République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE YAHIA FARES DE MEDEA

Faculté des Sciences et de la Technologie

Département de Génie des Procédés et Environnement

MEMOIRE DE MASTER

En vue de l'Obtention du Diplôme de Master en Génie des Procédés

Option : Procédés Pharmaceutiques

Thème

Caractérisation Physico-chimique et biochimique des biosurfactants produits par *Pseudomonas aeroginosa* sur une boue morte d'hydrocarbure.

Présenté par :

Mlle. MOUSSI Hafsa.

Mlle. TCHAKMAKDJI Latifa.

Dirigé par :

Dr. O. BENKORTBI

Mr. B. MAHAMADOU H

Année universitaire 2014/2015

Remerciements

En préambule à ce mémoire nous remerciant ALLAH qui nous aide et nous donne la patience et le courage durant ces langues années d'étude.

Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apportés leur aide et qui ont contribués à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.

Ces remerciements vont tout d'abord au corps professoral et administratif de la Faculté des Sciences et de la technologie pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

Nous tenons à remercier très chaleureusement Dr. Benkortebi Othmane qui nous a permis de bénéficier de son encadrement. Les conseils qu'il nous a prodigué, la patience, la confiance qu'il nous a témoignés ont été déterminants dans la réalisation de notre travail de recherche.

Nous tenant aussi à remercier sincèrement Mr. Mahamadou Harouna Bassirou, qui, en tant que Co-promoteur, s'est toujours montrés à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu nous consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Nous tenons également à remercier l'ensemble du corps enseignant du département du génie des procédés et environnement (UYF-Médéa), pour leurs concours dans la réussite de notre formation.

Nous tenons également à remercier Mr. Maazouz le directeur du Hall technologique pour son autorisation dans le laboratoire d'analyse physico-chimique afin de réaliser nos expériences dans son Laboratoire.

Nous remercions également les ingénieurs de laboratoire à savoir Mme Alikacem Amina, Safa Chaouech Amina, Benhaoua Meriem, Garomi Leila, Amel, Mourad, Zohir du Hall de technologie de médéa, Bakir Terki Othmane du LBMPT.

Merci à tous et à toutes.

Merci.

Dédicaces

Avec les sentiments d'amour je dédie ce modeste travail à ;

Mon cher père Hamid

En signe de reconnaissance de l'immense bien que vous avez fait pour moi concernant mon éducation qui aboutit aujourd'hui a la réalisation de cette étude. Recevez à travers ce travail, toute ma gratitude et mes profonds sentiments. Qu'Allah le tout puissant soit à vos côtés et vous accorde une meilleure santé (amin).

A la lumière de ma vie, ma très chère mère

Pour son amour, ses prières et ses sacrifices, pour m'avoir donnée la vie et la joie de vivre. Ta bonne éducation, tes conseils et tes bénédictions n'ont jamais fait défaut, que Allah le tout puissant te garde pour moi (amin).

A ma très chère grande mère.

A ma sœur et son mari. A mes frères Karim et Mohamed Riadh.

A mon neveu Iyad et ma nièce Liela.

Et toute ma famille qui n'a pas cessé de m'encourager dans les moments difficiles que

Allah les protège.

A Farah, Ouissem, Hassina, Ikram, et aicha,

A mon binôme et soeur Hafsa, pour son amitié sa loyauté et sa franchise, et toute sa famille.

A mes collègues

A touts mes amis.

A toute la promotion 2014-2015.

Latifa.

Dédicaces

Avant tout, je remercie le grand Allah, qui nous a aidés à élaborer

Ce modeste travail.

J'ai l'immense honneur de dédier ce modeste travail :

A mon père MOHAMED auquel je tiens la force, la ténacité ;

A ma mère FADHILA cette ange de tendresse, de patience et de générosité,

A mon frère unique ISLEM et mes deux sœurs

HiBA et Khadidja

A toute la famille MOUSSI et HAMMAMOUCHE sans exception.

A ma chère copine et ma sœur AICHA

A mes collège (es) : SALIM, FEDWA, NADJIB, ANFEL

A la mémoire de mon défunt grand-père et grand-mère.

A mon binôme et ma sœur Latifa pour ça sincérité et sa franchise et;

A toute sa famille.

A toute la promotion 2014-2015.

Hafsa.

Sommaire

Introduction générale ……1

Chapitre I : Les souches productrices des biosurfactants (Pseudomonas aeruginosa)

I.1-Introduction ……..2

I.2- Généralités……3

I.3- Microorganismes producteurs des Biosurfactants…….....3

I.4- Présentation de *Pseudomonas aeruginosa*…….5

I.4.1-Le genre Pseudomonas ……5

I.4.2- Description ……6

I.4.3- Milieu de Vie et distribution environnementale……8

I.4.4- Facteurs de virulence de P. aeruginosa……8

I.4.4.1- Facteurs de virulence associés à la bactérie……..9

A- Lipopolysaccharide (LPS)……9

B- Biofilms……9

C- Les flagelles……...10

D- Les pilis de type IV……11

E- Facteur d'attachement de type fimbriae (ou Cup) ……11

I.4.4.2- Facteurs de virulence sécrétés……11

A- Exotoxine……11

B- Les Rhamnolipides……12

C- Chromophores……12

D- Les phospholipases C……13

E- L'élastase ……13

I.5- *Pseudomonas aeruginosa* dans la production des Biosurfactants……14

I.6- Conclusion ……15

Chapitre II : Les Biosurfactants

II.1- Introduction ……17
II.2- Classification et nature chimique des biosurfactants……..17
II.2.1- Les Glycolipides…….18
II.2.2- Les acides gras ……20
II.2.3 Les phospholipides …….20
II.2.4- Biosurfactants antibactériens……20
II.2.5- Tensioactifs microbiens……21
II.3- La production microbienne des Biosurfactants (les *Rhamnolipides*……22
II.4- Aspect Microbiologique…….23
II.5- Facteurs affectant la production des Biosurfactants……25
II.5.1- Sources de carbone……25
II.5.2- Sources d'azotes……25
II.5.3- Facteurs physico – chimiques……25
II.5.3.1- Aération et agitation……26
II.5.3.2- Concentration en sel……26
II.6- Application des Biosurfactants ……26
II.7- Avantages de biosurfactants……27
II.8- Conclusion…….28

Chapitre III : Les méthodes de caractérisation de biosurfactants

III.1-Introduction ……29
III.2-Méthodes physico-chimiques…….29
III.2.1- Méthodes quantitative et qualitative……29
III.2.1.1- Tensiomètrie : Méthode de De Nouy-Ring……..29
III.2.1.2- Méthode Stalagmométrique……30
III.2.1.3- Méthode de la goutte pendante……..30

III.2.1.4- L'analyse axisymétrique de la forme de goutte par profil……31
III.2.1.5- Détermination de la concentration micellaire critique (CMC)……32
III.2.1.6- Test de microplate……33
III.2.1.7- Conductimètrie……34
III.2.1.8- Spectroscopie infrarouge à transformer de Fourier……34
III.2.1.9- Analyse par résonance magnétique nucléaire……35
III.2.1.10- Spectrométrie de masse……35
III.2.1.11- *Spectrométrie photoélectronique X*……35
III.2.1.12- Spectroscopie UV-Visible……36
III.2.1.13- Détermination de l'indice moussant……36
III.2.2- Essai de déplacement, d'étalement et de solubilisation d'huile……37
III.2.3- Essais de stabilité……38
III.3- Méthodes biochimiques……38
III.3.1- Le test Rhamnose ……38
III.3.2- L'indice d'émulsification EI_{24}……38
III.3.3- Caractérisation des glycolipides……38
III.3.4- *Analyse des amino-acides*……40
III.3.5- SDS-PAGE (*dodécyl sulfate de sodium*)……40
III.3.6- *Détermination* du *Monosaccharide*……41
III.3.7- Analyse des acides gras……41
III.4- Conclusion ……41

Chapitre IV : Procédure expérimentale

IV.1- Objectif……43
IV.2-Matériel et Produits ……43

IV.2.1- Matériel ……43
IV.2.2- Produits ……44
IV.3- Techniques expérimentales ……44
IV.3.1- Méthodes physico-chimiques ……44
IV.3.1.1-Préparation des solutions ……44
IV.3.1.2-Tensiomètrie ……45
IV.3.1.3-Détermination de la concentration micellaire critique (CMC)……45
IV.3.1.4-Conductimètrie……45
IV.3.1.5-Analyse structurale infrarouge à transformée de Fourier……46
IV.3.1.6-Détermination de la longueur d'onde d'absorption maximale……46
IV.3.1.7-La comparaison avec le SDS……46
IV.3.2- Etude de la stabilité……...47
IV.3.2.1- Effet de la salinité……47
IV.3.2.2-Effet du pH……47
IV.3.2.3- Effet de la température……47
IV.3.3-Déplacement et solubilisation d'huile……48
IV.3.4- Méthodes Biochimiques……48
IV.3.4.1- Quantification glucidique……48
IV.3.4.2- Indice d'émulsification EI_{24} ……48

Chapitre V : Résultats et discussion

V.1- Les méthodes physico-chimiques……49
V.1.1- La concentration micellaire critique CMC……49
V.1.2- L'analyse spectroscopique Infrarouge ……50
V.1.2.1- Etalonnage du Spectrophotomètre……50
V.1.2.2- Analyse du Biosurfactant……50

V.1.2.2.1-Description des bandes d'absorbance…….50
V1.2.2.2- Identification des groupements fonctionnels……..51
V.1.3- La spectroscopie d'absorption UV-VIS…….52
V.1.4- Test de Stabilité……53
V.1.4.1- Effet de la salinité……53
V.1.4.2- Effet du pH……54
V.1.4.3- L'effet de la température……54
V.1.5- Déplacement et solubilisation de l'huile……56
V.1.6- Etude comparative entre le SDS et le Biosurfactant…….56
V.1.6.1- CMC par conductimètrie……56
V.2- Les méthodes biochimiques……57
V.2.1- Quantification glucidique……57
V.2.2- L'indice d'emulsification ……57
V.3- Conclusion……58

Conclusion générale ……..59
Références bibliographiques……...60

Liste des figures

Chapitre I : Les souches productrices des biosurfactants (Pseudomonas aeruginosa)

Figure I.1: Pseudomonas aeruginosa……...7

Figure I.2. Les principales étapes de la formation d'un biofilm chez *P. aeruginosa*.....10

Chapitre II : Les Biosurfactants

Figure II.1: Structures générales des biosurfactants Rhamnolipides produits par *Sp. Pseudomonas aeruginosa*……..23

Chapitre III : Les méthodes de caractérisation de biosurfactants

Figure III.1 : Forme d'une goutte pendante avec le diamètre équatorial d_e et le plus petit diamètre d_s……...31

Figure III.2 : Forme d'une goutte sessile avec les rayons de courbure principaux r_1 et r_2.....32

Figure III.3 : Dosage de microplaques, à gauche : rhamnolipide biosurfactant dans l'eau, à droite: l'eau……..33

Liste des tableaux

Chapitre I : Les souches productrices des biosurfactants (Pseudomonas aeruginosa)

Tableau I.1 : Quelques caractères permettant d'identifier les *P.aeruginosa*, *P.fluorescens*, *P.putida*, *P.simiae* et *P.stutzeri* ……..6

Chapitre II : Les Biosurfactants

Tableau II.1 : Classification des Biosurfactants……..18

Tableau II.2 : Des types structuraux de bio – tensioactifs microbiens……24

Tableau II.3 : Les principaux types de biosurfactants…….27

Chapitre III : Les méthodes de caractérisation de biosurfactants

Tableau III.1 : préparation de la solution……34

Chapitre IV : Procédure expérimentale

Tableau IV.1 : Liste des produits utilisés……44

Liste des abréviations

Abréviation	Explication
ADSAP	Axysymmetric Drop Shape Analysis by Profile
BS	Biosurfactants
CCM	La chromatographie sur une couche mince
CE 50	Concentration efficace pour diminuer de 50% de la population d'essai
$CHCl_3$	Chloroforme
CMC	Concentration micellaire critique
C/N	Rapport de carbone sur azote
CO_2	Dioxyde de carbone
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
Cup	Chaperone usher pathway
$CuSO_4$	Le sulfate de cuivre
CxHy	Les hydrocarbures
Da	Dalton
DAB	2,4-diaminobutyric acid
E_{24}	Indice d'émulsification
FTIR	Infrarouge à transformer de fourrier
HAP	Les hydrocarbures aromatiques polycycliques
HCl	Acide chlorhydriques
HMQC	Les hétéronucléaires multiples cohérence par un phénomène quantique
HPLC	Hight performance liquid chromatography
KBr	Bromure de potasuim
LBMPT	Laboratoire de recherche de Biomatériaux et

	Phénomènes Transport de Médéa.
LPS	Lipopolysaccharide
MV	Molecular weight
MEOD	Chloroforme-méthanol deutéré
MS	Microbial surfactants
NAPLS	Solubilité aqueuse des milieux non miscibles
$NaBH_4$	Le tétrahydruroborate de sodium
NaOH	Hydroxyde de soduim
OH	Hydroxyde
P	*Pseudomonas*
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate
PMS	The polymeric microbial surfactants
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SP	Souche productrice
TFA	Trifluoroacétique
TLC	Chromatographie sur couche mince
TMS	Tétraméthylsilane
USI	Les unités de soins intensifs
VVM	Volume du milieu par volume d'aire par minute
UV-VIS	Ultra Violet-visible

Liste de lettres grecques

Lettres grecques	Explication
¢	Atome de carbone
σ_L	La tension superficielle du liquide à analyser
σ_W	La tension superficielle de l'eau

$\mathbf{N_L}$	Le nombre de gouttes du liquide
$\mathbf{N_w}$	Le nombre de gouttes d'eau
$\boldsymbol{\rho_L}$	La densité de et le liquide
$\boldsymbol{\rho_W}$	La densité de l'eau
$\boldsymbol{\Delta\rho}$	La différence de densité entre les deux phases
$\mathbf{d_e}$	Le diamètre équatorial de la goutte
$\mathbf{d_s}$	Le plus petit diamètre de la goutte suspendue
$\boldsymbol{\Delta p}$	La différence de pression à travers l'interface
$\mathbf{r_1 / r_2}$	Le rayons de courbure principaux
$\boldsymbol{\sigma}$	La tension de surface

الملخص

الغرض من هذا المشروع هو الدراسة الهيكلية والوظيفية للمفاعل السطحي تنتجها سلالة الزائفة الزنجارية. يتم إنتاج للمفاعل السطحي من زراعة الميكروب الحيهوائي في وسط يحتوي على الطين الميت الهيدروكربوني كمصدر الكربون, لأن للمفاعل السطحي خاص بركيزة النمو. هذا المفاعل السطحي هو من Rhamnolipides ويتألف من جزء رامنوز وجزء من المادة الدهنية التي تميز ركيزة النمو. يتم إجراء التحليلات الهيكلية عن طريق قياس امتصاص الأشعة تحت الحمراء عن طريق عدد الموجات من أجل الخصائص الفيزيوكيميائية. يتم إجراء الخصائص الكيميائية البيولوجية من قبل تحليل جزء المادة الدهنية للمفاعل السطحي بواسطة الليباز التي تنتجها نفس السلالة.

الكلمات المفتاحية : الزائفة الزنجارية, المفاعل السطحي, *Rhamnolipides* , الأشعة تحت الحمراء, تحليل الدهون.

Résumé

Le but de ce projet est l'étude structurale et fonctionnelle des biosurfactants produits par la souche *Pseudomonas aeruginosa.* Les biosurfactants sont produits à partir d'une culture aérobie sur un milieu ne contenant que de la boue morte d'hydrocarbure comme source de carbone car les biosurfactants sont même spécifiques du substrat de croissance. Les biosurfactants sont des *Rhamnolipides* constitués d'une fraction Rhamnose et d'une fraction lipidique qui caractérise le substrat de croissance. Les analyses structurales s'effectuent par mesure de l'absorbance des rayonnements infrarouge suivant les nombres d'ondes pour la caractérisation physico-chimique. La caractérisation biochimique s'effectue par hydrolyse de la fraction gras des biosurfactants par des lipases produites par la même souche.

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa,* Biosurfactant, *Rhamnolipides,* Rayonnement infrarouge, Hydrolyse lipidique.

Summary

The purpose of this project is the structural and functional study of biosurfactants produced by Pseudomonas aeruginosa strain. The biosurfactants are produced from an aerobic culture on a medium containing only dead hydrocarbon sludge as carbon source because the biosurfactants are even specific of the growth substrate. Rhamnolipid biosurfactants are constituted by a rhamnose fraction and a lipid fraction which characterizes the growth substrate. Structural analyzes are performed by measuring the absorbance of infrared radiation following wavenumbers for the physicochemical characterization. Biochemical characterization is performed by hydrolysis of the fatty fraction biosurfactants by lipases produced by the same strain.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, biosurfactant, *Rhamnolipides*, infrared radiation, lipid hydrolysis.

Introduction générale

Les agents tensioactifs sont des molécules amphiphiles avec deux parties hydrophobe et hydrophile. Ils sont utilisés dans les produits alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques et les industries pétrolières. La majorité des agents tensioactifs actuellement utilisés dans l'industrie sont synthétisés chimiquement. Parmi les différents composants d'un détergent, les biosurfactants représentent une part importante.

Biosurfactants représenter une telle alternative et ont l'avantage supplémentaire qu'ils sont généralement de faible toxicité voir inexistante par rapport aux agents tensioactifs chimiques. Ils ont trouvé une application dans la production de produits chimiques fins, comme les revêtements de surface comme additifs pour l'assainissement de l'environnement et dans la lutte biologique (Soberon-Chavez et *al.,* 2005). Les biosurfactants sont produits par les bactéries, les champignons et les levures, comprennent les glycolipides, les lipopeptides, les *lipoaminoacides*, les lipoprotéines, les lipopolysaccharides, les phospholipides, des *monoglycérides* et des *diglycérides*. Parmi ceux-ci, les *Rhamnolipides* produits par la souche *Pseudomonas aeruginosa* comme dans notre cas, ont reçu beaucoup d'attention en raison de leurs propriétés remarquables (moussant, émulsionnant, détergent, solubilisant, stabilisant…), (Mulligan, 2005; Maier et «Avez 2000 'Soberon-Ch). Ces *Rhamnolipides* sont capables de réduire la tension superficielle de l'eau de 72 $mN.m^{-1}$ à 40 voir 35 – 30 mN/m. Beaucoup de techniques sont employées pour identifier les propriétés de ses bioproduits a savoir les propriétés physico-chimiques des biosurfactants telles formation d'émulsion, solubilisation d'huile, le moussage et la détergence, abaissement de la tension superficielle etc. Ainsi, les méthodes biochimiques consistent à quantifier les fractions glucidiques et lipidiques des *Rhamnolipides*, par contre les méthodes physico-chimiques sont basées sur les méthodes spectroscopique et tensiométrique.

Dans le cadre de ce projet et selon les objectifs assignés deux grandes parties constituent l'essentielle du travail. La première partie de cette étude présentera une synthèse bibliographique qui regroupe trois chapitre (les souches productrices des biosurfactants «*Pseudomonas aeruginosa* », les biosurfactants et les méthodes de caractérisation des biosurfactants). La seconde partie porte sur l'étude expérimentale des caractéristiques physico-chimique et biochimique des biosurfactants produits par *Pseudomonas aeruginosa* sur une boue morte d'hydrocarbure en tant que principale source de carbone et d'énergie. Enfin les résultats obtenus sont présentés et discutés dans leur ensemble.

Chapitre I

Les souches productrices des biosurfactants

I.1- Introduction

P. aeruginosa, est l'un des membres de la famille de *Pseudomonacaes,* il se définit comme un bacille aérobie Gram négatif. *P. aeruginosa* peut se transformer en se développant en une anaérobiose en cas ou les nitrates sont disponibles. Presque toutes les souches sont mouvantes par l'intermédiaire d'un seul flagelle polaire. Il a une prédilection pour la croissance dans des environnements humides, reflétant probablement son existence naturelle dans le sol et l'eau. Ses exigences de croissance sont tellement minime qu'elle peut se développer dans de l'eau distillée et même de survivre en présence de certains désinfectants. La croissance optimale se produit dans le rang de 37,0 à 42,0°C. Mais elle peut également croître à des températures supérieures à 20°C. De plus, elle pousse dans une variété de milieux de culture, alors qu'elle ne fermente pas les sucres. Il faut aussi signaler que la contribution des propriétés naturelles de la bactérie a son succès écologique en fait un pathogène redoutable chez les immuno -déficients comme un pathogène opportuniste.

Pseudomonas aeruginosa produit trois types de colonies. L'isolat naturel provenant du sol ou de l'eau produit typiquement un type de colonies rugueuses. Un type est lisse, avec des bords plats et une apparence élevée. L'autre type, souvent obtenue à partir de sécrétions des voies respiratoires et urinaires, a un aspect mucoïde. Les phénotypes lisses et mucoïdes jouent probablement un rôle dans la colonisation et la virulence. Cet agent pathogène et pyocyanine, qui se traduisent dans son apparence bleu – verte caractéristique. Celle-ci est relativement spécifique de *P. aeruginosa* est produite par environ la moitié des souches.

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène opportuniste qui peut causer plusieurs maladies graves invasives les patients gravement malades et les personnes immunodéprimées. Étonnamment, *P. aeruginosa* provoque occasionnellement des graves infections chez les personnes en bonne santé et est souvent identifié comme la flore microbienne normale chez les individus sains. Même entant qu'un pathogène nosocomial commun dans tous les départements de l'hôpital, les infections dues à *Pseudomonas aeruginosa* sont particulièrement répandues parmi les unités de soins intensifs (USI), en raison de la gravité de la maladie dans cette population ainsi que les dispositifs ou des procédures invasives à taux élevé. L'appareil respiratoire est la source la plus fréquente des isolats de *Pseudomonas aeruginosa*, suivis par les plaies chirurgicales, l'urine et la circulation sanguine (J-P.Flandrois, 1997), (Habib Abbasi et al,. 2013).

I.2- Généralités

Dans l'antiquité et avant l'invention du microscope, bien peu de savants soupçonnèrent l'existence d'êtres vivants invisibles. Aristote avait formulé l'idée d'une contagion invisible de certaines maladies mais il ne pu en apporter la preuve. De même, au XVI^{ème} siècle, Von Hutten et Paracelse affirmèrent l'existence de germes vivants invisibles mais leurs idées n'eurent guère de succès.

Tout change à la fin du XVII^{e} siècle par le drapier hollandais Antoine van Leeuwenhoek qui a observé la présence des micro-organismes (microbes, levures, globules du sang) à l'aide d'un microscope de sa conception. Les bactéries sont une forme originale de cellule dans le monde vivant, capable de se développer dans un environnement adapté. Elles effectuent pour leur compte les synthèses cellulaires nécessaires à leur croissance et à leur multiplication. Leur place dans le monde vivant à beaucoup variée. Elles ont été d'abord réunies avec les protozoaires mais l'absence de structures membranaires interne les a fait individualiser ensuite sous le nom de procaryotes, par opposition aux eucaryotes, pourvus de structures membranaires internes. Dans toutes ces définitions, les bactéries étaient caractérisées, non en elles-mêmes, mais par opposition aux autres classes d'organismes vivants.

Au début du XX^{e} siècle une évolution des organismes est principalement conditionnée par celle de l'environnement terrestre. Ceci implique que la connaissance des caractéristiques de l'environnement terrestre au cours du temps peut fournir des indices sur les types d'organismes qui ont pu y vivre. En plus durant le dernier siècle, des recherches ont démontrés que plusieurs microorganismes de diverses origines phylogénétiques sont capables d'inhiber différents agents pathogènes. (J-P.Flandrois. 1997).

I.3- Microorganismes producteurs des Biosurfactants

Les biosurfactants sont principalement produits par des micro-organismes se développant de manière aérobie (Mulligan et al. 2001) dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone, comme des hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures (Bognolo. 1999 ; Mulligan et al. 2001). Ces organismes sont en général, des levures, des champignons ou des bactéries.

Le rôle principal physiologique des bio-tensioactifs ou biosurfactants est de permettre aux microorganismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension de surface et interfaciale par solubilisation des substrats dans un milieu aqueux, rendant ces

derniers plus facilement accessible (Fiechter. 1992 ; Matasandoval et al. 2000).

Les bactéries utilisées pour produire les biosurfactants sont, en général, issues de sols contaminés par des molécules hydrophobes telles que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Elles sont donc isolées de leur milieu naturel et sont cultivées au laboratoire. Ceci permet de faire des tests pour choisir la meilleure source de carbone et d'optimiser les milieux de culture afin d'obtenir un taux de production maximum. Dans tous les cas, les biosurfactants obtenus sont un mélange de plusieurs molécules. Par exemple, dans le cas des biosurfactants produits par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* UG2, on obtient un mélange de deux, voire quatre *Rhamnolipides* (Van dyke et al. 1993 ; Abalos et al. 2001) indiquent que sept homologues de *Rhamnolipides* ont été identifiés dans des cultures de *Pseudomonas aeruginosa AT10.*

Bien que de nombreuses espèces produisent des bio-tensioactifs, la régulation de leur synthèse est encore mal connue, sauf pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* qui sont actuellement les bactéries les plus étudiées (Banat et al. 2000). La biosynthèse des *Rhamnolipides* par *Pseudomonas aeruginosa* se réalise pendant la phase exponentielle de croissance et est due à un transfert séquentiel glycosyl catalysé par des transférases rhamnosyl spécifiques ; il y a intervention de donneurs rhamnosyl, les TPD transférases. Deux différentes transférases permettent la formation de quatre *Rhamnolipides* différents (Koch et al. 1991). Les molécules des biosurfactants sont associées aux membranes des bactéries et sont aussi secrétées dans le milieu (Thangamani et Shreve, 1994).

Les bactéries produisent des molécules de faible masse molaire, qui diminuent efficacement les tensions interfaciales, ainsi que des polymères de masses molaires élevées, qui se lient fortement aux surfaces (Ron et Rosenberg. 2002). Les biosurfactants de faibles masses molaires sont généralement des glycolipides, alors que ceux de masses molaires élevées sont constitués de polysaccharides, de protéines, de lipopolysaccharides ou des lipoprotéines. Ces derniers sont moins efficaces pour réduire les tensions interfaciales, mais plus efficaces pour entourer les gouttes d'huiles et empêcher leur coalescence.

Une des techniques utilisées pour suivre la production de biosurfactant est l'ADSA-P qui détermine simultanément l'angle de contact et la tension de surface du liquide grâce au profil d'une goutte restant sur une surface de solide. Les gouttes contenant les microorganismes producteurs sont placées sur une surface en fluoro-éthylène-propylène et le profil de la goutte est déterminé.

D'autres méthodes ont été décrites comme l'hémolyse du sang, qui est une

caractéristique connue de certains biosurfactants et un index d'émulsification (E_{24}) obtenu sur le kérosène (Banat. 1995). Le test du "drop-collapsing" est utilisé pour voir les colonies bactériennes produisant les biosurfactants ; des gouttes contenant des cellules en suspension sont placées sur une surface recouverte d'huile ; si la goutte reste stable, cela démontre l'absence des biosurfactants (Jain et al. 1991).

I.4- Présentation de *Pseudomonas aeruginosa*

I.4.1-Le genre Pseudomonas

Les *P. aeruginosa* sont connus depuis longtemps sous le nom de *Bacillus pyocyaneus* (bacille pyocyanique) ou agent du pus bleu des plaies surinfectés. Isolés pour la première fois en 1882 par C. Gessard, pharmacien militaire intrigué par la « coloration azurée des plaies purulentes », identifié le responsable de l'infection ; *Bacillus Pyocyaneus*, Gessard Flügge**.**

Le genre *Pseudomonas* fait partie des *Protéobactéries* à Gram négatif du groupe gamma, il appartient *au phylum des Proteobacteria, classe des Gammaproteobacteria, ordre des Pseudomonales),* à côté de germes comme *Stenotrophomonas maltophilia* et *Burcolderia sepatia* qui sont aussi des *Pseudomonas* et qui coopèrent aux multi-infections de la mucoviscidose à côté de *Pseudomonas aeruginosa*. Ce genre regroupe 7 espèces dont *P. aeruginosa, P. chlororaphis, P. fluorescens, P. pertucinogena, P. putida, P. stutzeri et P. syringae. P. aeruginosa* est l'espèce type du genre *Pseudomonas*.

L'espèce-type du genre, *P.aeruginosa*, est mésophile tandis que la majorité des espèces sont psychrotrophes (Rossignol. 2007). Il fait partie des espèces douées d'un pouvoir pathogène et parmi elles, des *Pseudomonas* à pigment *fluorescent*, qui sont très nombreuses et très répandus dans l'environnement, notamment, dans les milieux aquatiques à l'exception des eaux souterraines bien protégées. Pour bien différencier le *pyocyanique* des autres *Pseudomonas* à pigment *fluorescent*, l'identification se fait en recherchant le pigment *pyocyanine* soluble dans le chloroforme et la capacité du germe à se développer à 41°C. Ces deux tests suffisent à faire le diagnostic de *Pseudomonas aeruginosa.*

Tableau I.1 : Quelques caractères permettant d'identifier les *P.aeruginosa*, *P.fluorescens*, *P.putida*, *P.simiae* et *P.stutzeri* (Veron, 1989).

Caractères	***P.aeruginosa***	***P.fluorescens***	***P.putida***	***P.simiae***	***P.stutzeri***
Oxydase	+	+	+	+	+
Respiration nitrates	+	D	-	+	+
Nombre de flagelles	1	>1	>1		1
Croissance à 4°C	-	+	D	+	-
Croissance à 41°C	+	-	-	-	D
Pyocyanine	+	-	-	-	-
Pyoverdine	+	+	+	+	-
Arginine dihydrolase	+	+	+	+	-
ONPG	D	-	-	-	-
Hydrolyse l'esculine	-	-	-	-	-
Lysine décarboxylase	-	-	-		-
Phénylalanine désaminase	-	-	-		D
Amylase	-	-	-		+
Gélatinas	D	+	-	+	-
Lécithinase	D	+	-		-
DNase	D	-	-		-
Hémolyse	D	D	-		-
Acétate*	+	+	+		+
Glucose*	+	+	+	+	+
Tréhalose*	-	+	-	-	-
Maltose*	-	-	-	-	+
Inositol*	-	+	-	+	-
Mannitol*	+	+	-	+	D
Arginine*	+	+	+		-
Glucose**	+	+	+	-	+
Fructose**	+	+	+		+

I.4.2- Description

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est mésophile à Gram négatif non sporulant, se présente sous forme de bacilles droites, légèrement incurvées et fins de 1 à 5 µm de long et 0,5 à 1 µm de large (figure I.1). Elle est très mobile grâce à un flagelle polaire, ciliature mono-triche, dépourvus de spores et de capsules. Cette bactérie apparaît la plupart du temps isolée où en diplo-bacille, capable de se développer dans des températures allant de 4°C à 45°C. La température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C.

Le genre *P.aeruginosa* présente un type respiratoire aérobie strict et un type métabolique chimio-organotrophe oxydatif, qui utilise l'oxygène comme accepteur d'électrons mais en absence de ce dernier, elle peut utiliser les nitrates comme accepteur d'électrons (Vasil. 1986). C'est une bactérie très répandue dans la nature qui se développe sur tous les milieux usuels, même les plus simples (non enrichis), capable d'infecter un large spectre d'hôtes. Elle est caractérisée par leur résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques.



Figure I.1: Pseudomonas aeruginosa

L'espèce type du genre, *P.aeruginosa* est un germe peu exigeant, l'immense majorité des espèces n'exigent aucun facteur de croissance et sont capables d'utiliser de nombreux substrats hydrocarbonés utilisés comme source de carbone et d'énergie. Elle sécrète un certain nombre de pigments entre autres la *pyocyanine* (bleu-vert), la *fluorescéine* (jaune-vert fluorescent) la pyoverdine (jaune-vert) et la *pyorubine* (brun-rouge). C'est une bactérie lactose négative, c'est-à-dire dépourvue d'enzymes dégradant le lactose, pourvue d'une odeur de seringa (fleur de la famille des *Philadelphacées* encore appelée "jasmin des poètes") in vitro. Parmi les sécrétions de *P. aeruginosa*, on trouve aussi des protéines (élastase et protéase) qui détruisent l'intégrité des tissus de l'hôte en dégradant leurs protéines telles que l'élastine, le collagène et les transferrines. On trouve aussi des toxines de poids moléculaire faible comme la *pyocyanine,* affectant différents types de sites dans la cellule hôte, et un biofilm, le principal agent de sa résistance. Elle utilise des flagelles pour la mobilité, des systèmes introduisant des protéines effecteurs dans les cellules hôtes, et un lipopolysaccharide qui supprime les réponses immunitaires des hôtes en plus d'intervenir directement dans l'établissement d'infections persistantes (Pascal CHOLLEY. 2010), (Hichem Chaker. 2012), (Meliani Amina. 2013).

Pour une identification assurée, on recherche la présence des enzymes de type oxydase (élastase et protéase parmi d'autres) que cette bactérie sécrète. La production des deux pigments *pyocyanine* et *fluorescéine*, et la température de croissance optimale de 42 °C confirme l'identification. *P. aeruginosa* cause également de la corrosion microbienne dans le diesel et le carburant d'aviation (microorganismes utilisant l'hydrocarboné). Elle crée des masses gélatineuses sombres parfois appelées à tort « algues » (Meliani Amina. 2013).

I.4.3- Milieu de Vie et distribution environnementale

L'espèce *P. aeruginosa* est une bactérienne ubiquitaire, comme toutes les espèces du genre *Pseudomonas* ou apparenté. Ces bactéries ont des exigences nutritives peu importantes et sont capables de survivre dans l'environnement (eaux, surface, air, aliments) et particulièrement en milieu humide. Elle est très présente en milieu hospitalier et est responsable de nombreuses infections nosocomiales (11% des infections nosocomiales). Dans son environnement naturel, *P.aeruginosa* vit sous forme planctonique, mobile ou à l'état sessile dans un biofilm, attaché à une surface inerte ou une source de substrat. (Hichem Chaker. 2012), (Meliani Amina. 2013).

I.4.4- Facteurs de virulence de P. aeruginosa

Les facteurs de virulences ont fait l'objet de plusieurs études depuis des décennies. Le bacille *pyocyanique* (*P. aeruginosa*) reste à bien une énigme pour les chercheurs analysant sa virulence. Ce bacille exprime une pathogénéïcité polymorphe qui dépend avant tout de l'état immunitaire, de l'intégrité des barrières cutanéo-muqueuses et de l'efficacité des mécanismes de clairance des patients. Elle est attribuée à la production de nombreux facteurs de virulence membranaires et extracellulaires qui lui permettent d'intervenir dans les processus de colonisation et de multiplication en sécrétant des protéines qui peuvent être potentiellement toxiques pour les cellules hôtes. Parmi les facteurs membranaires (les facteurs de virulences associés à la bactérie) ; le flagelle, le facteur d'adhésion (pili de type IV) et l'alginate, tandis que les facteurs extracellulaires (facteurs de virulence sécrétés) comprennent les exotoxines, les exoprotéases, la phospholipase C, les *Rhamnolipides* (qui font l'objet de cette étude) et les chromophores (Van Delden et Iglewski. 1998).

I.4.4.1- Facteurs de virulence associés à la bactérie

Les facteurs de virulence associés à la bactérie constituent l'ensemble des éléments directement liés à sa paroi et sa membrane plasmique (protéines, polysaccharides….), qui sont exposés a la surface de la cellule bactérienne et permettent à celle – ci soit de communiquer ou adhérér au milieu extérieur (S.Bricha et al. 2009).

A- Lipopolysaccharide (LPS)

Les LPS sont des constituants lipidiques localisés dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Elles occupent une grande partie de la surface externe de la cellule bactérienne. Elles sont connues d'une part pour leur rôle protecteur contre la lyse provoquée par le sérum et d'autre part pour leur activité endotoxique. Elles sont également impliquées dans la stimulation de la réponse inflammatoire et dans les interactions avec les tissus de l'hôte. L'endotoxine est responsable d'une stimulation excessive du système immunitaire pouvant provoquer un choc septique et conduire à la mort (Lynn et Golenbock. 1992), par addition un noyau oligo-saccharidique et de l'antigène-O, et une région polysacharidique variable (Rocchetta et al. 1999). La molécule de LPS comprend une région hydrophobe permettant l'ancrage de la structure dans la membrane externe, du lipide A (ou endotoxine).

La souche *P. aeruginosa* synthétise deux types de LPS nommés type A et type B. Qui se distinguent par la composition polysaccharidique de leur antigène-O (Lam et al. 1989). D'après la présence ou l'absence de l'antigène-O dans le cœur oligosaccharidique, cela caractérise un phénotype lisse ou rugueux. Par ailleurs, le phénotype lisse a été souvent décrit comme plus virulent par rapport à un mutant isogénique possédant un phénotype rugueux (Cryz et al. 1984). De plus, cette région externe est connue pour être un ligand de *P. aeruginosa* pour la protéine CFTR, et joue un rôle crucial dans l'élimination de *P. aeruginosa* au niveau des poumons (Pier et al. 1996 ; Pier, 2002).

B- Biofilms

Comme la plupart des bactéries, *P.aeruginosa* se développe sous forme d'agrégats structurés appelés biofilms. Ces biofilms sont connus depuis les années 1670 lorsqu'Anton van Leeuwenhoek a observé des «animalculi» formant une communauté bactérienne, cette souche bactérienne peut le former en seulement 5 à 7 jours.

Un biofilm, c'est un ensemble de microorganismes et de microcolonies de cellules filles, associées entre elle et/ou aux surfaces et interfaces. Ces cellules sont incluses dans une matrice extracellulaire composée de polysaccharides, d'acides nucléiques et de protéines. La structure ainsi formée contient une multitude de canaux permettant le passage des nutriments.

Le biofilm joue un rôle actif dans le processus de communication entre cellules bactériennes, de plus, il protége *la souche bactériénne (P.aeruginosa)* contre l'antibiothérapie, la phagocytose et contre la réponse immunitaire anti-pyocyanique (Costerton et al. 1999; Jensen et al. 1990; Kharazmi *et al*, 1999; Jesaitis et al. 2003). Les principales étapes de la formation d'un biofilm sont décrites ci - dessous (figure (I.2)) :

- Attachement des cellules planctoniques (mobiles) à une surface de manière réversible ;
- Déplacement des bactéries sur la surface selon le mode de déplacement de type *twitching* grâce à l'extension et à la rétraction du pilis (Merz et al. 2000) ;
- Une formation éventuelle de microcolonies ;
- Les cellules bactériennes reçoivent un signal de maturation permettant la production d'exopolysaccharides (selon un système de *quorum sensing* de type *las*) ;
- Une formation d'un biofilm différencié et mature avec une perte de leurs flagelles et leurs pilis (le déttachement physique d'une partie du biofilm pour recommencer le cycle).

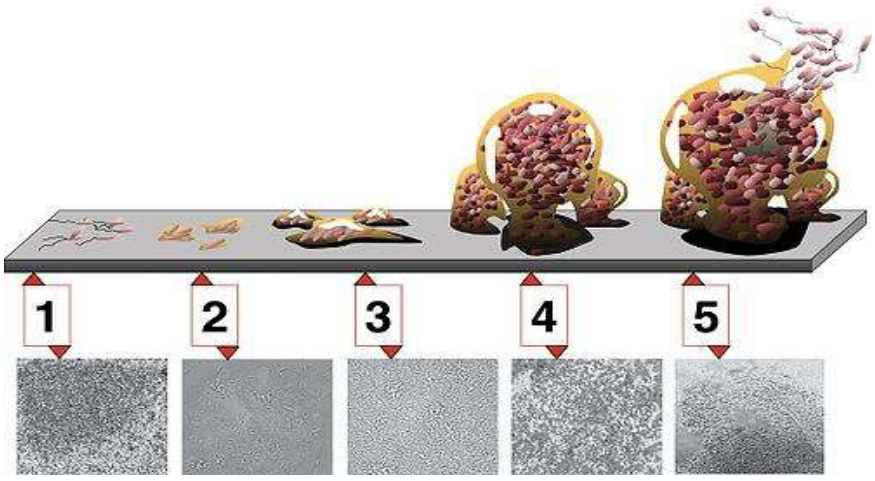


Figure I.2. Les principales étapes de la formation d'un biofilm chez *P. aeruginosa*.

C- Les flagelles

Les flagelles bactériens sont des structures rotatives impliquées dans l'attachement des cellules planctoniques (mobiles) à une surface et actionnées par un moteur situé à la base, qui entraîne un filament agissant comme une hélice. Ils sont composés d'un filament permettant la mobilité, d'un crochet et d'un corps basal ancré dans les membranes bactériennes.

La souche *Pseudomonas aeruginosa* possède un seul flagelle polaire essentiel pour assurer sa mobilité suivant un mode wimming *et* swarming (Kohler et al. 2000). Il facilite l'acquisition de nutriment et joue un rôle indirect dans l'adhésion cellulaire « précisément aux cellules épithéliales respiratoires (Feldman et al. 1998) ». Son importance dans la pathogenèse

semble établie puisque des souches non flagellées sont sévèrement atténuées dans leur virulence.

(FELDMAN, BRYAN et al. 1998) ont montré que des bactéries mutantes, sans flagelles, étaient moins invasives que la souche mobile. Le flagelle joue donc un rôle important dans les stades précoces du développement du biofilm bactérien *in vitro* (O'Toole et Kolter, 1998a).

D- Les pilis de type IV

Les pili de type IV sont des structure filamenteuses d'environ 6 nm de diamètre, constituées d'empilement de monomères de la protéine appelées piline (PilA) (Mattick, 2002). L'évènement initial dans l'infection par la bactérie de type rugueux aux cellules épithéliales des muqueuses grâce aux pilis de type IV, qui de plus favorisent la phagocytose. Les micro-organismes incapables d'adhérer aux muqueuses perdent donc la capacité d'établir une infection.

Ces pilis rétractables de type IV, sont nécessaires pour l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales (Hahn. 1997). Ils sont aussi impliqués dans le mécanisme de déplacement particulier, indépendant du flagelle, appelé « twitching motility » qui prédomine dans les mouvements à l'interface de surfaces solides. En outre, les souches piliées provoquent non seulement plus de pneumonies mais sont aussi à l'origine d'une grande mortalité que les souches ne possédant pas le pili.

E- Facteur d'attachement de type fimbriae (ou Cup)

Chez *P. aeruginosa*, ces facteurs d'attachements sont essentiels pour l'adhérence aux surfaces abiotiques. Comme le verre et le plastique, mais également dans la formation du biofilm. Ce genre possède trois systèmes Cup appelés CupA, CupB et CupC. Ces trois systèmes ont été identifiés comme étant codés respectivement par les gènes *cupA1-A5*, *cupB1-B6* et *cupC1-C3*, lesquels sont organisés en opéron. Ce type de fimbriae est déjà assemblé par la voie *chaperone usher pathway* (Cup). L'assemblage de ce type de pili par la voie Cup a été déja décrit chez *Escherichia coli* uropathogène et chez *Haemophilus influenzae* (Sauer et al. 2000).

I.4.4.2- Facteurs de virulence sécrétés

A- Exotoxine

L'exotoxine de type A est le composé le plus toxique produit par *P. aeruginosa*. Il est sécrété sous la forme d'une pro-toxine inactive. L'exotoxine serait important dans l'infection

chronique par cette souche bactérienne, en inhibant la régénération de nouveaux tissus, l'adhésion cellulaire et en induisant l'effacement des microvillies. Sa production est induite par un contact cellule bactérienne – cellule eucaryote et dans un environnant pauvre en Ca^{2+}. Ce genre est responsable de dommages tissulaires au site inflammatoire, de l'invasion bactérienne et d'une activité immunosuppressive. Outre cette capacité, il semble interférer avec l'organisation des filaments d'actine et empêche l'exocytose, la progression du cycle cellulaire et la phagocytose (Hichem Chaker. 2012), (Pouneh KHALILZADEH. 2009), (S.Bricha et al. 2009)

B- Les Rhamnolipides

Les *Rhamnolipides,* objet d'étude dans ce projet *s*ont des glycolipides extracellulaires thermostables, qui peuvent émulsionner les phosphates membranaires grâce à leur activité détergente. Ils perturbent le transport mucociliaire et les mouvements ciliaires de l'épithélium respiratoire humain. De plus, ils inhibent la phagocytose et contribuent donc à l'invasion du tissu pulmonaire par *P.aeruginosa*. De plus, ils sont retrouvés en concentrations élevées dans les crachats de patients atteints de la mucoviscidose infectés par cette bactérie. Tout comme le flagelle et les pili de type IV, les *Rhamnolipides* sont impliqués dans la mobilité de type swarming (Kohler et al. 2000) et la formation de biofilm (Davey et al. 2003; Boles *et* al. 2005). Ainsi, leur production et les mécanismes ayant traits à leurs implications dans le mode de vie et de développement de *P.aeruginosa* seront détaillés dans le chapitre suivant.

Les *Rhamnolipides*, sont des types de glycolipides principalement produit par *Pseudomonas aeruginosa*, ces derniers sont capables de produire six types de *Rhamnolipides*, possédant une structure chimique et une activité similaire de surface avec un poids moléculaire moyen de 577. Un *Rhamnolipide* peut réduire la tension superficielle de l'eau de 72 à 30 mN / m, avec une concentration micellaire critique de 27 à 54 mg / L.

C- Chromophores

L'acquisition du fer est cruciale pour la survie et pour la persistance d'un pathogène à l'intérieur de l'hôte. Le pathogène peut se procurer tous les nutriments nécessaires à partir de tissus de l'hôte, sauf le fer. Dans l'environnement aérobie, le fer existe sous forme oxydée (ferrique Fe^{3+}). Par contre, les concentrations de cette forme biologiquement utilisable sont insuffisantes et la bactérie nécessite des mécanismes spécifiques permettant l'acquisition du fer à partir de l'hôte. *P. aeruginosa*, comme la plupart des bactéries Gram négatif aérobies, est confronté au problème d'insolubilité du fer (III) et doit donc excréter des molécules chélatant le fer (III), les sidérophores. Ces protéines permettent à ce microorganisme d'obtenir le fer

des transferrines, des ferritines, de l'hémoglobine et d'autres protéines de l'hôte contenant du fer. Le complexe ferri-sidérophore résultant, est ensuite capté par un récepteur spécifique à la surface de la membrane externe (FpvA). *P. aeruginosa* produit deux types de sidérophores ; la pyoverdine et la pyocheline. Ces deux dernières agissent en synergie pour causer des dommages aux tissus du site d'infection (S.Bricha et al. 2009)

La pyoverdine, est un capteur et transporteur de fer caractérisée par sa couleur fluorescente. Elle est importante pour l'acquisition du fer dans le poumon et ainsi favorise la croissance bactérienne. Ce chromophore est produit *in vivo* lors de la colonisation des poumons des patients atteints de fibrose kystique. La ferri - pyoverdine (pyoverdine ayant capté du fer) présente dans le milieu extracellulaire est aussi un régulateur positif de la transcription des autres facteurs de virulence comme la protéase IV, l'exotoxine A et la pyoverdine elle – même (Lamont et al. 2002).

Cependant, *Pseudomonas aeruginosa* possède aussi d'autre capter de fer comme, la pyocheline agit aussi comme capteur de fer et est également responsable d'un effet pathogène secondaire et la pyocyanine, un autre chromophore est toxique pour les cellules eucaryotes et procaryotes, et elle est impliquée dans le cycle d'oxydoréduction en aérobie en générant le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène.

D- Les phospholipases C

Les *phospholipases C* sont des enzymes extracellulaires thermolabiles, synthétisée dans des conditions de carence en phosphate. *P.aeruginosa* produit deux *phospholipases C* ; les *phospholipases C* hémolytique et non-hémolytique. La *phospholipase C* non-hémolytique n'est pas impliquée dans la pathogénie de ce microorganisme tandis que la *phospholipase C* hémolytique est reconnue pour induire la perméabilité des cellules de l'hôte, la libération de médiateurs de l'inflammation induisant des dommages aux organes et la mort de l'individu.

E- L'élastase

L'élastase est une protéase majoritaire. Elle joue un rôle important dans la pathogenèse en provoquant des hémorragies et des nécroses tissulaires. L'élastase de *P. aeruginosa* est un des douzaines de facteurs de virulences secrétés par la bactérie pendant une infection. Son activité est médiée par l'action combinée de deux enzymes protéolytiques, LasA et LasB contrôlé par le *quorum sensing*. Cette activité conduit à la destruction de tissu pulmonaire. Cette activité n'est pas très claire in vivo, mais celle in vitro est la dégradation de l'élastine et du collagène aussi bien que la protéolyse de l'immunoglobuline IgG, l'inhibition de la protéinase du sérum I ; ceci prouve bien son potentiel pouvoir pathogène lors d'une infection par *P. aeruginosa* (Pouneh KHALILZADEH), (S.Bricha et al. 2009).

I.5- *Pseudomonas aeruginosa* dans la production des Biosurfactants

Ces dernières années, de plus en plus le développement de la biotechnologie microbienne a conduit à beaucoup plus d'intérêt dans les Biosurfactants par rapport à leurs homologues chimiques. Elle est due à des propriétés uniques des biosurfactants, notamment la biodégradabilité, faible toxicité, les conditions de production douce, l'acceptabilité environnementale, concentration micellaire critique inférieure, et une plus grande sélectivité ainsi qu'une meilleure activité à température extrême, le pH et la salinité.

Pseudomonas aeruginosa, a été utilisé pour produire des *Rhamnolipides* sur une variété des substrats carbonés, y compris des substrats hydrophiles, les huiles végétales et les huiles minérales. Cette souche bactérienne a été cultivée avec différents milieux et dans des conditions spécifiques pour déterminer la stratégie de culture optimale dans le but de produire des *Rhamnolipides*. Différentes sources de carbone, en particulier les huiles par exemple: (le diesel, le kérosène, l'huile d'olive, l'huile de soleil fleur, huile de pépins de raisin, etc.) ont été adoptés à explorer leurs effets sur le rendement de *Rhamnolipide*. D'après des études, la souche *P.aeruginosa* était capable d'assimiler les sept substrats carbonés ;(le glucose, le glycérol, l'huile d'olive, huile de tournesol, l'huile de pépins de raisin, du diesel et du kérosène, alors qu'ils progressaient de manière moins efficace dans les huiles minérales.

Parmi les travaux portant sur la production des Biosurfactants par *Pseudomonas aeruginosa* et la caractérisation des ses bioproduits, on peut citer entre autres :

- Bassirou .M.H et al. (2013 – 2014) avec un indice d'émulsification EI_{24} = 57,23% . Les biosurfactants produit par la souche bactérienne *P.aeruginosa* représentent les glycolipides incluant les *Rhamnolipides*, son rôle est de diminuer la tension superficielle des liquides et de réduire la tension interfaciale dans un mélange. Ils contribuent ainsi à disperser et à solubiliser les particules d'hydrocarbures liquides et solides, leur rôle physiologique est la solubilisation de substrats hydrophobes dans les cellules. *P.aeruginosa* synthétisent les biosurfactants en réponse à la présence de n-alcanes dans le milieu. Les biosurfactants sont appliqués dans plusieurs industries telles que l'industrie alimentaire, pharmaceutique, cosmétique etc.
- H.S. El-Sheshtawy, M.M. Doheim (2014) portant sur l'activité antimicrobienne des Biosurfactants produits par *Pseudomonas aeruginosa*. Cette souche bactérienne a été récupérée à partir du surnageant de culture après l'élimination des cellules par centrifugation. Cette étude consiste à sélectionner la meilleure souche bactérienne (*Bacillus subtilis* ou *Pseudomonas aeruginosa*) qui présente une réduction ultérieure de la

tension superficielle, le cas de *P. aeruginosa*, qui a montrée une capacité à croître dans le milieu de culture contenant du glucose.

- Senthil Balans et Jayalakshmi S. (2013) sur la production et la caractérisation des glycolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* de type marine avec une fraction grasse de 74% et 24% glucidique. Dans leur étude, ils ont décrit l'isolement, la composition chimique et la normalisation de la production de Biosurfactants utilisant une souche bactérienne marine *Pseudomonas aeruginosa* de Mudasalodai. Cette dernière a été isolée en utilisant des méthodes de dépistage de multiples standards du port de pêche contaminés par des hydrocarbures pétroliers. De plus, ils ont montré sa capacité dans le domaine de la biorestauration, l'agriculture et les industries pharmaceutiques. Les biosurfactants ont été extrait par suite d'une précipitation de l'acide suivie par une extraction au méthanol puis purifié partiellement afin d'être caractérisés biochimiquement.
- Elouzi1 et al. (2009) sur l'isolement et la caractérisation des *Rhamnolipides* produits sur un sol contaminé par du pétrole brut. Dans cette étude, des bactéries du genre « *Pseudomonas aeruginosa* » sont isolées à partir de différentes sources environnementales situées dans le champ Sarris (Zawia-Libye). *Pseudomonas aeruginosa* a été sélectionnée pour sa capacité à produire des produits extracellulaires (Biosurfactants) capable de réduire la tension de surface et émulsionner le kérosène. Ce Biosurfactant avait un excellent indice d'émulsification (E24) de 70% et une stabilité de 67% comparable et/ou meilleure que les biosurfactants classiques qui avaient des indices de 66% et 58%.

Conclusion

Pseudomonas aeruginosa, est une bactérie saprophyte opportuniste, possédant une grande capacité d'adaptation à des milieux variés ; environnement, plantes, hommes, animaux. De plus, elle a une capacité d'adhérence et de communication. Elle fait l'objet d'un grand intérêt dans le cadre de la production des Biosurfactants non seulement du fait de sa faible exigence en nutriments mais aussi de la qualité des ses biosurfactants employables tant en médecine en pharmaceutique, en agro – alimentaire et en industrie pétrolière. Du fait de sa capacité à dégrader les polluants dans les rejets des industries de raffinage et de biens d'autres domaines, elle fait ainsi l'objet d'une recherche poussée dans le domaine des biotechnologies microbiennes.

Les souches productrices des biosurfactants sont en majeur partie identifiées comme productrices des *Rhamnolipides*. Ainsi, ce bioproduit est aujourd'hui au cœur de la

biotechnologie du fait de l'avantage qu'il offre et de son potentiel de challenge face aux tensioactifs synthétiques. Comme cité précédemment la production des *Rhamnolipides* offrent un éventail permettant de valoriser la souche *Pseudomonas aeruginosa* au delà de son aspect pathogène.

Chapitre II

Les biosurfactants

II.1- Introduction

Les biosurfactants sont des composés amphiphiles obtenus dans des surfaces biologiques, principalement sur la surface des cellules microbiennes ou des fragments hydrophobes et hydrophiles extracellulaires excrétées qui confèrent une capacité d'accumuler entre phases fluides. Ils possèdent la propriété caractéristique de réduction de la tension superficielle et interfaciale en utilisant les mêmes mécanismes que les agents tensioactifs chimiques (Singh A et al. 2007).

Les tensioactifs sont des ingrédients actifs présents dans des savons et des détergents ayant la capacité de se concentrer à l'interface d'air et à l'eau. Ils sont couramment utilisés pour séparer les matières grasses à partir d'un support notamment en raison du fait qu'ils sont capables d'augmenter la solubilité aqueuse des milieux non miscibles (NAPLS) par la réduction de leur tension superficielle / interfaciale à l'interface air – eau et eau – huile (Yin H et al. 2009).

Les biosurfactants sont principalement classés en fonction de leur structure chimique et leur origine microbienne. Les principales classes de biosurfactants sont les glycolipides, les phospholipides, les biosurfactants polymères et les lipopeptides (surfactine). Les glycolipides les plus connus sont les Rhamnolipides, sophorolipides et trehalolipids (Yin H et al. 2009, Makkar RS et al. 2003).

Les applications industriels des tensioactifs sont très larges, agricoles, agro - alimentaires, les cosmétiques et pharmaceutiques mais la plupart de ces composés sont synthétisés chimiquement et potentiellement ils causent des problèmes environnementaux et toxicologiques en raison de la nature récalcitrante et persistante de ces substances (Makkar RS et al 2003).Avec les progrès actuels de la biotechnologie, l'attention a été portée au processus respectueux de l'environnement alternatif pour la production de différents types de biosurfactants d'origine microbiennes (Lotfabad TB et al. 2009).

II.2- Classification et nature chimique des biosurfactants

Les tensioactifs microbiens (MS) sont des molécules complexes qui couvrent une large gamme de types chimiques, y compris des peptides, des acides gras, les phospholipides, les glycolipides, les lipopeptides, les antibiotiques, etc. Les micro-organismes produisent également des agents tensioactifs qui sont dans certains cas, la combinaison de plusieurs types

chimiques ; dénommés les tensioactifs microbiens polymères (PMS). Nombreux d'entre eux ont été purifiés et leurs structures élucidées. Alors que le poids moléculaire élevé les MS sont généralement hétéropolysaccharides ; polyanioniques contenant à la fois des polysaccharides et des protéines, le faible poids moléculaire MS sont souvent glycolipides. Le rendement de la production varie avec le milieu de croissance du micro-organisme et le micro – organisme lui même. Les cellules microbiennes intactes qui ont une grande surface cellulaire hydrophobe sont des tensioactifs. Dans certains cas, les tensioactifs jouent eux-mêmes un rôle naturel dans la croissance de cellules microbiennes sur des substrats insolubles dans l'eau comme les hydrocarbures CxHy (où x et y sont deux entiers naturels), le soufre, etc. Les exo–cellulaires tensioactifs sont impliquées dans l'adhésion cellulaire, l'émulsification, la dispersion, la floculation, l'agrégation cellulaire, et les phénomènes d'adsorption. Une classification générale des Biosurfactants est donnée dans le tableau (**II.1**). Une très brève description de chaque groupe est donnée ci-dessous.

Tableau II.1 : Classification des Biosurfactants

1. Glycolipids : Trehalose lipids, Sophorolipids, Rhamnolipids
2. Fatty acids (Acides gras)
3. Phospholipids
4. Surface actives antibiotics: Gramicidin S, Polymixins, Surfactin et Antibiotic TA
5. Les tensioactifs microbiens polymères: émulsan de *Acidneiobacter calcoaceticus* RAG-1 (ATCC 31012), Le complexe de protéine de polysaccharide de *Acinetbacter calcoaceticus* BD4, autres émulsifiants de *Acinetobacter sp*, polysaccharides complexes liquides à partir de yeasis, PA protéine émulsifiante de *Pseudomonas aeruginosa*, émulsifiant et solubilisant des facteurs de PG-1, floculant biologique et emulcyan de *Pseudomonas* de la *cyanobactérie filamenteuse Phormidium* J-1.
6. Particulate surfactants : Extracellular vesicles from *Acinetobacter sp* H01-N, Microbial cells with high cell surface hydrophobicities

II.2.1- Les Glycolipides

Les glycolipides sont les types les plus communs des biosurfactants (Shaw, N et al. 1970). Le constituant mono-, di-, tri- et tétrasaccharides comprennent le glucose, le mannose, le galactose, l'acide glucuronique, le *Rhamnose*, et le sulfate de galactose. Le composant

d'acide gras a généralement une composition similaire à celle des phospholipides du même micro-organisme. Les glycolipides peuvent être classés comme suit :

- Les lipides de tréhalose : La croissance du serpentin vu dans de nombreux membres du genre *Mycobacterium* est due à la présence d'esters de tréhalose sur la surface (Asselineau, C et al. 1978, Block, H et al. 1950) cellulaire. Les facteurs de cordon de différentes espèces de *Mycobacteria* (Asselineau, C et al. 1978, Barksdale, L et al. 1977, Brady, R et al. 1964, Wong, M et al. 1979), *Corynebacteria* (Loneda, T et al. 1970)*, Nocardia*, *Rhodoccocus* et *Brevibacteria* diffèrents en taille et en structure des esters d'acides mycoliques.
- Sophorolipides : ils sont produits par différentes souches de la levure, *Torulopsis*. L'unité de sucre est le sophorose disaccharide qui est constitué de deux unités de glucose b-1,2-liés. Les 6 ¢ groupes hydroxyle sont généralement acétylés. Les sophorolipides réduisent les tensions de surface entre les molécules individuelles à la surface, même si elles sont des agents émulsifiants efficaces (Cooper, D et al 1983, Cooper, D et al 1984, Inoue, S et al. 1982). Les sophorolipides de *Torulopsis* ont été rapportés comme stimulants (Ito, S et al. 1982, Gobbert, U et al. 1984), inhibiteurs (Ito, S et al 1982, Ito, S et al 1980), et n'ont pas d'effet (Hauser, G et al. 1958) sur la croissance de la levure sur des substrats insolubles dans l'eau.
- Rhamnolipides : produits par *Pseudomonas. sp* en grandes quantités, ce sont des glycolipides constitués de deux molécules de rhamnose et deux molécules d'acide b-hydroxydecanoique (Edwards, J et al 1965, Jarvis, F et al. 1949). Leur premier groupe OH de l'acide gras est impliqué dans la liaison glycosidique avec l'extrémité réductrice du rhamnose disaccharide et le second groupe OH est impliqué dans la formation d'ester. Puisque l'un de l'acide carboxylique est libre, les *Rhamnolipides* sont des anions. Il a été rapporté que les *Rhamnolipides* sont agissent (Hisatsuka, K et al. 1971) dans un milieu en abaissant la tension de surface, en émulsifiants les CxHy, et stimulent aussi la croissance de *Pseudomonas.sp* sur le n-hexadécane. La formation de Rhamnolipides par *Pseudomonas.sp* MVB a été fortement augmentée par limitation d'azote (Wagner, F et al. 1983). Le Rhamnolipide pur réduit la tension interfaciale du n-hexadécane dans l'eau à environ 1 mN / m et a une concentration micellaire critique (CMC) de 10 à 30 mg / l en fonction du pH et les conditions salines (Lang, S et al. 1984).

II.2.2- Les acides gras

Les acides gras produits à partir des alcanes par des oxydations microbiennes ont reçu une attention maximale comme bio – tensioactifs (Rehn, H et al. 1981). Outre les acides à chaîne droite, les micro-organismes produisent des acides gras complexes contenant des groupes OH et des branches d'alkyle. Certains de ces acides complexes, comme les acides corynomucoliques, sont des biosurfactants efficaces (Cooper, D et al. 1981, MacDonald, C et al. 1981, Kretschmer, A et al. 1980).

II.2.3 Les phospholipides

Ce sont des composants majeurs des membranes microbiennes. Lorsque certaines bactéries dégradent les CxHy (Makula, R et al. 1975, Vachon, V et al. 1982) ou des levures (Hug, H et al. 1974, Mishina, M et al. 1977) sont cultivés sur des substrats hydrophobes, le niveau de phospholipides augmente fortement. Les phospholipides d'*Acinetobacter.sp* cultivés sur de l'hexadécane ont des propriétés tensioactives puissantes. Les phospholipides produits par *Thiobacillus thiooxidans* ont été démontré comme responsable de la capture du soufre élémentaire, qui est nécessaire pour la croissance (Kappeli, O et al. 1979, Beeba, J et al. 1971).

II.2.4- Biosurfactants antibactériens

Parmi ses biosurfactants on distingue :

- **Les Gramicidine S :** de nombreuses bactéries produisent un décapeptide cyclosymetrique antibiotique, la gramicidine S. La préparation de spores de *brevis Brevibacterium* contient de grandes quantités de la gramicidine S liés fortement à la surface extérieure des spores (Marahiel, M et al. 1979, Piret, J et al. 1982). Les spores mutants manquent de la gramicidine S et germent rapidement car ils n'ont pas une surface lipophile (Rosenberg, M 1981). L'activité antibactérienne de la gramicidine S est due à son activité de surface très élevée (Danders, W et al. 1982, Iranov, V et al. 1977).
- **Les Polymyxines :** Il s'agit d'un groupe d'antibactériens produits par *Brevibacterium polymyxa* et bacilles connexe (Paulus, H et al 1967). La Polymixine B est un décapeptide dans laquelle les acides aminés 3 à 10 forment un octapeptide cyclique. Un acide gras à chaîne ramifiée est connecté à l'acide 2,4-diamino- terminal (DAB). Les Polymixines sont capables de solubiliser certaine enzymes de membrane (Balakrishnan, R et al. 1980).

- **Les Surfactine (subtilysine) :** Un des plus actifs biosurfactants produits par *B. subtilis* est un lipopeptide surfactine cyclique (Arima, K et al. 1968, Bernheimer, A et al. 1970). Le rendement en produit de surfactine par *B. subtilis* peut être amélioré à environ 0,8 g / l en éliminant en continu l'agent tensio-actif par le fractionnement de mousse et l'ajout de fer ou des sels de manganèse au milieu de croissance (Cooper, D et al. 1981).
- **Les Antibiotique TA :** *Myxococcus xanthus* produit TA antibiotique qui inhibe la synthèse du peptidoglycane en interférant avec la polymérisation du pentapeptide lipide disaccharide (Zafriri, D et al. 1981) des micros - organismes. Cet antibiotique TA a des applications chimio-thérapeutique très intéressantes (Rosenberg, M et al. 1985).

II.2.5- Tensioactifs microbiens

La plupart de ces protéines hétérosaccharides contenant des polymères sont produites par des micro–organismes comme les :

- ***Acinétobacter calcoaceticus* RAG-1 (ATCC 31012)** : Une bactérie, RAG-1, a été isolée lors d'une enquête d'un facteur qui limite la dégradation du pétrole brut dans l'eau de mer. Cette bactérie émulsionne efficacement les milieux aqueux comme l'eau (Reisfeld, A et al. 1972) contenant des CxHy. L'*Acinetobacter calcoaceticus* a été utilisée plus tard avec succès pour effacer un compartiment de chargement d'un pétrolier au cours de son voyage (Rosenberg, E et al. 1979, Gutnick, D et al. 1977) de ballast. Le phénomène de nettoyage est dû à la production d'un facteur émulsifiant extracellulaire avec un poids moléculaire élevé (Rosenberg, E et al. 1979).
- **Le complexe de *protéine de polysaccharide d'Acinetobacter calcoaceticus* BD413 :** Un mutant de *A. calcoaceticus* BD4 excrète de grandes quantités de polysaccharides avec des protéines. L'activité émulsifiante nécessite la présence à la fois des polysaccharides et des protéines (Kaplan, N et al 1982, Taylor, W et al 1961).
- **D'autres *émulsifiants Acinetobacter* :** la production d'émulsifiant extracellulaire est très répandue dans le genre Acinetobacter. Dans un sondage (Sar, S et al 1983) de 8 à 16 souches de *A. calcaoceticus* produisent de grandes quantités d'émulsifiants suivant la croissance sur le milieu contenant de l'éthanol (Neufeld, R et al 1980, Neufeld, R et al 1984). Cette fraction extracellulaire était extrêmement actif dans la rupture d'émulsion kérosène / eau stabilisée par un mélange de Tween 60 et Span 60.

- **Les complexes polysaccharides – lipidique de la levure :** l'émulsifiant partiellement purifié, Liposan, a été signalé, qu'il contenait environ 95% de glucides et 5% de protéine (Kappeli et al. 1977). Une levure dégradant un substrat hydrophobe comme *Endomycopsis lipolytica* YM, produit un facteur de solubilisation d'alcane- instable (Reddy, P et al. 1982). Sur les substrats insolubles dans l'eau, la levure produit des glycolipides qui sont incapables de stabiliser les émulsions. Mais, lorsque le glucose était le substrat carboné, la levure produit un émulsifiant puissant.
- **Des protéines émulsifiant (PA) à partir de *Pseudomonas aeruginosa* :** La bactérie *P. aeruginosa* a été observée à excréter un émulsifiant protéique. Cette protéine est produite à partir de PA à longue chaîne n-alcanes, le 1-hexadécane, l'alcool et les substrats d'acétyle; mais pas à partir de glucose, le glycérol ou l'acide palmitique. La protéine a une MW de 14.000 Da et est riche en sérine et thréonine 80.
- **Les tensioactifs de *Pseudomonas PG-1* :** ils sont hydrocarbonés, de solubilisation extrêmement efficace. La bactérie utilise un large éventail des substrats y compris des alcanes gazeux et liquides volatils, les alcènes, pristane, et les radicaux alkylbenzènes (Reddy, P et al. 1982, Reddy, P et al. 1983, Cameotra, S et al. 1990).
- ***Bioflocculant* et *émulsifiant* de la *cyanobactérie filamenteuse Phormidium* J-1:** La variation de l'hydrophobicité de la surface cellulaire de *Phormidium cyanobactérie* a été corrélée avec la production d'un agent émulsifiant, emulcyan (Fattom, A et al. 1984). L'emulcyan partiellement purifiée a un poids moléculaire supérieur à 10.000 Da et contient des hydrates de carbone, des protéines et acides gras des esters. L'addition de cellules adhérentes à emulcyan hydrophobes conduit à leur devenir hydrophile et détacher de gouttelettes ou de perles d'hexadécane de sépharose phényle.

II.3- La production microbienne des Biosurfactants (les *Rhamnolipides)*

Les souches productrices comme *P.aeruginosa* en l'occurrence produit deux grands types de *Rhamnolipide* dans des milieux fermentatifs. Le mono – rhamnolipide, rhamnosyle-β-hydroxydécanoyle-β-hydroxydécanoate (Rha-C10-C10) et le rhamnolipide, rhamnosyle-rhamnosyle-β-hydroxydécanoyle-β-hydroxydécanoate (Rha- Rha-C10-C10] (E Deziel et al 2000). Outre ces, vingt-cinq Rhamnolipides congénères décrits chez *P. aeruginosa*, ceux – ci varient en longueur et / ou l'étendue de saturation de leur chaîne carbonée, ce qui montre que l'addition d'une chaîne hydrocarbonée à dTDP-L- rhamnose ne sont pas spécifiques aux

chaînes de carbone (E Déziel et al. 1999). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, les biosurfactants sont les produits de la convergence des deux voies métaboliques ; la biosynthèse de la dTDP-L-rhamnose et le détournement de la β-hydroxydécanoyl-ACP intermédiaire du cycle FASII par RhlA pour synthétiser le fragment dimère d'acide gras de Rhamnolipides et 3- [3-hydroxyalkanoyloxy] libre d'acide alcanoïque (HAA). Les transferases rhamnosyl RhlB RhlC et catalysent le transfert de dTDP-L-rhamnose soit HAA, ou un mono-rhamnolipide précédemment généré, respectivement (E Déziel et al. 2003). Les HAA libres montrent également les activités de la tension superficielle liés à la promotion de la motilité d'essaimage (E Déziel et al. 2003). Des études récentes suggèrent que RhlA est responsable du détournement des β-hydroxydécanoyl-ACP intermédiaires du cycle FASII directement en concurrence avec FabA et FabI pour cet intermédiaire (K Zhu et al. 2008). En outre, RhlA est la seule protéine nécessaire à la conversion de deux molécules de β-ACP dans une hydroxyacyl- HAA. Le détournement de la β-hydroxydécanoyl-ACP intermédiaire du cycle FASII est une étape importante pour produire la chaîne hydrocarbonée dans la molécule rhamnolipide, à la fois bio-technologiquement et cliniquement, ce qui fournit un substrat à l'enzyme RhlAB.

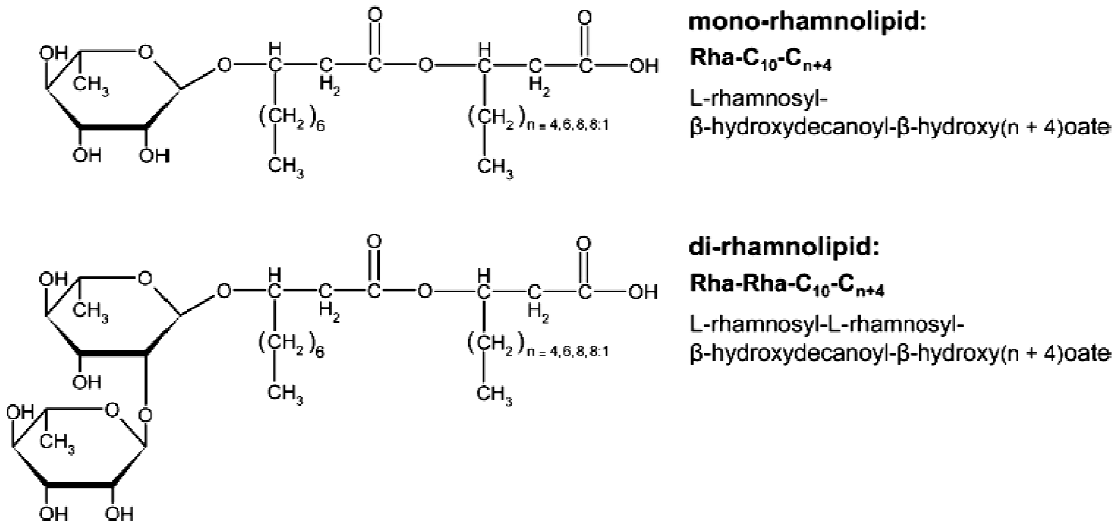


Figure II - 1: Structures générales des biosurfactants Rhamnolipides produits par *Sp. Pseudomonas aeruginosa.*

II.4- Aspect Microbiologique

Les microorganismes utilisent une variété de composés organiques en tant que source de carbone et d'énergie pour leur croissance. Lorsque la source de carbone est un substrat

insoluble comme un hydrocarbure (CxHy), les micro-organismes facilitent leur diffusion dans la cellule de production d'une variété de substances, les biosurfactants. Certaines bactéries et levures qui sécrètent les tensioactifs ioniques émulsifie le substrat de CxHy dans le milieu de croissance. Quelques exemples de ce groupe de BS sont les *Rhamnolipides* qui sont produits par différents *sp. Pseudomonas* (Guerra-Santos, L et al. 1984, Burger, M et al. 1963), ou les sophorolipides qui sont produits par plusieurs *sp. Torulopsis* (Cutler, A et al. 1979, Spencer, J et al. 1979). Des BS produites par divers micro-organismes sont indiquées au tableau **II.2**.

Tableau II.2 : Des types structuraux de bio – tensioactifs microbiens.

Surfactant	Source
Trehalose dimycolates	Mycrobacterium Sp
Trehalose dicorynemycolates	Nocardias sp. Rhodococcus sp . Arthrobacter sp. Corynebacterium sp .
Rhamnolipids	Pseudomonas sp
Sophorolipids	Torulopsis sp
Aminoacid-lipids Lipopeptides	Bacillus sp. Streptomyces sp.Corynebacterium sp. Mycrobacterium Sp.
Ornithine-lipid	Pseudomonas sp. Thiobacillus sp. Agrobacterium sp. Gluconobacter sp .
Phospholipids	Condida sp. Corynebacterium sp .Micrococcus sp. Thiobacillus sp .
Fatty acids/ natural lipids	Acineiobacter sp. Pseudomonas sp. Micrococcus sp. Mycrococcus sp. Candida sp . Penicillum sp . Aspergillus sp.

II.5- Facteurs affectant la production des Biosurfactants

L'activité, la composition et l'émulsification des biosurfactants dépendent non seulement de la souche productrice, mais également des conditions de culture, par conséquent, la nature de la source de carbone, la source d'azote ainsi que le rapport C/N. Les restrictions alimentaires, chimiques et les paramètres physiques telles que la température, l'aération, des cations divalents et le pH influent sur la quantité de produit mais aussi le type de polymère produit (Salihu A et al. 2009).

II.5.1- Sources de carbone

La qualité et la quantité de la production des biosurfactants sont affectées et influencés par la nature du substrat carboné (Rahman PKSM et al. 2008). Le diesel, le pétrole brut, le glucose, le saccharose, le glycérol ont été désignés par plusieurs travaux pour être des bonnes sources de carbone et d'énergie dans la production de biosurfactant (Desai JD et al. 1997).

II.5.2- Sources d'azotes

L'azote est important dans le milieu de production des biosurfactants parce qu'il est essentiel pour la croissance microbienne comme les synthèses protéiques et celles des métabolites primaires en dépendent. Différents composés azotés ont été utilisés pour la production de biosurfactants tels que l'urée, peptone, extrait de levure, sulfate d'ammonium, le nitrate d'ammonium, le nitrate de sodium, l'extrait de viande et des extraits de malt. Bien que l'extrait de levure est la source d'azote le plus utilisé pour la production biosurfactant, sa concentration et celle l'organisme dans le milieu de culture sont dépendante. Les sels d'ammonium et de l'urée sont des sources d'azote préférés pour la production des biosurfactants par *Arthrobacter paraffineus* alors que les nitrates appuient considérablement la production des biosurfactants par *P. aeruginosa* (Adamczak M et al. 2000).

II.5.3- Facteurs physico – chimiques

Ils sont extrêmement importants dans le rendement et les caractéristiques des biosurfactants produits. Pour obtenir de grandes quantités des biosurfactants, il est toujours nécessaire d'optimiser la bioprocédé parce que le produit peut être affecté par des changements de température, le pH, l'aération ou la vitesse d'agitation. La plupart des productions des biosurfactants sont effectuées dans un intervalle de température de 25 – 37°

(Desai JD et al. 1997). L'effet du pH sur le biosurfactant produit a été étudié par (Zinjarde et al. 2002) qui a déclaré que la meilleure production réalisée est lorsque le pH est de 8,0 qui est le pH naturel de l'eau de mer.

II.5.3.1- Aération et agitation

L'aération et l'agitation sont des facteurs importants qui influencent la production des biosurfactants et à la fois facilité de transfert d'oxygène de la phase gazeuse à la phase aqueuse. Elles peuvent également être liée à la fonction physiologique d'émulsifiant microbien, il a été suggéré que la production des bioémulsifiants peut améliorer la solubilisation de substrats insolubles dans l'eau et par conséquent de faciliter le transport des nutriments pour les micro-organismes. (Adamczak M et al. 2000) ont observé que la meilleure valeur de production de l'agent tensioactif (45,5 g / l) a été obtenue lorsque le débit de l'air était 1VVM (volume du milieu par volume d'air par minute) et la concentration en oxygène dissous a été maintenue à 50% de la saturation.

II.5.3.2- Concentration en sel

La concentration en sel d'un milieu particulier a également eu un effet correspondant sur la production des biosurfactants ainsi que le comportement des micro-organismes sont affectés par la concentration de sel. Néanmoins, les observations contraires ont été remarqués pour certaines productions des biosurfactants qui n'étaient pas touchés par des concentrations allant jusqu'à 10% (poids / volume), bien que de légères réductions de la CMC ont été détectés (Desai JD et al 1997).

II.6- Application des Biosurfactants

Les Biosurfactants sont potentiellement des challengers des tensioactifs synthétiques dans plusieurs procédés industriels, telles que graissage, mouillage, ramollissement, la fixation de colorants, émulsions, dispersions, stabilisation, moussants, prévention de la mousse, ainsi que dans les aliments, l'industrie biomédicale et pharmaceutique, et la bioremédiation des sols contaminés par des produits organiques ou inorganiques. Les Glycolipides et les lipopeptides sont les biosurfactants les plus importants (BS) à des raisons commerciales (tableau **II.3**). (Shete et al. 2006) cartographiaient les brevets sur les biosurfactants et les bioémulsifiants (255 brevets délivrés dans le monde) indiquant le nombre

élevé de brevets dans l'industrie du pétrole (33%), les cosmétiques (15%), agent antimicrobien pour la médecine (12%) et la bioremédiation (11%). Les Sophorolipides occupent 24%, la surfactine 13% et Rhamnolipides 12% représentent une grande partie des brevets. Cependant, cela peut être sous-estimé car de nombreux brevets ne précisent pas l'organisme producteur limité à l'utilisation spécifique de BS seulement.

Tableau II.3 : Les principaux types de biosurfactants

Classe des biosurfactants		**Microorganismes**	**Application**
.	Rhamnolipids	*P. aeruginosa and P. putida*	Bioremediation
		P. chlororaphis	Biocontrol agent
		Bacillus subtilis	Antifungal agent
		Renibacterium salmoninarum	Bioremediation
	Sophorolipids	*Candida bombicola and C. apicola*	Emulsifier, MEOR, alkane dissimilation
Glycolipids	Trehalose lipids	*Rhodococcus spp.*	Bioremediation
		Tsukamurella sp. and Arthrobacter sp.	Antimicrobial agent
	Mannosylerythritol lipids	*Candida antartica*	Neuroreceptor antagonist, antimicrobial agent
		Kurtzmanomyces sp	Biomedical application
Lipopeptides	Surfactin	*Bacillus subtilis*	Antimicrobial agent, biomedical application
	Lichenysin	*B. licheniformis*	Hemolytic and chelating agent

II.7- Avantages de biosurfactants

Les biosurfactants présentent de nombreux avantages par rapport à leurs homologues synthétisés chimiquement, ils possèdent les avantages suivants:

- Biodégradabilité: Les tensioactifs biologiques sont facilement dégradés par les micro-organismes (Mohan PK et al. 2006).
- Faible toxicité: les biosurfactants démontrent une absence de toxicité par rapport aux tensioactifs chimiques dérivés. Il a également été rapporté que les biosurfactants ont montrés des valeurs supérieur de CE 50 (concentration efficace pour diminuer de 50% de la population d'essai) que les dispersants synthétiques (Desai JD et al. 1997).
- La disponibilité des matières premières: Les biosurfactants peut être produit à partir de matières premières très bon marché qui sont disponibles en grandes quantités. La source de carbone peut provenir des hydrocarbures, des glucides et / ou des lipides, qui peuvent être utilisés séparément ou en combinaison les uns avec les autres (Kosaric N et al. 2001).
- Les facteurs physiques: Beaucoup de biosurfactants ne sont pas affectés par des facteurs environnementaux tels que la température, le pH et tolérances bien la force ionique des milieux. Le Lichenysin produit par la souche *Bacillus licheniformis* n'a pas été affectée par des températures allant jusqu'à 50°C, une plage de pH de 4 jusqu'à 9 avec une concentration de 50 g / l de NaCl et 25 g / l Calcium (Krishnaswamy M et al. 2008).
- L'activité de surface et d'interface: Mulligan (Mulligan CN et al. 2005) a indiqué qu'un bon agent tensio-actif peut abaisser la tension superficielle de l'eau de 75 à 35 mN / m et la tension interfaciale eau / hexadécane de 40 à 1 mN / m. Le surfactine possède la capacité de réduire la tension superficielle de l'eau à 25 mN / m et la tension interfaciale eau / hexadécane à < 1 mN / m (Krishnaswamy M et al. 2008).

II.8- Conclusion

En conclusion, la production de biosurfactant en l'occurrence, les *Rhamnolipides* peut être liée à plusieurs facteurs réglementaires qui répondent aux intrants environnementaux tels que la densité de la population, la disponibilité des nutriments et diverses contraintes. La production des Rhamnolipides est fortement contrôlée par les systèmes de réglementation multicouches et une meilleure connaissance de l'effet des stimulis environnementaux qui peuvent grandement améliorer leur production commerciale. D'un autre côté, l'application de biosurfactant dans des processus tels que le lavage, biorestauration et MEOR, nécessite une recherche approfondie sur une base au cas par cas, en prenant en compte les propriétés physiques et chimiques de biosurfactants et les conditions environnementales.

Chapitre III

Les méthodes de caractérisation des biosurfactants

III.1-Introduction

Les biosurfactants sont des molécules avec une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Elles ont donc un comportement particulier en solution en fonction de la polarité du solvant. Ces longues molécules se regroupent notamment en petites particules appelées micelles lorsque la concentration atteint un point critique appeler concentration micellaire critique qui détermine le seuil de formation des micelles dans le milieu aqueux.

Les méthodes de caractérisation des biosurfactants se divisent en deux catégories, les méthodes physico-chimiques et biochimiques. Ces derniers présentent l'avantage de quantifier les fractions glucidiques et lipidiques contenues dans le *Rhamnolipide*. Tandis que les méthodes physico-chimiques basées surtout sur les méthodes spectroscopiques découvertes par *Bunsen* et *Kirchhoff*, permet de sonder la matière de différentes manières pour en déduire des informations sur la structure et les groupements fonctionnels caractéristiques de la biomolécule.

D'autre part, les méthodes physique dont la principale constitue la tensiomètrie pour la mesure de la tension de surface des milieux avec ou sans biosurfactant par la technique de l'arrachement de l'anneau de *Pierre Lecomte du Noüy* (1919). De plus; la grandeur caractéristique des biosurfactants ou tensioactif, qui est la CMC peut être estimée par des méthodes électrochimiques apparentées aux méthodes physiques à savoir la conductimétrie. La CMC se définit comme un agrégat des biosurfactants formant des sphériques ou non dans le milieu aqueux.

III.2-Méthodes physico-chimiques

III.2.1- Méthodes qualitative et quantitative

III.2.1.1- Tensiomètrie : Méthode de De Nouy-Ring

La tension superficielle est une caractéristique qualitative des fluides et des solides divisés. C'est une énergie par unité de surface qui rend compte de l'effet de la pression capillaire sur l'ascension ou la descente du fluide. Ainsi, cette grandeur est mesurée à l'aide d'un tensiomètre de Nouy ou par détermination des variables d'état d'un fluide permettant de les quantifiées. Les solutions aqueuses contenant différentes concentrations des biosurfactants se mesurent en utilisant un type de tensiomètre à anneau de Nouy (Kruss, K10T). La mesure

de la tension de surface s'effectue à 25 ± 1 °C après trempage de la bague en platine dans la solution pendant un certain temps afin d'atteindre les conditions d'équilibre. La mesure se fait par répétition de trois fois pour garantir la stabilité des valeurs. La concentration micellaire critique (CMC) recherchée est ensuite déterminée à partir du point de la tension de surface par la méthode graphique de double tangente suivant la rupture de la courbe de concentration. Pour l'étalonnage de l'instrument, la tension superficielle de l'eau pure est mesurée avant chaque expérience.

L'avantage de cette méthode est la précision et la facilité d'utilisation. Cependant, il nécessite un équipement spécialisé. Un inconvénient est que les mesures des différents échantillons ne peuvent pas être réalisées simultanément. D'autres limitations de ce dosage comprennent le volume d'échantillon requis pour l'analyse, normalement quelques millilitres et la gamme restreinte de concentrations qui peut être analysée sans dilution.

III.2.1.2- Méthode Stalagmométrique

La tension superficielle d'un liquide peut aussi être mesurée avec un stalagmomètre de Traube. Ce dispositif est essentiellement une pipette avec une pointe large aplatie, ce qui permet d'obtenir des grosses gouttes de taille reproductible, qui tombent sous l'action de la gravité. La tension superficielle peut être déterminée sur la base du nombre de gouttes qui tombent par unité de volume, la densité de l'échantillon et la tension superficielle d'un liquide de référence, par exemple, de l'eau. Selon Dilmohamud et al. 2005, la tension de surface est donnée par l'expression suivante :

$$\sigma_L = \frac{\sigma_W . N_W . \rho_L}{N_L . \rho_W} \qquad \text{(III-1)}$$

Où, σ_L est la tension superficielle du liquide à analyser, σ_W est la tension superficielle de l'eau, N_L est le nombre de gouttes du liquide, N_w est le nombre de gouttes d'eau, ρ_L est la densité de et le liquide ρ_W est la densité de l'eau.

III.2.1.3- Méthode de la goutte pendante

La technique de la forme de goutte pendante est une méthode optique de mesure de la tension interfaciale. Une goutte de liquide à l'extrémité d'un capillaire est retenue en suspend par l'énergie de surface la reliant au tube. Ainsi, cette goutte soumise à l'action de la tension

interfaciale adopte un profil d'équilibre qui est une fonction unique du rayon du tube. Les forces agissantes sur elle sont la tension interfaciale, la densité et le champ de gravitation. Selon Tadros, la tension interfaciale est donnée par l'équation suivante:

$$\gamma = \frac{\Delta\rho g d_e^2}{H} H = f\left(\frac{d_s(t)}{d_e(t)}\right) \qquad \text{(III-2)}$$

avec Δρ représente la différence de densité entre les deux phases, d_e est le diamètre équatorial de la goutte et d_s est le plus petit diamètre de la goutte suspendue (Figue **III.1**), H est fonction de d_s et d_e. De plus, des valeurs précises pour H ont été obtenues par Nierderhauser et Bartell 1950.

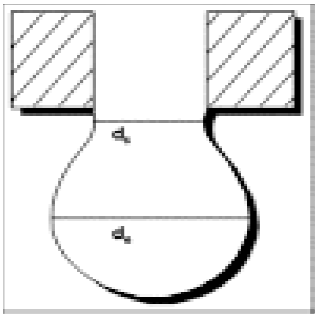


Figure III.1 : Forme d'une goutte pendante avec le diamètre équatorial d_e et le plus petit diamètre d_s.

Une variante de cette technique a été appliquée par Chen et al. 2007 qui a mesuré dans un mode inverse, un petit volume d'air insufflé dans un liquide et la forme de la bulle d'air dans le liquide a été ainsi mesurée. L'inconvénient de la technique de la forme de la goutte pendante est à l'identique de la technique de Nouy.

III.2.1.4- L'analyse axisymétrique de la forme de goutte par profil

L'analyse de la forme de goutte est une autre méthode pour la détermination optique de la tension de surface. À des fins de dépistage, elle a été appliquée d'abord par Van der Vegt et *al* ,1991. Le principe de base est que la forme d'une gouttelette de liquide dépend fortement de la tension superficielle du liquide. Les gouttelettes de liquides avec une faible tension de surface sont plus susceptibles de s'écarter d'une forme parfaitement sphérique que les

gouttelettes de liquides avec une tension de surface élevée. Selon Rotenberg et al.1983, le profil d'une goutte de liquide peut être décrit par l'équation suivante:

$$\Delta p = \sigma \left(\frac{1}{r_1} + \frac{1}{r_2} \right) \qquad \text{(III-3)}$$

Dans laquelle Δ *p* est la différence de pression à travers l'interface, r_1 et r_2 sont les rayons de courbure principaux et σ est la tension de surface (Figure **III.2**).

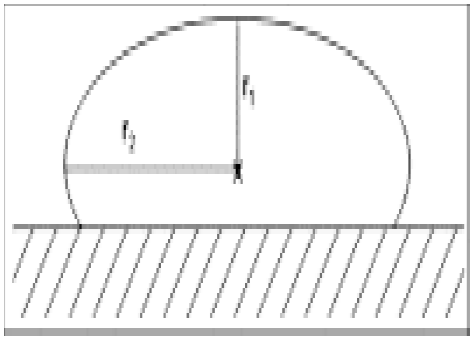


Figure III.2 : Forme d'une goutte sessile avec les rayons de courbure principaux r_1 et r_2.

Pour l'analyse de la forme de goutte, une gouttelette de 100 pi d'une suspension bactérienne est mise sur une surface FEP-Teflon. Le profil de la goutte est déterminé avec un moniteur de contour en fonction du temps jusqu'à 2 heures. La tension superficielle de la suspension peut ensuite être calculée à partir des profils de gouttelettes avec un schéma de solution mise au point par Rotenberg et *al.*, 1983. Comme représenté par Van der Vegt et *al*., 1991. L'analyse de la forme de la goutte peut être utilisée pour surveiller la production de biosurfactants bactérienne. Pour cet essai, seulement de petites quantités d'échantillons sont nécessaires. Mais un appareil photo spécial et un logiciel sont nécessaires. Le calcul de la tension de surface est assez complexe. En outre, différents échantillons ne peuvent pas être mesurés en parallèle.

III.2.1.5- Détermination de la concentration micellaire critique (CMC)

La concentration micellaire critique (CMC) des biosurfactants bruts est mesurée à 25°C avec un tensiomètre Krüss K100MK2 (Krüss GmbH, Hambourg, Allemagne) équipé d'un Metrohm Dosimat 765 (Metrohm, Zofingen, Suisse) et un régulateur de température F12 Julabo (Julabo Labortechnik GmbH , Seelbach, Allemagne) en utilisant la technique de la plaque de Wilhelmy 1850. Différentes concentrations de solution de biosurfactant (0-500 mg /

l) sont préparées par des dilutions successives de solution stock dans de l'eau distillée deux fois. Le tensiomètre est étalonné par rapport à l'eau distillée deux fois. Avant chaque mesure, la sonde est rincée plusieurs fois avec de l'eau distillée avec un double rinçage à l'acétone puis exposer aux flammes d'un bec Bunsen. La CMC est déterminée à partir du point de rupture de la tension de surface en fonction logarithmique de sa valeur par rapport aux concentrations mesurées Abalos et al. 2001.

III.2.1.6- Test de microplate

L'activité de surface des souches individuelles et / ou d'une solution des Biosurfacatnts peut être déterminée qualitativement avec le dosage de microplaques développées par Vaux et Cottingham 2001. Ce dosage est basé sur la variation de la distorsion optique qui est causée par des agents tensioactifs dans une solution aqueuse. L'eau pure dans un puits hydrophobe a une surface plane. La présence d'agents tensio-actifs entraîne un certain mouillage sur le bord du puits et la surface du fluide devient concave et prend la forme d'une lentille divergente. Pour cet essai, un échantillon de 100 µl du surnageant de chaque souche est prélevé et mis dans un micropuits d'une plaque de 96 mircowell. La plaque est visualisée en utilisant une feuille de support de papier avec une grille. La présence des biosurfactants dans le milieu est qualitativement prouvée par la surface concave déformée suivant l'image de la grille ci-dessous (**Figure III.3**). La distorsion optique de la grille fournit un dosage qualitatif de la présence d'agents tensioactifs.

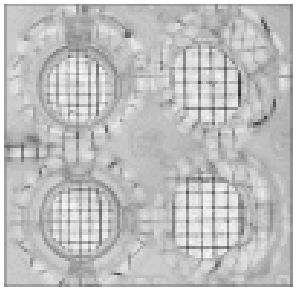


Figure III.3 : Dosage de microplaques, à gauche : rhamnolipide biosurfactant dans l'eau, à droite: l'eau.

Le dosage de la microplaque est facile, rapide et sensible. Ainsi, il permet une détection instantanée de composés tensio-actifs dans le milieu. Il suffit d'un petit volume (100 µl) d'échantillon. En outre, le procédé est approprié pour un criblage à haut débit automatisé.

(Chen et al. 2007) a démontré l'efficacité de la méthode de microplaques à des fins de criblage à haut débit.

III.2.1.7- Conductimètrie

La conductimètrie est une technique électrochimique permettant de mesurer la force ionique ou charge électrique du milieu à travers la quantité et la qualité des groupements et / ou des ions libres agissants dans le milieu. La mesure s'effectue au moyen d'un appareil muni d'une sonde ou électrode permettant de capter la force ionique due aux groupements ionisés et aux ions constituants la charge électrique du milieu. Dans une solution, les électrons ne se déplacent pas comme dans un solide (indépendamment des cations) mais les charges sont transportées en même temps que les ions qualifiés d'électrolytes. Ces ions peuvent provenir d'un sel, d'un acide ou d'une base ou encore de l'eau elle-même. La conductimètrie est très importante dans la détermination de la CMC et de l'effet d'un biosurfactant dans le milieu aqueux. Au travers d'un point d'inflexion de la courbe de la conductivité par rapport à la concentration des solutions mesurées, il est ainsi possible de déterminer la CMC d'une solution d'un tensioactif ou d'un biosurfactant.

On prépare une solution de dodécylsulfate de sodium (SDS) 0.04 M ($NaC_{12}H_{25}SO_4$) un jour à l'avance pour éviter la formation de mousse. On mesure la conductivité en faisant des ajouts de 1mL de cette solution dans 125 ml d'eau déminéralisée à température ambiante.

Tableau III.1 : préparation de la solution

	Masse (g)	MM (g/mol)	Volume (l)	Concentration (M)
Dodécylsulfate de sodium	1.153	288	0.1	0.040

Calcul :

Conductivité (k) = Conductance (G) * Constante de la cellule (C) (III-4)

Concentration de la solution mesurée (c) = c_{SDS} * (V_{SDS}/Vtot) (III-5)

Condutivité molaire (λ) = conductivité (κ) / concentration de la solution (c) (III-6)

III.2.1.8- Spectroscopie infrarouge à transformer de Fourier

La spectroscopie IR est une technique qualitative se basant sur l'absorption d'une énergie photoélectrique suivant la loi de Beer Lambert. L'absorption de cette énergie occasionne un phénomène vibratoire de la molécule absorbant au travers de ses liaisons chimique qui se comportent comme des ressorts animés. Ainsi, 2 mg de biosurfactants lyophilisés sont broyés avec 100 mg de KBr et pressés avec une force de 7500 kg (7.5 tonnes)

pendant 30s pour obtenir des pastilles translucides. Les spectres d'absorption Infrarouges sont ainsi enregistrés sur un spectromètre FTIR. Avec une résolution spectrale et une précision de nombre d'onde de $4cm^{-1}$ et 0,01 cm^{-1} respectivement. Toutes les mesures ont consisté de 100 scans, en utilisant une pastille de KBr et un spectre de référence. Les spectres sont pris à une résolution de 4 cm^{-1} et 32 scans avec correction du dioxyde de carbone atmosphérique.

III.2.1.9- Analyse par résonance magnétique nucléaire

L'analyse par résonance magnétique nucléaire est une méthode qualitative de détermination de l'environnement atomique constituant une molécule. Ainsi, dans la plupart des cas l'analyse de l'atome d'hydrogène, qui est la plus utilisée. De plus, la spectroscopie RMN s'est portée sur l'hydrogène ^{1}H couplé au carbone ^{13}C afin de décrire une molécule hydrocarbonée sur toute la chaîne du squelette carboné ce qui permet de rendre la description plus plausible. L'appareil utilisé dans ce cadre est Le FT-RMN 500 MHz spectromètre (JEOL, JNM-A500). L'affectation complète des signaux glycolipides sont effectuées en utilisant une dimension pour le ^{1}H et le ^{13}C (couplées et découplées). De ce fait, les hétéronucléaires multiples cohérence par un phénomène quantique (HMQC) suivent des programmes dans un spectromètre 400 MHz Bruker Avance DRX avec une sonde de 5 mm inverse. Les échantillons purifiés sont échangés par un deutérium évaporé répétitivement dans du chloroforme-méthanol-D2O (1: 1: 1, v / v). Les spectres de RMN sont déterminées dans du chloroforme-méthanol deutéré (MeOD) (2: 1, v / v) à 30°C, en utilisant le tétraméthylsilane (TMS) comme étalon interne.

III.2.1.10- Spectrométrie de masse

Les fractions isolées éluées de la colonne d'une HPLC peuvent être directement soumises à une analyse par spectrométrie de masse. Les expériences sont effectuées avec un spectromètre de masse Waters en utilisant électrospray en mode positif et une plage de masse à balayage de 300 à 900 Da.

III.2.1.11- Spectrométrie photoélectronique X

les Biosurfactants lyophilisés sont dissous dans de l'eau déminéralisée (30 $mg.ml^{-1}$) et 10 µl de gouttelettes sont placées sur des lames de verre revêtues d'or (1 cm x 1 cm). Après séchage à l'air, les lames de verre sont insérées dans la chambre du spectromètre (Surface Science Instruments, S-sonde, Mountain View, CA). La pression résiduelle dans le spectromètre est d'environ 10^{-9} Pa. Une anode en magnésium est utilisée pour la production de

rayons X (10 kV, 22 mA) à une taille de spot de 250 µg x 1 000 µg. Après un balayage du spectre global des liaisons de la molécules avec une gamme d'énergie de 1 à 1200 eV à faible résolution (150 eV passer énergie), des C_{ls} et des pics N_{ls} sont enregistrées pour des liaisons avec une gamme d'énergie de 20 eV à haute résolution (50 eV d'énergie de passe).

En raison de la contamination possible des biosurfactants lyophilisés avec des ions phosphates provenant de PBS (solution saline tamponnée au phosphate) et conservés sur la dialyse, seuls les pics C_{ls} et N_{ls} sont considérés. À partir des aires sous les pics, d'après Shirley 2006 la soustraction de fond et la correction des facteurs de sensibilité instrumentale, le ratio élémentaire de surface de concentration N / C est calculé. Le pic C_{ls} est décomposé par un programme d'ajustement des moindres carrés en quatre composantes gaussiennes fixés à 284,8 eV (notée C1), 286,2 eV (C2), 288,0 eV (C3) et 289,2 eV (C4) en imposant une largeur à mi-hauteur pleine constante de 1,35 eV. Ces quatre éléments sont jugés représentatifs du carbone impliqué dans liaisons C-C et C-H, C-O et C-N, (C = O) -N et (C = O) -O, et (C = O) -OH respectivement.

III.2.1.12- Spectroscopie UV-Visible

La spectroscopie UV/Visible est effectuée pour vérifier la pureté atteinte par les biosurfactants après perméation du gel. A cet effet, les premières fractions d'une colonne contenant des biosurfactants purifiés sous forme de micelles sont recueillies, rassemblées et lyophilisées. De même, les dernières fractions avec contaminants sont également rassemblées et lyophilisées. Des quantités égales de biosurfactants bruts, biosurfactants purifiés et les contaminants de la même colonne sont dissous dans l'eau et leurs propriétés d'absorption sont vérifiées dans l'UV et le visible. Les analyses de ces échantillons sont réalisées dans un spectrophotomètre UV-visible Perkin-Elmer à double faisceau. On prélève des échantillons en cuve en quartz et on les analyse entre 700 et 190 nm de la gamme par l'acquisition de données avec des intervalles de 1 nm. Un spectre d'arrière-plan est effectué pour l'eau pure utilisée pour les préparations est soustrait afin que le spectre des solutions des biosurfactants ne soit pas affecté.

III.2.1.13- Détermination de l'indice moussant

L'indice de formation de la mousse ou indice moussant est une caractéristique des tensioactifs donc des biosurfactants en solution aqueuse. Ainsi, pour la détermination de cet indice une solution des biosurfactants de 1 g / l est préparée (Das et al. 1998) avec quelques

modifications. Un volume de 20 ml de solution à 1 g / l des biosurfactants est transféré dans un cylindre de mesure et de l'air est injecté au travers la solution à raison de 0,5 l / min pendant 2 min. L'indice de moussage est ainsi déterminé selon l'équation suivante:

$$\text{Indice moussant (\%)} = \left(\frac{Hauteur_{mousse}}{Hauteur_{mousse+liquide}}\right)*100 \qquad \text{(III-7)}$$

III.2.2- Essai de déplacement, d'étalement et de solubilisation d'huile

Le test de déplacement de l'huile a été développé par (Morikawa et al. 2000). C'est une méthode utilisée pour mesurer le diamètre de la zone claire, qui se produit après la suppression des liaisons dans une région d'une solution huile – eau par ajout d'une solution contenant un tensioactif sur l'interface. Le diamètre binomial permet une évaluation de la tension superficielle par l'efficacité de réduction de celle – ci pour un biosurfactant donné. L'essai de déplacement de l'huile est effectué par addition de 50 ml d'eau distillée dans une boîte de Pétri d'un diamètre de 15 cm. Après cela, 20 µl du pétrole brut sont déposés sur la surface de l'eau. L'opération est suivie par l'addition de 10 µl d'une solution aqueuse contenant une concentration de 20 mg / ml d'un agent tensio-actif, sur la surface de l'huile. Les diamètres des zones claires obtenus sont triplés pour un même échantillon agent tensio-actif (biosurfactant) en valeur moyenne du diamètre (Rodrigues et al. 2006). De plus, cette méthode décrit non seulement un déplacement d'huile mais plus encore une solubilisation de ces derniers car le volume des solutions des biosurfactants déposés solubilise d'abord les huiles pour s'y pénétrer avant d'écarter le diamètre et permettre l'apparition d'une zone claire.

La méthode d'étalement de l'huile est rapide et facile à réaliser. Elle ne nécessite aucun équipement spécialisé, juste un petit volume d'échantillon. Elle peut être aussi appliquée lorsque l'activité et la quantité de biosurfactant est faible. (Plaza et al. 2006) et (Youssef et al. 2004) ont démontré que la technique d'étalement de l'huile est une méthode fiable pour détecter la production des biosurfactants par divers micro-organismes se développant dans le milieu. Le test a également été appliqué pour le dépistage par (Huy et al. 1999).

III.2.3- Essais de stabilité

Les études de stabilité ont été effectuées en utilisant une solution brute de biosurfactant 1g/l (Vanessa Walter, Christoph Syldatk et Rudolf Hausmann 2010 (BookZZ.org)). Les solutions aqueuses sont chauffées à 100°C (0 à 75 min) et 121°C (0 à 45 min) avec des intervalles de 15 min, puis refroidies à la température ambiante. Les effets de la température de cryo-congélation ont également porté sur 15 jours d'observation à température ambiante pour le cas de l'effet de la température. De plus, la stabilité du pH est réalisée en ajustant le pH à des valeurs différentes dans une plage de 2 à 12 avec du HCl ou du NaOH suivant les mêmes conditions d'observations que pour la température. Enfin le test de la salinité sur le biosurfactant est étudié par incubation des solutions aqueuses de biosurfactant contenant différentes concentrations de NaCl (50 à 300 g / l) pendant 15 jours à température ambiante.

III.3- Méthodes biochimiques

III.3.1- Le test Rhamnose

Il s'agit de la mise en évidence des groupements hydrocarbonés glucidiques de la molécule de biosurfactant mise en place par (Dubois et al. 1956). Le principe de mise en œuvre est très simple car il consiste à la mesure de la densité optique du complexe formé par la réaction entre les glucides et le groupement phénol en milieu acide. Ainsi, un volume de 0,5 ml du milieu acellulaire est prélevé puis mélangé avec 0,5 ml d'une solution de phénol 5% et enfin 2,5 ml d'acide sulfurique. Le mélange est placé au repos pendant 15 min et l'absorbance est lue à 490 mn.

III.3.2- L'indice d'émulsification EI_{24}

L'indice d'émulsification EI_{24} estimé par la méthode de Cooper et Goldenger 1987. Des échantillons de 2 ml sont pris après centrifugation puis ajustés à 4 ml avec de *n-hexadécane* et soumis à une agitation à la main pendant 5 minutes. La solution est ensuite laissée au repos pendant 24 h. L'indice d'émulsification à 24 h (EI_{24}) est donné en pourcentage par le rapport de la hauteur de la couche émulsionnée (mm) divisé par la hauteur totale de la colonne du liquide (mm).

III.3.3- Caractérisation des glycolipides

Outre la mise en évidence par la méthode de (Cooper et Goldenger 1980), et la méthode de Dubois et al. 1956. Les glycolipides peuvent être soumis à d'autres méthodes comme

l'extraction à l'acétate d'éthyle couplées à la CCM. Le principe de la méthode consiste à chauffer le surnageant déprotéiné d'une culture à 110°C pendant 10 min. Après refroidissement, on acidifié à pH = 3,0 par addition de HCl 2N.

Les glycolipides sont extraits en continu pendant 8 h par l'acétate d'éthyle, récupérés après évaporation du solvant sous pression réduite et repris dans du méthanol. Les différents types glycolipidiques sont séparés par Chromatographie sur couche mince (TLC), effectués sur des plaques de gel de silice 60 F-254 (Merck Darmstadt, Allemagne) en utilisant le système de solvant $CHCl_3$ / CH_3OH / acide acétique (65/15/2).

Deux techniques de détection sont utilisées ; l'exposition à la vapeur d'iode et de vaporisation avec le réactif de Molish α-naphtol (15% dans l'éthanol) / acide sulfurique / éthanol / eau (10,5 / 6,5 / 40,5 / 4,0) pour la récupération des produits séparés. Les spots sont grattés après détection de la vapeur d'iode et sont dissout dans du methanol. Les concentrations des différents types de glycolipides récupérés sont mesurées en utilisant la méthode phénol d'acide sulfurique (Herbert et al. 1971). La séparation des glycolipides individuels dans la solution méthanolique est réalisée par chromatographie HPLC à gradient en utilisant une colonne de 5 µm Hypersil C18 (4,6 mm x 150 mm) de type Interchim (Montluçon, France).

Le débit était de 1 ml / min et la composition de l'éluant eau – acétonitrile était programmée à 1 min pour 10% d'acétonitrile, puis 10% à 90% d'acétonitrile en 40 min, puis 15 min à 90% d'acétonitrile. Pour la détection, une diffusion de la lumière (ELS) un détecteur évaporation (détecteur de masse) de lumière chromatique de Translab (Orléans, France) est utilisé. L'acquisition de données est effectuée avec un HP 1000 / système de A600 (Hewlett-Packard, Sunnyvale, Etats-Unis). La même procédure de HPLC a été utilisée pour l'analyse des différents spots obtenus par CCM. Pour l'étude de la composition des glycolipides, des préparations brutes ont été hydrolysées par HCl 2N à 100°C pendant 2 h. Les fractions d'acides gras résultantes ont été extraites trois fois successivement par du toluène.

Les acides hydroxyles dans la phase de toluène ont été estérifiés par un mélange méthanol-H_2SO_4, puis convertis en triméthylsilyle (TMS) ester comme décrit ci- dessous pour les glucides. Ils ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à la spectrométrie de masse en utilisant un DB-5 (0,32 mm x 30 m) sur une colonne de J et W Scientifics (Folsom, États-Unis) et un spectromètre de masse MS 80 (Kratos, Manchester,

Royaume-Uni). La température du four est programmée pour être modifiée par le chromatographe de 100°C à 250°C à 6°C min après une stabilisation de 1 min à 100°C.

III.3.4- Analyse des amino-acides

L'analyse des mélanges d'amino-acides fournis par l'hydrolyse des protéines ou peptides est réalisée à l'aide de techniques permettant la séparation et le dosage soit d'un seul acide aminé, soit de tous les amino-acides.

L'analyse de la haute sensibilité d'acides aminés d'hydrolysats protéiques des biosurfactants a été effectuée avec un HP 1090 l'instrument Aminoquant par un système automatisé en deux étapes de pré-colonne en dérivé avec de l'o-phtaldéhyde et 9-fluorenylmethylchloroformate. Les hydrolyses ont été réalisées avec 5,7 N de HCl dans la phase gazeuse pendant 2 h à 166°C, les conditions dans lesquelles l'asparagine et la glutamine sont désaminés en acide aspartique et l'acide glutamique respectivement, mais le tryptophane et la cystine / cystéine ne peuvent être quantifiés avec précision.

III.3.5- SDS-PAGE (dodécyl sulfate de sodium)

Le but de la technique SDS-PAGE est de séparer les protéines selon leur taille, et aucune autre caractéristique physique. Le principe qui régit cette méthode est de rigueur dans sa mise en œuvre. Le SDS-PAGE sépare les protéines en fonction de leur structure primaire ou de la taille, mais pas la séquence d'aminoacides.

Les biosurfactants lyophilisés (2,5-10 $mg.ml^{-1}$) sont chauffés à 110°C pendant 10 minutes dans le SDS un tampon de dissociation, contenant 10 mM Tris / HCl, 1,0 mM d'EDTA, pH 8,0, 2,5% de SDS, 5,0% β-mercaptoéthanol et 0,01% de bleu de bromophénol. Après centrifugation, 0,5µl de surnageant sont appliqués sur un gel de 10 à 15% de gradient de SDS est électrophorisé sur un système Pharmacia Phast. Selon Slayne et *al.,* 1990, suivie d'une coloration à l'argent.

Les poids moléculaires standards utilisés sont la phosphorylase b (94 kDa), albumine de sérum bovin (67 kDa), l'ovalbumine (43 kDa), anhydrase carbonique (30 kDa), inhibiteur de trypsine de soja (20,1 kDa) et la lactalbumine (14,4 kDa).

III.3.6- Détermination du Monosaccharide

La composition en monosaccharides se détermine par CPG-MS, l'analyse des dérivés d'acétate d'alditol. Un milligramme des échantillons du mono-rhamnolipides et de di-rhamnolipides sont hydrolysés avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) à 1 M pendant 8 h à 100°C. La solution hydrolysée est ensuite évaporée à sec et le résidu réduit avec $NaBH_4$, pendant une nuit à température ambiante. La solution est ensuite lavée avec de l'acide acétique glacial-méthanol (1: 200, v/v) et on le sèche sous pression réduite. Cette étape est réalisée trois fois de suite.

Le produit est acétylé avec de l'anhydride acétique-pyridine (1: 1, v/v) à 100°C pendant 1 h. Le processus est interrompu par addition de l'eau glacée, et le mélange est ensuite extrait avec du $CHCl_3$ puis lavé avec 5% (p/v) de $CuSO_4$ aqueux. La couche organique contenant des dérivés d'acétate d'alditol est séchée à température ambiante avant le lancement de l'analyse par CPG-MS.

III.3.7- Analyse des acides gras

Des parties aliquotes (1 mg) des taches extraites sont methanolisées dans 1 % de méthanol-acide sulfurique (v/v) pendant 12 h à reflux sous 80°C. Le mélange est neutralisé avec du NH_4OH aqueux (25%, v / v) et les esters méthyliques d'acides gras résultant sont extraits deux fois avec 1 ml de $CHCl_3$. Le $CHCl_3$ (chloroforme) est évaporé à température ambiante et le résidu acétyle avec de l'anhydride acétique-pyridine (1: 1, v/v) à 100°C pendant 1 h. L'hydroxy-esters méthyliques d'acide gras acétylé sont extraits avec du $CHCI_3$ et lavés avec 5% (p/v) $CuSO_4$ aqueux. La couche organique contenant (L'hydroxy-esters méthyliques d'acide gras acétylé) est analysée par CPG-MS comme précédemment en utilisant Avarian modèle 3300 chromatographe en phase gazeuse couplé à un modèle Finnigan Ion-Trap 800R spectromètre de masse avec une colonne DB-23 capillaire avec comme gaz vecteur l'hélium.

Les conditions analytiques suivent l'impact de l'électron à 70 eV; la température de l'injecteur 250°C; la température initiale: 50°C (1 min); le gradient de température de 40°C. min^{-1} à 215°C et maintenue à 215°C pendant 25 min.

III.4- Conclusion

Afin d'acquérir le but de notre projet, plusieurs méthodes de caractérisation d'un biosurfactant sont fournies, des méthodes physico-chimiques quantitatifs ou qualitatifs à

savoir l'analyse infrarouge, l'analyse de l'Ultra Violet-visible, la tensiomètrie, la conductimètrie et les tests de stabilité. De plus, les méthodes biochimiques en l'occurrence le test de rhamnose, la détermination des acides gras et des monosaccharides constituent l'essentiel des méthodes permettant de caractériser les biosurfactants.

C'est grâce à ces méthodes que plusieurs caractéristiques d'un biosurfactant seront acquises, la structure des groupements fonctionnels de la biomolécule sera ainsi, déterminer. Les différentes méthodes citées constituent un support pour la caractérisation des biosurfactants produits par *P.aeruginosa.*

Chapitre IV

Procédures expérimentales

IV.1- Objectif

L'objectif de cette étude est la caractérisation physico-chimique et biochimique des biosurfactants produit par *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853 sur une boue morte d'hydrocarbures. La caractérisation physico-chimique porte sur la spectroscopie qualitative comme l'infrarouge à transformer de Fourier qui consiste à faire une analyse de la structure des groupements fonctionnels des biosurfactants et quantitative comme l'UV-Visible, qui permet de déterminer la longueur ou les longueurs d'ondes d'absorption des biosurfactants par utilisation de la loi d'additivité de Beer Lambert.

La première étape de caractérisation portant sur la mise en évidence des biosurfactants lors de leur production qui consiste à déterminer l'indice d'émulsification et le test *Rhamnose* sur un milieu acellulaire. Deux méthodes ont été utilisées pour la détermination de la concentration micellaire critique (CMC) à savoir la méthode par tensiométrie, et la méthode par conductimétrie.

De plus, les différents tests de stabilité et de solubilisation – déplacement d'huile envisagés ont pour but de démontrer les capacités des biosurfactants face aux perturbations physiques et physico – chimiques des solutions en vue des applications industrielles et environnementales. Enfin, la caractérisation biochimique vise à rendre compte de l'aspect biologique des biosurfactants de part leur procédé de production et de leur origine. En outre elle mettra évidence la composition biochimique structurelle des biosurfactants par la détermination des sucres totaux et l'hydrolyse de la fraction grasse par les méthodes enzymatiques ou chimiques.

IV.2-Matériel et Produits

IV.2.1- Matériel

Les biosurfactants utilisés dans ce projet sont produit localement au niveau du laboratoire de recherche de Biomatériaux et Phénomènes de Transport de Médéa (LBMPT). Ils nous ont été fournis à l'état brut de leur production sous forme solide conservés à température ambiante. Pour la détermination de la tension superficielle, nous avons utilisé un tensiomètre de Nouy de type PHYWE avec un anneau en platine. Ainsi, pour la détermination de la longueur d'onde d'absorption des biosurfactants nous avons utilisé un spectrophomètre de type UVmin-1240 Shimadzu. La détermination des groupements caractéristiques par analyse structurelle

spectroscopique s'est effectuée à l'aide d'un appareil Infrarouge à transformer de Fourier de type FTIR 8400 Shimadzu. L'eau distillée utilisée dans ce projet pour la préparation des solutions a été distillée par un distillateur de type GFL® 2001/4 Labortechnik mbH. Pour la mesure du pH des solutions nous avons utilisé un pH mètre portable POCKET PRO TESTER HACH, et un pH mètre fixe pH 209 HANNA et pour la température un thermomètre de type Checktemp 4 HANNA. Pour les mesures de conductivité nous avons utilisé deux conductimètres le HI9033 et le EC 214 de HANNA, et nous avons utilisé une plaque chauffante avec agitation de type UC152 Stuart .Toutes les pesées ont été effectuées au moyen d'une balance de précision (± 0,0001g) de type KERN ALS 220-4N Germany. Les données recueillies ont été traitées à l'aide du logiciel Origine Pro ver 8 et STATISTICA Entreprise ver 10.028.

IV.2.2- Produits

Les produits utilisés sont listés dans le tableau ci – dessous.

Tableau IV.1 : Liste des produits utilisés.

Type de produit	Type
Phénol	SIGMA
Acide Sulfurique	SIGMA
HCl	SIGMA-ALDRICH
NaOH	SIGMA-ALDRICH
NaCl	SIGMA-ALDRICH
SDS (Dodécyl Sulfate de Sodium)	SIGMA-ALDRICH

IV.3- Techniques expérimentales

IV.3.1- Méthodes physico-chimiques

IV.3.1.1-Préparation des solutions

Les biosurfactants bruts sont broyés à l'aide d'un mortier pour faciliter leur dissolution dans l'eau distillée. Une masse de ce biosurfactants a été pesée puis dissoute dans un litre d'eau distillée sous agitation constante jusqu'à dissolution complète. Ainsi, de cette solution mère sont préparées une série de solutions filles par dilution au ½ pour avoir 10 échantillons.

Le temps nécessaire pour une dissolution complète était presque 16 heures. Le calcul de la dilution a été fait en utilisant la loi d'Ostwald.W ($C_1V_1 = C_2V_2$) dans des fioles jaugés de 50ml.

Des échantillons de 25 ml sont prélevés et complétés avec de l'eau distillée jusqu'au trais de jauge. La même procédure a été suivie pour toute l'étude envisagée.

IV.3.1.2-Tensiomètrie

La tension superficielle de la solution aqueuse à différentes concentrations de Biosurfactants a été mesurée en utilisant un tensiomètre à anneau du Noüy. L'anneau est rincé avec de l'éthanol puis avec de l'eau pour éviter toutes particules ou poussières pouvant contaminer ce dernier. Le poids de l'anneau est neutralisé par une tare à l'aide de la barre d'équilibre et avant chaque mesure, l'anneau est rincé avec l'eau distillée.

La mesure de la tension de surface a été effectuée à 25 ± 1°C fixée par une plaque chauffante après trempage de la bague en platine dans la solution puis retirer lentement à l'aide de l'élévateur jusqu'à ce que l'anneau touche la surface de la solution, on commence à retirer l'anneau légèrement jusqu'à l'arrachement à l'aide de disque tournant gradué en notant la force correspondante en (mN). La mesure a été répétée trois fois et une valeur moyenne a été obtenue.

IV.3.1.3-Détermination de la concentration micellaire critique (CMC)

Deux méthodes ont été utilisé pour déterminer la concentration micellaire critique (CMC) des biosurfactants bruts à savoir : la méthode utilisant un tensiomètre de Noüy et la méthode par conductimètrie le but est alors de comparer les résultats suivants une gamme de concentration d'une série plus faible à une série plus grande. Toutes les mesures ont été effectuées à une température de 25°C.

La CMC a été déterminée à partir de la mesure de la tension de surface en fonction de la concentration de rupture par la méthode graphique de double tangente à la courbe de $\gamma = f(C)$. Pour l'étalonnage de l'instrument, la tension superficielle de l'eau pure a été mesurée avant chaque série d'expériences.

IV.3.1.4-Conductimètrie

La présence des biosurfactants influe sur la conductivité du milieu par la formation des micelles jusqu'à atteindre la concentration micellaire critique (CMC), car ils se comportent comme des électrolytes dans un milieu aqueux. Une solution des biosurfactants bruts est préparée à 0,6 g/L, un jour à l'avance pour éviter la formation de mousse puis une autre de SDS de même concentration massique. On mesure la conductivité de chacune des solutions après 24h puis 1mL de NaCl de conductivité connue est ajouté à la série de solutions. La conductivité est

ensuite mesurée après ajout et homogénéisation pour les deux produits afin de faire la comparaison. Ce qui détermine l'efficacité des biosurfactants par rapport aux tensioactifs synthétiques comme le SDS.

IV.3.1.5-Analyse structurale infrarouge à transformée de Fourier

En premier lieu, une quantité de 10% de biosurfactants solide est bien broyé avec 90% de KBr dans un mortier muni d'un pilon pour la préparation de la pastille translucide. Ensuite le broyat est versé uniformément dans le cylindre de la presse hydraulique. La pastille est obtenue par pressage en abaissant le poinçon de la presse, le broyat est ensuite extrait du moule sous la forme d'une pastille très fine.

En second lieu, la spectroscopie IR consiste à déposer la pastille dans le port échantillon spécial de l'appareil FTIR situé dans la chambre noire. L'appareil est piloté par un logiciel (Solutions IR/FP) qui fixe les conditions d'humidité et de l'air ambiant (correction du dioxyde de carbone atmosphérique). De ce fait, un premier balayage est effectué pour étalonner l'appareil avant toute mesure avec un étalon de référence. L'échantillon est ainsi, scanné avec une résolution de 4 cm^{-1}, 32 fois (ou scans) ce qui donne des graphes en transmittance et en absorbance.

IV.3.1.6-Détermination de la longueur d'onde d'absorption maximale

La détermination de la longueur d'absorption de la solution de 0,6 g/L, des biosurfactants a été choisie afin d'étudier leur capacité à absorber, la lumière non – chromatique et la région d'absorption est une plage de 1000 à 200 nm en utilisant des cellules en quartz et en plastique. Comme tout dosage par UV/VIS le blanc est taré avant le balayage de la solution et la détermination de la longueur d'onde λ_{max}.

IV.3.1.7-La comparaison avec le SDS

La comparaison avec le SDS (un tensioactif chimique) au niveau de la valeur de CMC et la conductivité a était effectuée par la préparation d'une série d'échantillon de (0.6g/l) avec 9 dilutions à 50% chaque fois, cette série d'échantillon est déposée en repos pendant 24h pour se débarrasser de la mousse produite, les mesures de la tensiométrie et de la conductivité ont était réalisées pour les deux produits le SDS et le biosurfactant, après avoir les résultats des mesures la comparaison entre les deux doit être évaluer.

IV.3.2- Etude de la stabilité

IV.3.2.1- Effet de la salinité

L'effet de la salinité sur les solutions aqueuses des biosurfactants a été étudiée par l'ajout à des solutions saline de NaCl avec une plage de 50 à 300 g / l, dans le sens croissant des concentrations des solutions des biosurfactants. Tout comme le pH et la température l'objectif est d'évaluer la réactivité des biosurfactants face aux conditions chimiques extrêmes. Ainsi, la tension superficielle a été choisie comme paramètre de cette étude par des mesures avant et après ajout après un temps de suivi de 20 jours. Il est à noter que la salinité est une caractéristique des eaux de mer et cette étude nous a permis de savoir dans quelles conditions les biosurfactants agissent et peuvent être utilisés en dépollution des eaux de mer en cas de contamination par des huiles par exemple.

IV.3.2.2-Effet du pH

La stabilité des biosurfactants face à la variation du pH a été réalisée suivant une gamme de pH allant de 2 à 11 en ajustant le pH des différents échantillons dans le sens croissant de la concentration et du pH avec du HCl (0,1 M) ou du NaOH (0,1 M). Les échantillons sont ainsi portés à l'incubation pendant une durée de 20 jours à température ambiante. L'objectif assigné est d'évaluer la réactivité ou non des solutions du bioproduit face aux conditions physico – chimiques extrêmes. Le principe est le même quant aux processus de mesure et les paramètres mesurés à savoir la tension de surface et le pH avant et après ajustement et enfin du temps de suivi de 20 jours à température ambiante.

IV.3.2.3- Effet de la température

L'étude de stabilité a été effectuée en utilisant une solution des biosurfactants bruts (0,6 g /l). Les solutions diluées sont préparées à partir de la solution mère puis la tension superficielle a été mesurée avant d'être exposées à la chaleur. Les échantillons sont placés à l'étuve à 100°C pendant un intervalle de temps allant de 0 à 75 min et sont soumises à des refroidissements tous les 15 min à la température ambiante. La même procédure a été appliquée à la température de 121°C en suivant le pH des solutions avant et après exposition pendant 45 min. Le temps de séjour après exposition était de 20 jours. Au $20^{ème}$ jour la tension superficielle et le pH ont été mesurés pour les échantillons exposés à 100°C et le pH pour les échantillons exposés à 121°C. Ce qui permet d'évaluer l'activité des bioproduits face à la température et au temps de repos.

IV.3.3-Déplacement et solubilisation d'huile

La méthode de déplacement de l'huile par solubilisation est utilisée pour mesurer le diamètre de la zone d'étirement des huiles non miscibles à l'eau. La solubilisation et le déplacement se produit avec l'ajout d'une solution d'un ou des biosurfactants à l'interface huile – eau.

A. Procédure

- On remplie une boîte Pétri avec 50 ml d'eau distillée ;
- Puis, 20 µl de l'huile végétal et/ou de l'huile de graissage dans un deuxième essai ;
- La quantité d'huile est déposée sur la surface d'eau ;
- On ajoute 15 µl d'une solution de biosurfactant de concentration de (1g/L) sur la surface de l'huile.

IV.3.4- Méthodes Biochimiques

IV.3.4.1- Quantification glucidique

La quantification glucidique est effectuée suivant la méthode de *Dubois and al*, (1956) sur des échantillons préparés. Un volume de 0,5 ml de chaque échantillon de biosurfactant (0,6 g/l de la solution mère) est prélevé puis mélangé avec 0,5 ml d'une solution de phénol 5% et enfin 2,5 ml d'acide sulfurique. Les échantillons sont placés au repos pendant 15 min. La lecture de l'absorbance a été faite à 490 mn. Le but de cette étude est d'évaluer la concentration en glucide contenue dans les échantillons en unité de D.O, qui sera convertie en Transmittance et le pourcentage de l'énergie transmisse et directement proportionnel à la quantité massique de la fraction glucidique des biosurfactants introduites dans la solution.

IV.3.4.2- Indice d'émulsification EI_{24}

L'indice d'émulsification EI_{24} estimé par la méthode de Cooper et Goldenger 1987. Des échantillons de 2 ml sont pris après centrifugation puis ajustés à 4 ml avec de *n-hexadécane* et soumis à une agitation à la main pendant 5 minutes. La solution est ensuite laissée au repos pendant 24 h. L'indice d'émulsification à 24 h (EI_{24}) est donné en pourcentage par le rapport de la hauteur de la couche émulsionnée (mm) divisée par la hauteur totale de la colonne du liquide (mm).

Chapitre V

Résultats et discussions

V.1- Les méthodes physico-chimiques

V.1.1- La concentration micellaire critique CMC

Pour la détermination de la CMC une série d'échantillon a été préparé suivant la procédure annoncée dans le chapitre précédent.

La figure obtenue représente une courbe de la tension superficielle en fonction de la concentration en biosurfactants. La variation de la tension superficielle est une exponentielle décroissante en fonction de la concentration. Ainsi, par application de la technique de double tangente la CMC est estimé à (24 ± 0,1) mg / L à partir du point de rupture. Cette concentration correspond à la phase de remplissage de la surface libre du fluide par des monomères (molécules des biosurfactants). Cette évolution est caractéristique des trois phases à savoir la phase linéaire de décroissance entre [0 – 18] mg / L jusqu'au début du remplissage de la surface suivie la phase deux qui correspond à la phase de remplissage de la surface au cours de laquelle le milieu atteint la CMC proprement dite. De plus la phase trois est caractéristique de la saturation du milieu ou les molécules des biosurfactants passent de l'état des monomères à l'état des polymères. Au vu des résultats obtenus, la concentration micellaire critique des biosurfactants analysés est de 24 mg/ l pour une série d'échantillon entre [0 – 150] mg/l.

La figure obtenue indique l'effet de la concentration en biosurfactants sur la variation de la tension superficielle et de la conductivité du milieu. Les deux graphes montrent que la tension superficielle décroît de manière exponentielle jusqu'à atteindre un minimum proche de 40,52 mN/m pour une concentration en biosurfactants supérieur ou égale à 600 mg/l. Tandis que la conductivité du milieu croit graduellement en fonction de la concentration des échantillons. Cette augmentation de la conductivité caractérise la présence d'un électrolyte dans le milieu en l'occurrence le biosurfactant.

La conductivité est la capacité d'une solution à faire passer le courant électrique dans un milieu en présence des électrolytes moléculaires ou ioniques. Plus elle est grande plus le milieu est conducteur. Dans la figure obtenue, on observe nettement qu'au début la conductivité représente une fonction linéaire de la concentration jusqu'au point de rupture de la concentration qui caractérise la CMC. La valeur de cette dernière a été estimé d'après la figure à environ 240 mN/m. Qui plus est égale à 10 fois la valeur de 24 mN/m obtenue avec la

série d'échantillon de [0 – 150] mg/l. Ainsi, le constat montre que les échantillons de [0 – 600] mg/l du fait de l'augmentation de l'échantillonnage de 4 fois; la CMC augmente de 10 fois. Cette même valeur de la CMC est obtenue par la méthode de Nouÿ avec la même série d'échantillon. Ainsi, la méthode conductimètrique et tensiomètrique confirme la même valeur de la CMC. L'évolution de la conductivité du milieu est inversement proportionnelle à l'évolution de la tension superficielle des mêmes échantillons pour les mêmes concentrations. De plus, les phénomènes caractéristiques de la tension superficielle précédemment discutées sont identiques à ceux de la conductivité à savoir les trois phases caractéristiques.

À ce stade, les résultats suggèrent que le biosurfactants fourni d'excellentes propriétés en termes de réduction de la tension de surface et une valeur basse de la CMC. Cela s'explique par le fait que les biosurfactants agissent en très faibles quantités avec une meilleure réduction de la tension superficielle et une bonne conductivité du milieu dans lequel ils s'y trouvent. Ainsi, les résultats obtenus ont montré une faible valeur la concentration en biosurfactants et cela même en l'état brut de celui – ci permettant de former des micelles dans le milieu. Dans cette étude, le meilleur abaissement de la tension superficielle a été obtenu avec une concentration de 600 mg/L correspondant à 40, 52 mN/m.

V.1.2- L'analyse spectroscopique Infrarouge

Tous les spectromètres infrarouges conduisent à un tracé appelé spectre infrarouge, qui se présente sous forme d'une suite de bandes d'absorption plus ou moins larges, exprimées en nombres d'onde (cm^{-1}). Le graphe représentatif de l'analyse IR rapporte une ordonnée en transmittance (%T) ou en absorbance A = log (1/T).

V.1.2.1- Etalonnage du Spectrophotomètre

Afin d'étalonner l'appareil et éviter les absorbances parasites un premier signal est enregistré par le détecteur du spectrophotomètre. Celui – ci a pris en compte l'absorption de l'air ambiant en l'occurrence le CO_2 qu'il contient dans le compartiment de mesure. C'est donc un spectre de bruit de fond qui est enregistré (background), qui est ensuite soustrait du spectre obtenu avec la pastille contenant l'échantillon. Cela a permis d'éliminer les absorptions parasites.

V.1.2.2- Analyse du Biosurfactant

V.1.2.2.1- Description des bandes d'absorbance et/ou de Transmittance

Le capteur qui enregistre la superposition des signaux (correspondant aux différentes fréquences) transmis et génère un signal résultant qui n'est pas directement informatif. Le signal collecté par le spectromètre est ensuite converti avec un logiciel de pilotage en spectre d'absorption par un traitement mathématique suivant la transformée de Fourier, qui apparaît sur l'écran de l'ordinateur.

Le spectre obtenu démontre deux régions avec deux pics d'absorbance maximale caractéristique des groupes fonctionnels. Dans la première région on constate un pic d'une forte intensité qui porte deux amplitudes à la fois, le premier absorbe vers 3277 cm^{-1} et le second a 3419 cm^{-1} et la deuxième région est un pic d'une forte intensité de bande étroite qui absorbe vers 1105 cm^{-1}.

De plus, les intensités moyennes portent sur trois bandes dans la même région de 3000 à 2500 cm^{-1} qui sont ; 2955 cm^{-1}, 2926 cm^{-1} et 2862 cm^{-1} et trois autres bandes dans la région de 1300 à 900 cm^{-1} qui sont 1247 cm^{-1}, 1182 cm^{-1}, 997 cm^{-1} et une dernière bande fine qui absorbe vers 617 cm^{-1}.

En effet les bandes d'intensité faibles ou moyennent faibles sont identifiées au nombre de huit. Qui sont entre autres rapportées à 1647 cm^{-1}, 1558 cm^{-1}, 1454 cm^{-1}, 1384 cm^{-1}, 881 cm^{-1}, 810 cm^{-1}, 698 cm^{-1} et 540 cm^{-1}. Enfin, on observe aussi sur le spectre deux régions de bandes de combinaison à des intensités faibles. La première de 2500 à 1800 cm^{-1} et la deuxième se situe entre 4000 à 3600 cm^{-1}.

V.2.2.2- Identification des groupements fonctionnels

Dans le spectre obtenu le domaine 1820 – 1200 cm^{-1} comporte deux bandes d'intense moyenne avec une absorbance vers 0,36 et 0,39. Ce qui indique la présence d'un groupe >C=O caractéristique d'une fonction cétone. Cette diminution de fréquence du groupe >C=O est un cas spécial qui décrit à une autre possibilité sur les vibrations de valence et de déformation du groupe C – CO – C car les cétones présentes une absorption moyenne entre 1300 et 1100 cm^{-1} due à l'élongation et à la déformation angulaire des vibrateurs C-C-C du groupe C – CO – C. Ainsi, les nombres d'onde cétoniques obtenus (1647 et 1247) sont représentatifs de deux types de fonction cétone à savoir 1647 cm-1 pour le groupement C = O et 1247 cm^{-1} pour le groupement C – CO – C.

De plus une bande d'absorption caractéristique des fonctions esters est obtenue vers 1182 cm^{-1}. Cette bande symétrique qui tourne autour de 1105 cm^{-1} est caractéristique des groupements de type O – C – C d'élongation des esters d'alcools secondaires. La présence d'un ester avec un pic voisin de celui du groupe – C – CO – C de cétone avec les vibrations d'élongation C – O des esters se consistent en deux vibrations asymétriques couplées C – C (= O) – O et O – C – C, la première étant plus importantes. Ces bandes apparaissent entre 1300 et 1000 cm^{-1}. La bande de – C – C (= O) – O des esters obtenue à 1182 cm^{-1} caractérise un ester saturé compris entre 1210 et 1163 cm^{-1}.

Ainsi, la présence d'alcool – OH apparait sur une large bande entre 3600 – 3300 cm^{-1} à 3419 cm^{-1} des – OH de valence associée. Ces groupements alcools sont associés au squelette glucidique de la fraction rhamnose constituant le biosurfactant. De plus, d'autres groupements alcools sont remarquables sur la bande de C-O des esters compris entre 1300-1000 cm^{-1} à 1105 cm^{-1}.

Par ailleurs, le spectre obtenu montre une bande large à 3277 cm^{-1} caractéristique des acides carboxyliques. Cette bande constitue une vibration d'élongation du groupe O – H des dimères d'acides carboxyliques avec une absorption large de la liaison O – H compris entre 3300 et 2500 cm^{-1}. De plus cette bande caractéristique des acides carboxyliques se distingue aisément de celle de l'alcool par son absorbance abaissée et élargie couvrant les bandes C – H même au contraire de celle de l'alcool, symétrique à 3419 cm^{-1} et à 1105 cm^{-1}. Enfin un squelette carboné est identifié sur les bandes correspondantes aux transmittance à 997 cm^{-1} jusqu'à 617 cm^{-1}.

Au regard de la structure d'un mono – rhamnolipide rapporté par la littérature et selon les résultats obtenus dans cette analyse en l'occurrence les principaux groupements, qui sont les groupements alcool, ester, acide carboxylique, cétone, aussi les ramifications et le squelette carbonés. Il a été ainsi possible de rapproché le biosurfactant analysé au mono – rahamnolipide constitué d'une fraction glucidique (*Rhamnose*) décrite par un squelette hydrocarboné et d'une fraction gras portant les groupements acide carboxylique, ester et cétone.

V.1.3- La spectroscopie d'absorption UV-VIS

L'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des substances en solution à condition de se placer à la longueur d'onde d'absorption maximale suivant la loi de

Beer – Lambert. La longueur d'onde est caractéristique des molécules qui constituent la solution a analysé

La longueur d'onde maximale obtenue est λ_{max} = 343 nm indique que le domaine d'absorption du biosurfactant est l'ultraviolet. Car l'absorption est caractéristique de la molécule et non de la solution. De plus, les molécules portant des groupements acides sont caractéristiques d'une absorption dans l'ultraviolet.

Les valeurs de ε en amont la CMC sont inférieure à 10 par contre en aval la CMC les valeurs sont supérieure à 10. Cette variation de coefficient d'absorption entre 10 et 100 L mol^{-1} cm^{-1}, traduit une transitions électronique de type $n - \sigma^*$ des groupements chromophores isolés tel que C=O (Ce type de transitions peu intense est rencontré dans le cas de molécules comportant un atome porteur de doublets électroniques libres) comme dans le cas des atomes de l'oxygène.

V.1.4- Test de Stabilité

V.1.4.1- Effet de la salinité

Les résultats obtenus a l'issu du test de stabilité par rapport à l'action du NaCl sur les biosurfactants ont montré une forte réactivité des ceux – ci dans le milieu en amont de la CMC en terme d'abaissement de la tension superficielle et cela dépasse même l'état des échantillons sans sel au bout de 20 jours d'observation. En cette phase, il a été constaté que l'ajout du NaCl de 50 à 175 g/l couvrant des concentrations des biosurfactants allant de 0 à 20 mg/l augmente l'efficacité des biosurfactants à réduire la tension de surface du milieu par effet de compétition entre les électrolytes. Cela dit, en aval de la CMC une légère augmentation de la tension superficielle a été observée malgré la durée du suivi. Cette augmentation résulte non seulement de l'effet de compétition mais plus encore de l'effet de saturation du milieu en électrolytes. La concentration de saturation en NaCl était de 225 g/l pour une concentration de 75 mg/l des biosurfactants.

De surcroit, l'effet du temps de suivi montre que les biosurfactants réduisent la tension superficielle dans le temps décrit par le taux de réduction estimé de 0 jusqu'à un maximum de R = 29,62% avec une tension superficielle minimal de 49,76 mN/m pour une concentration en NaCl = 150 g/l et une concentration en biosurfactants C = 9,37 mg/l.

V.1.4.2- Effet du pH

Les résultats obtenus a l'issu du test de stabilité par rapport à l'action du pH ont indiqué la capacité des biosurfactants à réagir face à l'augmentions de la force ionique en amont et on aval en terme d'abaissement la tension superficielle durant les 20 jours de suivi.

Le pH est un facteur important, il peut limiter ou favoriser l'effet des biosurfactants dans le milieu. Lorsque le pH du milieu est acide est [2 – 6], la tension superficielle diminue jusqu'à atteindre une valeur de 52,31mN /m pour une concentration d'environ 18,75 mg/l. Ce qui s'explique par la présence des ions de H_3O^+ excès dans le milieu. Par contre, les ions Cl^- présent bloque la réactivité des monomères par effet de compétition pour les ions hydroniums. Tandis que le pH basique [8 – 9] induit une augmentation de la tension superficielle du milieu. Cela est du à la force ionique des ions OH^- d'une part et d'autre part les ions Na^+ ne peuvent réagir pour saponifier le milieu que lorsqu'une énergie extérieure est apportée au milieu. De ce fait, l'effet de la saturation du milieu en aval de la CMC combiné a la saponification à froid et l'effet de la force ionique des ions hydroxydes déplace l'équilibre du milieu, ce qui traduit l'élévation de la tension superficielle dans cette zone.

Par ailleurs les résultats obtenus montrent que le meilleur pH pour une meilleure réactivité des biosurfactants est 7 avec un taux de réduction entre l'état ajusté et l'état final du suivi de 11, 78. Ainsi la réactivité des biosurfactants démontre une capacité de réaction et de restauration de l'équilibre du milieu pour abaisser suffisamment la tension superficielle face aux contraintes physico – chimiques.

IV.3. L'effet de la température

L'objectif de cette étude est de tester le comportement des molécules des biosurfactants face à l'exposition à une température élevé de 100°C et 121°C afin d'estimer l'effet sur la réactivité des biosurfactants dans le milieu au bout d'un temps d'exposition et après un temps de repos. La perte de réactivité est estimée par le rapport entre la différence de tension de surface entre l'eau pure et l'échantillon après 75 minutes d'exposition sur la différence entre l'eau pure et l'échantillon non exposé a laquelle est soustraite la valeur de 1.

Le tableau représente le changement des valeurs de la tension de surface entre le 1^{er} jour et le $20^{ème}$ jour de l'exposition à la chaleur de 100°C. De plus la perte maximale au premier jour est de 56,31% et celle du $20^{ième}$ jour donc après le repos est de 98,58%.

La figure obtenue montre l'effet de la temperature sur les biosurfactants au premier jours et au 20ème jour. Au premier jour de l'exposition à la temperation de 100°C, on constate en amont de la CMC une augmentation de la tension superficielle due à l'effet de la chaleur extrême à comparer aux valeurs des échantillons de mêmes concentration non exposés de 65,05 mN/m pour l'échatillon de 1,17 mg/l jusqu'à 60,19 mN/m pour la concentration de 9,37 mg/l. De plus les résultats de la figure obtenue montre une hausse de la tension superficielle aux environs de la CMC, qui diminue avec l'augmentation de la concentration en biosurfactants jusqu'à 59,39 mN/m contre 50,63 mN/m avant exposition. Cela s'explique par le fait que l'effet marquant de la température extrême s'observe dans la zone de remplissage de la surface du fluide par les monomères dans la moncouche. Ainsi, cette augmentation provoque la dispersion et la rechute des molécules vers l'intérieur du fluide due fait de la faible énergie intermoléculaire des monomères. Ce qui conduit à une perte de réactivité estimée à la valeur maximale de 53,45% du debut de remplissage à 47,78% à la fin de remplissage.

De surcroit, la chute de la tension superficielle en fonction de l'augmentation de la concentration en biosurfactants dans le milieu résulte de l'effet de l'énergie intermoléculaire qui relie les polymères entres eux sur la surface du fluide au stade de la saturation. Ainsi, la perte maximale au vu de l'effet de l'énergie intermoléculaire est de 41,05%.

Après un repos de 20 jours les valeurs de la tension superficielle sont plus élevées que celle de premier jour. La valeur maximale est de 70,86 mN/m et la valeur minimale est de 62,66 mN/m. La comparaison des valeurs de tension superficielle entre les échantillons exposés et mis au repos pendant 20 jours et les échantillons non exposés montrent que la température de 100°C a altéré les molécules des biosurfactants car les valeurs du tableau ci – dessus montrent une augmentation graduelle de la perte en terme de tension superficielle. De plus, l'exposition d'une solution de biosurfactant à une haute température augmente l'agitation thermique des molécules dans le milieu. Ce qui provoque des chocs mécaniques entre les molécules. Elles auront donc une plus grande facilité à quitter la surface pour se déplacer vers l'intérieur. De ce fait, l'énergie de surface étant la résultante de l'interaction entre les molécules internes et externes celle – ci tend à se réduire dans les conditions physiques optimales. Cependant, l'augmentation de l'énergie de surface constatée au 20ième jour résulte de la dénaturation des molécules provoquant la perte de l'interaction intermoléculair.

V.1.5- Déplacement et solubilisation de l'huile

L'objectif de l'essai de solubilisation et déplacement d'huile est de mettre en évidence la capacité des biosurfactants à solubilisés et à élargir le diamètre de la goutte d'huile déposée sur une surface hydrophile en l'occurrence l'eau distillée.

Les figures montrent que dans le cas de test de solubilisation et déplacement d'huile dans l'eau après contacte d'une quantité de 20µl de la solution de biosurfactant de 1g/l avec une quantité de 15µl de l'huile déposé sur 50 ml d'eau. Le biosurfactant solubilise d'abord l'huile avant de se freiner un chemin dans l'huile. Ainsi, ce dernier ce positionne à l'interface huile – eau en abaissant la tension de superficielle de l'eau. Les fractions hydrophobes composent un réseau avec l'huile par des attractions hydrophobes alors que la tête hydrophile se solubilise dans l'eau. On constate un déplacement du diamètre de l'huile de 0 à 2 cm. Ce déplacement se produit d'autre part du fait de la diminution de la viscosité de l'huile par la solution des biosurfactants. Par ailleurs le déplacement de l'huile sur une solution de biosurfactants d'un volume de 25 ml et de concentration de 1 g/l atteint jusqu'à 5 cm. Dans cette étape l'huile se solubilise dans la solution des biosurfactants en élargissant son diamètre en fonction du temps.

V.1.6- Etude comparative entre le SDS et les Biosurfactants

La comparaison est effectuée entre les résultats de la conductivité des solutions de SDS et les solutions de Biosurfactants avec le même nombre d'échantillons et la même concentration. Le but étant de comparé la CMC des deux produits tensioactifs.

La valeur de la conductivité d'une solution ionique dépend de la nature de la solution, ainsi que de la géométrie de la cellule de mesure mais aussi du type d'anions et de cations contenus dans la solution.

La comparaison entre les deux graphes qui présent les valeurs de la conductivité G en fonction de la concentration montre les points différentes entre les deux graphes. Le graphe de SDS démontre une CMC = 305 mg/l tandis que celui des biosurfactants montre une CMC = 240 mg/l. Ce qui démontre l'efficacité des biosurfactants à agir avec une CMC très faible par rapport aux tensioactifs synthétiques comme le SDS.

V.II- Les méthodes biochimiques

V.2.1- Quantification glucidique

L'étude biochimique des caractéristiques des biosurfactants produits par *Pseudomonas aeruginosa* sur une boue morte d'hydrocarbure a été faite suivant la méthode de l'absorbance de la fraction *Rhamnose* constituant la composition glucidique des biosurfactants.

L'analyse des résultats obtenus a montré une corrélation des valeurs de 0,9588. Ainsi, cette corrélation exprime l'agencement des valeurs de l'absorbances de la fraction *Rhamnose* avec les valeurs de concentration des biosurfactants. L'estimation de la faction *Rhamnose* étant effectuée par la méthode colorimétrique, les valeurs calculées montrent que les biosurfactants analysés contiennent en grande partie des sucres en moyenne **81,32 %.** Cela dit, la spécificité des biosurfactants aux substrats de production (source de carbone et d'énergie) montre que la fraction glucidique est abondante et que cela définit un ensemble des di – *Rhamonolipides* et des mono – *Rhamonolipides*. A cet effet les résultats de l'analyse Infrarouge ont déjà révélé la présence éventuelle de ses deux *Rhamnolipides* dans la quantité des biosurfactants analysés.

Au regard de la littérature, l'abondance de la fraction glucidique est d'autant plus importante que le substrat est hydrophobique comme le cas des hydrocarbures. De plus, les résultats obtenus dans les différents tests et analyses précédemment effectués montrent que la capacité et / ou les différentes propriétés de ces biosurfactants sont en proportionnalités avec l'abondance de sa fraction glucidique.

V.2.2- L'indice d'emulsification

L'émulsification est basée sur la capacité des biosurfactants à émulsifier un milieu fermentatif acellulaire suite à l'ajout des huiles comme l'hexadécane ou le kérozène. Il est estimée pratique par l'E_{24} (indice d'émulsification après 24).

La figure présente les résultats de l'émulsification des différents échantillons par le n-hexadécane à différents instants. L'indice (E_{24}) est calculer après 24 heures en divisant la longueur de la couche émulsionnée par tout la longueur du mélange est en multiplions par 100. Les résultats expriment la capacité de biosurfactant à émulsifier le milieu et stable sur une période de 24h avec un pourcentage d'émulsification à 53,50%.

D'après les résultats de tableau, l'indice d'émulsification décroit en fonction du temps. Ce qui s'explique par une rareté du substrat carboné dans le milieu fermentatif. Ainsi, cette mise en évidence biochimique des biosurfactants lors de la croissance démontre que la capacité des biosurfactants et non seulement liée à la souche productrice mais aussi a la nature du substrat (quantitativement et qualitativement).

V.3- Conclusion

L'étude des caractéristiques des biosurfactants produits par *Pseudomonas aeruginosa* a relevé d'importants potentiels d'application des ses biosurfactants à l'issu des résultats obtenus. Ainsi, des divers éléments structuraux des biosurfactants ont été caractérisés par des méthodes physico-chimiques, qui ont montrées que les biosurfactants peuvent supporter des degrés élevés de la salinité. En plus, de réagir face à l'augmentions de la force ionique, est que le meilleur pH pour une meilleure réactivité des biosurfactants se situe dans la zone de neutralité. Il a été aussi constaté que les biosurfactants exposés a une haute température peuvent subir une dénaturation comportementale par conséquent une perte de réactivité.

La démonstration de la CMC par conductivité et tensiométrie a suggérée que le biosurfactants fourni d'excellentes propriétés en termes de réduction de la tension de surface avec une valeur plus faible que celle des tensioactifs synthétiques.

L'analyse spectroscopique à infrarouge a mis en perspective les groupements fonctionnels contenue dans les biosurfactants tel que, les alcools, les esters, les acides carboxyliques et les cétones. Une autre analyse spectroscopique à ultraviolet-visible a montré que les solutions des biosurfactants absorbent dans le domaine ultraviolet. De plus les valeurs de coefficient d'extinction indiquent la présence des doublées électroniques libres comme ceux de l'oxygène dans la structure.

Les caractéristiques biochimiques en l'occurrence la capacité d'émulsification des milieux fermentatif des ses biosurfactants, l'importance de sa fraction glucidique, la capacité de solubiliser les huiles sont des atouts majeur pour des applications industrielles.

Conclusion Générale

L'objectif de notre travail est la caractérisation physico-chimique des biosurfactants produit par *Pseudomonas aeruginosa* sur une boue morte d'hydrocarbure. Cette souche bactérienne se caractérise par son grande capacité d'adaptation à des milieux variée, sa virulence etc.Les tensioactifs sont des molécules amphipathiques, qui réduisent les tensions superficielle entre deux les liquides, qui confère une excellente détergence, émulsifiant, moussant et d'autres processus chimique polyvalent.

Ces biosurfactants ont caractérisé par plusieurs techniques, tout d'abord par la tensiomètrie et la conductivité dans le but d'abaissement la tension superficielle et la détermination de CMC ou les micelles commençant à former, d'autre méthodes quantitatif et qualitatif d'UV-V et d'IR respectivement qui permit de bénéficiée dans la diversité structurelle et la détermination de la longueur d'onde d'absorption des biosurfactants par utilisation de la loi d'additivité de Béer Lambert. Une faible toxicité et la biodégradabilité, désigne d'autre propriété permit de l'exploiter dans une variété d'applications potentielles, y compris les formulations Cosmétique, pharmaceutiques, agricoles …En outre, différents tests à été fait, les tests de stabilité comporte (salinité, température, PH), déplacement d'huile, ces dernières montrent que les biosurfactants face aux perturbations physiques et physico-chimiques des solutions en vue des applications industrielles et environnementales.

L'étude des caractéristiques physico-chimiques des biosurfactants produits par *Pseudomonas aeruginosa* a relevé l'existence des groupements fonctionnels et structurels, comme les groupements d'acide et esters. Ainsi la résistance à des concentrations élevées de salinité et aussi face aux variations de pH et de température.

Par ailleurs, des caractérisations biochimiques démontrent que les biosurfactants produit de souche *P.* aeruginosa disposent une capacité d'émlsification des mielieux acellulaires et possèdent une quantité importante en sucre.