *Pseudomonas*, une série de dilutions décimales a été réalisée en diluant la solution dans un milieu approprié dans de l'eau physiologique stérile, de  $10^{-1}$  à  $10^{-8}$ . Chaque dilution représente une diminution successive d'un facteur de 10 par rapport à la précédente, ce qui nous a permis d'obtenir une gamme de concentrations différentes. (Voir figure 17 et 18).



Figure 17 et 18 : Préparation des dilutions décimales.

#### 4.2. Isolement sélectif sur gélose contenant l'antibiotique cétrimide (milieu CN)

L'isolement a d'abord été effectué sur de la gélose nutritive, un milieu de culture non sélectif qui permet la prolifération de toutes les bactéries. Ensuite, une sélection orientée a été réalisée en cultivant les bactéries sur un milieu sélectif.

La gélose CN contient un antibiotique, le cétrimide (voir annexe 01), qui inhibe la croissance de la plupart des bactéries, mais permet celle des *Pseudomonas* qui sont résistantes à cet antibiotique. Cette propriété sélective permet d'isoler spécifiquement les *Pseudomonas* présents dans l'échantillon.

#### 4.3. Ensemencement

Une fois les dilutions préparées, nous avons prélevé 0,1 ml de chaque dilution que nous avons ensemencé par étalement sur des boîtes de gélose préalablement coulée. Cette étape nécessite une précision de la quantité à ensemencer et la maîtrise de la technique utilisée pour permettre une croissance distincte des colonies bactériennes. (Voir figure 19).



Figure 19 : Ensemencement par étalement.

### 4.4 Incubation

Les boîtes de géloseensemencées ont ensuite été incubées à une température optimale pour la croissance des *Pseudomonas*, généralement 30°C. Cette incubation peut durer de 24 à 48 heures (voir figure 13), pour permettre le développement et la caractérisation des colonies microbiennes. Après l'incubation, les boîtes ont été examinées pour observer la croissance des colonies bactériennes.



Figure 20 : Incubation des boitesensemencées.

## 5. Repiquage et purification

La purification des échantillons microbiologiques est une étape cruciale dans la caractérisation des espèces bactériennes, en particulier dans le cas des *Pseudomonas*. Pour ce faire, nous avons adopté la technique classique des trois quadrants.

Le processus de repiquage des colonies se déroule selon deux méthodes :

### Méthode 1 : Dilution dans des tubes Eppendorf

Cette méthode implique la dilution des colonies dans des tubes Eppendorf contenant une solution physiologique stérile, suivie d'un nouvel ensemencement sur milieu cétrimide, spécifique à la culture des *Pseudomonas*.

- **Principe** : Cette méthode vise à diluer les colonies initiales pour réduire la densité cellulaire et favoriser la croissance de colonies individuelles sur le nouveau milieu solide, ce qui permet d'obtenir des cultures microbiennes moins denses et potentiellement pures
- **Technique** : Les colonies sont diluées dans une solution physiologique dans des tubes Eppendorf, puis une petite quantité de cette dilution est ensemencée sur gélose CN à l'aide d'une pipette stérile (Voir figure 21 et 22).

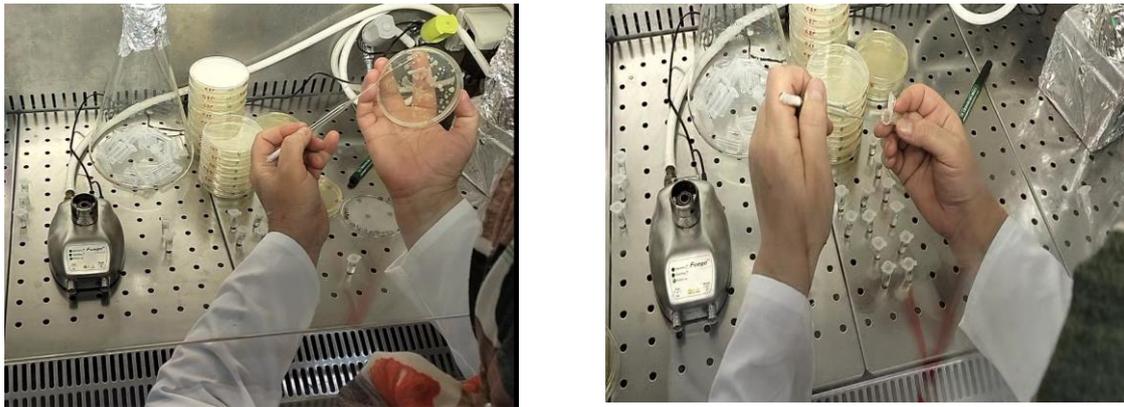


Figure 21 et 22 : Repiquage des colonies sur des tubes Eppendorf.

### Méthode 2 : Transfert sur gélose CN

En parallèle, une autre approche est employée, impliquant le transfert successif de colonies bactériennes isolées sur des milieux de culture appropriés afin d'obtenir des populations microbiennes pures.

- **Principe**

La gélose CN est un milieu de culture sélectif qui favorise la croissance des *Pseudomonas* tout en inhibant la croissance d'autres espèces bactériennes, ce qui permet d'obtenir des colonies pures de *Pseudomonas*.

- **Technique**

Les colonies sont transférées individuellement sur des boîtes de gélose CN à l'aide d'une pipette Pasteur stérile.

Ces deux techniques de repiquage sont complémentaires et visent à optimiser la probabilité d'obtenir des cultures microbiennes dépourvues de toute contamination.

Une fois le processus de purification achevé, une observation précise des cultures est effectuée : Si, après 48 heures d'incubation à 30°C, les cultures présentent des colonies homogènes, cela indique une population bactérienne relativement pure. À ce stade, l'identification des espèces de *Pseudomonas* peut être amorcée en se basant sur plusieurs critères.

### 6. L'identification macroscopique

Les colonies de *Pseudomonas* se caractérisent par leur petite taille, généralement de 1 à 3 mm de diamètre (Garrity, 2005). D'autres critères pris en compte incluent la morphologie de la colonie, l'aspect de sa surface, son opacité et sa coloration...



Figure 23 : Observation macroscopique des colonies bactérienne.

### 7. L'identification microscopique

#### 7.1. Coloration de Gram :

Elle a été réalisée selon la technique conventionnelle (voir annexe 02).



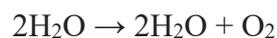
Figure 24 : Observation microscopique des cellules bactériennes après coloration de Gram.

## 8. Identification biochimique

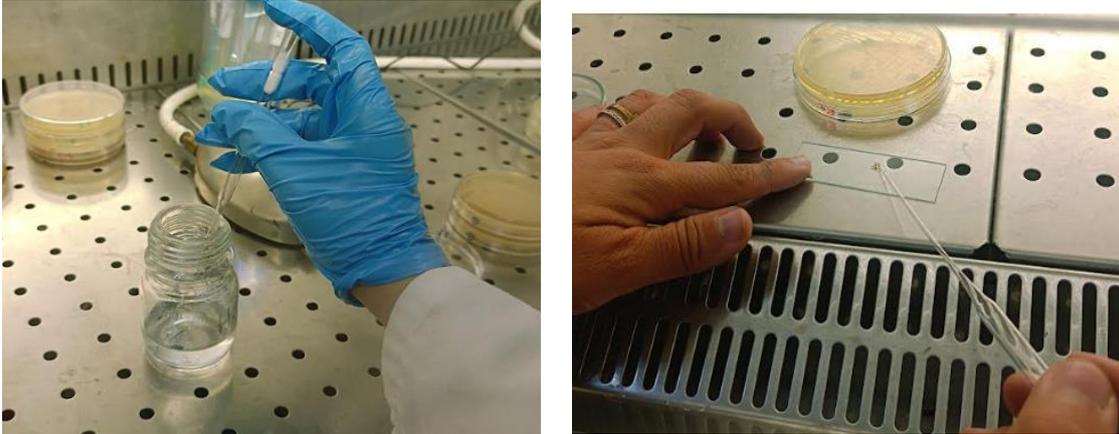
Les souches sélectionnées présumées productrices des PHAs sont capables d'accumuler des vésicules lipidiques dans leurs cytoplasmes étaient revivifiées sur gélose Mueller Hilton puis identifiées selon la galerie classique et compléter par la galerie API system 20 NE (Gordon *et al.*, 1973., Logan *et al.*, 2009).

### 8.1. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme qui décompose l'eau oxygénée en oxygène et en eau. Sur une lame propre, on dépose une goutte d'eau oxygénée (30 volumes) puis on écrase une parcelle de culture bactérienne. Si la bactérie possède cette enzyme, un dégagement gazeux sera observé (Leyral et Vierling, 2007).



Ce test a été réalisé sur les mêmes 18 souches isolées. Utiliser une pipette Pasteur stérile pour déposer quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène directement sur la colonie bactérienne prélevée sur une lame de verre propre et sèche, puis observer immédiatement la formation de bulles d'oxygène pour détecter la présence de la catalase (Voir figure 25 et 26).



**Figure 25 et 26 :** Détection de l'activité catalase dans les souches bactériennes isolées par le test de peroxyde d'hydrogène.

### 8.2. Recherche de l'oxydase

La recherche de la cytochrome-oxydase a été effectuée à l'aide de disques « Ox » dont la zone réactionnelle est composée d'un papier filtre imprégné de N, N-diméthyl-1,4- phénylène diamine -dichlorure. A partir d'un milieu solide, une quantité de culture bactérienne a été déposée à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée sur un disque oxydase placé sur une lame, La présence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé (Joffin et Leyral, 2006).

Ce test a été réalisé sur les mêmes souches isolées.

Pour le test d'oxydase, il convient d'utiliser une pipette pasteur stérile pour appliquer une goutte de réactif d'oxydase directement sur la colonie bactérienne prélevée sur du papier buvard propre et sec, puis observer immédiatement un changement de couleur généralement vers le bleu ou le violet indiquant la présence de l'enzyme oxydase (Voir figure 27).



**Figure 27 :** Détection de l'activité cytochrome-oxydase dans les souches bactériennes isolées par le test de coloration au réactif d'oxydase.

### 8.3. Les galeries Api 20NE

- **Objet du test**

API 20NE « Analytical profile index » est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non enterobactéries et non fastidieux (ex. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.) combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation, et une base de données.

- **Principe**

La galerie API 20 NE contient 20 microtubes avec des substrats déshydratés, inoculés avec une suspension bactérienne saline pour reconstituer les milieux.

Pendant la période d'incubation, les réactions se manifestent par des changements de couleur spontanés ou après l'ajout de réactifs.

Les tests d'assimilation utilisent un milieu minimum, et la croissance bactérienne indique la capacité à utiliser le substrat correspondant.

La lecture des réactions s'effectue à l'aide du Tableau de lecture, et l'identification des bactéries est obtenue grâce au Catalogue Analytique ou à un logiciel d'identification.

- **Matériels et réactifs nécessaires** (voir annexe 04)

- **Préparation de la galerie**

Le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation sont réunis, puis environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée sont répartis dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. La galerie est ensuite retirée de son emballage individuel et placée dans la boîte d'incubation.

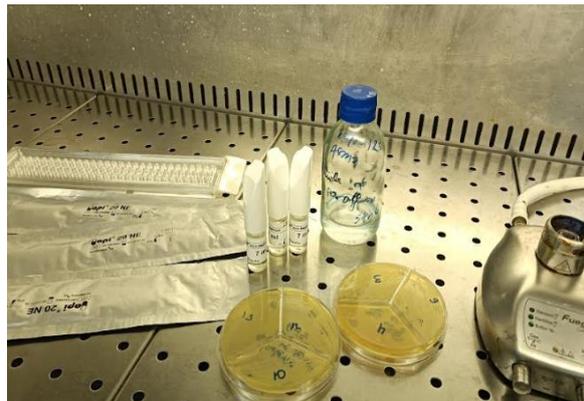
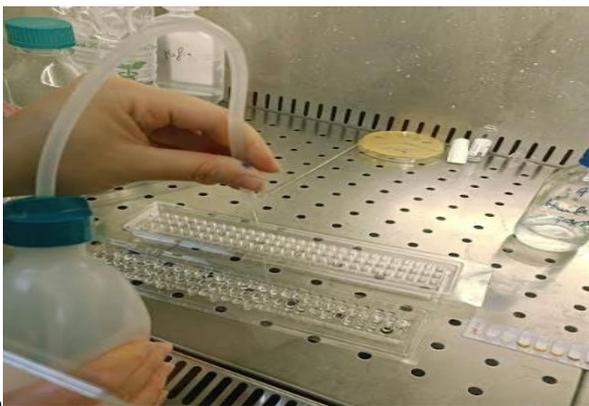


Figure 28 et 29 : Préparation de la Galerie pour l'incubation Bactérienne.

- **Préparation de l'inoculum**

À l'aide d'une pipette, 1 à 4 colonies de morphologie identique provenant de cultures jeunes (18-24 heures) sont prélevées.



**Figure 30 et 31** : Préparation de l'inoculum par prélèvement de colonies de cultures jeunes.

Une suspension est ensuite préparée avec une turbidité équivalente à 0,5 McFarland, correspondant à une absorbance de 0,8 à une longueur d'onde de 625 nm (Voir figure 32 et 33).



**Figure 32 et 33** : Préparation d'une Suspension Bactérienne à une Turbidité de 0,5 McFarland.

- **Inoculation de la galerie**

Remplir les tubes (et non les cupules) des tests  $\text{NO}_3$  à PNPG avec la suspension précédente en utilisant une micropipette. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la micropipette sur le côté de la cupule (Voir figure 34).



**Figure 34 :** Inoculation de la Galerie pour les tests Biochimiques.

Transférer environ 200  $\mu$ l de la suspension précédente. Homogénéiser avec la pipette en évitant la formation de bulles. Puis remplir tubes et cupules des tests GLU à PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Et enfin remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour former un ménisque convexe (Voir figure 35 et 36).



**Figure 35 et 36 :** Application d'huile de paraffine pour former un ménisque convexe dans les cupules des tests GLU, ADH, URE.

Refermer la boîte d'incubation et incuber à 30°C pendant 24 heures (Voir figure 37 et 38)

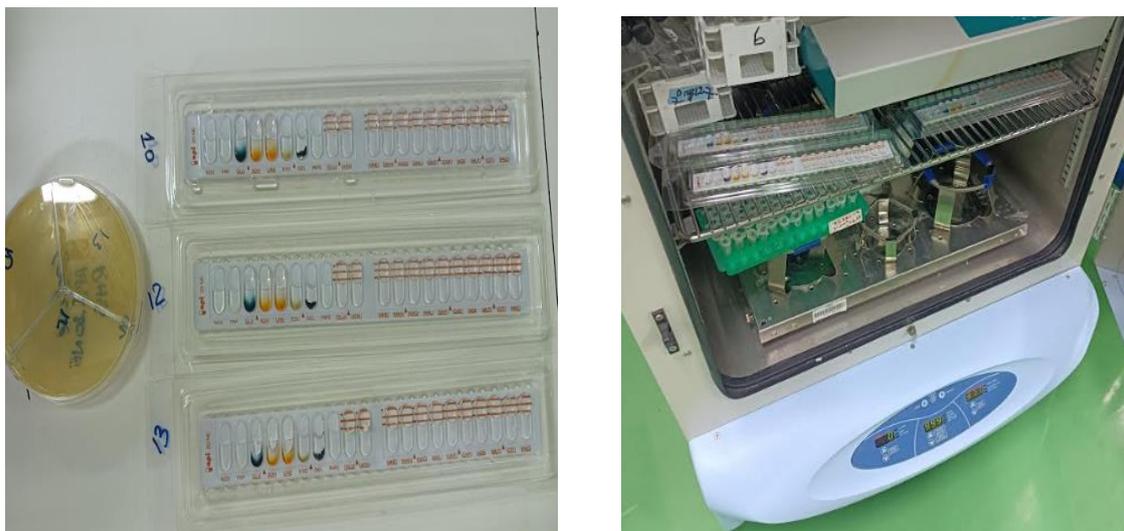


Figure 37 et 38 : Incubation de la galerie à 30°C pendant 24 heures.

### 9. Identification moléculaire des souches productrices des PHAs

L'identification génotypique des souches sélectionnées productrices des PHAs par la technique d'amplification de la région ARNr 16S a été réalisée au niveau du laboratoire de biologie moléculaire du centre de recherche en biotechnologie.

Sa découverte en 1983 et mise au point par K.Mullis en 1985, la PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique de réplication ciblée *in vitro*, qui permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant d'ADN, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. L'ordre de grandeur à retenir est celui de million de copies en quelques heures.

#### 9.1. Extraction et purification de l'ADN génomique bactérien

##### 1. Matériel et réactifs (voir annexe 05)

##### 2. Méthode

Prélever trois à cinq colonies fraîches et mettre en suspension dans 150µl de tampon Tris-HCl EDTA (TE) stérile, pH 8,0 (voir figure 39 et 40).



Figure 39 et 40 : Préparation de la Suspension.

Bouillir la suspension à 95 °C pendant 10 minutes en bain à sec. Après centrifuger à 12 000 tr/min pendant 10 minutes. Puis récupérer le surnageant et aliquoter dans des tubes de 50 µl.



Figure 41 et 42 : chauffage et Centrifugation de la suspension.

## 9.2. Evaluation de la pureté par le Nano Drop

Pour confirmer la pureté de l'ADN extrait le Nano Drop a été utilisé pour fournir des informations sur la pureté des échantillons en mesurant les ratios d'absorbance (par exemple, 260/280 nm pour les acides nucléiques) (voir figure 43). Ces ratios aident à identifier la présence de contaminants tels que les protéines ou les solvants organiques.

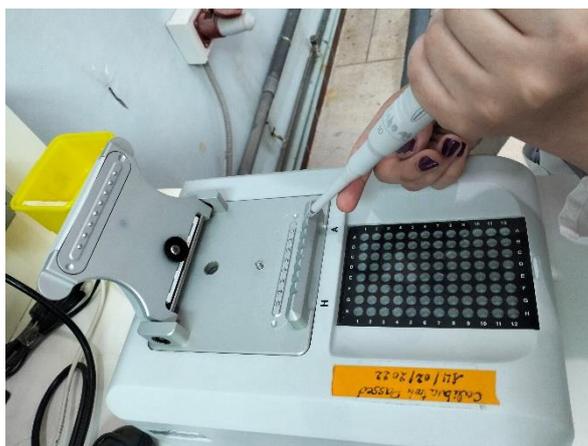


Figure 43 : l'évaluation de la pureté de l'ADN par le Nano Drop.

### 9.3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La technique consiste à amplifier une séquence définie d'ADN du génome en le multipliant en grand nombre de fois grâce à une polymérase. L'ADN génomique des souches en question a été extrait selon le protocole décrit ci-dessous :

#### 9.3.1. Matériel (voir annexe 05)

Le gène de l'ARN ribosomique (ARNr) 16S a été amplifié à l'aide de l'amorce spécifique aux bactéries 27F (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') et de l'amorce universelle 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), produisant des amplicons de 1 465 pb (Wang *et al.*, 2020).

#### 9.3.2. Méthode

##### a) Préparation du mix

On prépare le mix de 25 µl par réaction, comme suit :

Produit	Quantité (1 réaction)	Quantité (11 réactions)
Eau ultra pure	18,8	206,8
Tampon de réaction PCR 10X + MgCl <sub>2</sub>	2,5	27,5
Amorces 1 10nmol	0,5	5,5
Amorces 2 10nmol	0,5	5,5
dNTP	0,5	5,5
Taq polymérase	0,2	2,2
<b>Total</b>	<b>23</b>	<b>253</b>

Dans chaque tube PCR, on dépose 23µl du mix, ajouter 2ul d'extrait d'ADN.

**b) Les conditions de la PCR**

Les conditions opératoires pour l'amplification étaient les suivantes (Mir et al., 2016) :

- Dénaturation initiale à 95°C pour 12 minutes.
- Dénaturation à 95°C pour 30 secondes,
- Hybridation à 56°C pour 60 secondes. } 35 cycles
- Extension à 72°C pour 90 secondes. }
- Extension finale à 72°C pour 7 minutes.

**9.4. Electrophorèse**

• **Principe**

L'électrophorèse sur gel est une méthode utilisée pour visualiser et séparer les acides nucléiques de différentes tailles.

La séparation de l'ADN est réalisée grâce à l'application d'un champ électrique. L'ADN, étant chargé négativement, se déplace du cathode (-) vers l'anode (+) lorsque la tension est appliquée. La séparation se produit dans différents types de gels qui contiennent des pores permettant aux molécules d'ADN de passer en fonction de la taille des fragments.

La concentration d'agarose dans un gel dépend de la taille des fragments d'ADN à séparer, la plupart des gels se situent entre 0,5 % et 2 %. Le volume du tampon ne doit pas être supérieur à 1/3 de la capacité du ballon.

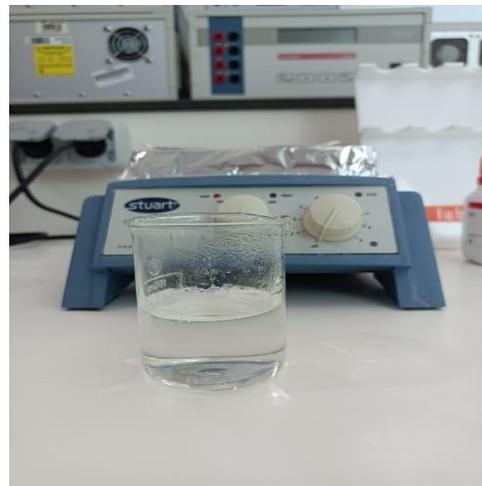
Les fragments plus grands rencontrent une plus grande obstruction de la matrice du gel et ont donc tendance à se déplacer sur une plus courte distance.

Les fragments plus petits peuvent plus facilement se faufiler à travers les pores du gel et tendent donc à se déplacer sur une plus grande distance. Le gel est coloré avec un colorant intercalant tel que le bromure d'éthidium.

Le bromure d'éthidium se lie aux bases de l'ADN et fluoresce sous lumière UV, permettant ainsi la visualisation. La taille relative des fragments produits sur le gel est déterminée en comparant leur position à celle d'un marqueur de poids moléculaire (Sambrook et Russell, 2001 ; Watson et al., 2008).

- **Préparation du gel d'électrophorèse**

Peser 0.75g d'agarose dans un erlenmeyer. Les gels d'agarose sont préparés à l'aide d'une solution en pourcentage p/v. Ajouter 50ml tampon TBE x1 (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA) à l'erlenmeyer contenant l'agarose. Puis agiter pour mélanger et Faire fondre le mélange agarose/tampon. Cette opération s'effectue le plus souvent par chauffage sur une plaque chauffante agitatrice à un intervalle de 30 mins jusqu'à ce que l'agarose soit complètement dissous et le mélange devient transparent (Voir figure 35). Ensuite ajouter du bromure d'éthidium (EtBr) à une concentration de 0,5 µg/ml. Laisser refroidir l'agarose sur la paillasse (Voir figure 36).



**Figure 44 et 45 :** Préparation du gel d'agarose.

Placer un peigne approprié dans le moule à gel pour créer les puits. Verser l'agarose fondu dans le moule à gel. Laissez l'agarose prendre à température ambiante. Retirer le peigne et placer le gel dans la cuve d'électrophorèse remplie préalablement avec le tampon fonctionnel. (Voir figure 46 et 47).



Figure 46 et 47 : Préparation de la matrice du gel.

- **Mise en place de l'appareil à gel et séparation des fragments d'ADN (Lee et *al.*, 2012)**

Ajouter suffisamment de tampon de fonctionnement pour couvrir la surface du gel. Il est important d'utiliser le même tampon que celui utilisé pour la préparation du gel. Ensuite ajouter le colorant de chargement aux échantillons d'ADN à séparer. Le colorant est généralement préparé à une concentration de 6X (0,25 % de bleu de bromphénol, 0,25 % de cyanol de xylène, 30 % de glycérol). Il permet de suivre la distance parcourue par l'échantillon d'ADN et permet également à l'échantillon de s'enfoncer dans le gel (Voir figure 48).

Puis Introduire lentement et soigneusement les échantillons d'ADN dans le gel. Un marqueur de taille d'ADN approprié doit toujours être chargé avec les échantillons expérimentaux (Voir figure 49). Programmer l'alimentation électrique à la tension souhaitée (120V). (Voir figure 50). Relier les fils de la boîte à gel à l'alimentation électrique.

Mettez l'alimentation en marche et vérifiez que la boîte à gel et l'alimentation fonctionnent. (Voir figure 51). La cathode (fils noirs) doit être plus proche des puits que l'anode (fils rouges). Vérifiez que les électrodes sont branchées dans les bons emplacements du bloc d'alimentation. En fin mettre l'appareil en marche. Faire fonctionner le gel jusqu'à ce que le colorant ait migré à une distance appropriée. (Voir figure 52 et 53).



**Figure 48** : Ajout du colorant aux échantillons d'ADN à séparer.



**Figure 49** : Dépôt des échantillons d'ADN sur gel d'électrophorèse

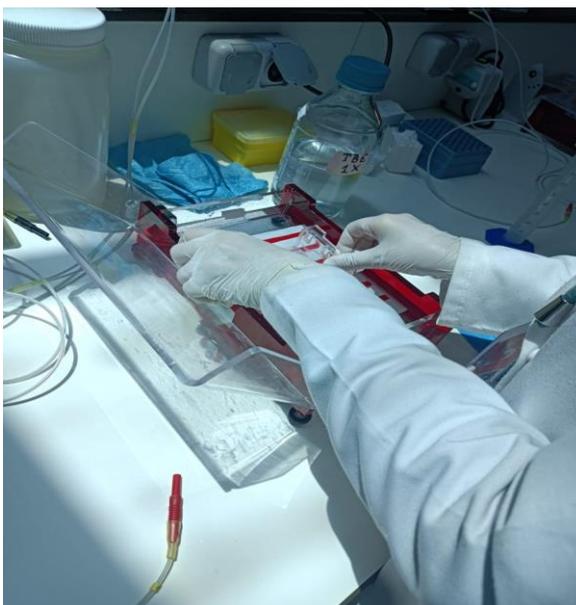
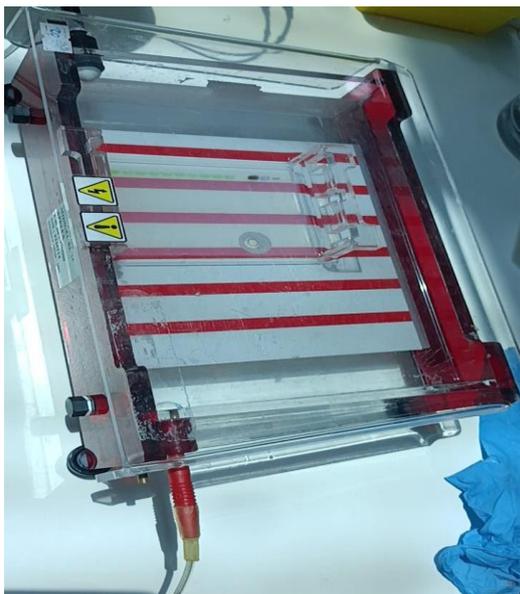


Figure 50 et 51 : Préparation de la cuve d'électrophorèse

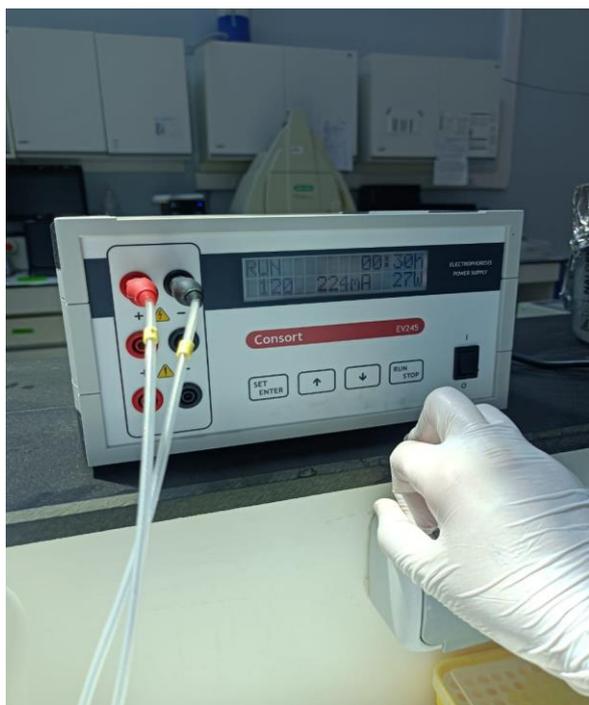


Figure 52 et 53 : Dépôt du gel dans la cuve et début de migration.

## 10. Fermentation

La production des PHAs implique le développement de souches, l'optimisation en flacons agités « shake flask », des études en fermenteurs de laboratoire et pilotes, suivies d'une mise à l'échelle industrielle (Chen, 2009).

### 10.1. Fermentation à l'échelle erlenmeyer

#### 10.1.1. Préparation de pré-culture

Les souches bactériennes productrices des PHAs sélectionnées sont inoculées à une concentration de  $10^8$  bactéries par millilitre dans des flacons Erlenmeyer contenant un volume de 150ml de milieu de production (milieu minimal M9) (Borrero-de Acuña et al., 2014) (voir annexe 03), avec une concentration de 2% de source de carbone (glucose) (voir figure 54) et incubé pendant 18 heures dans des conditions aérobies à 30°C dans un agitateur « shaker » réglé à 180 rpm (Borrero-de Acuña et al., 2014). (Figure 55).

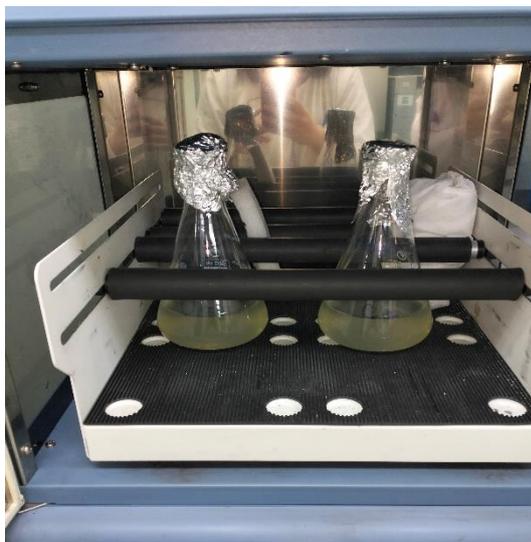
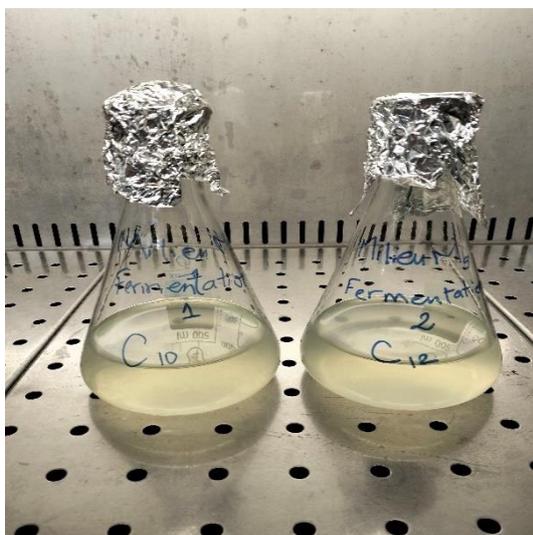


Figure 54 et 55 : Fermentation en erlenmeyers.

#### 10.1.2. Détermination du poids sec cellulaire

L'évaluation de la biomasse bactérienne se fait par la mesure du poids sec. Les cellules de la souche productrice sélectionnée sont centrifugées à 10000 tr/min pendant 10 minutes. (Voir figure 56). Le culot est ensuite séché à une température de 95-100°C jusqu'à obtention d'un poids constant, exprimé en Grammes de matière sèche par litre (Al-Obaidi, 1987 ; Mikkili, 2014). (Voir figure 57).



Figure 56 et 57 : centrifugation et estimation de la biomasse après séchage.

### 10.2. Criblage et sélection des souches potentiellement productrices des PHAs

Dans notre étude, la méthode utilisée est la coloration au noir Soudan sur frottis (**Ramsay et al., 1994**).

Réaliser un frottis fin des souches sur une lame de verre propre. Ensuite chauffer légèrement le frottis pour le fixer. Plonger la lame dans une solution à 0.3% de noir soudan pendant 15 à 20 minutes. Puis la contre coloration a été réalisé par l'ajout de la safranine pendant 10 secondes. En fin examiner la lame au microscope à immersion d'huile (100×) pour détecter la présence de granules intracellulaires des PHAs.



Figure 58 et 59 : La coloration au noir Soudan B.

## 11. Fermentation à l'échelle semi-pilote « scale up »

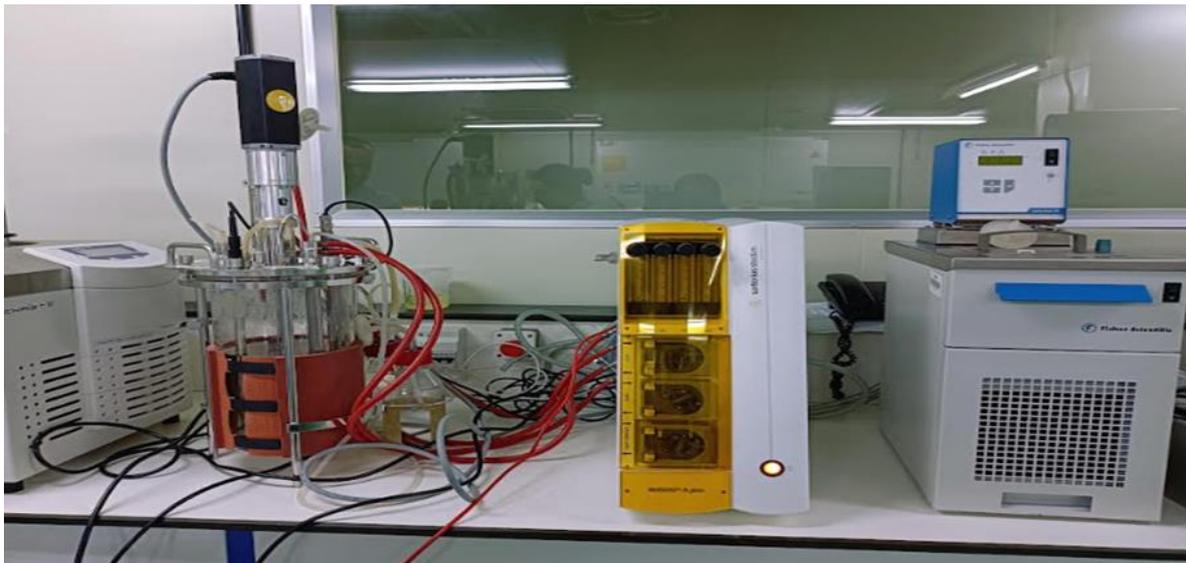
La fermentation discontinue a été réalisée dans un bioréacteur BIOSTAT® Aplus de 4 L

### 11.1. Description des appareils

La fermentation discontinue a été réalisée dans un bioréacteur BIOSTAT® Aplus de 4L (Voir figure 60).

Le bioréacteur BIOSTAT® Aplus est conçu pour la culture de microorganismes et de cellules avec différents volumes de réacteur. Il permet d'effectuer de manière reproductible, efficace et rentable des analyses en vue du développement et de l'optimisation de méthodes de culture ainsi que des processus de production avec des volumes limité.

Le système de mesure et de régulation « micro-DCU System » permet de mesurer, de commander et d'analyser en ligne des paramètres de processus (tels que des températures et des valeurs de pH et de O<sub>2</sub>).



. **Figure 60** : Fermentation à l'Échelle Semi-Pilote dans un Bioréacteur BIOSTAT® Aplus de 4 L.

### 11.2. Processus de fermentation

#### 11.2.1. Up Stream

#### 11.2.2. Préparation du milieu de fermentation (le milieu M9)

Peser les différents composants du milieu M9 (composants essentiels et additifs) à l'aide d'une balance de précision. Puis dissoudre les composants essentiels dans 3600 ml d'eau

## Partie II : Matériel et méthodes

---

distillée dans des erlenmeyer contenant des barreaux magnétiques. Agiter jusqu'à dissolution complète.

Dissoudre le glucose dans 360 ml d'eau distillée. Puis dissoudre les additifs dans 40 ml d'eau distillée et conserver à 4°C jusqu'au lancement de la fermentation.



Figure 61 et 62 : Préparation du milieu de fermentation.

### 11.2.3. Préparation de l'inoculum

Sous la hotte à flux laminaire, prélever 1ml du milieu M9 et le déverser sur la boîte Pétri préalablementensemencée. Racler les colonies avec une pipette Pasteur stérile en forme de râteau. Puis prélever tout le mélange avec une micropipette et le transférer dans un tube conique contenant 60 ml du milieu M9. Incuber 18 heures à 30°C.



Figure 63 et 64 : Préparation de l'inoculum.

### 11.3.2. Middle Stream (lancement de la fermentation)

Le fermenteur contenant le milieu M9 préalablement préparé a été autoclavé à 120°C pendant 2 heures. Ainsi le glucose a été autoclavé séparément du milieu de fermentation. Ensuite les additifs ont été stérilisés par filtration avec un filtre stérile de 0.2 micromètre de diamètre.



**Figure 65 et 67 :** Préparation des différents composants pour le lancement de la fermentation.

Avant de démarrer le processus, un test de stérilité a été effectué. Cela permet de constater si les cuves de culture et les dispositifs connectés ont été parfaitement stérilisés ou si des contaminations sont apparues.

Tous les paramètres de processus nécessaires (température, vitesse de rotation, aération, régulation du pH, etc.) ont été réglés et le bioréacteur est mis à fonctionner pendant environ 24 h pour essayer de détecter le moindre signe d'erreur, par ex. : changement de la valeur de pH, consommation en oxygène anormalement élevée, turbidité du milieu, odeurs inhabituelles dans l'air évacué. Ces signes peuvent indiquer que l'équipement n'a pas été suffisamment stérilisé ou que des germes de l'environnement ont pénétré à l'intérieur de l'appareil par des raccords ou des garnitures non étanches ou défectueux.

Si le test de stérilité est négatif, l'inoculum, le glucose et les additifs sont transférés dans la cuve du bioréacteur dans des conditions d'asepsie totale.

Configurer le système de mesure et de régulation en effectuant les opérations suivantes :

## Partie II : Matériel et méthodes

---

Mettre tous les périphériques en marche (par ex. le système de chauffage du filtre d'évacuation). Et vérifier qu'il n'y a pas de dysfonctionnements. Les messages d'erreur du système DCU sont affichés sur l'écran de commande. Sélectionner les fonctions de mesure et de régulation et réglez les paramètres nécessaires pour le processus (Borrero-de Acuña et al., 2014) :

- Température de fonctionnement des cuves de culture) = 30°C
- Vitesses de l'agitateur (dans le régulateur de vitesse) = 800 rpm
- Valeur de consigne du pH = 7
- Taux d'oxygène = 40%.



Figure 68 : Réglage des différents paramètres.

La fermentation est lancée avec le logiciel pilote qui va surveiller le déroulement de la fermentation tout au long des 24 heures à travers les différents paramètres cités dans le paragraphe précédent.

### 11.3.3. Down stream

La fermentation a été arrêtée à la fin de la phase stationnaire, et tout le milieu qui a servi à la fermentation à savoir les 4L a été récupéré et centrifugé à 10000 rpm pendant 10 minutes à 4°C (12 cycles) pour récupérer la biomasse afin de procéder à l'extraction des PHAs.

## 12. Extraction des polyhydroxyalcanoates (PHAs)

La méthode d'extraction choisie est celle de l'extraction par solvant : le chloroforme.

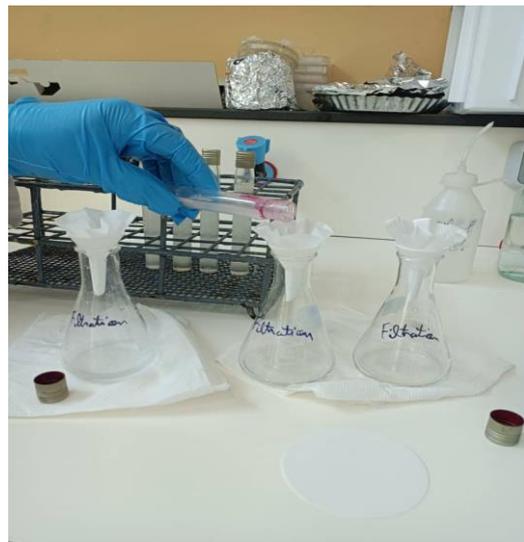
## Partie II : Matériel et méthodes

---

Retirer le surnageant et récupérer les culots cellulaires. Broyer 20mg de la biomasse dans un mortier (Voir figure 69). Ensuite rajouter 5ml de chloroforme à la biomasse préalablement broyée (voir figure 70). Déverser le contenu dans des tubes à essai et agiter au vortex pendant 1 minute. Porter au bain marie à 50°C pendant 30 minutes (Voir figure 71). Laisser refroidir puis filtrer avec du papier Wattman n° 1 (rajouter si nécessaire une quantité de solvant pour remplacer celle évaporée lors de la filtration) (Voir figure 72). Laisser secher à température ambiante pendant 24 à 48 heures.



**Figure 69 et 70 :** Lyse mécanique et chimique des cellules.



**Figure 71 et 72 :** Chauffage au bain Marie et filtration avec le papier Whatman n°1.

### 13. Purification des PHAs

La purification des PHAs est effectuée par l'élimination des autres substances organiques. L'extraction des PHAs est réalisée dans un milieu aqueux par la destruction de la paroi bactérienne par lyse mécanique, L'élimination de la biomasse est effectuée à l'aide d'une filtration sur papier Whatman n° 1. Récupérer Les PHAs dans le filtrat par précipitation avec l'éthanol concentré à 96%. Ensuite centrifuger le filtrat à une vitesse de 10 000 rpm, à une température de 10°C pendant 20 mn pour récupérer Les PHAs. Laver deux fois avec l'éthanol et sécher à température ambiante (**Chaijamrus et al ; 2008**).

### 14. Lyophilisation des souches productrices des PHAs

La lyophilisation est un processus de déshydratation où l'eau est sublimée à partir de préparations congelées sur une surface froide. Utilisé pour préserver les matériaux biologiques, ce procédé maintient leur stabilité et prolonge leur durée de conservation. Appliquée pour la première fois aux substances biologiques par Shackell en 1909. La préparation commence généralement avec une culture en phase stationnaire de croissance, où le rendement cellulaire est maximal.

On privilégie une concentration cellulaire élevée, en ajoutant des substances protectrices telles que le lait, le sérum, le sucre ou le glutamate de sodium avant la congélation.

La nature du milieu de suspension optimal pour une survie maximale dépend de l'espèce, de la vitesse de congélation, ainsi que des conditions de séchage et de stockage (**Heckly, 1961**). La lyophilisation améliore la stabilité des produits, prolonge leur durée de conservation et limite le développement microbien.

#### 14.1 Principe

La lyophilisation peut être décomposée en deux phases principales : la phase de congélation et la phase de déshydratation, cette dernière étant subdivisée en deux parties distinctes : l'étape de sublimation et l'étape de désorption.

Schématiquement, Cela implique tout d'abord la congélation du produit, suivi par la sublimation pour éliminer le surplus de solvant en surface du produit, et enfin la désorption pour éliminer le solvant lié au produit.

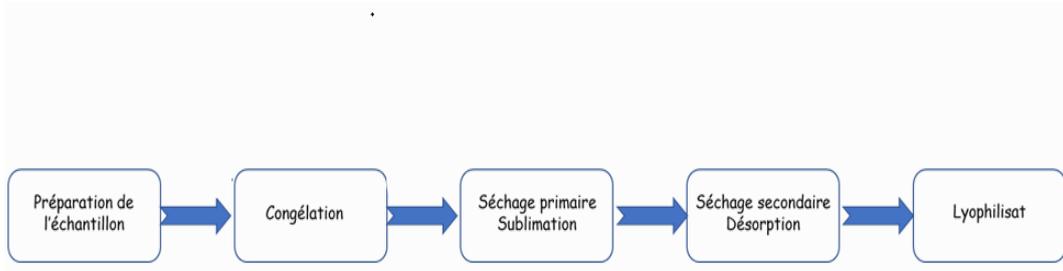


Figure 73 : schéma montrant les étapes de lyophilisation (Biofarma technologies, 2024).

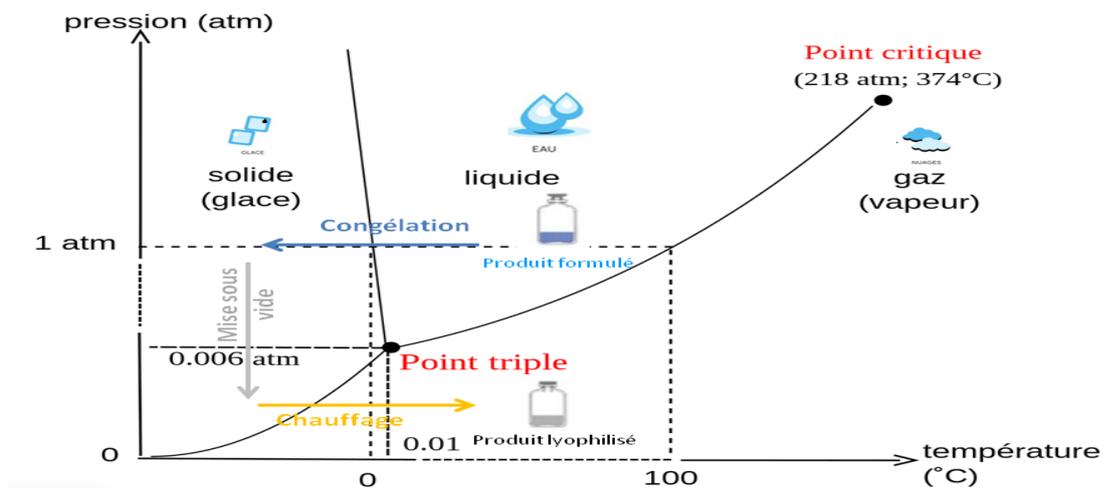


Figure 74 : DiaGramme représentatif des changements d'états de l'eau (La qualité au carré, 2024).

La lyophilisation des cultures cellulaires commence par une congélation rapide pour minimiser la formation de gros cristaux de glace et préserver la morphologie cellulaire. L'eau extracellulaire gèle en premier, suivie de l'eau intracellulaire, qui gèle à des températures inférieures à  $-5\text{ °C}$  ou s'écoule et gèle à l'extérieur de la cellule (El-kest et Marth, 1992 ; Morgan et al., 2006).

Pendant la phase de séchage primaire, la culture congelée est exposée à une pression extrêmement basse pour sublimer la glace sans la faire fondre (Morgan et al., 2006). La phase de séchage secondaire élimine l'eau liée à des températures plus élevées (Trelea et al., 2016). Le stress de dessiccation est limité pendant le séchage, mais des dommages peuvent survenir pendant le stockage à cause des réactions de Maillard et du stress oxydatif (Achour et al., 2001 ; Carvalho et al., 2008 ; Stephan et al., 2016).

Le lait écrémé est couramment utilisé comme milieu de séchage pour stabiliser les composants de la membrane cellulaire en formant un revêtement protecteur autour des cellules (Carvalho et al., 2004).

### 14.2 Matériels

Pipettes Pasteur

Micropipette

Tubes coniques stériles

Coton cardé stérile

Boite de lait écrémé

Lyophilisateur

### 14.3 Méthode

Remplir les tubes coniques de 50 ml avec le lait en raison de 10 ml. Ensuite prélever 2 à 3 ml de lait écrémé et déverser dans la boîte à l'aide d'une micropipette de 1000 $\mu$ l. Avec une pipette stérilisée au bec former un râteau et racler légèrement les colonies sans gratter la gélose et les délayer dans le lait. Aspirer toute la suspension avec la micropipette et verser dans des tubes coniques de 50 ml. Homogénéiser la suspension à l'aide d'un vortex. Fermer les tubes avec un coton cardé stérile Mettre les tubes dans le lyophilisateur



Figure 75 et 76 : Préparation et lyophilisation des Souches Productrices des PHAs.

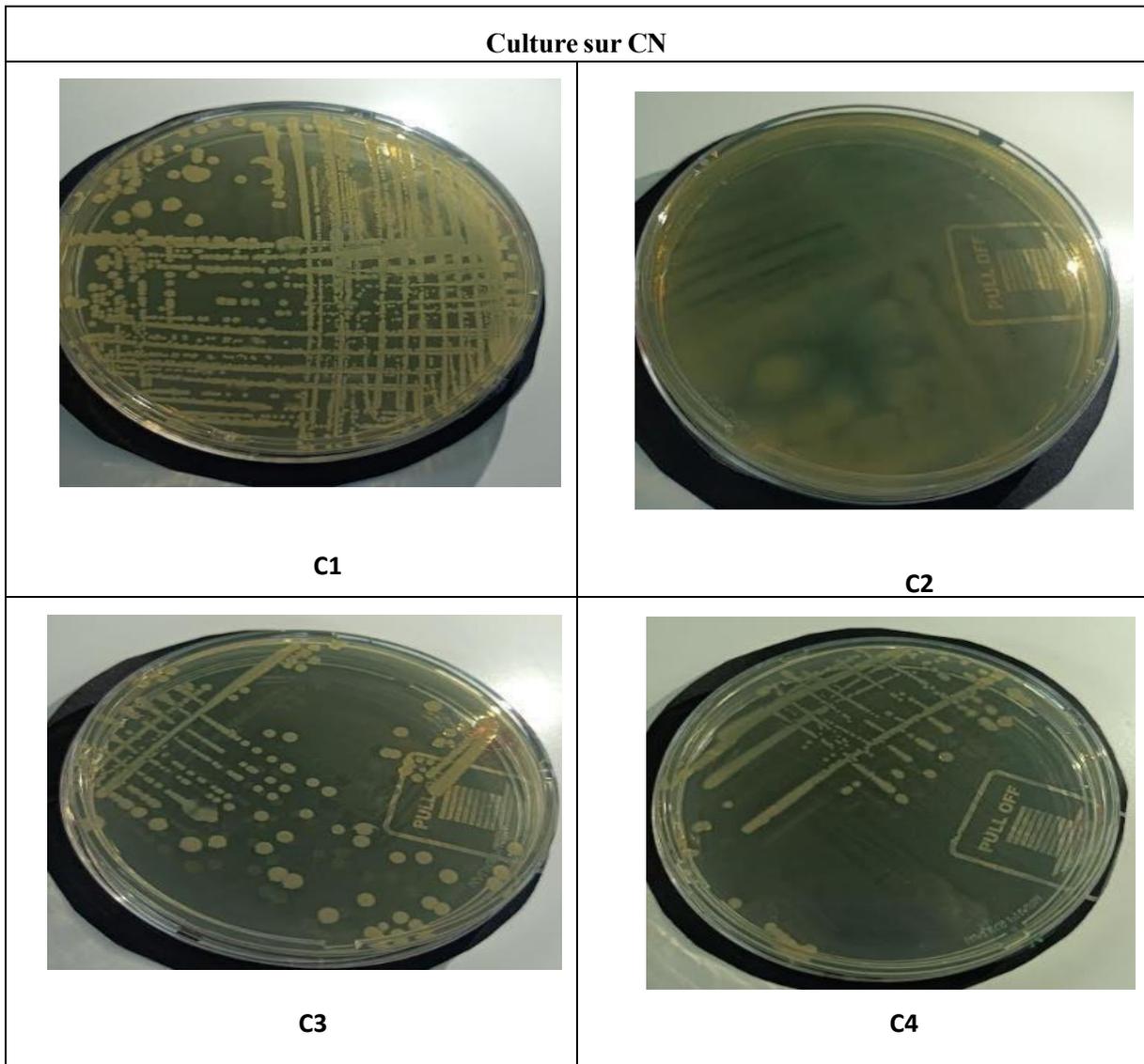
# **Partie III : Résultats et discussion**

## 1. Isolement

L'échantillon effectué à partir du site de prélèvement a permis d'isoler environ 40 souches sur gélose nutritive, qui est un milieu de culture non sélectif utilisé pour la culture de diverses bactéries, y compris celles appartenant au genre *Pseudomonas*. Pour orienter la sélection spécifiquement vers les espèces de *Pseudomonas*, un ensemencement sur milieu cetrimide a été effectué.

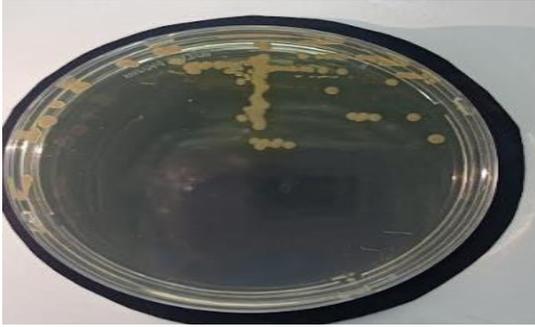
Le milieu CN est un milieu sélectif qui favorise la croissance des espèces appartenant au genre *Pseudomonas*, tout en inhibant la croissance d'autres bactéries (Avril et al., 2000). Grâce à cette méthode de sélection orientée, 18 souches ont poussé en raison de leur capacité à croître sur le milieu CN. Ces résultats sont en accord avec (Avril et al., 2000).

Tableau 09 : Les cultures des souches sur milieu cetrimide.

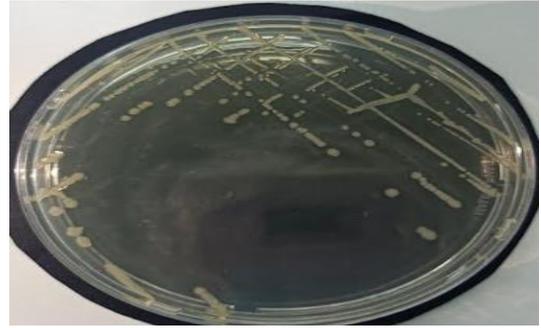


Partie III : Résultats et discussion

---



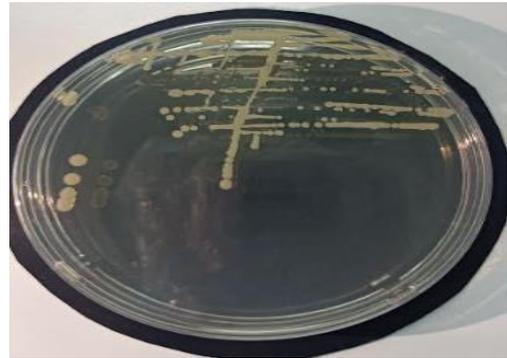
C5



C6



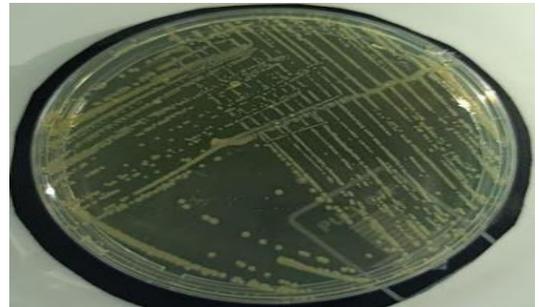
C7



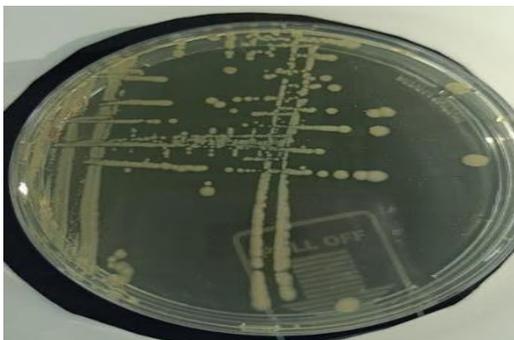
C8



C9



C10



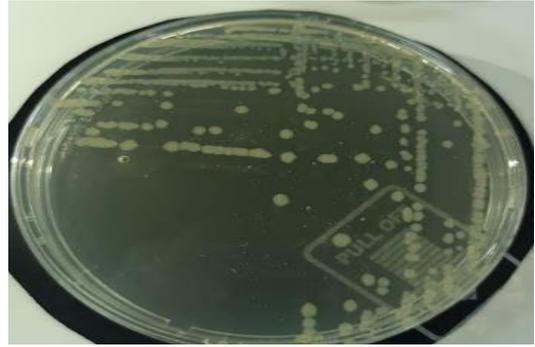
C11



C12



C13



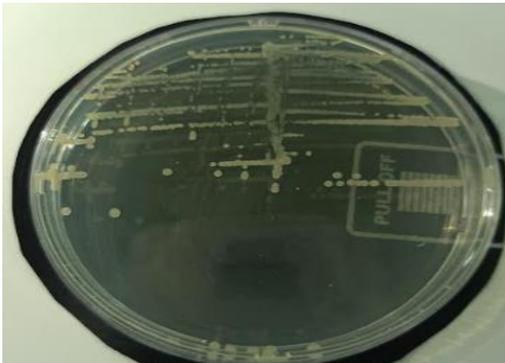
C14



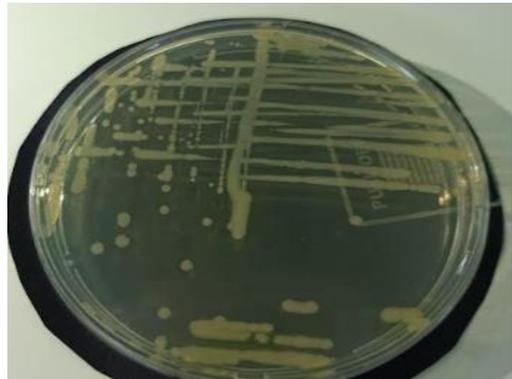
C15



C16



C17



C18

## 2. Purification et identification du genre

L'examen macroscopique, la coloration de Gram et l'observation microscopique des souches isolées ont montré des cellules en forme de bâtonnets légèrement incurvés, avec une réaction positive à l'oxydase et à la catalase, ce qui suggère fortement leur appartenance au genre *Pseudomonas*. Ces résultats concorde la description de (Garrity, 2005).

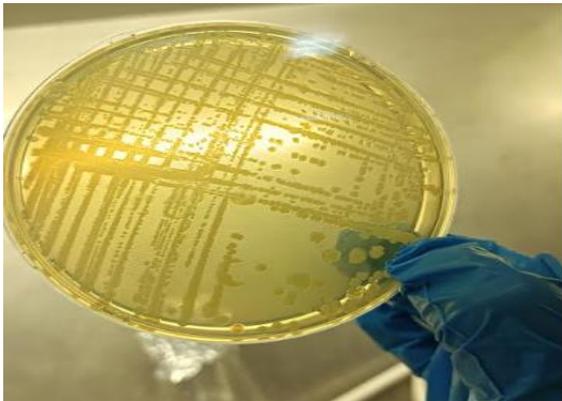
### Partie III : Résultats et discussion

---

Les souches sélectionnées sont purifiées à travers des repiquages successifs, inoculées sur gélose CN à une température de 30°C pendant 28 heures et conservées à 4°C.

#### 2.1. Aspect macroscopique

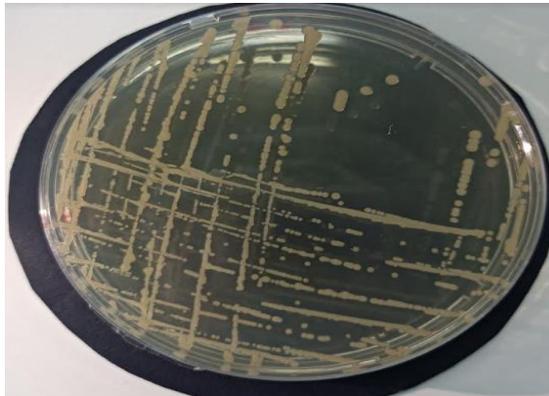
L'observation macroscopique des souches sélectionnées, inoculées sur gélose CN et incubées à une température de 30°C pendant 48 heures, a permis de visualiser des colonies de grande taille, rondes et plates, avec un contour irrégulier pour certaines et régulier pour d'autres. De plus, les colonies sont soit de couleur verte, jaune ou apigmentée. Les résultats sont en accord avec la description de (Avril et al., 2000).



A



B

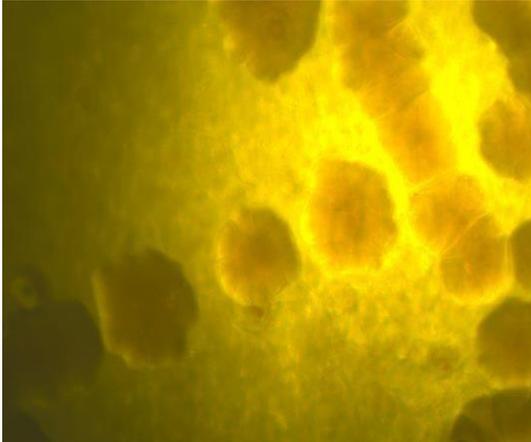
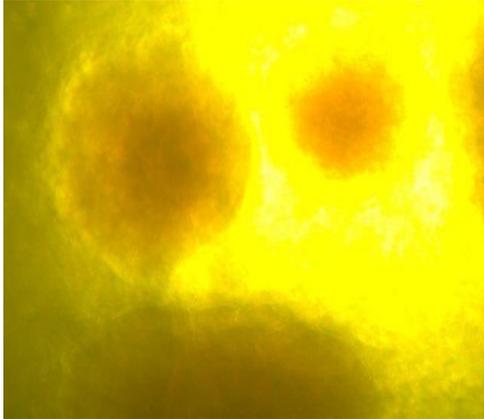
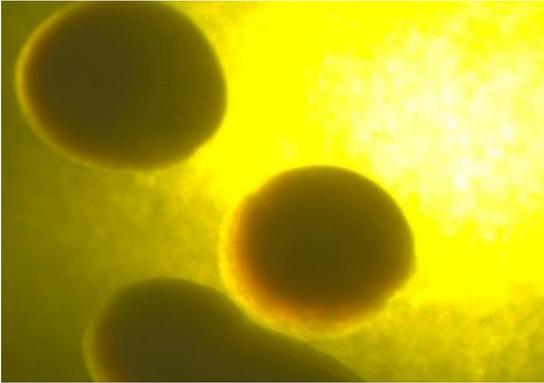
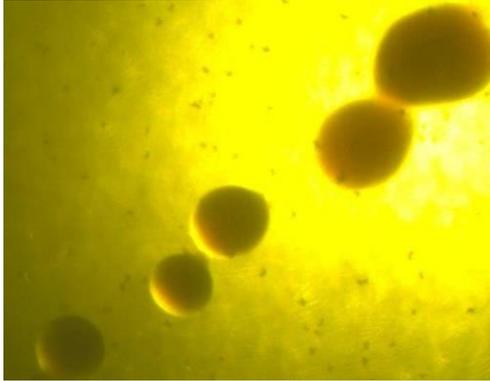
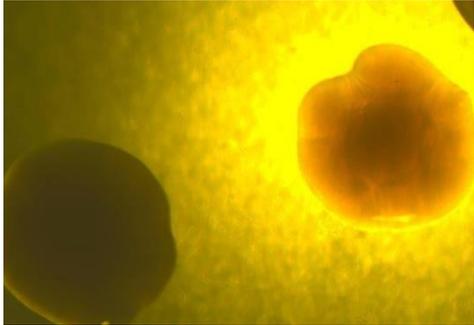


C

**Figure 77 et 78 et 79 :** Observation macroscopique de la souche C10 = de couleur jaune (A), C13= de couleur Verte (B), C8 = Apigmentée (C).

### Partie III : Résultats et discussion

**Tableau 10** : Observation macroscopique des colonies bactériennes par microscope trinoculaire.

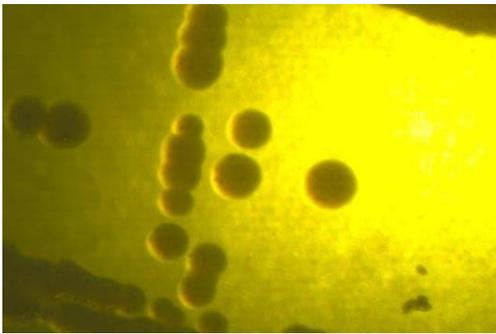
<b>Aspect macroscopique des colonies</b>	
 <p>C1</p>	 <p>C2</p>
 <p>C3</p>	 <p>C4</p>
 <p>C5</p>	 <p>C6</p>



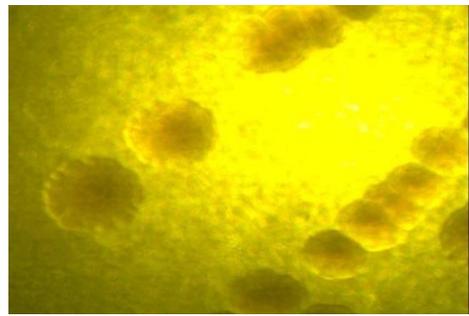
C7



C8



C9



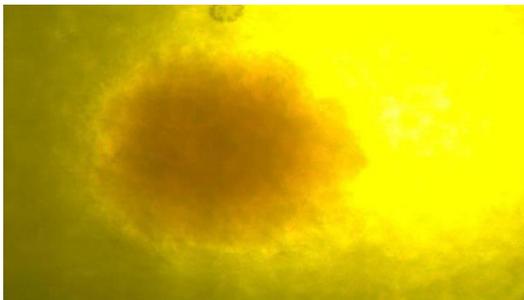
C10



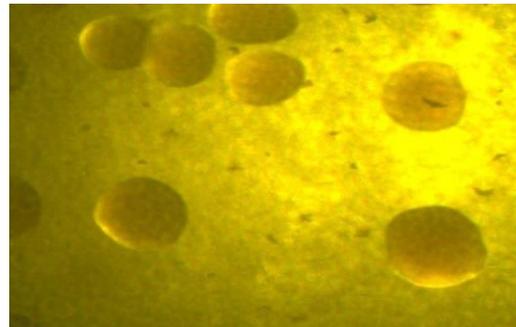
C11



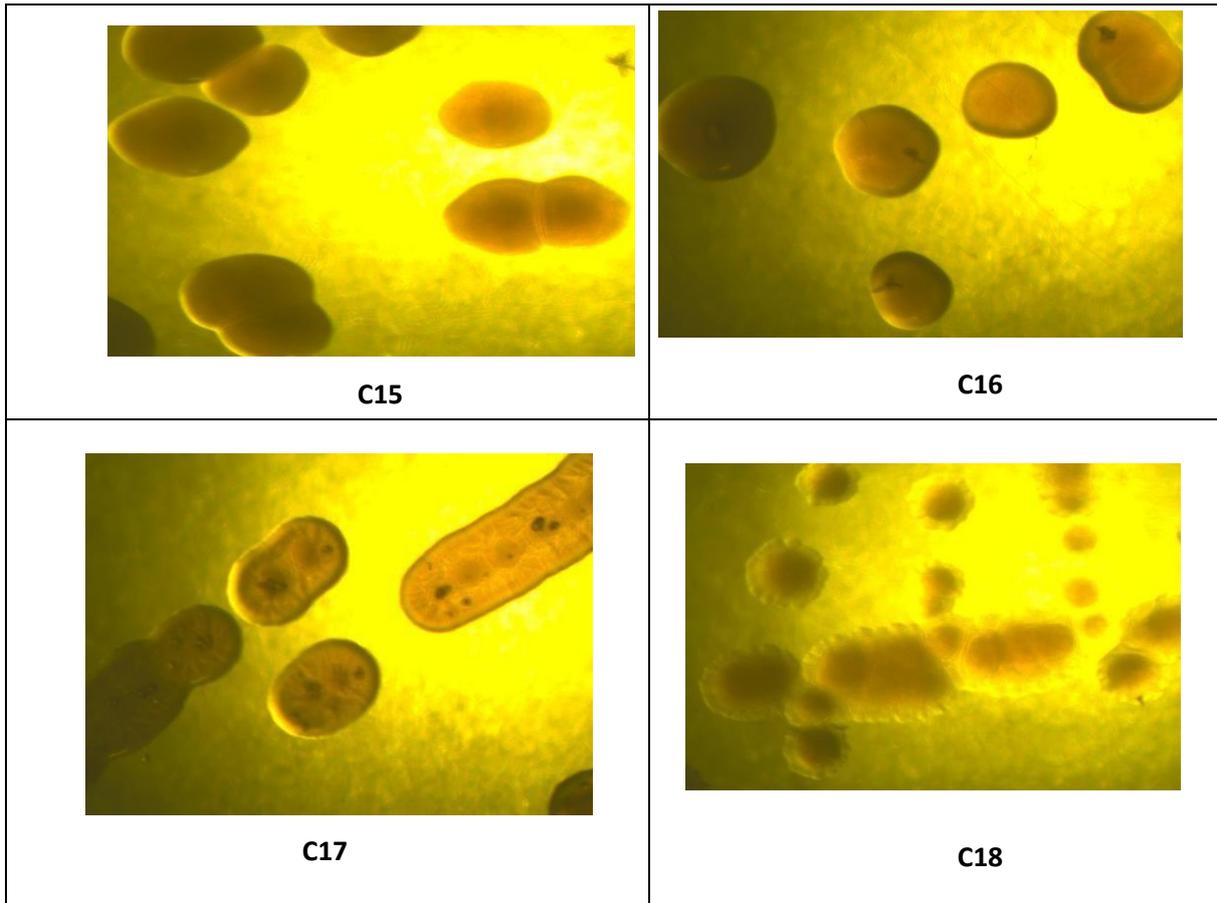
C12



C13



C14



## 2.2. Aspect microscopique

La coloration de Gram, la détermination morphologique et l'organisation des cellules ont été réalisées sur les 18 isolats, inoculés sur la gélose CN et incubés à une température de 30°C pendant 48 heures. La coloration de Gram des isolats a révélé qu'ils étaient des bâtonnets à Gram négatif, non sporulés, droits ou légèrement incurvés mais non hélicoïdaux, avec un diamètre de 0,5 à 1,0  $\mu\text{m}$  et une longueur de 1,5 à 5,0  $\mu\text{m}$ , présentant un regroupement isolé ou en chaînette correspondant aux résultats de (Garrity, 2005).

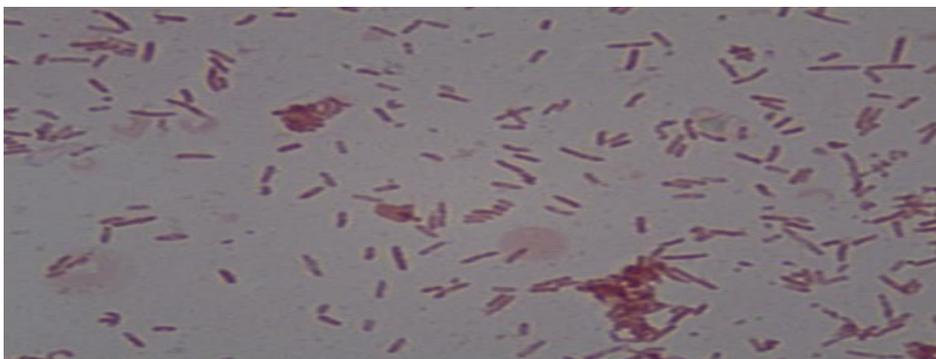
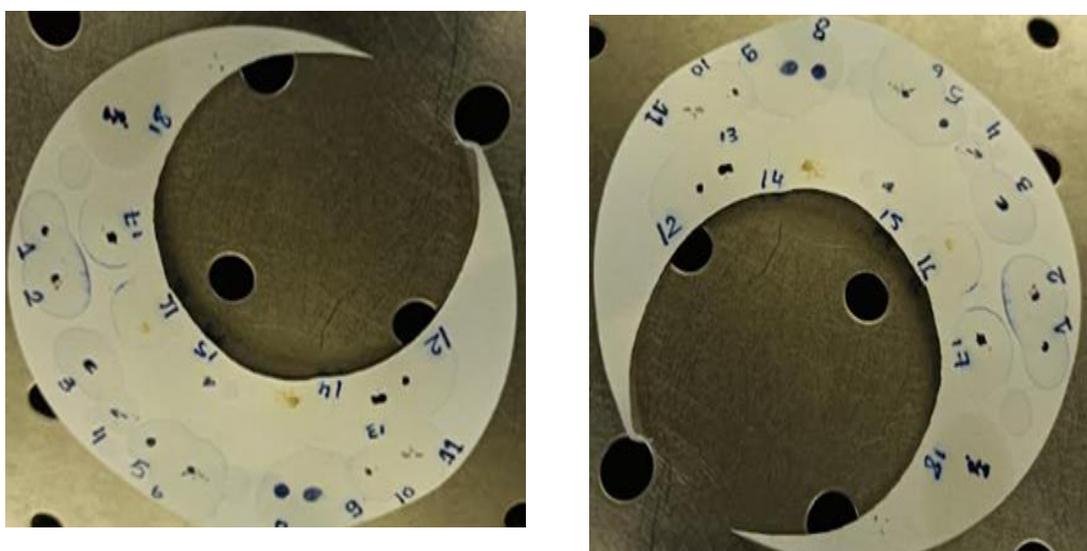


Figure 80 : L'observation microscopique de la souche C 12 après coloration de Gram au grossissement x 100.

Les résultats des prélèvements effectués, l'examen macroscopique, la présence des pigments, la coloration de Gram négative, les tests d'oxydases positifs, et l'organisation des souches isolées, sous forme bâtonnet ont permis d'identifier l'appartenance des 18 souches au genre *Pseudomonas*.

#### 2.3. Mise en évidence de l'oxydase

La détection de la présence de l'enzyme cytochrome oxydase chez les souches isolées a montré une réaction positive chez 16 isolats. Cependant, les isolats C14 et C16, qui présentent une réaction négative à l'oxydase, ont été retenus dans cette étude (Voir figure 81 et 82). Les espèces peuvent être oxydase positives ou négatives mais sont catalase positives (**Garrity, 2005**).



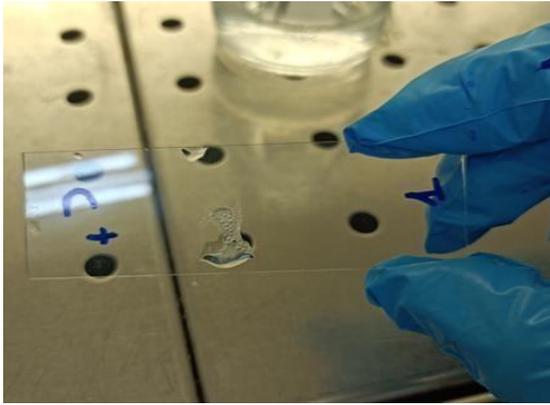
**Figure 81 et 82** : Mise en évidence de l'oxydase des souches : (A) colonies de 1-11, (B) colonie de 12-18.

#### 2.4. Mise en évidence de la catalase

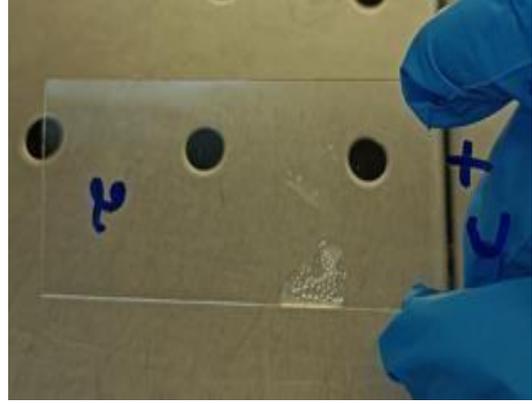
La mise en évidence de la présence de l'enzyme responsable de la dégradation de l'eau oxygénée chez les souches isolées a montré une réaction positive chez 16 isolats ce qui concorde les résultats de (**Avril et al.,2000 ; Garrity,2005**), Cependant, les isolats C7 et C8, qui présentent une réaction négative à la catalase, ont été exclus de cette étude (Voir tableau 11) Elles peuvent être oxydase positives ou négatives et sont catalase positives (**Garrity, 2005**).

. **Tableau 11** : Mise en évidence de la catalase des 18 souches.

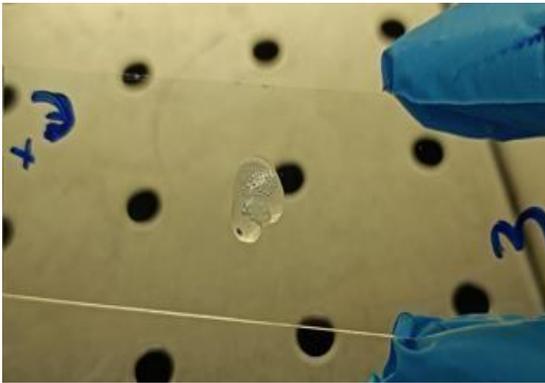
Mise en évidence de la catalase



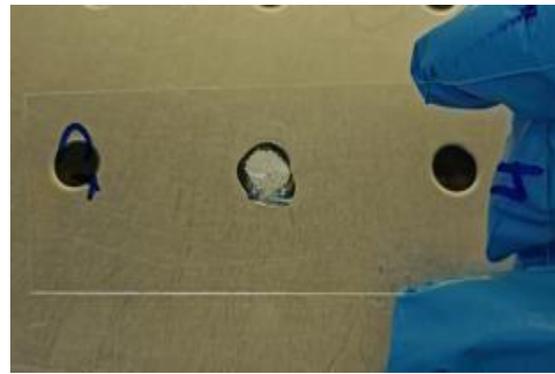
C1



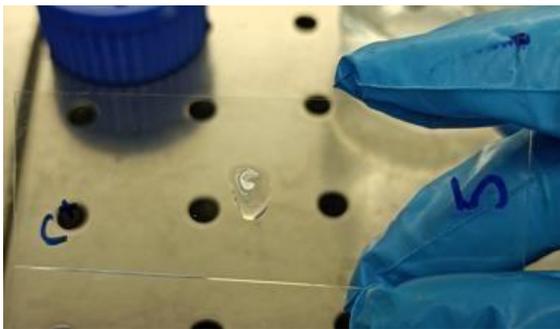
C2



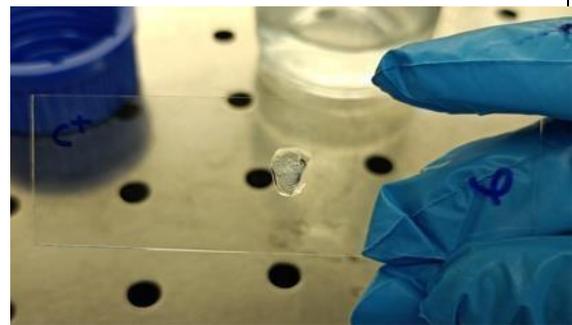
C3



C4

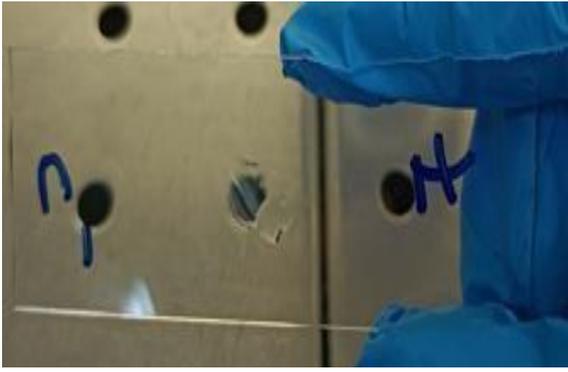


C5

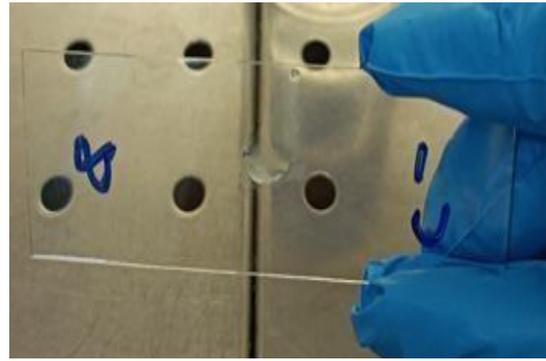


C6

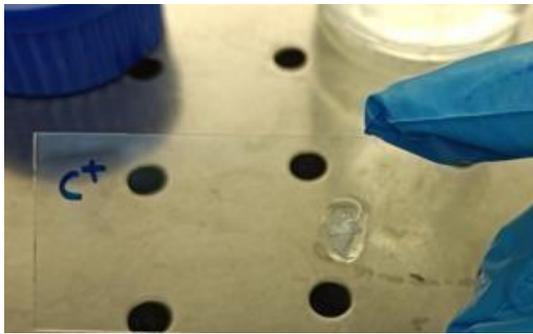
Partie III : Résultats et discussion



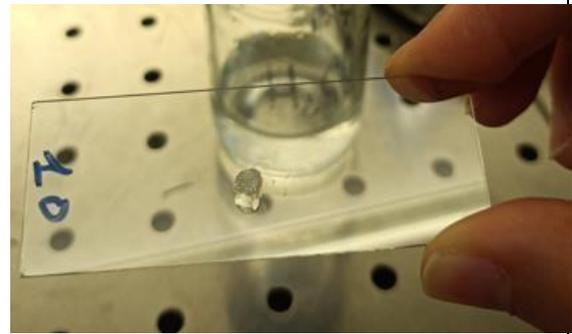
C7



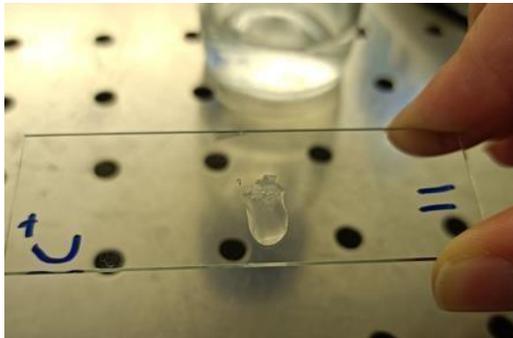
C8



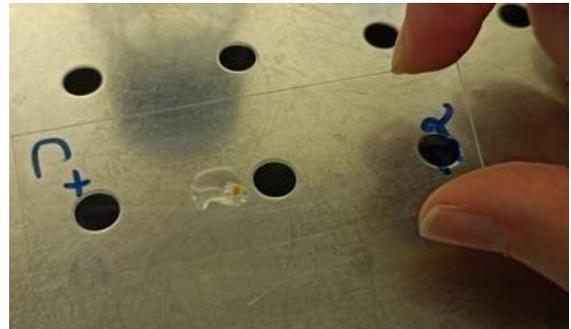
C9



C10



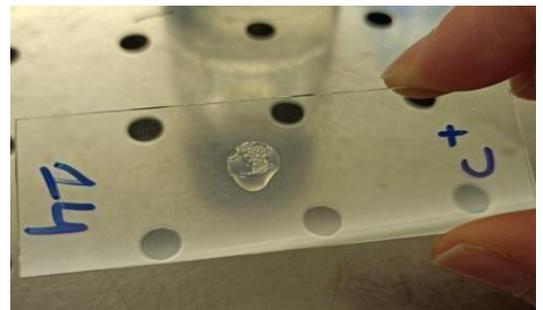
C11



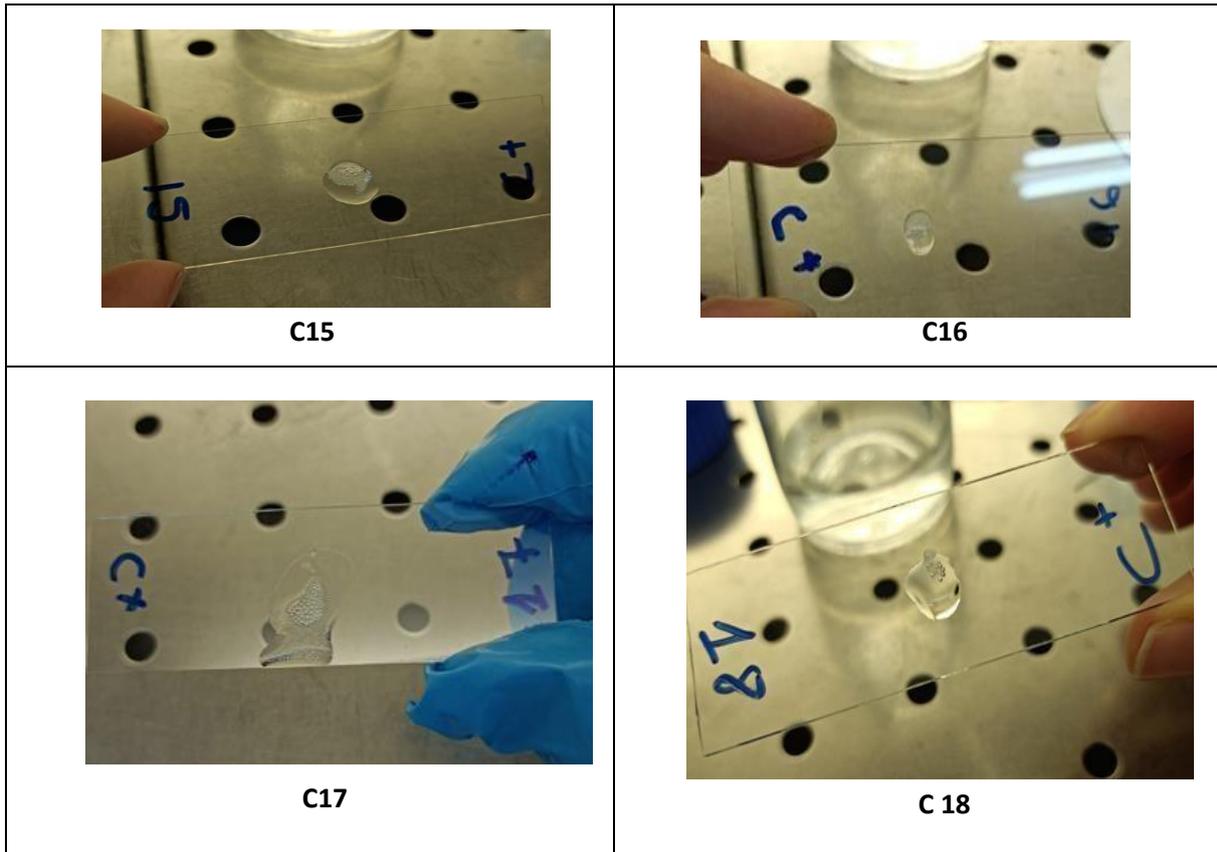
C12



C13



C14



### 2.5. Identification des souches par API 20NE

Les souches 10, 12 et 13 de *Pseudomonas* ont été soumises à l'utilisation de la galerie API 20NE pour l'identification spécifique des espèces. Chaque galerie API 20NE contient 20 micros tubes avec des substrats déshydratés pour différents tests biochimiques spécifiques aux *Pseudomonas*.



Figure 83 : Profils d'identification des souches 10, 12 et 13 de *Pseudomonas* par la galerie API 20NE.

### Partie III : Résultats et discussion

Les réactions biochimiques ont été observées après incubation et ont été interprétées en utilisant le tableau de lecture fourni par le fabricant.

✓ **Pour la souche 10 :**

- Les tests biochimiques ont montré un profil caractéristique avec des résultats positifs pour certains tests d'assimilation et des réactions spécifiques aux substrats.
- Les caractéristiques biochimiques observées indiquent que la souche 10 appartient à l'espèce *Pseudomonas putida* (Voir figure 84).

apiweb™ - Résultat d'identification

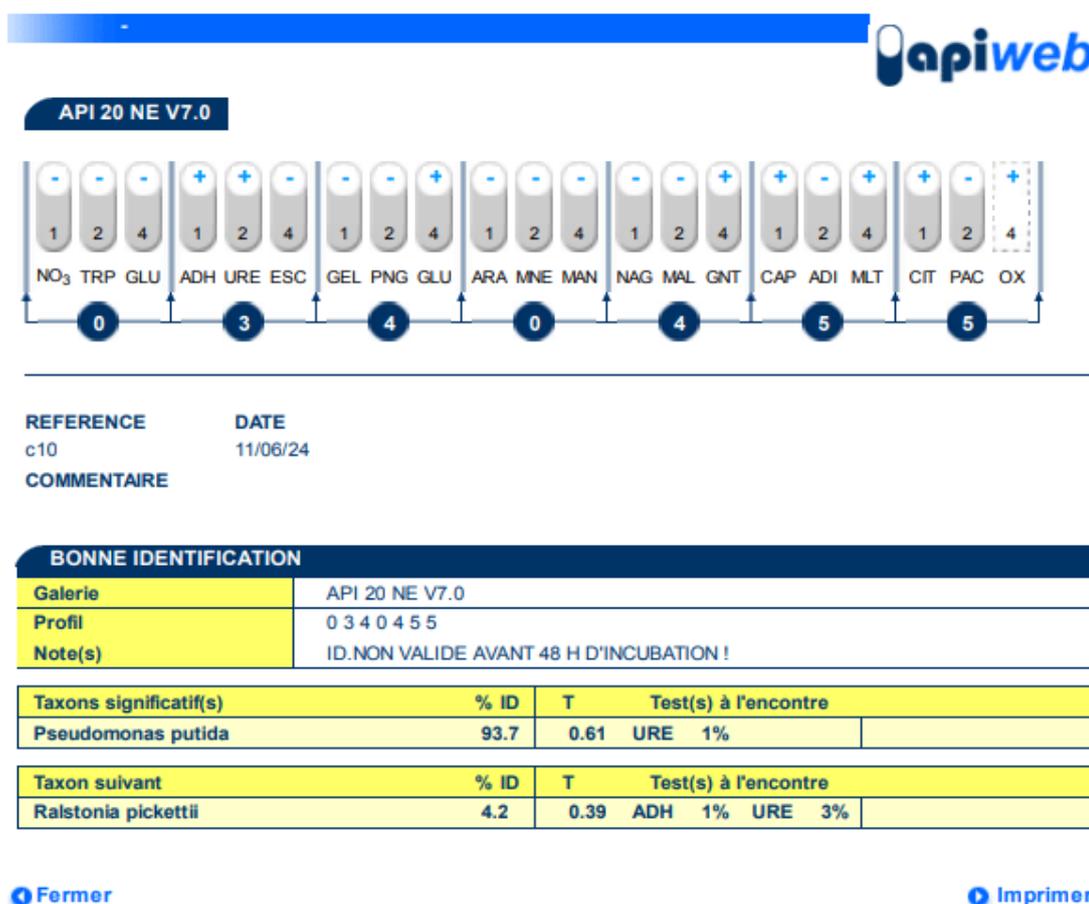


Figure 84 : Identification biochimique de la souche 10 de *Pseudomonas putida* par la galerie API 20NE

✓ **Pour la souche 12 :**

Les tests biochimiques ont révélé un profil distinctif avec des résultats positifs pour certains tests d'assimilation et des réactions spécifiques aux substrats.

Les réactions biochimiques indiquent clairement l'identification de la souche 12 comme une espèce spécifique de *Pseudomonas putida* (Voir figure 85).

apiweb™ - Résultat d'identification

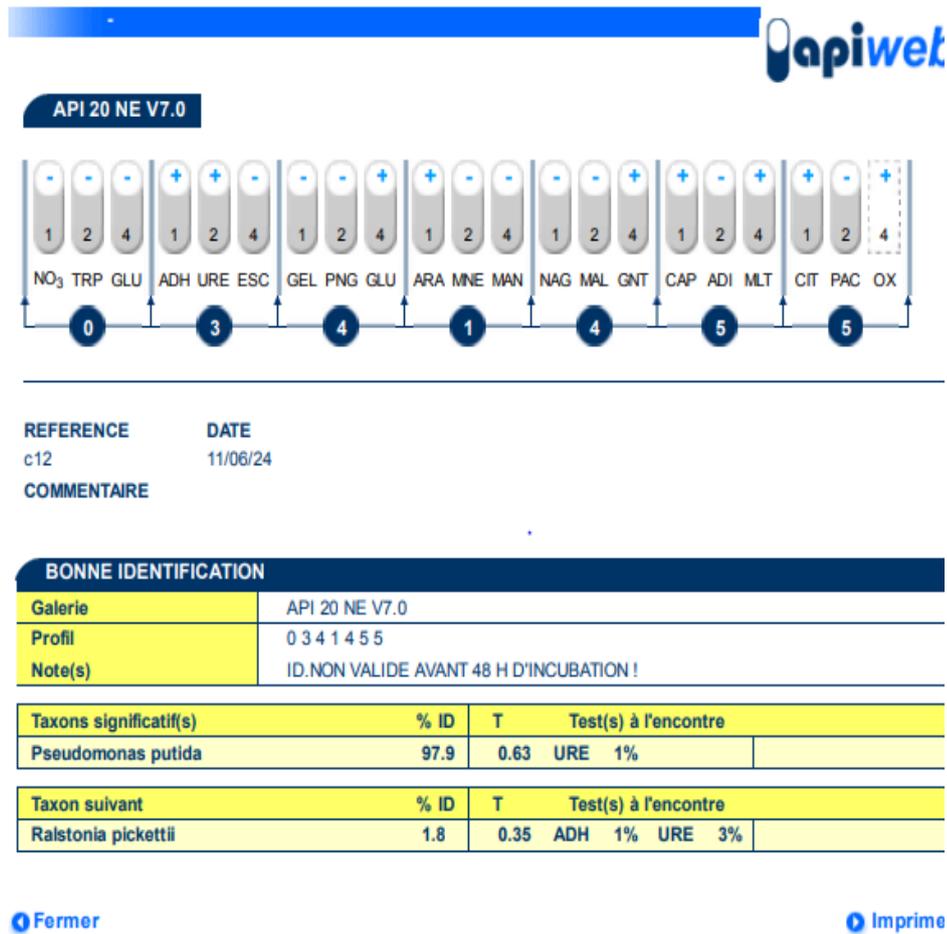


Figure 85 : Identification biochimique de la souche 12 de *Pseudomonas putida* par la galerie API 20NE.

✓ **Pour la souche 13 :**

Les résultats des tests biochimiques ont montré un profil unique avec des réactions différentes des autres souches testées.

Les caractéristiques biochimiques observées confirment l'identification précise de la souche 13 comme une espèce spécifique de *Pseudomonas aeruginosa* (Voir figure 86).

apiweb™ - Résultat d'identification

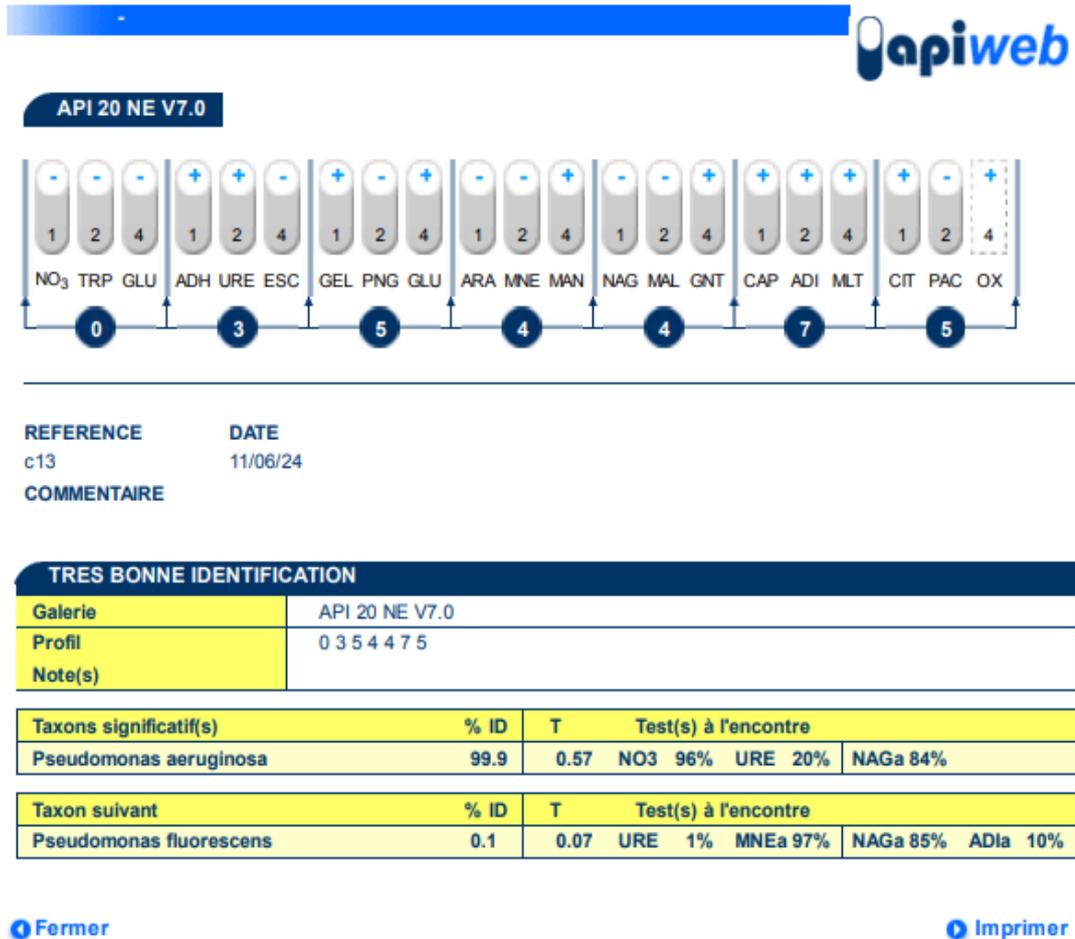


Figure 86 : Identification biochimique de la souche 13 de *Pseudomonas aeruginosa* par la galerie API 20NE.

L'utilisation de la galerie API 20NE pour l'identification des souches 10, 12 et 13 de *Pseudomonas* a démontré une fiabilité et une efficacité élevées.

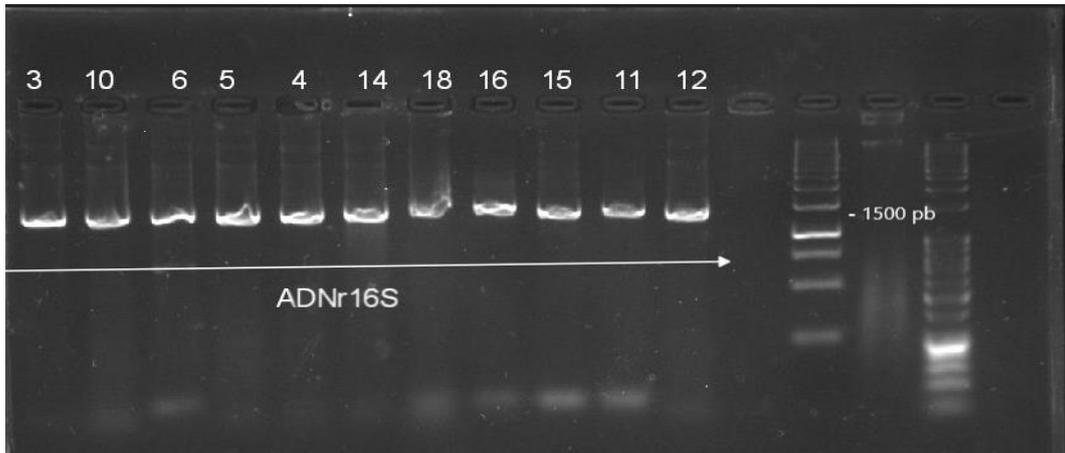
### 3. Identification moléculaire des souches sélectionnées

Le gène 16S rDNA est composé de régions conservées permettant l'appariement d'amorces et la distinction de l'espèce (Baker *et al.*, 2003).

La PCR réalisée sur l'ADNr 16S a permis d'amplifier le gène 16S des 11 souches étudiées : C3, C4, C5, C6, C10, C11, C12, C14, C15, C16, et C18. Les résultats montrent la présence d'une seule bande d'ADN pour chaque échantillon étudié, sans la présence d'un smear, ce qui indique l'absence de contamination ou de dégradation de l'ADN extrait. Le produit de la PCR (amplicon) a été évalué visuellement par comparaison au marqueur utilisé. La taille de la bande

### Partie III : Résultats et discussion

correspond au poids moléculaire de 1500 Pb avec un marqueur de taille de 100 Pb (Voir Figure 87).



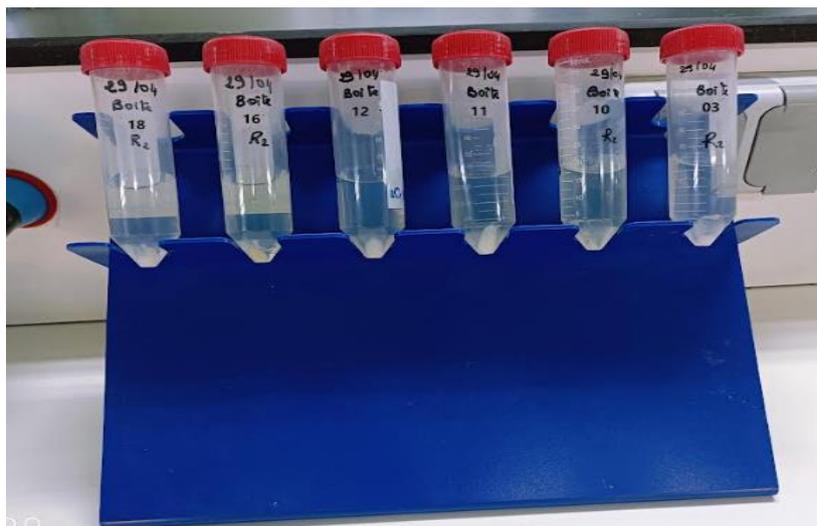
**Figure 87 :** Profil électrophorétique de l'amplification des fragments d'ADN du gène Ribosomal 16S sur gel d'agarose de 1,5 %.

Sur la base de la caractérisation phénotypique et génotypique, ainsi que par comparaison théorique aux résultats d'amplification de l'ADNr 16S effectuée par (Nimali et al.,2010), les souches sélectionnées forment un groupe associé au genre *Pseudomonas*.

#### 4. Fermentation

##### 4.1 Fermentation à l'échelle erlenmeyer

- Détermination du poids sec cellulaire



**Figure 88 :** Les résultats de la centrifugation des souches C3, C10, C11, C12, C16 et C18.

### Partie III : Résultats et discussion

Après la centrifugation des cellules des souches sélectionnées, voici les résultats obtenus dans le tableau suivant :

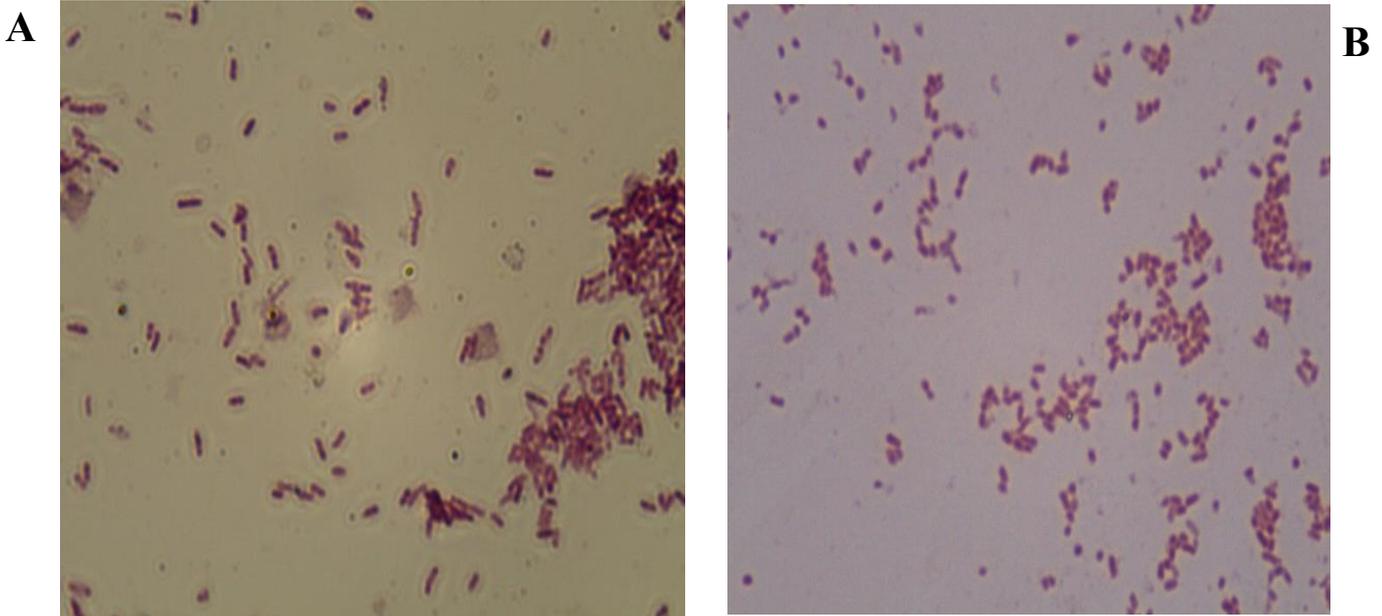
**Tableau 12** : Détermination du poids sec cellulaire des 18 souches.

<b>Tubes</b>	<b>Poids sec</b>
1	8,90
2	8,91
3	9,02
4	8,99
5	9,03
6	8,98
7	8,93
8	8,94
9	8,96
10	9,01
11	9,00
12	9,10
13	8,92
14	8,97
15	8,99
16	9,02
17	8,90
18	9,04

Sur la base des résultats obtenus, les souches (C3, C4, C5, C6, C10, C11, C12, C15, C16, C18) ont été sélectionnées en raison de leur poids sec élevé, ce qui suggère une corrélation potentielle avec une production élevée des PHAs. Cette corrélation a été renforcée par la coloration en noir soudan, démontrant ainsi la capacité de ces souches à produire des polyhydroxyalcanoates à des niveaux significativement élevés.

#### **4.2 Le criblage et sélection des souches potentiellement productrices des PHAs**

La sélection des souches productrices des PHAs est basée sur la coloration des frottis avec le noir soudan à concentrations de 0,3 % (Voir figure 89 et 90).



**Figure 89 et 90** : Coloration de la souche productrice (A), non productrice (B) avec le noir Soudan B  $\times 100$ .

Le noir Soudan est un colorant synthétique dérivé des hydrocarbures extraits du goudron de houille et dérivés du benzène. Il est insoluble dans l'eau, mais soluble dans l'éthanol, l'éther, le méthanol et les corps gras tels que les polyhydroxyalcanoates (**Medjeber, 2016**).

L'observation microscopique après coloration au noir Soudan montre que les PHAs apparaissent sous forme de granules cellulaires noirs. Les résultats obtenus de la coloration sur frottis avec le noir Soudan B ont montré que parmi les 11 souches appartenant au genre *Pseudomonas*, 8 souches (**C3, C5, C10, C11, C12, C15, C16, C18**) sont fortement productrices des PHAs. Ce choix était basé sur l'intensité de rétention du noir Soudan. Les cellules productrices des PHAs augmentent de volume après 48 heures de croissance dans le milieu M9.

Les colonies issues des cellules bactériennes à PHA +, étaient reconnues par leur coloration en noir ou gris foncé, par contre les cellules à PHA -, les colonies étaient incolores ou grises, car les cellules n'ont pas retenu le colorant. Sur frottis on peut voir l'intensité des vésicules noires dans le cytoplasme des cellules productrices. Ces résultats sont identiques à ceux obtenus par (**Sharma et Harish, 2015 ; Yan et al., 2000 ; Murray et al., 1994**).

### 4.3. Fermentation à l'échelle semi-pilote « scale up »

L'accumulation des PHAs dans les cellules est maximale lorsque les bactéries sont cultivées sur des substrats contenant simultanément un excès de carbone et une limitation de l'apport d'autres substances nutritives telles que, l'ammonium, le sulfate, le phosphate, le fer, le magnésium, le potassium ou l'oxygène (Doi., 1990 ; Steinbüchel et al., 1992 ; Phanse et al., 2011).

En créant ce déséquilibre, les microorganismes cessent de se multiplier pour commencer à produire les PHAs. Le milieu synthétique sélectionné dans cette étude favorise l'accumulation de bioplastique lorsque l'équilibre de nutriment essentiel est perturbé en respectant le rapport C/N élevé.

Les souches de *Pseudomonas* sont largement étudiées pour leur polyvalence métabolique, ce qui les rend idéales comme usines cellulaires pour la production de polyhydroxyalcanoates (PHAs) (Poblete-Castro et al., 2014).

En raison de leur coût de production raisonnable, les procédés de fermentation en mode batch sont fréquemment employés dans l'industrie de la fermentation (Kaur et Roy, 2015).

Dans notre étude, pour la réalisation de la fermentation en batch, le choix s'est porté sur la souche C12 en raison de sa biomasse élevée et de l'intensité élevée des inclusions des PHAs après le criblage au noir de soudain.

Le suivi de la cinétique de croissance de la bactérie étudiée est assuré par la surveillance de différents paramètres (O<sub>2</sub>, température, pH, agitation), La figure 91 ci-jointe illustre l'évolution de ces paramètres au cours du processus de fermentation.

### Partie III : Résultats et discussion



Figure 91 : Courbe de l'évolution des différents paramètres au cours du processus de fermentation.

Tous les paramètres sont contrôlés par le logiciel pilote :

- Courbe de température (en jaune) : elle est maintenue constante tout au long de fermentation grâce au système de la ceinture chauffante, ce qui n'influence pas la cinétique de croissance des bactéries.
- Courbe de pH (en bleu clair) : Surveillée par des prélèvements effectués à intervalles réguliers toutes les 2 heures, le pH reste constant (entre 7 et 7,43). Par conséquent, l'ajout d'acide ou de base n'est pas nécessaire (voir figure 92).



Figure 92 : Mesure de la stabilité du pH pendant la fermentation.

### Partie III : Résultats et discussion

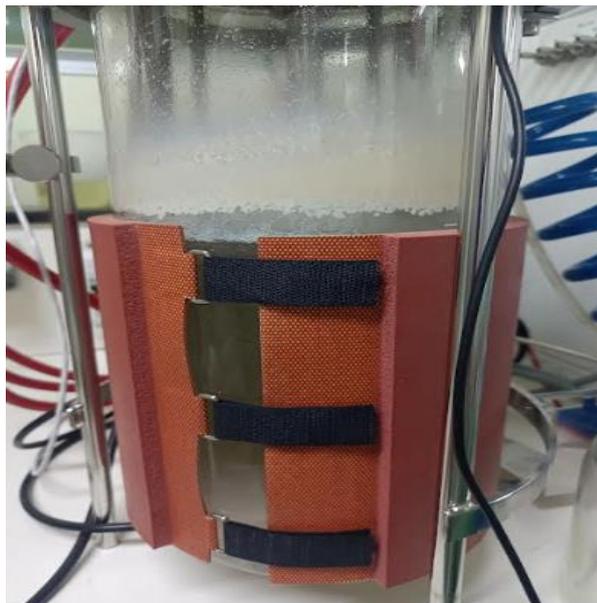
---

- L'agitation (en bleu foncé) : Maintenu à 800 rpm, elle permet une bonne homogénéisation des composants du milieu et une aération optimale pour notre souche étudiée.
- L'oxygène (en rouge) : Varie en corrélation avec la cinétique de croissance des cellules bactériennes.

Lorsque le taux d'oxygène reste stable au début de la fermentation, cela suggère que les cellules bactériennes traversent une phase initiale d'adaptation au milieu de culture. Pendant cette phase, les cellules ajustent leur métabolisme et leur physiologie pour s'adapter aux conditions spécifiques du milieu. Cette adaptation peut impliquer des changements dans l'expression des gènes, l'activation de certaines voies métaboliques et la synthèse de protéines spécifiques nécessaires à la croissance et à la survie dans le milieu de fermentation.

Une fois que les cellules ont achevé cette phase d'adaptation, elles peuvent entrer dans une phase de croissance exponentielle où la consommation d'oxygène atteint son maximum, ce qui se traduit par une baisse de son taux.

Pendant la phase stationnaire, bien que la croissance cellulaire cesse, les cellules continuent souvent à métaboliser et à produire divers composés, y compris les polyhydroxyalcanoates (PHAs), en réponse à une carence en nutriments. C'est à ce stade que nous arrêtons la fermentation et récupérons la biomasse pour l'extraction des PHA.



**Figure 93** : Down Stream (l'arrêt de la fermentation).

## 5. Extraction des polyhydroxyalcanoates (PHAs)

Les PHA sont des produits intracellulaires, et les méthodes de séparation de la biomasse sont souvent coûteuses et complexes. La méthode la plus couramment utilisée pour extraire les PHA de la biomasse est l'extraction par solvants. Dans cette étude, une extraction liquide-solide avec du chloroforme chaud, suivie d'une précipitation sélective dans l'éthanol, a été employée pour récupérer les PHA à partir de la biomasse de *Pseudomonas*.

L'extraction par solvant à température ambiante, combinée à une homogénéisation rapide à 13 500 rpm suivie d'une précipitation à l'éthanol, a été utilisée par (Chaijamrus et Uduy, 2008).

Diverses méthodes d'extraction des bioplastiques bactériens ont été explorées. Celles-ci incluent l'extraction par solvants à chaud ou à froid, ainsi que des combinaisons de l'extraction au  $\text{CHCl}_3$  avec la digestion chimique, telles que l'utilisation de l'hypochlorite de sodium, rapportées par (Yu et al., 2001 ; Adwitiya et al., 2009 ; Hahn et al., 1995 ; Choi et Lee, 1997), ou bien le SDS (sodium dodecyl sulfate) par (Jiang et al., 2008). Cependant, ces traitements chimiques de la biomasse provoquent souvent une dégradation importante du polymère (Chee et al., 2010).

Cette approche a été choisie pour sa capacité à extraire efficacement les PHA tout en minimisant la dégradation du polymère.

En comparant notre méthode avec d'autres approches rapportées dans la littérature, telles que l'extraction au  $\text{CHCl}_3$  combinée à la digestion chimique avec l'hypochlorite de sodium ou le SDS, nous avons observé que ces traitements chimiques pouvaient souvent entraîner une dégradation significative du polymère.

En revanche, notre méthode à base de chloroforme chaud suivie de la précipitation à l'éthanol a montré une récupération peu efficace des PHA sans une dégradation significative du polymère.

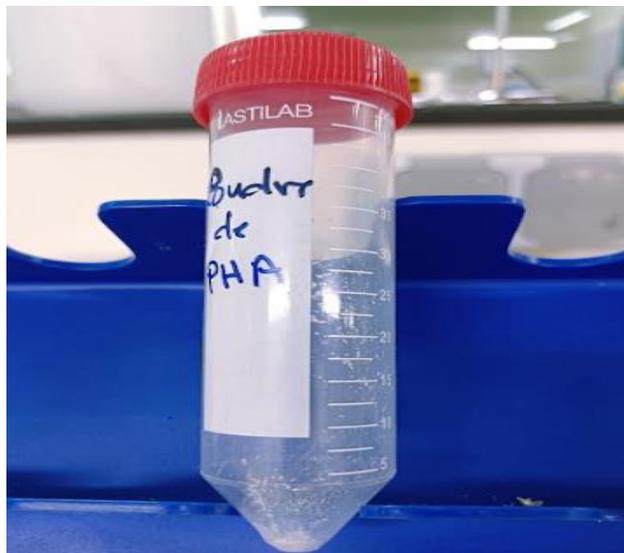
## 6. Purification des PHA

En général, la synthèse des PHA, suivie de leur accumulation, constitue une réponse au stress chez les bactéries résidant dans différentes niches écologiques (Koller et al., 2011). Le poids moléculaire des PHA varie entre 2 000 et 2 millions de daltons selon la souche

bactérienne, les conditions de fermentation et le substrat utilisé dans la technologie des bioprocédés.

La quantité de polymère produite est déterminée par gravimétrie. Après évaporation du solvant, les PHAs sont récoltés sous forme d'une poudre blanche dans des tubes Eppendorf préalablement séchés et pesés, puis exprimés en pourcentage par rapport au poids sec cellulaire (**Salazar et al., 2014**). Dans notre cas, une petite quantité de poudre a été collectée dans des tubes coniques (voir Figure 94). Ces résultats sont en désaccord avec (**Kaur et Roy, 2015**).

Nous supposons que la souche choisie est peu rentable car plusieurs facteurs peuvent influencer le poids moléculaire des PHAs, tels que les conditions de croissance, les méthodes d'extraction, le substrat utilisé et le type de fermentation (**Koller, 2017**).



**Figure 94** : Purification des PHAs et collecte en tubes Coniques.

## 7. Lyophilisation

Les souches de *Pseudomonas* ont été soumises à un processus de lyophilisation. Après la lyophilisation, les échantillons ont été observés pour leur aspect physique.

Les souches lyophilisées ont montré une poudre fine et homogène sans agglomération notable, indiquant une lyophilisation réussie.

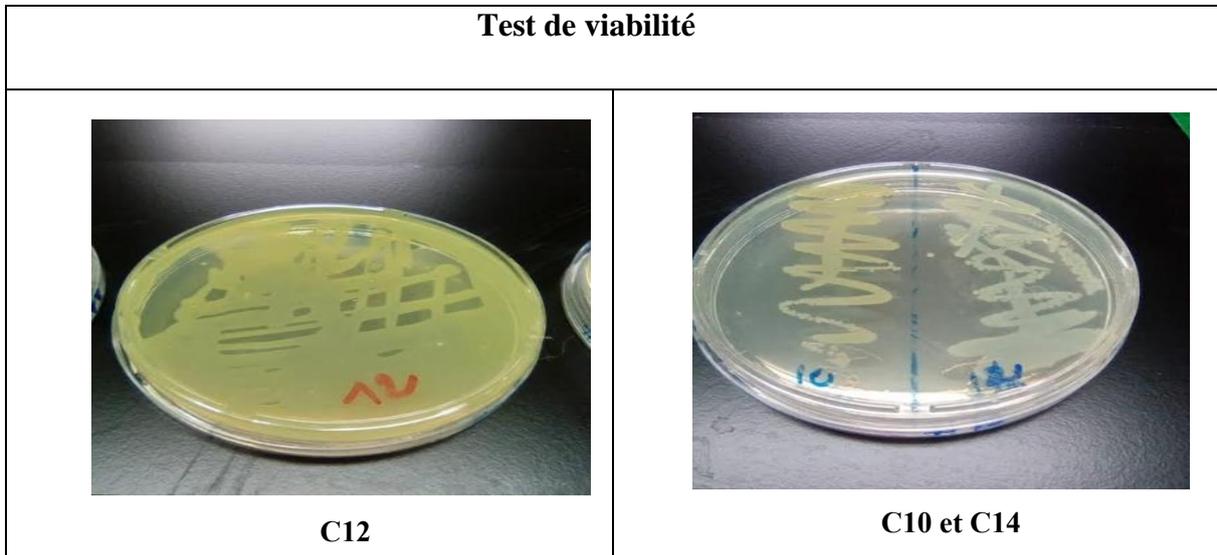


Figure 95 : Aspect physique des souches de *Pseudomonas* après lyophilisation.

### 7.1. Test de viabilité

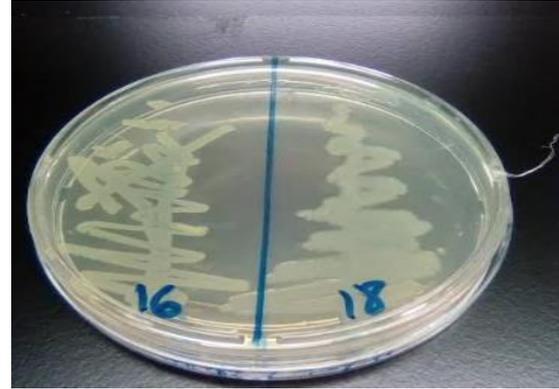
Le test de viabilité a été effectué en plaquant les échantillons reconstitués sur le milieu Mueller-Hinton. Le test a montré que les souches C12, C10, C11, C13, C14, C16, C18 conservaient leur capacité de croissance après la reconstitution, démontrant que la lyophilisation n'avait pas compromis leur viabilité

Tableau 13 : Test de viabilité des souches C10, C11, C12, C13, C14, C16 et C18 de *Pseudomonas* après lyophilisation et reconstitution sur milieu Mueller-Hinton.





C11 et C13



C16 et C18

# **Conclusion et perspectives**

## Conclusion et perspectives

---

Cette étude a permis l'isolement et l'identification des espèces du genre *Pseudomonas* à partir d'échantillon d'eaux usées. Nos résultats ont montré que Sur 18 souches, 08 isolats sont producteurs des PHAs par fermentation en batch. Parmi eux la souche C12 correspondant à *Pseudomonas Putida* identifiée grâce aux galerie API 20 NE montrant la plus grande biomasse qui est en corrélation avec la production intracellulaire des PHAs. La fermentation à l'échelle semi pilote a été lancée avec cette dernière. A la fin de ce processus une poudre a été récupérée après extraction par solvants avec chauffage puis purifiée. En vue d'une future production industrielle, les résultats obtenus à l'échelle laboratoire devront être validés à l'échelle pilote et pour se faire la lyophilisation s'est imposée.

Pour assurer une production durable de polyhydroxyalcanoates (PHAs) par les espèces de *Pseudomonas*, il est essentiel de surmonter les principaux défis liés aux coûts des sources de carbone et à l'amélioration de l'efficacité de la production et de l'extraction. L'utilisation de divers flux de déchets comme sources de carbone permet non seulement de réduire les coûts de production, mais aussi de boucler les cycles de consommation des matériaux, un aspect crucial de l'économie circulaire. L'intégration de sous-produits de déchets et de cultures microbiennes mixtes, associée à des outils d'ingénierie métabolique, représente une voie prometteuse pour les processus de production des PHAs et leur utilisation en tant que bioproduits précieux et respectueux de l'environnement.

Actuellement, la majorité des recherches se concentrent sur l'augmentation du rendement des processus. Cependant, pour convaincre le marché d'adopter les PHAs issus des cultures microbiennes mixtes (MMC), les recherches doivent viser à obtenir une qualité constante avec une composition uniforme des biopolymères, en plus de rendements de production élevés. La bioaugmentation des méthodes d'extraction efficaces pourraient être des stratégies clés pour améliorer la production des PHAs à partir des MMC.

La commercialisation des bioplastiques connaît une phase critique. Les récentes réglementations strictes visant à interdire ou à réduire l'utilisation des plastiques conventionnels dérivés du pétrole, la diminution anticipée des ressources en combustibles fossiles et la sensibilisation accrue du public encouragent la recherche de plastiques biodégradables et durables. En conséquence, la production microbienne de polyhydroxyalcanoates (PHAs) gagne en popularité en raison de ses nombreux avantages.

# **References bibliographiques**

## Références bibliographiques

---

**Amache R., Sukan A., Safari M., Roy I., Keshavarz T.**, 2013, Advances in phas production, Chemical Engineering Transactions, 32, 931-936 DOI: 10.3303/CET1332156

**Amal A. Aljuraifani, Mahmoud M. Berekaa and Azzah A. Ghazwani** (2018). Perspectives of Polyhydroxyalkanoate (PHAs) Biopolymer Production Using Indigenous Bacteria: Screening and Characterization, <http://dx.doi.org/10.22207/JPAM.12.4.36>

**Amal A. Aljuraifani, Mahmoud M. Berekaa, and Azzah A. Ghazwani**, Perspectives of Polyhydroxyalkanoate (PHAs) Biopolymer Production Using Indigenous Bacteria: Screening and Characterization, J Pure Appl Microbiol., 2018; 12(4):1997-2009 <http://dx.doi.org/10.22207/JPAM.12.4.36>

**Aswini P., Kavitha P., Revathi A R, Babujanarthanam R.** Poly  $\beta$  hydroxy butyrate (PHB) biosynthesis in Bacillus. Int J Pharm Sci Rev Res., 2014; 28:8–11.

**Bhuwal A., Singh G., Aggarwal N., Varsha G., Anita Y.** Isolation and screening of polyhydroxyalkanoates producing bacteria from pulp, paper, and cardboard industry wastes. Inter.J.Biomaterials., 2013.

**Biopharma technologies France**, 2024 [en ligne] (page consultée le 24/05/2024) <https://www.biopharmatech.fr/actualites/la-lyophilisation/>

**Carbiolice**, (2023) Quatre grandes solutions pour lutter contre la pollution plastique, [en ligne] (page consultée le 02/06/2024) <https://www.carbiolice.com>

**Castilho L. R., Mitchell D. A., Freire D. M. G.**, 2009, Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. Bioresource technology, 100, 5996-6009.

**Catone MV, Ruiz JA, Castellanos M, Segura D, Espin G, López NI** (2014) High polyhydroxybutyrate production in *Pseudomonas extremaustralis* is associated with differential expression of horizontally acquired and core genome polyhydroxyalkanoate synthase genes. PLoS ONE 9:e98873–e98873.

**Chanasit W, Hodgson B, Sudesh K, Umsakul K** (2016) Efficient production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from *Pseudomonas mendocina* PSU using a biodiesel liquid waste (BLW) as the sole carbon source. Biosci Biotechnol Biochem 80:1440–1450. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1158628>

## Références bibliographiques

---

- Chanprateep S** (2010) Current trends in biodegradable polyhydroxyalcanoates. *J Biosci Bioeng* 110:621–632. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.07.014>
- Chanprateep S** (2010) Current trends in biodegradable polyhydroxyalcanoates. *J Biosci Bioeng* 110:621–632. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.07.014>
- Chee JY, Yoga SS, Lau NS, Ling SC, Abed RM, Sudesh K** (2010) PHA bacterially produced polyhydroxyalkanoate. Converting renewable resources into 42 bioplastics. In: Mendez-Vilas A (ed) Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. Formatex Research Center, Badajoz, pp 1395–1404
- Chen Y, Huang Y, Lee C** (2014) Production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalcanoates by *Pseudomonas mosselii* TO7. *J Biosci Bioeng* 118:145–152. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.01.012>
- Chen Y, Huang Y, Lee C** (2014) *Production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalcanoates by Pseudomonas mosselii TO7. J Biosci Bioeng 118:145–152.* <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.01.012>
- Chitte RR, Dey S.** Potent ibrinolytic enzyme from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain SD5. *Lett Appl Microbiol.* 2000; 31:405–410
- Davis R, Duane G, Kenny ST, Cerrone F, Guzik MW, Babu RP, Casey E, O'Connor KE** (2014) High cell density cultivation of *Pseudomonas putida* KT2440 using glucose without the need for oxygen enriched air supply. *Biotechnol Bioeng* 112:725–733. <https://doi.org/10.1002/bit.25474>
- Divyashree MS, Shamala TR, Rastogi NK** (2009) Isolation of polyhydroxyalkanoate from hydrolyzed cells of *Bacillus flexus* using aqueous two-phase system containing polyethylene glycol and phosphate. *Biotechnol Bioprocess Eng* 14:482–489. <https://doi.org/10.1007/s12257-008-0119-z>
- Divyashree, M.S., Shamala, T.R., Rastogi, N.K.,** 2009. Isolation of polyhydroxyalkanoate from hydrolyzed cells of *Bacillus flexus* using aqueous twophase system containing polyethylene glycol and phosphate. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 14, 482e489
- Don, Z., Sun, X., Zhaolin, D., Xuenan, S.U.N.,** 2000. A new method of recovering polyhydroxyalkanoate from *Azotobacter chroococcum*. *Chin. Sci. Bull.* 45, 252e256.

## Références bibliographiques

---

**Du C., Sabirova J., Soetaert W., Ki Carol Lin S.**, 2012, Polyhydroxyalcanoates Production from Low-cost Sustainable Raw Materials. *Current Chemical Biology*, 6, 14-25.

**Faizan Muneer, Ijaz Rasul1, Farrukh Azeem1, Muhammad Hussnain, Siddique Muhammad Zubair, Habibullah Nadeem.** (2020). Microbial Polyhydroxyalcanoates (PHAs): Efcient Replacement of Synthetic. *Polymer Journal of Polymers and the Environment* <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01772-1>

**Follonier S, Henes B, Panke S, Zinn M** (2012) Putting cells under pressure: a simple and efficient way to enhance the productivity of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate in processes with *Pseudomonas putida* KT2440. *Biotechnol Bioeng* 109:451–461. <https://doi.org/10.1002/bit.23312>

**Furrer P, Panke S, Zinn M** (2007) Efcient recovery of low endotoxin medium-chain-length poly([R]-3-hydroxyalkanoate) from bacterial biomass. *J Microbiol Methods* 69:206–213. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.01.002>

**Furrer, P., Panke, S., Zinn, M.**, 2007. Efficient recovery of low endotoxin mediumchainlength poly([R]-3-hydroxyalkanoate) from bacterial biomass. *J. Microbiol. Methods* 69, 206e213.

**Girdhar A, Bhatia M, Nagpal S, Kanampalliwar A, Tiwari A** (2013) Process Parameters for Influencing Polyhydroxyalkanoate Producing Bacterial Factories: An Overview. *J Pet Environ Biotechnol* 4: 155. doi:10.4172/2157-7463.1

**Goh YS, Tan IKP** (2012) Polyhydroxyalkanoate production by antarctic soil bacteria isolated from Casey Station and Signy Island. *Microbiol Res* 167:211–219. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.08.002>

**Grazia Licciardello, Antonino F. Catara and Vittoria Catara**, (2019). *Production of Polyhydroxyalcanoates and Extracellular Products Using Pseudomonas Corrugata and P. Mediterranea: A Review.*

**Grazia Licciardello, Antonino F. Catara and Vittoria Catara.** (2019). Production of Polyhydroxyalcanoates and Extracellular Products Using *Pseudomonas Corrugata* and *P. Mediterranea*: A Review. *Bioengineering* 2019, 6, 105; doi:10.3390/bioengineering6040105

**Gumel, A.M., Anuar, M.S.M., Heidelberg, T.**, 2014. Growth kinetics, effect of carbon substrate in biosynthesis of mcl-PHA by *Pseudomonas putida* Bet001. *Braz. J. Microbiol.* 45, 427e438.

## Références bibliographiques

---

**Guzik, M.W., Kenny, S.T., Duane, G.F., Casey, E., Woods, T., Babu, R.P., NikodinovicRunic, J., Murray, M., O'Connor, K.E.,** 2014. Conversion of postconsumer polyethylene to the biodegradable polymer polyhydroxyalkanoate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 4223e4232.

**Haddadi MH, Asadolahi R, Negahdari B** (2019) The bioextraction of bioplastics with focus on polyhydroxybutyrate: a review. *Int J Environ Sci Technol* 16:3935–3948. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02352-0>

**Hampson, J.W., Ashby, R.D.,** 1999. Extraction of lipid-grown bacterial cells by supercritical fluid and organic solvent to obtain pure medium chain-length polyhydroxyalkanoates. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 1371e1374

**Heckly, R.J.** (1961) Preservation of Bacteria by Lyophilization. *Advances in Applied Microbiology*, 3, 1-76. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70506-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70506-9)

**Hejazi P, Vasheghani-Farahani E, Yamini Y** (2003) Supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* for poly( $\beta$ hydroxybutyrate) recovery. *Biotechnol Prog* 19:1519–1523. <https://doi.org/10.1021/bp034010q>

**Hejazi, P., Vasheghani-Farahani, E., Yamini, Y.,** 2003. Supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* for poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate) recovery. *Biotechnol. Prog.* 19, 1519e1523. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121500>

**Ibrahim MHA, Steinbüchel A** (2010) *Zobellella denitrificans* strain MW1, a newly isolated bacterium suitable for poly (3- hydroxybutyrate) production from glycerol. *J Appl Microbiol* 108:214–225. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04413.x>

**Ibrahim, M.H.A., Steinbüchel, A.,** 2009. Poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via high-cell-density fed-batch fermentation and simplified solvent extraction. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6222e6231.

**Impallomeni G, Ballistreri A, Carnemolla GM, Guglielmino SP, Nicolo MS, Cambria MG** (2011) Synthesis and characterization of poly(3-hydroxyalkanoates) from *Brassica carinata* oil with high content of erucic acid and from very long chain fatty acids. *Int J Biol Macromol* 48:137–145. <https://doi.org/10.1016/j.ijbio mac.2010.10.013>

**Impallomeni G, Ballistreri A, Carnemolla GM, Guglielmino SP, Nicolo MS, Cambria MG** (2011) Synthesis and characterization of poly(3-hydroxyalkanoates) from *Brassica carinata* oil

## Références bibliographiques

---

with high content of erucic acid and from very long chain fatty acids. *Int J Biol Macromol* 48:137–145. <https://doi.org/10.1016/j.ijbio mac.2010.10.013>

**Impallomeni G, Ballistreri A, Carnemolla GM, Rizzo MG, Nicolò MS, Guglielmino SPP** (2018) *Biosynthesis and structural characterization of polyhydroxyalkanoates produced by Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 from long odd-chain fatty acids*. *Int J Biol Macromol* 108:608–614. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiom ac.2017.12.03>

**Jacquel N, Lo CW, Wei YH, Wu HS, Wang SS** (2008) Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *BiochemEngJ* 39:15–27. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.11.029>

**Jacquel, N., Lo, C.W., Wei, Y.H., Wu, H.S., Wang, S.S.,** 2008. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochem. Eng. J.* 39, 15e27.

**Jean-Luc Audic, Patrick Loulergue et Lydie Paugam.** (2017). Les PHAs, un bioplastique bactérien. [www.lactualitechimique.org/spip.php?rubrique11](http://www.lactualitechimique.org/spip.php?rubrique11).

**Jiang XJ, Sun Z, Ramsay JA, Ramsay BA** (2013) Fedbatch production of MCL-PHA with elevated 3-hydroxynonanoate content. *AMB Express* 3:50. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-50>

**Jiang, Y., Song, X., Gong, L., Li, P., Dai, C., Shao, W.,** 2008. High poly(hydroxybutyrate) production by *Pseudomonas fluorescens* A2a5 from inexpensive substrates. *Enzym. Microb. Technol.* 42, 167e172.

**José Manuel Borrero-de Acuña, Agata Bielecka, Susanne Häussler, Max Schobert, Martina Jahn, Christoph Wittmann, Dieter Jahn and Ignacio Poblete-Castro** (2014) Production of medium chain length polyhydroxyalkanoate in metabolic flux optimized *Pseudomonas putida*, Borrero-de Acuña et al. *Microbial Cell Factories* 2014, 13:88 <http://www.microbialcellfactories.com/content/13/1/88>

**Justyna Mozejko Ciesielska, Karolina Szacherska, Paulina Marciniak.** 2019. *Pseudomonas* species as producers of eco-friendly polyhydroxyalkanoates

**Kasra Khatami, Mariel Perez-Zabaleta, Isaac Owusu-Agyeman, Zeynep Cetecioglu.** 2020. Waste to bioplastics: How close are we to sustainable polyhydroxyalkanoates production?

**Kaur G, Roy I** (2015) Strategies for large-scale production of polyhydroxyalkanoates. *Chem Biochem Eng Q* 29(2):157–172. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2014.2255>

## Références bibliographiques

---

**Kaur G, Srivastava A, Chand S** (2012) Advances in biotechnological production of 1, 3-propanediol. *Biochem Eng J* 64:106–118. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.03.002>

**Kenny ST, Runic JN, Kaminsky W, Woods T, Babu RP, Keely CM, Blau W, O'Connor KE** (2008) Up-cycling of PET (polyethylene terephthalate) to the biodegradable plastic PHA (polyhydroxyalkanoates). *Environ Sci Technol* 42(20):7696–7701. <https://doi.org/10.1021/es801010e>

**Kenny, S.T., Runic, J.N., Kaminsky, W., Woods, T., Babu, R.P., Keely, C.M., Blau, W., O'Connor, K.E.,** 2008. Up-cycling of PET (polyethylene terephthalate) to the biodegradable plastic PHA (polyhydroxyalkanoate). *Environ. Sci. Technol.* 42, 7696e7701.

**Kepka, C., Collet, E., Persson, J., Ståhl, Å., Lagerstedt, T., Tjerneld, F., Veide, A.,** 2003. Pilot-scale extraction of an intracellular recombinant cutinase from *E. coli* cell homogenate using a thermoseparating aqueous two-phase system. *J. Biotechnol.* 103, 165e181.

**Khosravi-Darani, K., Vasheghani-Farahani, E., Yamini, Y.,** 2003. Solubility of Poly (beta hydroxybutyrate) in supercritical carbon dioxide. *J. Chem. Eng. Data* 48, 860e863.

**Kim GJ, Lee IY, Yoon SC, Shin YC, Park YH** (1997) Enhanced yield and a high production of medium-chain-length poly (3- hydroxyalkanoates) in a twostep fed-batch cultivation of *Pseudomonas putida* by combined use of glucose and octanoate. *Enzyme Microb Tech* 20(7):500–505. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)00179-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00179-2)

**Koller H, Niebelschütz G** (2013) Brauneegg, Strategies for recovery and purification of poly[(R)- 3-hydroxyalkanoates] (PHAs) biopolyesters from surrounding biomass. *Eng Life Sci* 13:549– 562. <https://doi.org/10.1002/elsc.201300021>  
**Kunasundari B, Sudesh K** (2011) Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polym. Lett.* 5:620– 634. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2011.60>

**Koller M, Brauneegg G** (2015) Potential and prospects of continuous polyhydroxyalkanoate (PHAs) production. *Bioengineering* 2(2):94–121. <https://doi.org/10.3390/bioengineering202094>

**Koller M, Muhr A** (2014) Continuous production mode as a viable process-engineering tool for efficient poly(hydroxyalkanoate) (PHAs) bio-production. *Chem Biochem Eng Q* 28(1):65–77

## Références bibliographiques

---

- Koller, M.**, 2016. Characterization of polyhydroxyalcanoates. In: Microbial Biopolyester. Recent Advances in Biotechnology, vol. 2. Bentham Science Publishers, Sharjah, p. 283
- Koller, M., Niebelschutz, H., Braunegg, G.**, 2013a. Strategies for recovery and purification of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHAs) biopolyesters from surrounding biomass. Eng. Life Sci. 13, 549e562.
- Koller, M., Sandholzer, D., Salerno, A., Braunegg, G., Narodoslowsky, M.**, 2013b. Biopolymer from industrial residues: life cycle assessment of poly(- hydroxyalkanoates) from whey. Resour. Conserv. Recycl. 73, 64e71.
- Kulpreecha S., Boonruangthavorn A., Meksiriporn B., Thongchul N.**, 2009, Inexpensive fed-batch cultivation for high poly (3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. Journal of bioscience and bioengineering, 107, 240-245.
- Kumar, M., Ghosh, P., Khosla, K., Thakur, I.S.**, 2018a. Recovery of polyhydroxyalcanoates from municipal secondary wastewater sludge. Bioresour. Technol. 255, 111e115.
- Kumar, M., Thakur, I.S.**, 2018. Municipal secondary sludge as carbon source for production and characterization of biodiesel from oleaginous bacteria. Bioresour. Technol. 4, 106e113
- Kunasundari, B., Sudesh, K.**, 2011. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalcanoates. Express Polym. Lett. 5, 620e634.
- La qualité au carré**, 2024 [en ligne] (page consultée le 24/05/2024). [https://la-qualite-au-carre.com/lyophilisation-pharmaceutique/#Documents\\_de\\_reference](https://la-qualite-au-carre.com/lyophilisation-pharmaceutique/#Documents_de_reference)
- Lee SY** (1996) Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. Trends Biotechnol 14(11):431–438. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)10061-5](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)10061-5)
- Lee WH, Azizan MNM, Sudesh K** (2004) Effect of culture conditions of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Comamonas acidovorans*. Polym Degrad Stab 84(1):129–134. [https://doi.org/10.1016/j.polym\\_degra\\_dstab.2003.10.003](https://doi.org/10.1016/j.polym_degra_dstab.2003.10.003).
- Lee WH, Azizan MNM, Sudesh K** (2004) Effect of culture conditions of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Comamonas acidovorans*. Polym Degrad Stab 84(1):129–134. [https://doi.org/10.1016/j.polym\\_degra\\_dstab.2003.10.003](https://doi.org/10.1016/j.polym_degra_dstab.2003.10.003)

## Références bibliographiques

---

**Lee, P.Y., Costumbrado, J., Hsu, C.Y., Kim, Y.H.** Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J. Vis. Exp.* (62), e3923, [doi:10.3791/3923](https://doi.org/10.3791/3923) (2012).

**Leong, Y.K., Show, P.L., Lan, J.C.W., Loh, H.-S., Yap, Y.J., Ling, T.C.,** 2017. Extraction and purification of Polyhydroxyalcanoates (PHAs): application of Thermoseparating aqueous two-phase extraction. *J. Polym. Res.* 24, 158.

**Lillo JG, Rodriguez-Valera F** (1990) Effects of culture conditions on poly(beta-hydroxybutyric acid) production by *Haloferax mediterranei*. *Appl Environ Microbiol* 56(8):2517–2521

**Liu Q, Luo G, Zhou XR, Chen GQ** (2011) Biosynthesis of poly (3-hydroxydecanoate) and 3-hydroxydodecanoate dominating polyhydroxyalcanoates by  $\beta$ -oxidation pathway inhibited *Pseudomonas putida*. *Metab Eng* 13(1):11–17. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.10.004>

**Louis Paul et Antony Paladino,**2009. screening, optimization and extraction of polyhydroxyalcanoates from *Bacillus megaterium*. - 121-Jehan Mohamed El- Mohamedy Hawas, Tarek El- Said El- Banna, Elsayed Belal Abdelmonteleb and Ahmed Ahmed Abd El-Aziz; 2016. Production of bioplastic from some selected Bacterial stains.

**Manish Kumar, Rashmi Rathour , Rashmi Singh, Yuqing Sun, Ashok Pandey , Edgard Gnansounou, Kun-Yi Andrew Lin , Daniel C.W. Tsang, Indu Shekhar Thakur .**(2020). Bacterial polyhydroxyalkanoates: Opportunities, challenges, and prospects, *Journal of Cleaner Production*, Volume 263,121500, ISSN 0959-6526, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121500>.

**Mariana-Gratiela Vladu, Maria-Monica Petrescu, Amalia Stefaniu,Gabriela Savoiu, Maria Spiridon, MihaelaCarmen Eremia, Irina Lupescu,** 2019. Studies on polyhydroxyalcanoates biosynthesis by some pseudomonas spp.strains. DOI :[10.25083/rbl/24.3/388.394](https://doi.org/10.25083/rbl/24.3/388.394)

**Martin Koller.** (2018). A Review on Established and Emerging Fermentation Schemes for Microbial Production of Polyhydroxyalkanoate (PHAs) Biopolyesters. *Fermentation* 2018, 4, 30; [doi:10.3390/fermentation4020030](https://doi.org/10.3390/fermentation4020030)

**Mohammadi, M., Hassan, M.A., Phang, L.Y., Shirai, Y., Man, H.C., Ariffin, H.,** 2012. Intracellular polyhydroxyalcanoates recovery by cleaner halogen-free methods towards zero emission in the palm oil mill. *J. Clean. Prod.* 37, 353e360.

## Références bibliographiques

---

**Mozejko-Ciesielska J, Kiewisz R** (2016) Bacterial polyhydroxyalcanoates: still fabulous? *Microbiol Res* 192:271–282. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.07.010>

**Mozejko-Ciesielska J, Szacherska K, Marciniak P.** (2019) *Journal of Polymers and the Environment* <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01422-1>

**Mozejko-Ciesielska, J., Kiewisz, R.,** 2016. Bacterial polyhydroxyalcanoates: still \_ fabulous? *Microbiol. Res.* 192, 271e282.

**Murray R.G.E., Doetsch R.N., Robinow C.F.** Determinative and cytological light microscopy, In *Methods for General and Molecular Bacteriology* American Society for Microbiol., 1994; 21-41.

**Narancic T, Kenny ST, Djokic L, Vasiljevic B, O'Connor KE, Nikodinovic-Runic J** (2012) Medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production by newly isolated *Pseudomonas* sp. TN301 from a wide range of polyaromatic and monoaromatic hydrocarbons. *J Appl Microbiol* 113(3) :508–520. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05353.x>

**Obaidi Z S.** (1987). Optimization of propagation medium for Baker's Yeast using date extract and molasses. Determination of the optimum concentration of micro elements and vitamins. *Date palm journal*, vol. 5 (1) N°9, pp. 65-78.

**Obruca S, Sedlacek P, Koller M, Kucera D, Pernicova I** (2018) Involvement of polyhydroxyalcanoates in stress resistance of microbial cells: biotechnological consequences and applications. *Biotechnol Adv* 36:856–870. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.006>

**Obruca S, Sedlacek P, Krzyzanek V, Mravec F, Hrubanova K, Samek O, Kucera D, Benesova P, Marova I** (2016) Accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) helps bacterial cells to survive freezing. *PLoS ONE* 11: e0157778. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157778>

**Ojumu, T.V.1\*, Yu, J.2 and Solomon, B.O.3,** (2004). *Production of Polyhydroxyalcanoates, a bacterial biodegradable polymer*, <http://www.academicjournals.org/AJB>

**Palmeri R, Pappalardo F, Fragalà M, Tomasello M, Damigella A, Catara AF** (2012) *Polyhydroxyalcanoates (PHAs) production through conversion of glycerol by selected strains of Pseudomonas mediterranea and Pseudomonas corrugata.* *Chem Eng Trans* 27:121–126. <https://doi.org/10.3303/CET1227021>

**Panigrahi S., Ujwala B.** Screening, Isolation and quantification of PHB-producing soil bacteria. *Intern.J.Engineering.Sci.Inven.*, 2013: 2:1-6.

**Park, Y.L., Bhatia, S.K., Gurav, R., Choi, T.R., Kim, H.J., Song, H.S., Park, J.Y., Han, Y.H., Lee, S.M., Park, S.L., Lee, H.S., Kim, Y.G., Yang, Y.H.,** 2020. Fructose based hyper production of poly-3-hydroxybutyrate from *Halomonas* sp. YLGW01 and impact of carbon sources on bacteria morphologies. *Int. J. Biol. Macromol.* 154, 929–936.

**Pereira JR, Araújo D, Marques AC, Neves LA, Grandfils C, Sevrin C, Alves VD, Fortunato E, Reis MAM, Freitas F** (2019) Demonstration of the adhesive properties of the medium-chainlength polyhydroxyalkanoate produced by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* from glycerol. *Int J Biol Macromol* 122:1144–1151. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.064>

**Pikal M. J.** Lyophilization. In J. Swarbrick and J. Boylan (eds.), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Marcel Dekker, New York, 2002, pp. 1299–1326.

**Potter, M., Madkour, M.H., Mayer, F., Steinbuchel, A.,** 2002. Regulation of phasin expression and PHA granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology* 148, 2413e2426.

**Prasad, M.P., Seth, R.,** 2013. Production and isolation of polyhydroxyalkanoates from *Pseudomonas* sp. using waste cooking oil as a sole carbon source. *Int. J. Adv. Biotechnol. Res.* 4, 527e532.

**Rai R, Yunos DM, Boccaccini AR, Knowles JC, Barker IA, Howdle SM, Tredwell GD, Keshavarz T, Roy I** (2011) Poly3-hydroxyoctanoate P(3HO), a medium chain length polyhydroxyalkanoate homopolymer from *Pseudomonas mendocina*. *Biomacromol*

**Ramsay BA, Saracovan I, Ramsay JA, Marchessault RH** (1991) Continuous production of long-side-chain poly-beta-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas oleovorans*. *Appl Environ Microbiol* 57(3):625–629

**Ramsay JA, Berger E, Voyer R,** et al. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. *Biotechnol Tech.* 1994;8:589–594.)

**Raza ZA, Tariq MR, Majeed MI, Banat IM** (2019) Recent developments in bioreactor scale production of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Bioprocess Biosyst Eng* 42:901–919. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02093-x197>.

## Références bibliographiques

---

**Raza, Z.A., Abida, S., Banat, I.M.,** 2018. Polyhydroxyalcanoates: characteristics, production, recent developments and applications. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 126, 45e56.

**Sambrook J, Russell D.** Molecular cloning. 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

**Satoh Y, Tajima K, Nakamoto S, Xuerong H, Matsushima T, Ohshima T, Kawano S, Erata T, Dairi T, Munekata M** (2011) Isolation of a thermotolerant bacterium producing mediumchain-length polyhydroxyalkanoate. *J App Microbiol* 111:811– 817. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05093.x>

**Sayyed, R.Z., Gangurde, N.S., Chincholkar, S.B.,** 2009. Hypochlorite digestion method for efficient recovery of PHB from *Alcaligenes faecalis*. *Indian J. Microbiol.* 49, 230e232.

**Sedlacek P, Slaninova E, Koller M, Nebesarova J, Marova I, Krzyzanek V, Obruca S** (2019) PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances. *New Biotechnol* 49:129–136. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.10.00>

**Shang L., Jiang M., Yun Z., Yan H. Q., Chang H. N.,** 2008, Mass production of medium-chain-length poly (3-hydroxyalkanoates) from hydrolyzed corn oil by fed-batch culture of *Pseudomonas putida*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 2783-2787

**Sharma M., Harish K.D.** Isolation and optimization of culture conditions for PHB production by *Bacillus megaterium*. *Int. J. Pharma.Bio.Sci.*, 2015; 6:724-734.

**Shrivastav A, Mishra SK, Pancha I, Jain D, Bhattacharya S, et al.** (2011) Biodegradability studies of polyhydroxyalkanoate (PHA) film produced by a marine bacterium using *Jatropha* biodiesel byproduct as a substrate. *World J Microb Biot* 27: 1531-1541

**SITELI yazid** ,2020. Recuperation et reutilisation des rejets issus de la production de bioplastiques pour la crissance des micoorganismes(*C.nector*) producteurs de PHA ,

**Solaiman, D.K.Y., Ashby, R.D., Foglia, T.A.,** 2001. Production of polyhydroxyalcanoates from intact triacylglycerols by genetically engineered *Pseudomonas*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 664e669.

**Sun, Z., Ramsay, J.A., Guay, M., Ramsay, B.A.,** 2007. Carbon-limited fed-batch production of medium-chain-length polyhydroxyalcanoates from nonanoic acid by *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 69e77.

## Références bibliographiques

---

**Tanadchangsang N., Yu J.**, 2012, Microbial synthesis of polyhydroxybutyrate from glycerol: Gluconeogenesis, molecular weight and material properties of biopolyester. *Biotechnology and bioengineering*, 109, 2808-2818.

**Tripathi A. D., Yadav A., Jha A., Srivastava S.**, 2012, Utilizing of Sugar Refinery Waste for Production of Bio-Plastic Under Submerged Fermentation Process. *Journal of Polymers and the Environment*, 1-8. Troeger C. N., Harvey A. P., 2009, The Production of Polyhydroxyalcanoates Using an Oscillatory Baffled Bioreactor. *Chemical Product and Process Modeling*, 4.

**Vandamme, P., Coenye, T.**, 2004. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 2285e2289.

**Verlinden, R.A.J., Hill, D.J., Kenward, M.A., Williams, C.D., Radecka, I.**, 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalcanoates. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1437e1449.

**Verlinden, R.A.J., Hill, D.J., Kenward, M.A., Williams, C.D., Radecka, I.**, 2007. *Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalcanoates. J. Appl. Microbiol.* 102, 1437e1449.

**Wang Q, Nomura TC** (2010) Monitoring differences in gene expression levels and polyhydroxyalkanoate (PHAs) production in *Pseudomonas putida* KT2440 grown on different carbon sources. *J Biosci Bioeng* 6:653–659. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.08.001>

**Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R.** *Molecular biology of the gene.* 6th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2008.

**Williams, S.F., Martin, D.P., Williams, S.F., Martin, D.P.**, 2005. Applications of Polyhydroxyalcanoates (PHAs) in Medicine and Pharmacy. *Biopolymers Online.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp. 91e127.

**Ying Wang, Guo-Qiang Chen** (2017). *Polyhydroxyalcanoates: Sustainability, Production, and Industrialization.* <https://www.researchgate.net/publication/314014117>.

**Zinn M, Witholt B, Egli T** (2001) Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv Drug Del Rev* 53(1):5–21. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00218-6](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00218-6)

# **Annexes**

---

---

**Annexe 01:**

➤ **CN Gélose Base Sélectif pour *Pseudomonas***

Egalement nommé Gélose CN (*Pseudomonas*) ; Gélose au cétrimide

**1. Principe**

Milieu solide sélectif utilisé pour la détection de *Pseudomonas aeruginosa* selon la norme EN 12780-2002 et ISO 16266 (**BROWN et LOWBURY ,1965**).

- ✓ Peptone de gélatine..... 16.00
- ✓ Peptone de caséine..... 10.00
- ✓ Potassium sulfate.....10.00
- ✓ Magnesium chloride..... 1.40
- ✓ Cetiltrimethyl-ammonium Bromure..... 0.20
- Agar.....15.00

- pH final 7,1 ±0,2 à 25 °C Formule \* en g/L \*Ajuster et/ou compléter au besoin pour répondre aux critères de performance (**GOTO et ENOMOTO ,1970**).

**2. Préparation**

Ajouter 52,6 g de poudre à 1 L d'eau distillée avec 10 mL de glycérol. Chauffer jusqu'à dissolution complète. Distribuer dans des récipients adaptés et stériliser à l'autoclave à 121 ° C pendant 15 min. Refroidir à 45-50 ° C et dans chaque 500 mL de milieu Ajouter un flacon de supplément sélectif d'acide nalidixique (Art. N ° 928090NL) Bien mélanger et verser dans des boîtes de Pétri. Ne laissez pas le milieu à l'état fondu pendant plus de 4 heures. Ne pas refondre. Les plaques finies peuvent être utilisées sans perte d'efficacité. Jusqu'à un mois s'ils sont réfrigérés et conservés dans l'obscurité.

**3. Description**

Le milieu sélectif CN pour *Pseudomonas* a été progressivement développé à partir du milieu de base de King, Ward et Raney pour la production améliorée de pigments. Browne et Lowbury ont ajouté du cétrimide comme agent sélectif et Goto et Enomoto ont amélioré la sélectivité en ajoutant de l'acide nalidixique. La présence des deux inhibiteurs élimine le microbiote contaminant des échantillons fortement pollués et a été adopté par la norme ISO pour la détection de *P. aeruginosa* par filtration sur membrane de l'eau (**ISO 16266:2006**).

**Annexe 02 :**

➤ **Coloration de Gram**

**1. Principe**

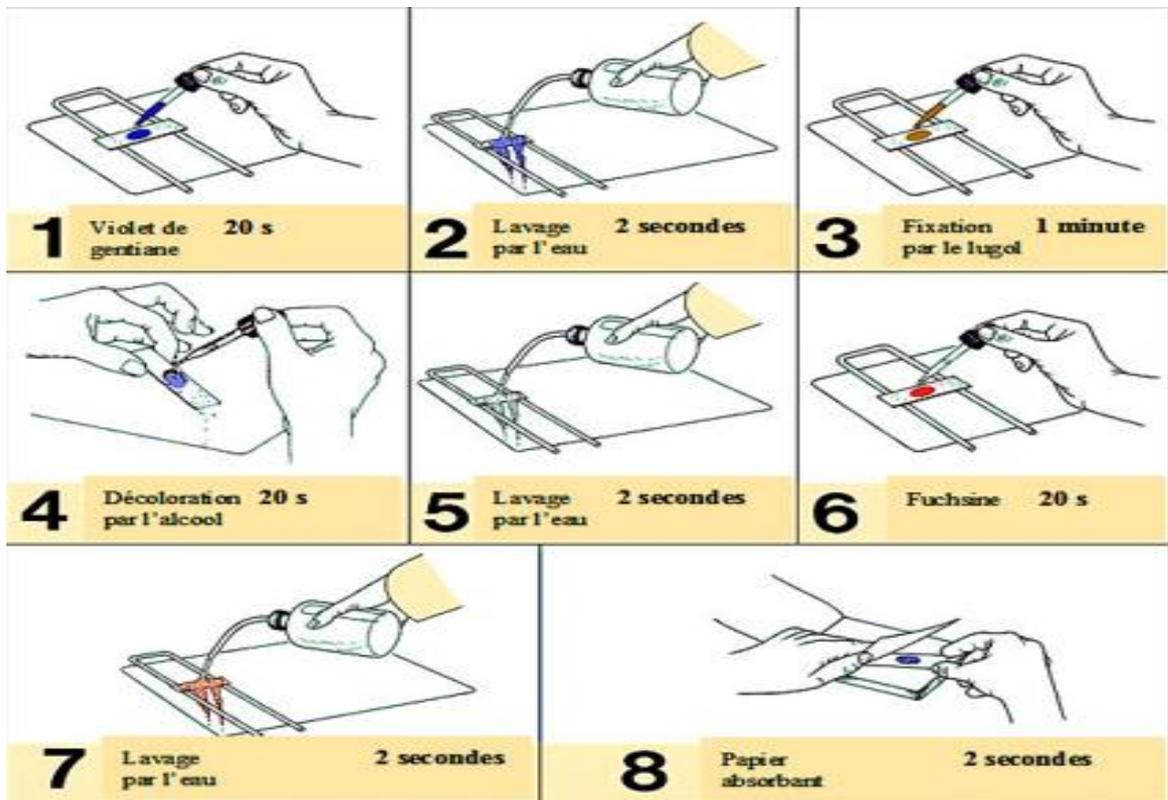
Sur le frottis bactérien préparé, le premier colorant utilisé est le cristal violet oxalate, qui colore les bactéries en violet. Ensuite, le Lugol libère de l'iode, qui fixe le colorant précédent, formant ainsi un complexe iode-cristal violet. Ce complexe est solubilisé par l'alcool à 95° lors de la décoloration, mais uniquement pour les bactéries à Gram négatif.

Le deuxième colorant, la fuchsine, est utilisé comme colorant de contraste, colorant en rose les bactéries à Gram négatif. Les bactéries à Gram positif, qui ne sont pas décolorées par l'alcool, conservent leur couleur violette.

**2. Technique**

- ✓ Une goutte d'eau distillée stérile est déposée sur une lame propre à l'aide d'une pipette Pasteur stérile.
- ✓ Une colonie bien isolée est prélevée avec une pipette Pasteur et dissoute dans la goutte d'eau. Le frottis obtenu est ensuite séché et fixé.
- ✓ Le frottis est ensuite recouvert totalement de violet de gentiane pendant 1 minute, puis rincé à l'eau du robinet. Ensuite, il est recouvert de lugol pendant 60 secondes.
- ✓ La décoloration est réalisée en plongeant le frottis dans de l'alcool pendant 10 secondes, suivi d'un rinçage rapide à l'eau du robinet.
- ✓ Enfin, le frottis est recouvert de fuchsine pendant 45 secondes, puis lavé à l'eau et séché à l'aide d'un bec Bunsen.
- ✓ L'examen microscopique du frottis est effectué à l'aide d'un microscope à immersion, à l'objectif x100).

Annexe 02 :



La procédure de coloration de Gram (Hill Companies, 2001).

Annexe 03 :

➤ **Composition du milieu M9 :**

Les souches de *Pseudomonas putida* ont été cultivées dans un milieu minéral défini appelé M9, préparé comme suit : 12,8 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , et 0,5 g de  $\text{NaCl}$  ont été dissous dans de l'eau, stérilisés à l'autoclave. Ensuite, le milieu a été complété avec 0,12 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  et une solution d'oligo-éléments contenant : 6,0 mg/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,7 mg/L de  $\text{CaCO}_3$ , 2,0 mg/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1,16 mg/L de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,37 mg/L de  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,33 mg/L de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,08 mg/L de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Enfin, 20 g/L de glucose ont été ajoutés et le mélange a été stérilisé par filtration (Borrero-de Acuña et al 2014).

#### Annexe 04

##### Matériel et réactifs nécessaire pour la réalisation de la galerie API 20 NE

➤ **Matériel**

- Pipettes Pasteur pour prélever les colonies.
- Tubes à essai stériles
- Micropipettes de 1000 µl
- Embouts stériles

➤ **Réactif**

- Solution saline 0.9% NaCl
- JAMES « KOVACS »
- NIT 1 + NIT 2
- Zn
- Huile de paraffine

#### Annexe 05

##### Matériel et réactifs nécessaires pour l'extraction

- ✓ Tampon Tris-HCl EDTA (TE), pH 8,0
- ✓ Micro-tubes 1,5ml
- ✓ Pipettes Pasteur
- ✓ Centrifugeuse
- ✓ Bain à sec
- ✓ Micropipettes
- ✓ Embouts
- ✓ Portoirs

##### Matériel et réactifs nécessaires pour la PCR

a) **Equipement**

- Thermocycleur
- Micropipettes : 1000, 200, 10
- Vortex
- Mini-centrifugeuse

- Glace

**b) Consommable**

- Tubes PCR
- Embouts stériles : 1000, 200, 10

**c) Produits chimiques**

- Taq polymérase
- Buffer
- DNTP
- Eau ultra pure stérile
- ADN
- Amorce

Année universitaire : 2023-2024

Présenté par : ZIBOUCHE Hana

KHELLAFI Roumeissa

BENELOUEZZANE Soulef

## Production des polyhydroxyalcanoates (PHAs) par fermentation bactérienne

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie moléculaire des microorganismes

### Résumé :

Avec une production annuelle de plus de 368 millions de tonnes de plastique, la gestion de leur accumulation ne cesse de se poser. Effectivement, les plastiques pétrochimiques conventionnels sont soit détruits après leur utilisation, produisant des fumées toxiques et polluantes, soit accumulés dans l'environnement, notamment dans les océans. Ainsi, l'intérêt pour la fabrication de plastiques biodégradables est de plus en plus grand. **Les polyhydroxyalcanoates (PHAs)** sont un type de polymères biosourcés et biodégradables particulièrement intéressant en raison de leur variété structurale et de leur ressemblance avec les plastiques classiques. Néanmoins, leur fabrication biologique est actuellement basée sur la fermentation à l'aide de cultures pures microbiennes, naturelles ou recombinantes. Les espèces de *Pseudomonas* ont été choisies comme productrices des PHAs dans de nombreuses études récentes. Être métaboliquement polyvalentes et possédant une tolérance remarquable à un large éventail de sources de carbone, ces bactéries sont devenues une usine de cellules pour la production des PHAs. Dans la présente étude, des souches du genre *Pseudomonas* caractérisées par leurs capacités à synthétiser des lipides intracellulaires ont été isolées à partir d'échantillons d'eaux usées. Sur l'ensemble des dix-huit (18) isolats, 12 sont criblés avec une coloration spécifique au Noir Soudan B, 08 souches ont un potentiel élevé pour la production des PHAs. Dans le cadre de la production et l'extraction des PHAs, une fermentation en batch a été lancée avec la colonie 12 pendant 18 heures et la biomasse récupérée par centrifugation. Une extraction des polymères avec du chloroforme est réalisée. Ensuite les souches criblées sont lyophilisées. Pour une production durable, il est essentiel de réduire les coûts des sources de carbone et d'améliorer l'efficacité des procédés, en utilisant notamment des déchets comme substrat de la fermentation

**Mots clés :** Bioplastique, **Polyhydroxyalcanoates (PHAs)**, Batch, *Pseudomonas putida*, Biodégradable.

**Mots clés :** Bioplastique, **Polyhydroxyalcanoates (PHAs)**, Batch, *Pseudomonas putida*, Biodégradable.

Laboratoires de recherche : Laboratoire de Microbiologie (Centre de recherche en biotechnologie CRBt).

**Président du jury :** MEZIANI Meriem (Maître de conférences B – UFM Constantine1).

**Encadrant :** SEKHRI-ARAFI Nedjoudja (Maître de conférences A – UFM Constantine1).

**Examineur(s) :** MEGHNOUS Ouissem (Maître de conférences B – UFM Constantine1).