



Bioconversion éco-compatible de triterpénoïdes par des bactéries immobilisées sur *Luffa cylindrica*

Hamid Bou Saab

► To cite this version:

Hamid Bou Saab. Bioconversion éco-compatible de triterpénoïdes par des bactéries immobilisées sur *Luffa cylindrica*. Autre. Université de Haute Alsace - Mulhouse, 2011. Français. NNT : 2011MULH6411 . tel-00704061

HAL Id: tel-00704061

<https://theses.hal.science/tel-00704061>

Submitted on 4 Jun 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE HAUTE ALSACE
Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Mulhouse
Ecole doctorale Jean-Henri Lambert
Laboratoire de Chimie Organique et Biororganique

Thèse de doctorat

Hamid BOU SAAB

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE HAUTE ALSACE

Spécialité : Chimie-Biologie

**Bioconversion éco-compatible de triterpénoïdes par des bactéries
immobilisées sur *Luffa cylindrica***

Soutenue publiquement le 8 Juillet 2011 devant la commission d'Examen

Rapporteurs externes

Pr Isabelle Chevalot
Dr Laurence Miesch

Rapporteurs internes

Pr Angélique Simon

Directeur de thèse

Pr Serge Neunlist

Examineurs

Dr Amina Wirth

Membres invités

Dr Samuel Fouchard	Co-directeur
Dr Anna Boulanger	Co-directrice

Résumé

L'un des avantages majeurs des réactions de bioconversion résulte du fait que le milieu réactionnel des biocatalyseurs est l'eau. Ce dit avantage constitue l'une des principales limitations de ces réactions de bioconversion lorsqu'il s'agit de substances lipophiles non solubles dans l'eau comme les stérols. L'efficacité d'un procédé de bioconversion de substances lipophiles solides dépend essentiellement du contact et de l'interaction entre le biocatalyseur et ce substrat lipophile. Les solutions proposées dans la littérature font appel à des solvants et des produits chimiques de natures souvent toxiques, inflammables et explosives. Ces solutions décrites font perdre à la bioconversion son caractère de biotechnologie blanche. Dans ce travail, nous avons montré qu'en plus de ses avantages connus, l'immobilisation passive de biocatalyseurs au sein d'un support poreux peut favoriser l'interaction cellule-substrat lipophile et augmenter le taux de bioconversion sans utiliser de solvants et de produits chimiques. La réaction modèle étudiée est le clivage de la chaîne latérale des stérols par des mycobactéries en vue de l'obtention des androsténones précurseurs naturels des stéroïdes, molécules à forte valeur biologique ajoutée. Le support d'immobilisation le plus performant a été le fruit sec de *Luffa cylindrica*. Par rapport aux supports organiques classiques tels que les gels de polyacrylamide, les mousses de polyuréthane, la silicone et les plastiques, le fruit sec de *Luffa cylindrica* présente les avantages suivants : (i) c'est un produit naturel, (ii) biodégradable, (iii) peu onéreux, (iv) non toxique pour les microorganismes, (v) stable du point de vue mécanique et thermique, (vi) et réutilisable.

Summary

One of the major advantages of using biocatalysts in organic synthesis is that water constitutes the reaction medium. However, water becomes a serious problem when bioconversion deals with lipophilic compounds, in particular those poorly soluble in water such as sterols. Bioconversion of lipophilic compounds depends on the close contact between the hydrophobic substrate and the biocatalyst. Increasing this contact requires usually the use of huge amounts of chemical which are often toxic, flammable and explosive. In this work, we showed that passive cell immobilization in porous materials can increase the contact between microorganisms and lipophilic substrates without using chemicals. The side chain cleavage of sterols was studied as a model multistep microbial bioconversion of lipophilic compounds. This reaction allows the production of androsthenones which are the natural precursors of steroids. Among the studied immobilization carriers, the dried fruit of *Luffa cylindrica* was the most efficient. Compared to other organic support carrier such as alginate beads, polyurethane foams, silicones and plastics, the dried fruit of *Luffa cylindrica* is advantageous since it is natural, renewable, biodegradable, cheap, mechanically strong, free of toxicity and it doesn't need a chemical pretreatment

Remerciements

Ce travail a été mené à l'Université de Haute Alsace. Il a été réalisé dans le cadre de l'Ecole Doctorale Jean-Henri Lambert et financé par une bourse de ministère. Avant d'exposer mes travaux qui ont abouti à la rédaction de ce mémoire, je tiens à remercier les personnes qui ont permis cette réalisation.

Monsieur le professeur Serge Neunlist, directeur de l'ENSCMu, a dirigé mes travaux de recherche avec la conviction et l'enthousiasme communicatif dont il sait faire preuve. C'est à la fois un privilège et une expérience exceptionnelle que d'avoir pu bénéficier de ses conseils. Je suis reconnaissant de vous avoir croisé dans ma vie. Merci pour m'avoir donné l'occasion de continuer.

Madame le professeur Céline Tarnus, directrice du laboratoire de Chimie Organique et Bioorganique, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

J'exprime tous mes remerciements aux membres du jury, Mme Isabelle Chevalot, professeur à l'ENSAIA, Mme Laurence Miesch, docteur à l'université de Strasbourg, Mme Amina Wirth-Heller, professeur à FHNW school of Life Sciences, Mme Anélique Simon-Masseron, professeur à l'ENSCMu, pour avoir accepté de participer à ma soutenance de thèse et de juger ce travail.

Je voudrais tout particulièrement remercier Monsieur Samuel Fouchard, co-encadrant, tout d'abord pour son épaulement tout au long de cette thèse, pour toutes ses remarques pertinentes, pour nos discussions et pour le reste...

Un remerciement spécial à Mme Anna Boulanger qui fût constamment pour moi un guide sûr et bien veillant. Son aide jamais sollicitée en vain, et ses directives me furent précieuses.

J'exprime mes remerciements les plus sincères à Monsieur Paul Schaulenbaum de m'avoir permis d'intégrer le Laboratoire Vigne Biotechnologies et Environnement pour m'aider à mettre en place et réaliser les expériences avec les cellules végétales.

Je remercie infiniment Madame Cécile Joyeux, responsable du service analyses et séparation chromatographique, pour son aide dans l'analyse de mes échantillons. Sa compétence et ses conseils judicieux m'ont permis de mieux analyser et étudier en profondeur mes résultats.

Je remercie également Monsieur Didier le Nouen pour sa disponibilité et son aide dans l'analyse des spectres RMN.

Je remercie les membres du jury qui ont bien voulu prendre le temps d'étudier le présent rapport et de transmettre leurs commentaires.

Merci également aux personnes que j'ai eu de la chance de côtoyer durant ces années de Doctorat : Cédric, Alexandre, Lionel, Mira, Céline, Emel, Carine, Sarah et Aurélie. Les résultats obtenus ici sont aussi le travail de plusieurs stagiaires à qui j'adresse ma reconnaissance : Yann, Julie, Georges, Derya, Adam, Romain, Pauline, Mathieu, Coralie, Marion, Pierre, Elodie, Caroline, Axelle, Ludovic et Carole.

Je remercie aussi ma compagne Angelina, et mes parents, pour leur patience et leur soutien.

Liste des Abréviations

AD	Androst-4-ène-3,17-dione
ADD	Androst-1,4-diène-3,17-dione
AND	Androstan-3,17-dione
BSS	β -sitostérol
CAM	Campestérol
CDO	Cholesta-1,4-diène-3-one
CHA	Cholestan-3-one
CHL	Cholestérol
CHO	Cholest-4-ène-3-one
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CP	Cellules planctoniques
CI	Cellules immobilisées
COX	Cholestérol-oxydase
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
DBS	Dihydrobrassicatérol
DM	Densité microbienne
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
η	Rendement
NP	Cellules non proliférantes
NRRL	Northern Regional Research Laboratory
P_s	Productivité spécifique
PS	Poids sec
P_v	Productivité volumétrique
σ	Sélectivité
SP	Support poreux
TPR	Teneur en protéines
vvm	Volume d'air par volume de milieu liquide par minute
X	Taux de bioconversion

Sommaire

Résumé	2
Remerciements	3
Liste des Abréviations	4
Sommaire.....	5
Liste des figures.....	9
Introduction Générale.....	13
Revue bibliographique	17
1. La biotechnologie blanche	18
2. Intérêt de la recherche sur les triterpènes	20
3. Les stérols	22
3.1. Structure.....	23
3.2. Origine et biosynthèse	26
3.3. Fonctions.....	27
3.4. Intérêt de la recherche sur les stérols.....	28
3.5. Biotransformation des stérols	29
4. Biocatalyseurs	31
4.1. Le genre <i>Rhodococcus</i>	32
4.1.1. Biologie des <i>Rhodococci</i>	32
4.1.2. Métabolisme des stéroïdes	33
4.1.3. Avantages des <i>Rhodococci</i>	35
4.2. Le genre <i>Mycobacterium</i>	36
4.2.1. Biologie des <i>Mycobacteriae</i>	36
4.2.2. Métabolisme des stéroïdes	37
4.2.3. Avantages des <i>Mycobacteria</i>	38
5. Problématique	38
5.1. Utilisation de solvants organiques miscibles à l'eau.....	40
5.2. Utilisation de tensioactifs	41
5.3. Ajout de cyclodextrine.....	41
5.4. Système biphasique	42
5.5. Encapsulation sous forme de liposomes	43
5.6. Système au point de trouble.....	43
5.7. Augmentation de la perméabilité membranaire	43
6. Technologie des cellules immobilisées	44
6.1. Définition et avantages	44

6.2. Méthodes d'immobilisation	45
6.2.1. Agrégation et floculation	47
6.2.2. Inclusion	47
6.2.3. Encapsulation	48
6.3. Immobilisation par adsorption passive	49
6.3.1. Avantages	49
6.3.2. Principe	49
6.3.3. Considérations.....	49
6.3.4. Applications dans le domaine des stéroïdes	51
6.4. Effets physiologiques de l'immobilisation	52
7. <i>Luffa cylindrica</i>	52
8. Les questionnements scientifiques et les objectifs	54
Notre Étude.....	57
1. Biotransformation de cholestérol par <i>Rhodococcus</i>	59
2. Biotransformation de cholestérol par <i>Mycobacterium</i>	62
2.1. Identification des produits obtenus dans le milieu TSB	62
2.2. Influence des conditions de culture sur le métabolisme de cholestérol.....	65
2.2.1. Biotransformation de cholestérol 0,43 mM par des cellules non proliférantes	66
2.2.2. Biotransformation de cholestérol 0,86 mM par des cellules non proliférantes	68
2.2.3. Biotransformation de cholestérol 1,72 mM par des cellules non proliférantes	78
2.3. Supports d'immobilisation pour la biotransformation de cholestérol	81
2.3.1. Influence d'un support sur la biotransformation de cholestérol	81
2.3.2. Influence d'un support sur la croissance	82
2.3.3. Biotransformation de cholestérol en présence de <i>Luffa cylindrica</i>	84
2.3.4. Analyse descriptive du système fibres de <i>Luffa cylindrica</i> /cellules immobilisées ..	86
2.3.5. Influence de la quantité de <i>Luffa cylindrica</i> sur la bioconversion de cholestérol....	89
2.3.6. Influence de l'hydrophobisation de <i>Luffa cylindrica</i>	90
2.3.7. Réutilisation de <i>Luffa cylindrica</i>	92
2.4. Optimisation de la bioconversion de cholestérol	95
2.4.1. Biotransformation du cholest-4-ène-3-one.....	95
2.4.2. Confinement du système cellules immobilisées- <i>Luffa cylindrica</i> et cholestérol....	96
2.4.3. Biotransformation de cholestérol à l'état particules solides	97
2.4.4. Biotransformation de cholestérol solide 1,72 mM, 2,59 mM et 3,45 mM	99
2.5. Système continu	102

3. Biotransformation des phytostérols par <i>Mycobacterium</i>	106
3.1. Bioconversion des phytostérols dans des fioles agitées	107
3.1.1. Bioconversion des phytostérols solubilisés par l'acétone	107
3.1.2. Bioconversion des phytostérols à l'état solide	111
3.2. Bioconversion dans un fermenteur de 5 L	114
Conclusion.....	121
Perspectives	125
Matériel et Méthodes	127
1. Biocatalyseurs et culture.....	128
1.1. Milieux de culture et préparation	128
1.2. Tryptone Soy Broth (TSB)	128
1.3. Gym Streptomyces Medium (GSM)	129
1.4. Tampon phosphate (PBS).....	129
1.5. Milieu synthétique MS	129
2. Protocole générale de culture bactérienne	130
3. Matériaux	130
3.1. Célite®	131
3.2. Extrelut®	131
3.3. Cordiélite	131
3.4. Céramique poreuse.....	131
3.5. Luffa cylindrica	132
3.6. Luffa cylindrica acétylée	132
3.6.1. Acétylation par autoclavage.....	132
3.6.2. Acétylation en présence du NBS.....	132
3.7. Cytoline™ 1.....	133
4. Méthodes analytiques	133
4.1. Mesure de la biomasse.....	133
4.2. Turbidité dans le visible : Population cellulaire.....	133
4.3. Dosage des protéines	134
4.4. Chromatographie en phase gazeuse	134
4.5. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	135
4.6. Chromatographie liquide à haute performance	135
4.7. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse ...	136
4.8. Microscopie électronique à balayage	136

5. Biotransformation.....	136
5.1. Biotransformation dans les fioles.....	136
5.2. Biotransformation dans un fermenteur	137
5.3. Biotransformation dans une colonne	137
5.4. Extraction.....	137
5.5. Calcul des paramètres cinétiques	137
5.5.1. La bioconversion.....	137
5.5.2. Le rendement	138
5.5.3. La sélectivité	138
5.5.4. La productivité volumétrique.....	139
5.5.5. La productivité spécifique	139
Références	140

Liste des figures

Figure 1: Hydroxylation de la progestérone en position C-11 par <i>Rhizopus nigricans</i>	18
Figure 2: Synthèse de la cortisone à partir de l'acide désoxycholique	19
Figure 3: Synthèse de la cortisone	19
Figure 4: Effectif cumulé de bioprocédés établis à l'échelle industrielle	20
Figure 5: Positions des hydroxylations d'un stéroïde produites par des actinomycètes	21
Figure 6: Représentation de l'isoprène et du squalène	22
Figure 7 : Numérotation des atomes des cycles A, B, C, D du noyau perhydrocyclopentaphénanthrénique, avec les carbones asymétriques (o).....	23
Figure 8 : Structure tridimensionnelle de cholestérol	23
Figure 9 : Trois séries de stéroïdes avec un exemple pour chaque série.....	24
Figure 10 : Différences structurales au niveau de la chaîne latérale des quatre stérols étudiés	25
Figure 11: Epoxyde de squalène.....	26
Figure 12 : Schéma général de biosynthèse des stérols chez les eucaryotes.....	27
Figure 13: Pourcentage de familles de composés produits par des bioprocédés.....	28
Figure 14: Structures et formules brutes de l'androstadiènedione et l'androstènedione	29
Figure 15 : Dégradation de la chaîne latérale de cholestérol en ADD.....	30
Figure 16 : Mécanisme d'oxydation du C-28.....	31
Figure 17 : Nombre de procédés en fonction du type de biocatalyseurs	32
Figure 18: Bioconversion de cholestérol en cholest-4-ène-3-one par la cholestérol-oxydase des <i>Rhodococci</i>	33
Figure 19 : Catabolisme de l'androst-4-ène-3,17-dione par des <i>Rhodococci</i>	34
Figure 20: Les mécanismes d'accession des microorganismes aux substrats lipophiles.....	39
Figure 21 : Schémas des principales techniques d'immobilisation	46
Figure 22 : <i>Luffa cylindrica</i>	53
Figure 23 : Effet de la présence d'un support poreux sur la biotransformation de cholestérol par DSM 43066 (A-B-C) et DSM 43287 (D-E-F) dans le milieu GSM.....	60
Figure 24: Production de CHO à partir de cholestérol par DSM 43066 (A) et DSM 43287 (B) dans le milieu GSM.....	61
Figure 25 : Production de CHO à partir de cholestérol par DSM 43066 (A) et DSM 43287 (B) dans le milieu PBS.	62
Figure 26 : Biotransformation de cholestérol (0,86 mM) par DSM 2966 dans le milieu TSB.	63
Figure 27 : Structures et formules brutes du cholestan-3-one one et du cholest-1,4-diène-3-one	64
Figure 28 : Biotransformation de cholestérol (0,86 mM) par DSM 2967 dans le milieu TSB.....	65
Figure 29 : Biotransformation de cholestérol (0,43 mM) par DSM 2966 (A) et DSM 2967 (B) dans le tampon phosphate PBS.....	67

Figure 30 : Biotransformation de cholestérol (0,43 mM) par DSM 2966 (A) et DSM 2967 (B) adsorbées sur zéolites dans le tampon phosphate PBS..	68
Figure 31 : Biotransformation de cholestérol (0,86 mM) par DSM 2966 (A) et DSM 2967 (B) dans le milieu PBS..	69
Figure 32 : Biotransformation de cholestérol (0,86 mM) par DSM 2966 (A) et DSM 2967 (B) adsorbées sur Célite® dans le milieu PBS..	70
Figure 33 : Biotransformation de cholestérol (0,86 mM) en poudre (A) et adsorbé sur Célite® (B) par DSM 2966 dans le milieu PBS.	72
Figure 34 : Biotransformation de cholestérol (0,86 mM) en poudre (A) et adsorbé sur Célite® (B) par DSM 2967 dans le milieu PBS..	72
Figure 35 : Biotransformation de cholestérol (0,86 mM) par des cellules induites (A) et pré-induites (B) de DSM 2966 dans le milieu PBS..	74
Figure 36 : Biotransformation de cholestérol (0,86 mM) par des cellules induites (A) et pré-induites (B) de DSM 2967 dans le milieu PBS..	74
Figure 37 : Biotransformation de cholestérol (0,86 mM) par DSM 2966 (A) et DSM 2967 (B) dans le TSB dilué.....	75
Figure 38 : Biotransformation de cholestérol (0,86 mM) par DSM 2966 dans les milieux PBS (A), MS (B) et TSB (C) et par DSM 2967 dans les milieux PBS (D), MS (E) et TSB (F).....	77
Figure 39 : Biotransformation de cholestérol (1,72 mM) par DSM 2966 à 30°C (A) et 20°C (B) dans le milieu PBS.	78
Figure 40 : Biotransformation de cholestérol (1,72 mM) par DSM 2967 à 30°C (A) et 20°C (B) dans le milieu PBS..	79
Figure 41 : Biotransformation de cholestérol (1,72 mM) par DSM 2966 (A) en présence de Célite® (B), d'Extrelut® (C) et par DSM 2967 (D), en présence de Célite® (E) et d'Extrelut® (F) dans le milieu PBS.....	80
Figure 42 : Biotransformation de cholestérol (1,72 mM) par DSM 2966 (A) et DSM 2967 (B) dans le milieu TSB en présence d'une matrice d'immobilisation après 7 jours d'incubation.	82
Figure 43 : Effet de la présence d'une matrice d'immobilisation (200 mg) sur la croissance de DSM 2966 (A) et DSM 2967 (B) après 3 jours d'incubation dans le milieu TSB.....	83
Figure 44 : Biotransformation de cholestérol (1,72 mM) par DSM 2966 dans le milieu TSB en absence (A) et en présence (B) de fibres de <i>Luffa cylindrica</i> (≈200 mg)..	84
Figure 45 : Biotransformation de cholestérol (1,72 mM) par DSM 2967 dans le milieu TSB en absence (A) et en présence (B) de fibres de <i>Luffa cylindrica</i> (≈200 mg)..	85
Figure 46 : Fibres de <i>Luffa cylindrica</i> observées à différents grossissements par la microscopie électronique à balayage..	87
Figure 47 : Fibres de <i>Luffa cylindrica</i> avant (A-C) et après (B-D) deux jours d'incubation avec <i>Mycobacterium</i> sp. DSM 2966 dans le milieu TSB. Observation à différents grossissements par la microscopie électronique à balayage..	88
Figure 48 : Biotransformation de cholestérol (1,72 mM) par DSM 2966 dans le milieu TSB après 7 jours d'incubation en présence de différentes quantités des fibres de <i>Luffa cylindrica</i> ..	89
Figure 49 : Biotransformation de cholestérol (1,72 mM) par DSM 2966 (A) et DSM 2967 (B) en présence de <i>Luffa cylindrica</i> (≈400 mg) dans le milieu TSB.....	90

Figure 50 : Biotransformation de cholestérol (1,72 mM) par DSM 2966 sans <i>Luffa cylindrica</i> (A), avec <i>Luffa cylindrica</i> (B), avec <i>Luffa cylindrica</i> acétylé (C) et par DSM 2967 sans <i>Luffa cylindrica</i> (D), avec <i>Luffa cylindrica</i> (E), avec <i>Luffa cylindrica</i> acétylé (F) dans le milieu TSB.....	92
Figure 51 : Biotransformation de cholestérol (1,72 mM) par DSM 2966 avec des fibres de <i>Luffa cylindrica</i> réutilisées 10 fois dans le milieu TSB..	93
Figure 52 : Biotransformation de cholestérol (1,72 mM) par des cellules de DSM 2966 (A) et DSM 2967 (B) immobilisées sur <i>Luffa cylindrica</i> durant des cycles de 3 jours d'incubation et de renouvellement du milieu TSB.....	94
Figure 53 : Biotransformation de cholestérol (1,72 mM) ajouté sous forme de particules solides de différentes tailles par DSM 2967 après 3 jours d'incubation dans le milieu TSB.	98
Figure 54 : Accumulation d'ADD par DSM 2966 (A) et d'AD par DSM 2967 (B) à partir de cholestérol solide (× : 1,72 mM, ▲ : 2,59 mM, ■ : 3,45 mM) avec (—) et sans (- - -) <i>Luffa cylindrica</i> dans le milieu TSB..	99
Figure 55 : Rapport ADD/AD avec DSM 2966 (A) et AD/ADD avec DSM 2967 (B).	100
Figure 56 : Evolution de la productivité volumétrique d'ADD accumulée par DSM 2966 (A) et d'AD accumulée par DSM 2967 (B) à partir de cholestérol dans le milieu TSB avec et sans <i>Luffa cylindrica</i>	101
Figure 57 : Représentation schématique (A) simple du montage expérimental (B) réalisé du système de mycobactéries immobilisées sur les fibres de <i>Luffa cylindrica</i> et opéré en continu dans une configuration lit fixe.....	104
Figure 58 : Biotransformation d'un mélange de phytostérols (0,66 g/L) par DSM 2966 dans le milieu TSB en absence(A) et en présence (B) de fibres de <i>Luffa cylindrica</i> . Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Inoculum : 5% (v/v). <i>Luffa cylindrica</i> : ≈ 400 mg. Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.	107
Figure 59 : Productivité spécifique en AD(D) par DSM 2966 dans le milieu TSB à partir d'un mélange de phytostérols (0,66 g/L) dissous dans 1 mL d'acétone.	109
Figure 60 : Biotransformation d'un mélange de phytostérols (0,66 g/L) par DSM 2967 dans le milieu TSB en absence(A) et en présence (B) de fibres de <i>Luffa cylindrica</i> . Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Inoculum : 5% (v/v). <i>Luffa cylindrica</i> : ≈ 400 mg. Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.	110
Figure 61 : Productivité spécifique en AD(D) par DSM 2967 dans le milieu TSB à partir d'un mélange de phytostérols (0,66 g/L) dissous dans 1 mL d'acétone.	110
Figure 62: Biotransformation d'un mélange de phytostérols (1 g/L) par DSM 2966 dans le milieu TSB en absence(A) et en présence (B) de fibres de <i>Luffa cylindrica</i> . Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Inoculum : 5% (v/v). <i>Luffa cylindrica</i> : ≈ 400 mg. Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.	112
Figure 63: Productivité spécifique en AD(D) par DSM 2966 à partir d'un mélange de phytostérols (0,66 g/L) dissous dans l'acétone (A) et de phytostérols (1 g/L) ajouté à l'état solide (B) dans le milieu TSB.....	112
Figure 64 : Biotransformation d'un mélange de phytostérols (1 g/L) par DSM 2967 dans le milieu TSB en absence(A) et en présence (B) de fibres de <i>Luffa cylindrica</i> . Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Inoculum : 5% (v/v). <i>Luffa cylindrica</i> : ≈ 400 mg. Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.	113

Figure 65 : Bioconversion de phytostérols (1 g/L) par DSM 2966 dans un fermenteur de 5 L. Volume utile : 3 L de TSB. Acétone : 5%. Température : $30\pm 1^{\circ}\text{C}$. pH = $7,2\pm 0,5$. Aération : 1 vvm. Agitation : 200 rpm. Inoculum : 2%. Anti-mousse : 500 ppm.	115
Figure 66 : Bioconversion de phytostérols (1 g/L) par DSM 2966 dans un fermenteur de 5 L. Volume utile : 3 L de TSB. <i>Luffa cylindrica</i> : 20 g. Acétone : 5%. Température : $30\pm 1^{\circ}\text{C}$. pH = $7,2\pm 0,5$. Aération : 1 vvm. Agitation : 200 rpm. Inoculum : 2%. Anti-mousse : 500 ppm.	117
Figure 67 : Bioconversion de phytostérols (1 g/L) par DSM 2966 dans un fermenteur de 5 L. Volume utile : 3 L de TSB. Acétone : 5%. Température : $30\pm 1^{\circ}\text{C}$. pH = $7,2\pm 0,5$. Aération : 1 vvm. Agitation : 200 rpm. Inoculum : 5%. Anti-mousse : 500 ppm.	118
Figure 68 : Bioconversion de phytostérols (1 g/L) par DSM 2966 dans un fermenteur de 5 L. Volume utile : 3 L de TSB. <i>Luffa cylindrica</i> : 20 g. Acétone : 5%. Température : $30\pm 1^{\circ}\text{C}$. pH = $7,2\pm 0,5$. Aération : 1 vvm. Agitation : 200 rpm. Inoculum : 5%. Anti-mousse : 500 ppm.	119

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Une grande variété de substances naturelles lipophiles persiste dans l'environnement malgré l'activité métabolique des microorganismes, des plantes et des animaux (Rohmer et Vandecasteele, 2005). Parmi ces substances lipophiles, les triterpènes constituent une classe de substances naturelles extrêmement abondante avec plus de 4000 composés identifiés (Dzubak et al., 2006). La fonctionnalisation de ces molécules par le biais des microorganismes est d'une grande importance en biotechnologie moderne parce qu'elle permet d'accéder à des molécules à haute valeur biologique ajoutée difficilement accessibles autrement (Angelova et Schmauder, 1999).

Toutefois, de nombreuses biotransformations sont à ce jour impossibles par ce biais ou conduisent à des rendements très faibles. Cela est fréquemment attribuable à des problèmes de biodisponibilité des substances. En effet, la faible solubilité des triterpènes dans l'eau, milieu réactionnel essentiel des biocatalyseurs, est un facteur limitant leur biotransformation. Plusieurs approches ont été envisagées pour contourner ce problème de non biodisponibilité du substrat. Ces approches font souvent appel à l'utilisation de solvants organiques miscibles (Chen et al., 2009; Yang et al., 2007; Tritz et al., 1999) ou immiscibles à l'eau (Carvalho et al., 2004; Staebler et al., 2004) et de surfactants (Wang et al., 2002; Smith et al., 1993). Ces produits chimiques peuvent affecter les fonctions biocatalytiques des microorganismes et avoir des conséquences néfastes sur la santé du personnel opérateur et sur l'environnement (Fernandes et al., 2003; Mahato et Garai, 1997).

L'immobilisation des cellules s'est révélée durant les deux dernières décennies comme une alternative à ce problème (Claudino et al., 2008; Bálež, 1994). En effet, la stabilité d'un microorganisme est souvent accrue lorsqu'il est fixé. Par ailleurs un tel procédé permet d'obtenir des concentrations en biomasse beaucoup plus élevées qu'en fermentation classique (Le Bec, 1981). La coupure de la chaîne latérale des stéroïdes par cellules immobilisées étudiées jusqu'à présent fait intervenir le plus souvent l'immobilisation passive des bactéries par adsorption sur des supports solides de nature minérale (Wendhausen et al., 2005; Llanes et al., 2001; Fernandes et al., 1998; Lee et Liu, 1992) ou organique (Claudino et al., 2008; Lee et Liu, 1992), l'inclusion des cellules dans des gels (Le Bec, 1981; El-Refai et al., 1995) et la micro-encapsulation (Malaviya et Gomes, 2008).

Cependant, les supports tels que les mousses de polyuréthane, les billes d'alginate et de silicone ne conviennent pas à l'application industrielle du fait de leur coût élevé, la diffusion restreinte du substrat à travers le support et leur faible stabilité mécanique (Hideno et al., 2007). D'autre part, les supports minéraux tels que la Célite[®], la céramique et l'oxyde d'Aluminium nécessitent l'utilisation de grandes quantités de solvants organiques (Llanes et al., 2001; Fernandes et al., 1998).

La tendance « chimie verte » et « biotechnologie blanche » est actuellement à la recherche d'alternatives aux solvants polluants. C'est dans ce cadre, que nous nous sommes intéressés à la recherche de supports d'immobilisation pour la biotransformation de substances lipophiles sans utilisation massive de solvant.

En plus de la stabilité accrue et la plus grande biomasse, l'immobilisation des microorganismes peut induire une modification de leur croissance, leur physiologie et leur activité métabolique (Rong et al., 2007; Kourkoutas et al., 2004). En effet, il est connu que les conditions d'environnement de l'organisme ont une importance décisive dans l'induction et la répression de certaines de ces enzymes (Lefebvre, 1974). Ainsi, nous postulons que le rapprochement entre les microorganismes et les substrats dans des sites particuliers, par exemple au sein de matériaux poreux, puisse être un outil précieux pour induire la biotransformation de certaines molécules lipophiles non bio-convertibles actuellement ; tel est le cas de triterpènes des familles hopane et dammarane.

L'objectif général de ce travail se résume donc en une étude de la biotransformation de triterpènes par des microorganismes immobilisés dans et sur des supports poreux. La réaction modèle choisie est le clivage de la chaîne latérale des stérols en vue de l'obtention des androsténones, précurseurs naturels des stéroïdes. Le clivage de la chaîne latérale des stérols sans dégradation totale du noyau stéroïde est une réaction connue depuis 1972 (Marsheck et al., 1972). Cette découverte a permis la transformation de stérols disponibles en grandes quantités en hormones stéroïdes, molécules aux importantes propriétés pharmacodynamiques et à forte valeur ajoutée. De nombreuses études ont montré que la production de ces androsténones peut être améliorée par l'utilisation de produits chimiques dont les inconvénients ont été présentés ci-haut. Dans ce travail, nous explorons un procédé innovant, éco-compatible, permettant d'obtenir, à moindre coût, des taux de bioconversion des stérols similaires voire meilleurs que ceux rencontrés dans la littérature.

Ce document est divisé en trois parties :

- La première partie introductive aborde les voies de biotransformation permettant la fonctionnalisation de molécules inactives, leurs avantages et les domaines d'application des différents biocatalyseurs. Ensuite, cette partie explicite les substrats sujets de l'étude et l'état de connaissance sur les travaux effectués dans la bibliographie. Le choix des biocatalyseurs est justifié dans un paragraphe indépendant. La problématique du sujet, les solutions existantes et les solutions envisagées sont détaillées dans les paragraphes 5 et 6. Les travaux effectués sur l'utilisation du fruit sec de *Luffa cylindrica* comme matrice d'immobilisation et les caractéristiques physiques et chimiques de ce fruit sont traités indépendamment. Les questionnements scientifiques et les objectifs de l'étude terminent cette partie.
- La deuxième partie expose les résultats de l'étude de l'influence des différents matériaux testés sur la biotransformation des stérols. L'étude de *Luffa cylindrica* comme matrice d'immobilisation est profondément étudiée. Les essais de bioconversion de stérols dans un système de culture en batch et en culture continue seront présentés. Une conclusion générale du travail et des perspectives terminent ce chapitre.
- La troisième et dernière partie présente les tests mis en place au laboratoire et les différentes méthodes d'analyse.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Most, if not all, of the classical chemical transformations discovered and implemented by modern organic and medicinal chemistry pre-exist within the natural chemical cycles performed by nature (Robertson et Bornscheuer, 2005).

1. LA BIOTECHNOLOGIE BLANCHE

L'utilisation des biocatalyseurs pour la fonctionnalisation de substances naturelles est d'une actualité brûlante. Par comparaison aux méthodes de synthèse chimique classiques, les voies de bioconversion présentent un outil du plus haut intérêt dans les contextes d'une utilisation accrue des matières premières renouvelables, de la nécessité de favoriser les procédés éco-compatibles et du respect des contraintes du développement durable.

La synthèse chimique classique présente plusieurs inconvénients : nombreuses étapes, des catalyseurs souvent écotoxiques, rendements faibles, un temps de préparation long et une non-spécificité de certaines réactions (Schmid et al., 2001). Pour les transformations ponctuelles, les chimistes doivent relever le défi lancé par la nature et trouver des méthodes chimiques pour imiter la sélectivité et le rendement des transformations enzymatiques : il faut orienter une réaction sur un site de la molécule qui n'est pas activé par ses groupements classiques.

Par ailleurs, les réactions de bioconversion ont lieu dans des conditions de pH (5-8) et de température (20-40°C) modérées (Faber, 2000). L'avantage principal des voies de bioconversion par rapport à la synthèse chimique classique est l'obtention d'excès énantiomériques importantes. Vu que l'activité biologique dépend souvent d'un seul énantiomère, cet aspect est primordial (Prescott et al., 2003; Faber, 2000; Loughlin, 2000).

Une application typique de l'utilisation des microorganismes a été découverte par Murray & Peterson en 1952 : la 11- α hydroxylation de la progestérone par *Rhizopus nigricans* (Figure 1) (Mahato et Garai, 1997).

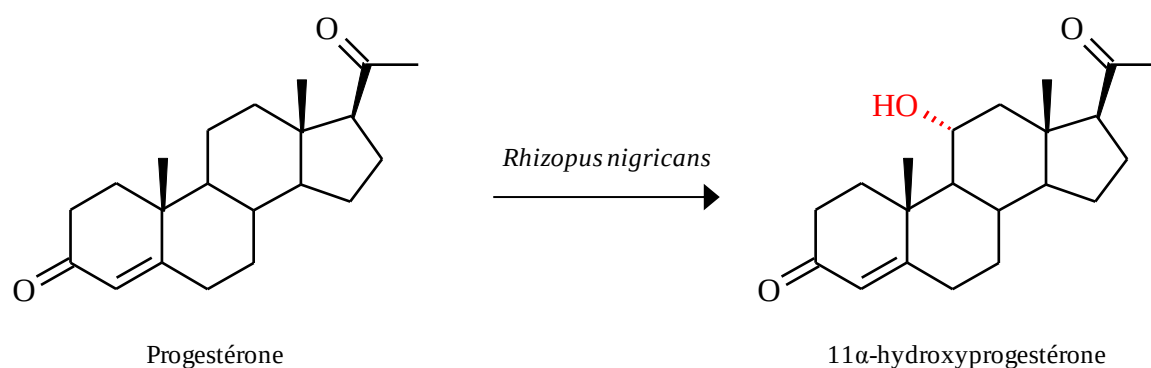


Figure 1: Hydroxylation de la progestérone en position C-11 par *Rhizopus nigricans*

A l'origine, le but recherché était l'obtention de la cortisone à partir de l'acide désoxycholique, produit par la bile (**Figure 2**).

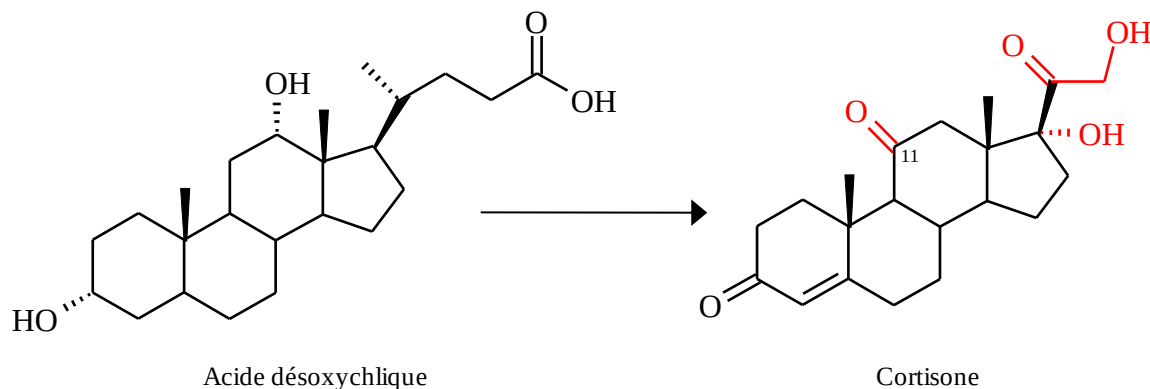


Figure 2: Synthèse de la cortisone à partir de l'acide désoxycholique

5 Cette voie de synthèse développée en 1949 par les Laboratoires Merck (Allemagne) exigea deux ans de travail, et permit d'obtenir la cortisone à travers 31 étapes chimiques (**Figure 3**) pour un rendement final de 0,15% (1 Kg de cortisone à partir de 615 Kg d'acide désoxycholique) (Vasic-Racki, 2000).

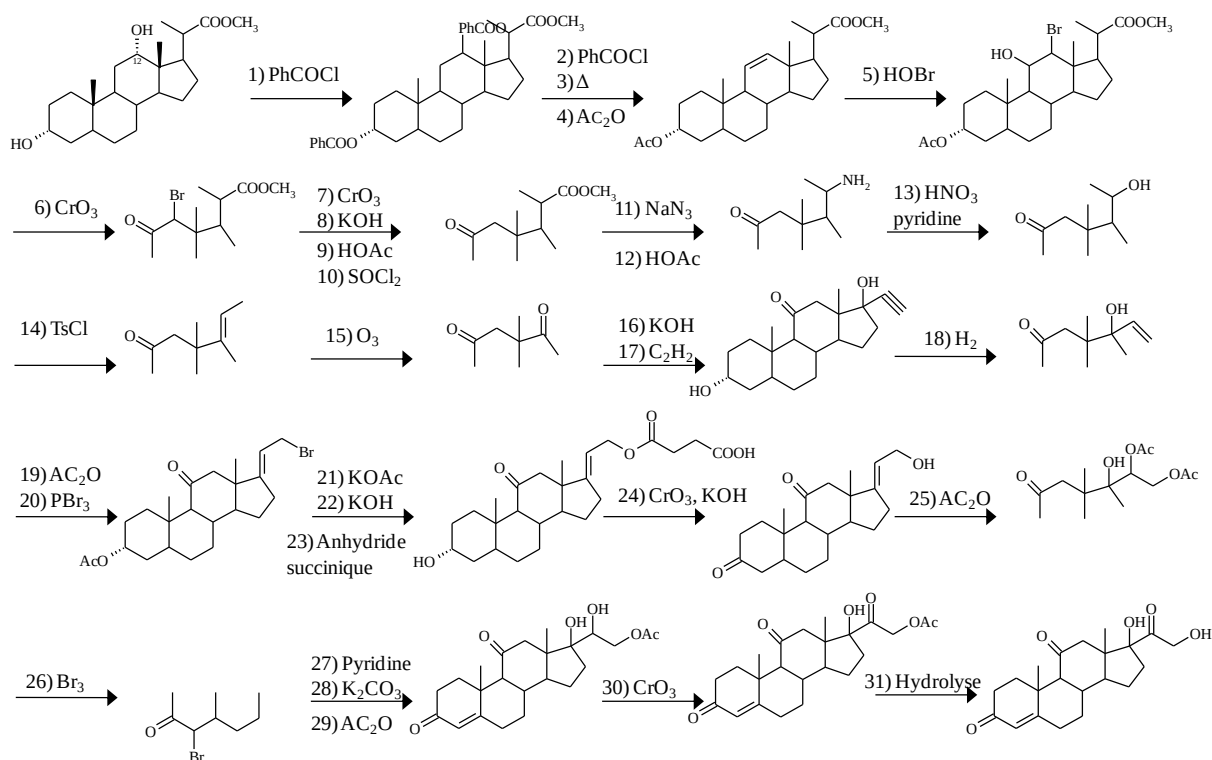


Figure 3: Synthèse de la cortisone (Vasic-Racki, 2000)

Il fallait notamment, 12 étapes pour faire passer l'oxygène de la position C-12 à la position C-11 ; cette transformation, essentielle pour l'activité pharmacologique posait donc de sérieux problèmes aux organiciens (Simon, 1970). C'est pourquoi, la découverte de Peterson, qui permet l'introduction facile d'une fonction OH en position C-11 à partir de composés d'origine végétale, assez abondants et auparavant inutilisables, eut un retentissement économique important. Suite à cette réaction microbienne, le prix de la cortisone a baissé de 200\$/g à 6\$/g (Vasic-Racki, 2000; Simon, 1970).

Cette découverte ouvrit la voie de bioconversion des stéroïdes. C'est ainsi que l'utilisation des microorganismes et des enzymes isolés dans la fonctionnalisation de molécules naturelles s'est accrue rapidement aussi bien au niveau des laboratoires de recherche qu'au niveau industriel (Loughlin, 2000; Liese et Villela Filho, 1999). La **Figure 4** montre l'augmentation exponentielle des bioprocédés établis à l'échelle industrielle à partir de 1960 (Straathof et al., 2002).

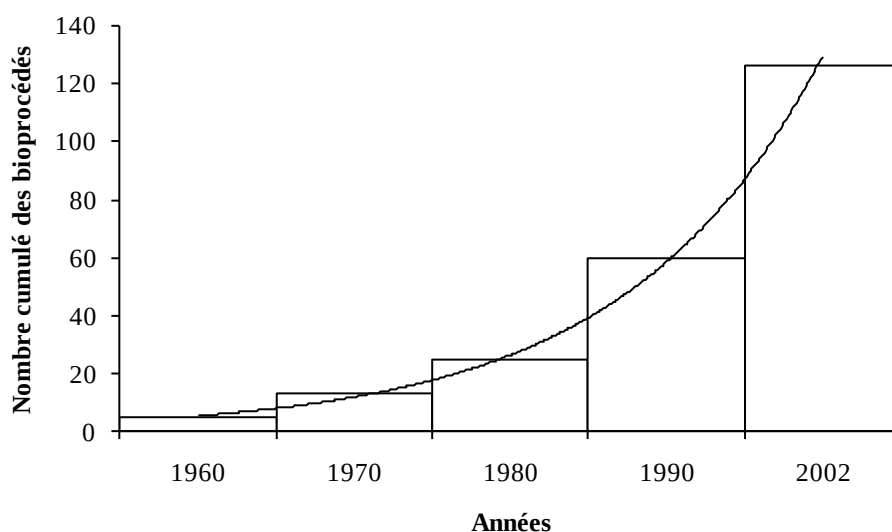


Figure 4: Effectif cumulé de bioprocédés établis à l'échelle industrielle (Straathof, 2002)

2. INTERET DE LA RECHERCHE SUR LES TRITERPENES

Présents dans toutes les roches sédimentaires, les triterpènes sont parmi les substances les plus anciennement connues et les plus répandues sur la terre (Taylor, 1984). Ils se trouvent également dans la matière organique vivante dans tous les règnes (Muffler et al., 2011). La famille des triterpénoïdes compte plus de 4000 composés avec environ 200 squelettes différents (Connolly et Hill, 2007).

A part leur abondance, les triterpènes sont reconnus pour avoir un fort potentiel pharmacologique ; certains triterpènes ont été intensivement étudiés au cours de ces dernières années (Dzubak et al., 2006). Ils sont utilisés depuis longtemps en phytothérapie grâce à leurs fonctions biologiques diverses (anti-inflammatoires, anti-cancéreux, anti-microbiens, anti-fongiques, analgésiques, virostatiques et immunostimulateurs,...) (Connolly et Hill, 2007; Dzubak et al., 2006; Connolly et Hill, 2002; Newman et al., 2000).

Cependant, ces fonctions thérapeutiques sont limitées à certains dérivés actifs bien particuliers. En effet, l'activité biologique est conditionnée par la présence de groupements alcools, cétones et les doubles liaisons à différentes positions dans la molécule (Bureik et Bernhardt, 2007). Pour les stéroïdes par exemple, certaines propriétés particulières sont liées à la position du groupement hydroxyle sur le squelette stéroïde. Ainsi la présence d'un oxygène en C-11 confère au stéroïde une activité anti-inflammatoire (Chen et al., 2007a), une hydroxylation en 16 α augmente l'activité glucocorticoïde de ce même stéroïde (Fernandes et al., 2003), alors qu'en position 7 α et 14 α l'hydroxylation augmente l'activité diurétique, immunitaire et anticancéreuse (Angelova et Schmauder, 1999; Kolek, 1999).

La fonctionnalisation des triterpènes par les méthodes de synthèse chimique est limitée davantage par la sensibilité de leurs squelettes vis-à-vis de certaines substances chimiques qui peuvent dégrader la molécule au-delà de la réaction souhaitée (Bensasson et al., 1999). Au contraire, la bioconversion représente un outil du plus haut intérêt à ce niveau vue l'énantio et la régiosélectivité des enzymes pour des sites spécifiques sur le substrat (Loughlin, 2000). A ce jour, presque tous les atomes de carbone d'un stéroïde peuvent être hydroxylés stéréospécifiquement par les microorganismes (Doble et al., 2004b). La **Figure 5** représente quelques exemples des hydroxylations sélectives sur le noyau stéroïde.

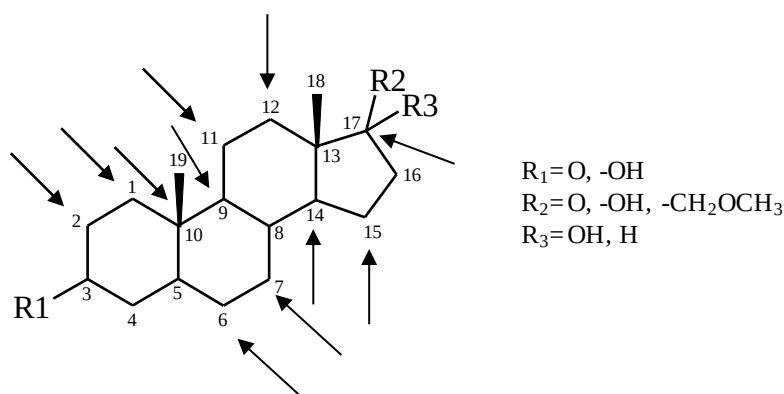


Figure 5: Positions des hydroxylations d'un stéroïde produites par des actinomycètes (Donova, 2007)

Bref, la fonctionnalisation de ces substances est d'une grande importance au niveau thérapeutique (Angelova et Schmauder, 1999) et permet, dans le cadre du développement durable, l'utilisation de matières premières renouvelables.

Dans ce travail, nous nous intéressons à la biotransformation de stérols. Le cholestérol (CHL), le β -sitostérol (BSS), le campestérol (CAM) et le dihydrobrassicastérol (DBS) sont choisis comme modèles pour les stérols. La chimie, l'origine, les fonctions, l'importance de la recherche sur ces substrats et les produits de leurs biotransformations sont présentés dans les paragraphes suivants.

3. LES STEROLS

Les triterpènes sont présents chez tous les organismes vivants et remplissent des rôles physiologiques très divers (Rohmer et Vandecasteele, 2005). Ils proviennent de la cyclisation du squalène ; celui-ci est formé par la polymérisation et le remaniement de six unités isoprène à 5 atomes de carbone (**Figure 6**).

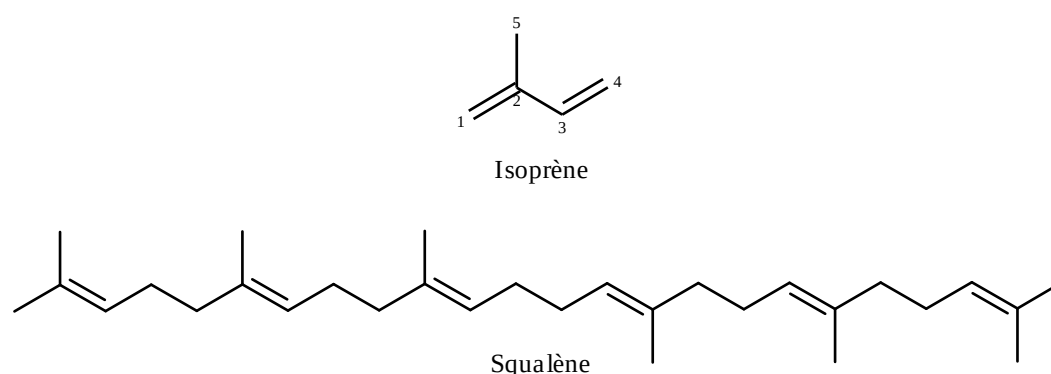


Figure 6: Représentation de l'isoprène et du squalène

La grande majorité des triterpènes sont tétra- ou pentacycliques et le dernier cycle peut contenir 5 ou 6 atomes de carbone (Hautevelle, 2005). En effet, selon le mécanisme de la cyclisation du squalène, des triterpènes pentacycliques comme les hopanoïdes (chez les microorganismes et les plantes) et des triterpènes tétracycliques comme les dammaranes (chez les plantes et les animaux) et les stérols (essentiellement chez les plantes et les animaux) sont obtenus (Taylor, 1984).

3.1. Structure

Toutes les molécules qui appartiennent à la famille des stéroïdes se caractérisent par la présence d'un cycle perhydrocyclopentaphénanthrénique ou gonane, hydrocarbure tétracyclique (**Figure 7**) (Gagnault et al., 1997).

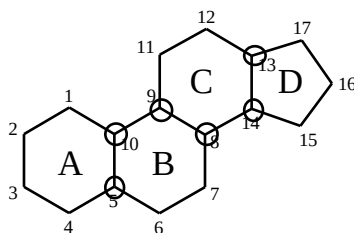


Figure 7 : Numérotation des atomes des cycles A, B, C, D du noyau perhydrocyclopentaphénanthrénique, avec les carbones asymétriques (o).

La partie polycyclique du squelette des stéroïdes est constituée de 17 atomes de carbone formant trois cycles hexaniques, dénommés A, B, C, et un cycle pentanique, D, accolés entre eux et pouvant adopter diverses conformations (Gagnault et al., 1997). Le noyau perhydrocyclopentaphénanthrène contient six carbones asymétriques. Par conséquent, il est possible d'envisager 64 formes isomériques. La stéréochimie de la grande majorité de stéroïdes naturels consiste en un couplage des quatre cycles en configuration spatiale chaise (**Figure 8**) (Klyne, 1966).

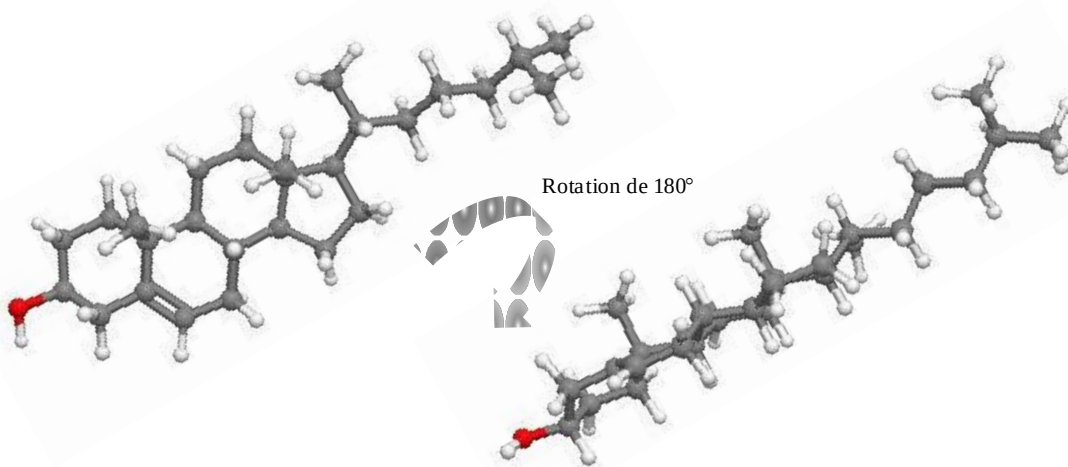
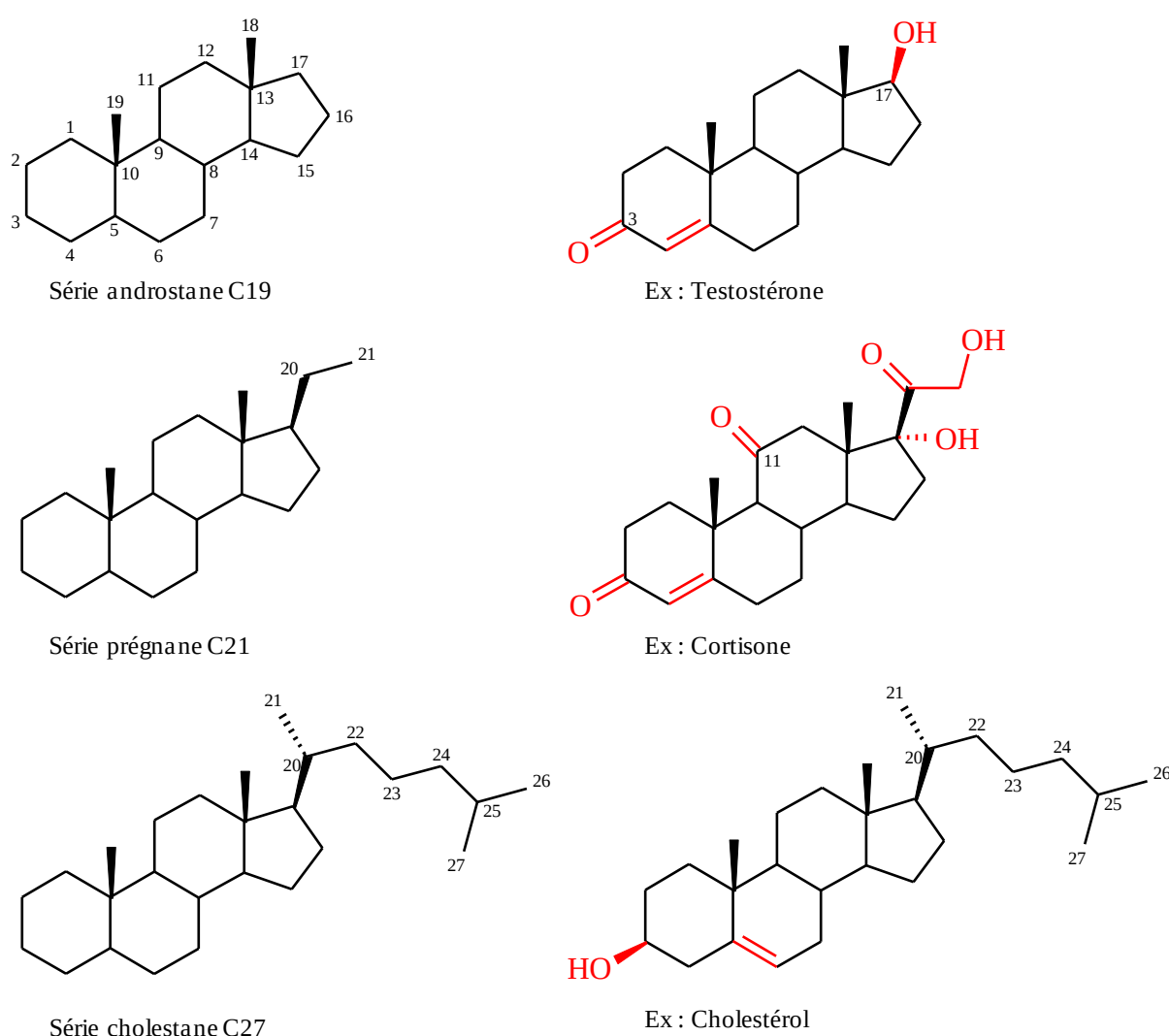


Figure 8 : Structure tridimensionnelle de cholestérol

Les stéroïdes diffèrent les uns des autres par la nature et la position des différents groupements portés par ce squelette gonane, par la présence éventuelle de doubles liaisons et leur nombre. Les principales positions de substitution sont le carbone C-3 du cycle A, le carbone C-11 du cycle C et le carbone C-17 du cycle D (Le Bec, 1981). L'arrangement spatial des substituants du noyau est présenté par une liaison pleine (β) dans le cas d'une position au-dessus du plan de la molécule et par une liaison discontinue (α) dans le cas d'une position en dessous de ce plan. La **Figure 9** montre les squelettes hydrocarbonés de trois séries de stéroïdes avec un exemple de stéroïde appartenant à chacune de ces séries.



10

Figure 9 : Trois séries de stéroïdes avec un exemple pour chaque série

La jonction des cycles est dite *trans* lorsque les deux substituants qui s'y trouvent sont en position *trans* l'un par rapport à l'autre et par référence au plan moyen du squelette. Dans

la plupart des stérols naturels et des hormones stéroïdes, la jonction des cycles A/B, B/C et C/D est en configuration *trans*. Celle-ci confère à la molécule une structure spatiale presque plane (Kreit, 1999).

Le terme stérol s'applique à la classe des stéroïdes qui possèdent, en plus du noyau gonane :

- En 10 β et 13 β , deux méthyles angulaires,
- En 17, presque toujours avec l'orientation β , une chaîne à 8 atomes de carbone, pouvant elle-même être alkylée,
- En 3, un hydroxyle, généralement avec l'orientation β (**Figure 10**).

Les ramifications de la chaîne alkyle latérale en position 17 β permettent de distinguer les quatre stérols étudiés dans ce travail (**Figure 10**). Ainsi, le β -sitostérol a la même structure que le cholestérol avec en plus, un groupement éthyle en position β sur le carbone C-24. La stéréochimie du groupement méthyle sur le carbone C-24 permet de différencier le campestérol et le dihydrobrassicastérol; ce groupement méthyle est en position α pour le premier et en β pour le deuxième.

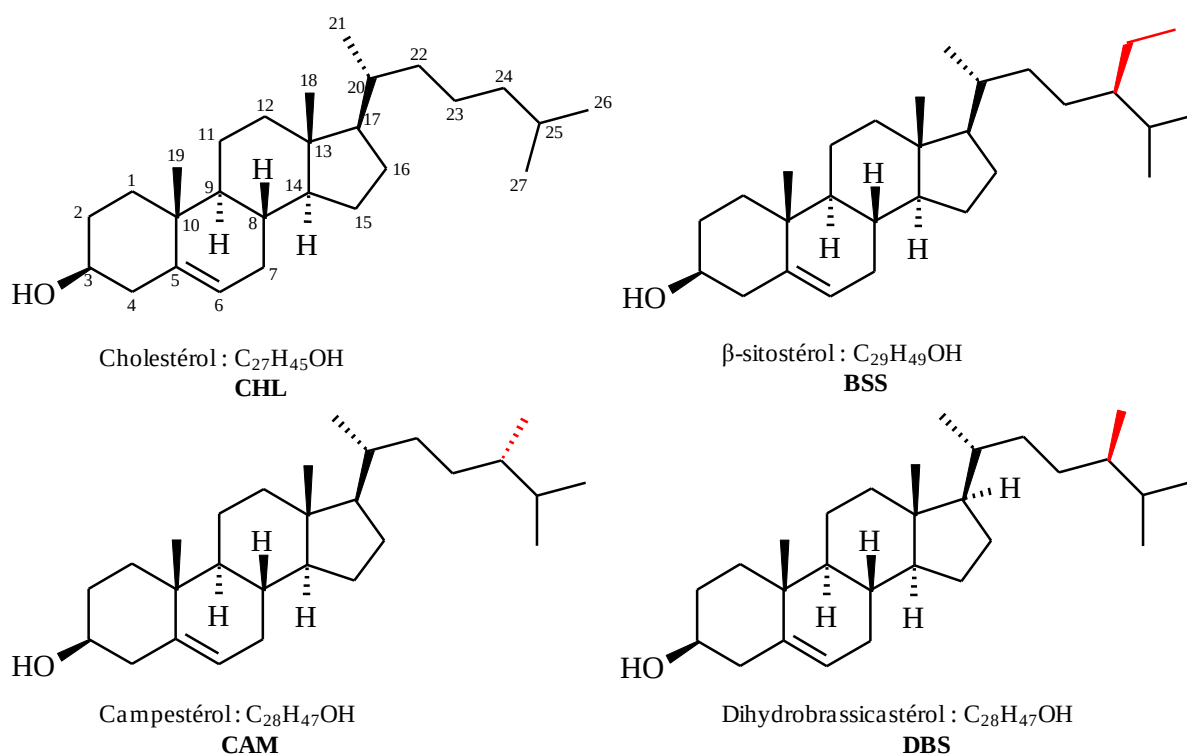


Figure 10 : Différences structurales au niveau de la chaîne latérale des quatre stérols étudiés

3.2. Origine et biosynthèse

Les stérols, et tous les stéroïdes qui en dérivent par métabolisation, sont très répandus dans la nature. Ils sont rencontrés dans les règnes végétal et animal ainsi que dans les roches sédimentaires (Gagnault et al., 1997). Le cholestérol est le principal stérol d'origine animale, alors que le β -sitostérol, le campestérol et le dihydrobrassicastérol sont des stérols d'origine végétale.

La voie de biosynthèse des stérols est très vraisemblablement commune aux végétaux et aux animaux pour tous les stades précédant la formation de l'époxyde de squalène (**Figure 11**), mais au-delà elle suit deux cheminements différents selon le règne considéré.

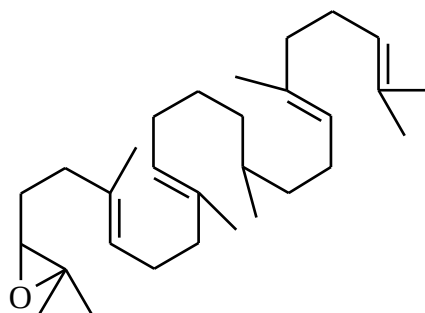


Figure 11: Epoxyde de squalène

La cyclisation chez les eucaryotes de phylum non chlorophyllien se fait par la lanostérol cyclase qui conduit au lanostérol (4,5) déméthylé, en zymostérol puis en cholestérol. Alors que chez les eucaryotes du phylum chlorophyllien, elle se fait par la cycloarténol cyclase conduisant au cycloarténol. Par l'intermédiaire du cycloeucalénol et de l'obtusifoliol, celui-ci conduit aux stérols des plantes, soit les phytostérols (Gagnault et al., 1997). Le schéma général de biosynthèse des stérols est illustré dans la **Figure 12** (page 27).

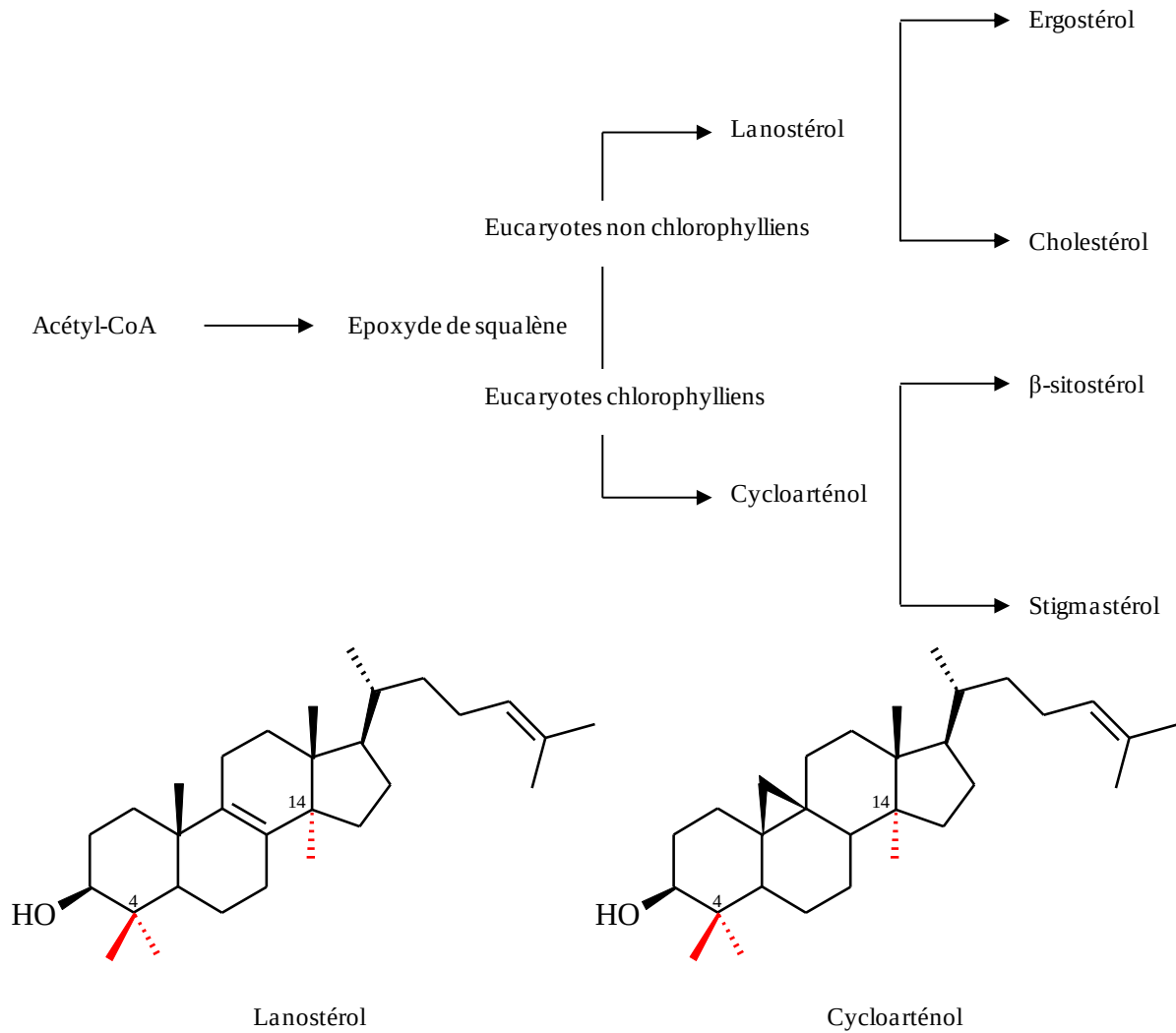


Figure 12 : Schéma général de biosynthèse des stérols chez les eucaryotes

3.3. Fonctions

Grâce à leur caractère amphiphile et leur topologie parfaitement plane, les stérols s'intègrent dans la bicouche phospholipidique des structures membranaires en association avec des lipides simples et complexes. Ils confèrent aux membranes une plus grande stabilité, jouant ainsi le rôle de renforçateur membranaire (Moreau et Hicks, 2001). Le cholestérol, principal stérol d'origine animale, est également le précurseur de nombreuses substances stéroïdes, hormones sexuelles et corticosurréniennes, d'acides et sels biliaires.

3.4. Intérêt de la recherche sur les stérols

Les stéroïdes constituent une classe majeure de la chimie thérapeutique. Les stérols, et en particulier le β -sitostérol, sont des produits naturellement abondants et constituent un stock de matières premières intéressant pour l'industrie pharmaceutique (Donova et al., 2005). Les dérivés obtenus sont utilisés en thérapeutique comme régulateurs du métabolisme, anti-inflammatoires, immunosuppresseurs, contraceptifs, diurétiques ; leur utilisation s'étend aussi au traitement des cancers du sein, de la prostate ou la prévention de certaines maladies cardiaques... (Gagnault et al., 1997).

Du point de vue économique, le marché mondial des stéroïdes est depuis de nombreuses années très important (Szentirmai, 1990; Le Bec, 1981). Parmi les substances produites par les voies de biotransformations, les stéroïdes représentent 6,5% de ces substances (**Figure 13**) selon une enquête effectuée sur 134 procédures industrielles (Straathof et al., 2002). La production mondiale de stéroïdes excède un million de tonnes par an (Schmid et al., 2001) avec un chiffre d'affaire mondial de l'ordre de dix milliards de dollars (Bureik et Bernhardt, 2007). Les deux androsténones AD et ADD représentent quant à eux un chiffre d'affaire 750 millions dollars (De Palma, 2000).

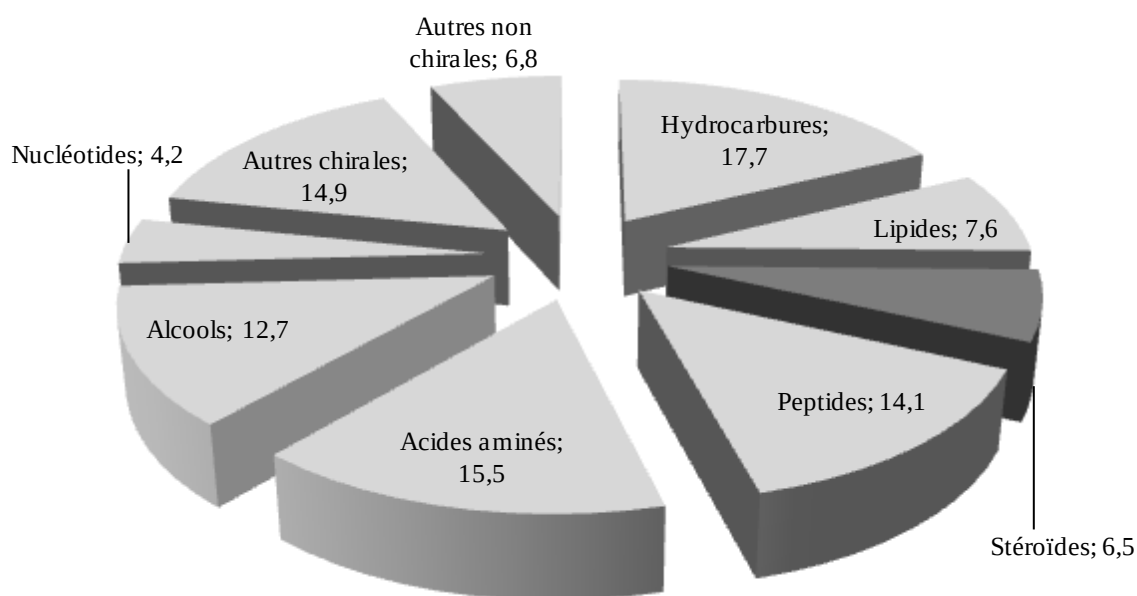


Figure 13: Pourcentage de familles de composés produits par des bioprocédés (Straathof, 2002)

On peut distinguer trois grands groupes dans les stéroïdes thérapeutiques : (i) les dérivés de cortisone d'une part, qui occupent 50% du marché mondial, (ii) les contraceptifs d'autre part (35% du marché), (iii) et enfin les séries diversifiées (15%) ou figurent les produits cosmétiques, dermatologiques, sédatifs... (Zianveni, 1982; Le Bec, 1981).

5 3.5. Biotransformation des stérols

Pour qu'ils soient utilisables comme matières premières dans l'industrie des stéroïdes, le clivage sélectif de la chaîne latérale des stérols est une étape importante. Au début de l'activité industrielle dans le domaine des stéroïdes, le clivage de la chaîne saturée de cholestérol a pu être effectué par voie chimique (oxydation) mais les rendements de cette opération coûteuse et polluante restaient très médiocres (Malaviya et Gomes, 2008; Simon, 1970). La voie microbiologique par contre convertit directement le cholestérol en androsta-1,4-diène-3,17-dione (ADD) et androsta-4-diène-3,17-dione (AD) (**Figure 14**) avec des rendements satisfaisants grâce à l'intervention de microorganismes (Marsheck et al., 1972). L'AD et l'ADD sont les précurseurs naturels des androgènes et des oestrogènes ; ils peuvent être utilisés pour la production de testostérone, d'œstradiol, d'éthinylestradiol, de testolactone, de progestérone, de cortisone, de cortisol, de prednisone et de prédnisolone (Malaviya et Gomes, 2008). La production mondiale d'AD et d'ADD dépasse 1000 tonnes par an (Schmid et al., 2001).

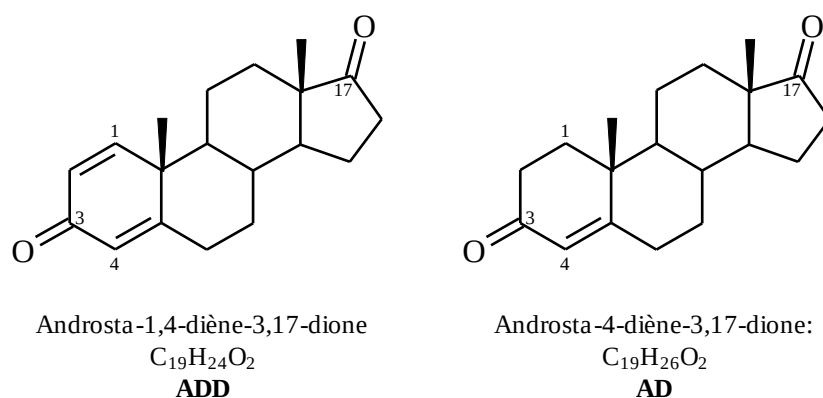


Figure 14: Structures et formules brutes de l'androstadiènedione et l'androstènedione

La **Figure 15** (page 30) présente les principales étapes du clivage de la chaîne latérale de cholestérol qui se fait par neuf enzymes sur quatorze étapes consécutives (Szentirmai, 1990). Le clivage de cette chaîne obéit à un mécanisme similaire à celui de la β -oxydation des acides gras (Kreit, 1999). Cette oxydation enzymatique intéresse d'abord les carbones

terminaux (Ambrus et al., 1995), puis le carbone C-24, et une première scission se produit entre les atomes C-24 et C-25. Une seconde a lieu ensuite entre les atomes C-22 et C-23, et une dernière entre les atomes C-17 et C-20 (Szentirmai, 1990). Cette conversion microbiologique implique aussi le cycle A : l'hydroxyle en C-3 est oxydé en cétone, deux doubles liaisons conjuguées à celle-ci sont créées. Elle livre l'ADD avec deux moles d'acide propionique et une mole d'acide acétique. Dans la réalité, l'ordre des étapes proposé dans la **Figure 15**, pour aboutir à l'ADD, n'est pas forcément respecté. En effet, la structure chimique du cycle A n'influence pas la dégradation de la chaîne latérale (Szentirmai, 1990).

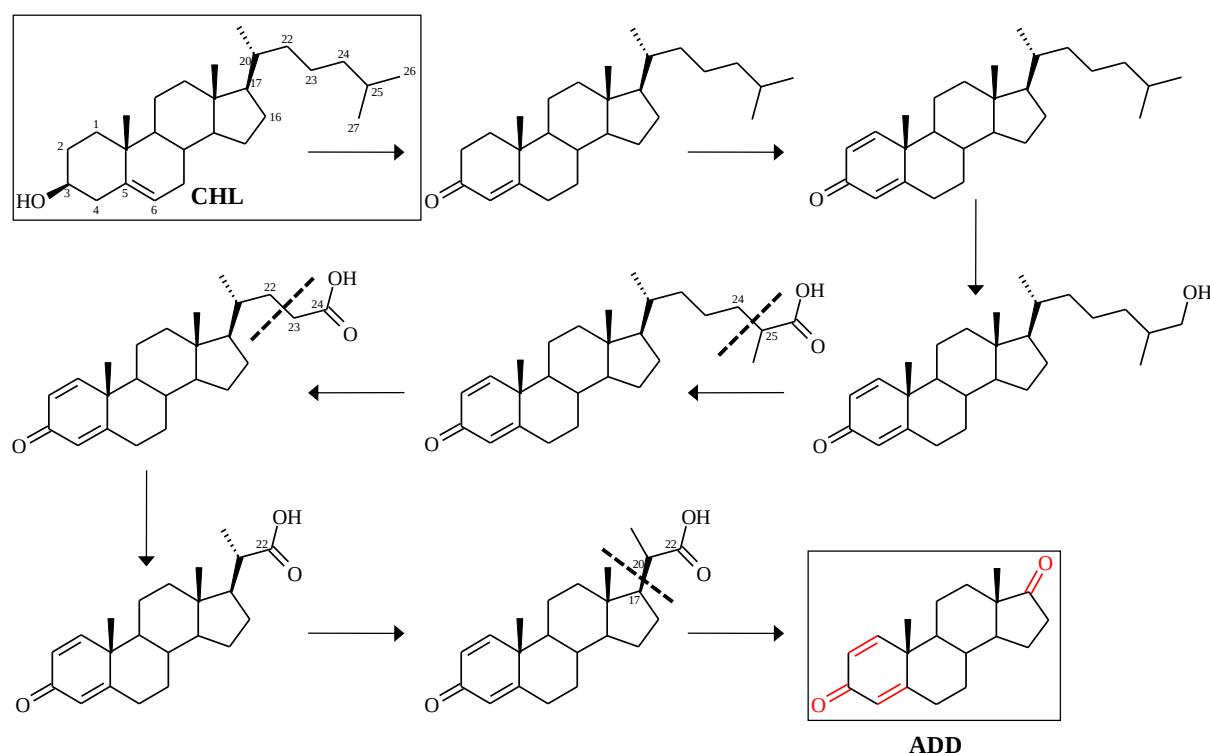


Figure 15 : Dégradation de la chaîne latérale de cholestérol en ADD. Schéma adapté (Szentirmai, 1990)

La chaîne latérale des stérols alkylés en C-24 (β -sitostérol, campestérol et dihydrobrassicastérol) est scindée par les microorganismes à des étapes impliquant l'oxydation du méthyle terminal et des réactions du type β -oxydation (**Figure 16**, page 31). Le clivage de la chaîne latérale du β -sitostérol et du campestérol implique une oxydation préalable du C-28 suivie d'une décarboxylation.

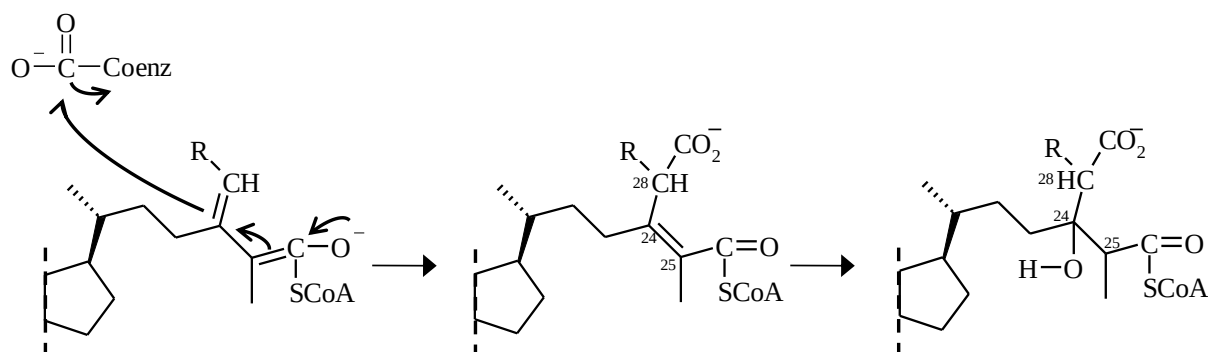


Figure 16 : Mécanisme d'oxydation du C-28. Schéma adapté (Kreit, 1999)

En conséquence, trois molécules de propionate et une molécule d'acétate sont enlevées du β -sitostérol, tandis que la chaîne latérale du campestérol donne deux molécules de chaque acide (Kreit, 1999). Bref, à l'exception de la carboxylation du C-28, la chaîne latérale des phytostérols et celle de cholestérol sont raccourcies par le même mécanisme.

4. BIOCATALYSEURS

Les biocatalyseurs peuvent être des enzymes isolées ou des cellules entières (en croissance ou en phase stationnaire). Dans la fonctionnalisation des triterpènes et la coupure de la chaîne latérale des stérols nécessitant plusieurs étapes enzymatiques, ce sont les cellules entières qui sont privilégiées. Les enzymes isolées ont une activité définie comme tout réactif chimique ; ce qui permet un meilleur contrôle du procédé et une possibilité d'établir des systèmes continus (Loughlin, 2000). Cependant, elles présentent quelques inconvénients comme le coût élevé de leur extraction, purification et de leur stabilisation (Ishige et al., 2005; Bortolini et al., 1997). Pour les réactions d'oxydoréduction va s'ajouter le problème lié à la régénération des cofacteurs comme le NADH et le NADPH (Doble et al., 2004a).

En revanche, les cellules entières peuvent être cultivées à faible coût, la régénération des cofacteurs se fait *in situ* et les enzymes intracellulaires ont une meilleure stabilité (Ishige et al., 2005; Schmid et al., 2001). Les microorganismes peuvent adapter la structure et l'activité de leurs enzymes en fonction des conditions de culture (Liese, 2000). Ce qui fait des cellules entières les biocatalyseurs privilégiés par l'industrie (**Figure 17**, page 32) (Straathof et al., 2002) et en particulier pour la biotransformation de substances triterpéniques.

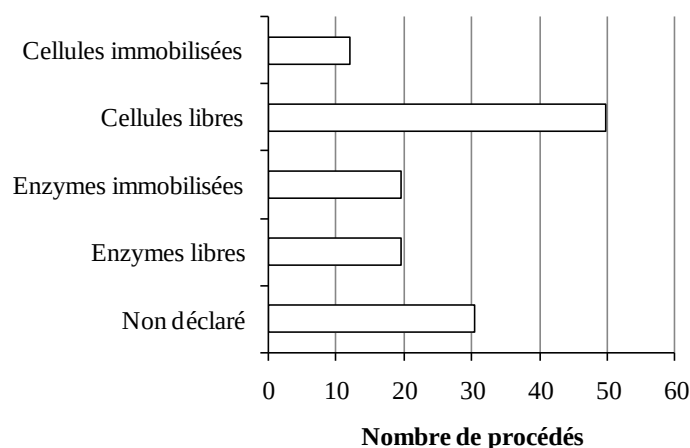


Figure 17 : Nombre de procédés en fonction du type de biocatalyseurs (Straathof et al., 2002)

Des actinomycètes saprophytes appartenant aux genres *Nocardia*, *Rhodococcus* et *Mycobacterium* possèdent la faculté remarquable de biosynthétiser des enzymes induites permettant de métaboliser une grande variété de substances organiques y compris les stéroïdes (Lefebvre, 1974). D'autres espèces bactériennes, sont aptes à couper la chaîne latérale des stérols ; les plus connues sont *Lactobacillus bulgaricus* produisant la testostérone à partir de cholestérol (Kumar et al., 2001), *Micrococcus* (Dogra et Qazi, 1999), *Bacillus subtilis* (Andhale et Sambrani, 2006) et *Morexella* sp. (Fernandes et al., 2003). Dans ce travail, nous étudierons des espèces des genres *Rhodococcus* et *Mycobacterium*. La biologie de ces deux genres ainsi que leurs capacités métaboliques vis-à-vis des stérols et d'autres triterpénoïdes sont détaillées ci-après.

4.1. Le genre *Rhodococcus*

4.1.1. Biologie des *Rhodococci*

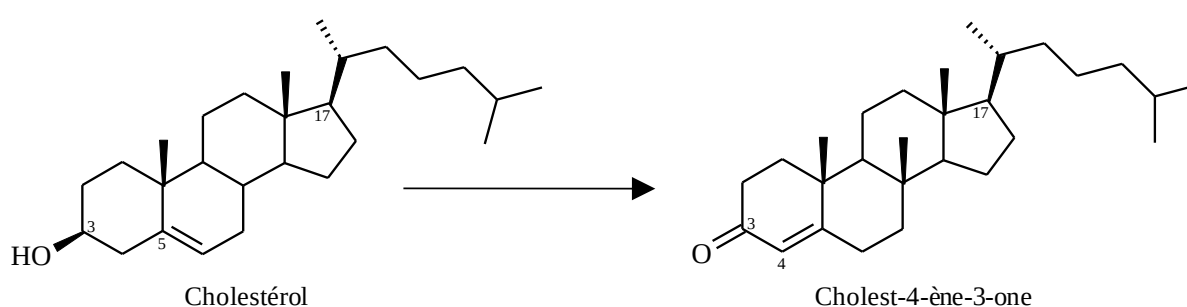
Le genre *Rhodococcus* est placé dans la famille des *Nocardiaceae* de l'ordre des Actinomycétales. Ce sont des bactéries aérobies, à coloration Gram positif ou variable, partiellement acido-résistantes suite à la présence d'acides mycoliques dans leur paroi (Goodfellow et Maldonado, 2006). Ces derniers constituent 40% de la membrane des *Rhodococci*, d'où le caractère hydrophobe de cette membrane (Carvalho et Fonseca, 2005). Leur température optimale de croissance est de 30°C et elles sont caractérisées par un métabolisme oxydatif (Goodfellow et Maldonado, 2006). Le genre *Rhodococcus* englobe des espèces qui possèdent des capacités métaboliques multiples, comprenant la dégradation de stéroïdes, d'herbicides et d'hydrocarbures variés (Kreit, 1999). Au cours de leur croissance,

ces bactéries présentent un véritable cycle morphologique : des formes coccobacillaires donnent naissance à de courts bacilles puis à des filaments plus ou moins ramifiés qui par fragmentation redonnent des coccobacilles ou de petits bacilles. Chez certaines espèces, il se forme même des hyphes aériens visibles au microscope (Goodfellow et Maldonado, 2006).

5 4.1.2. Métabolisme des stéroïdes

L'utilisation de cholestérol comme seule source de carbone par des *Rhodococci* fut observée par Turfitt en 1948 (MacLachlan et al., 2000). Depuis, de nombreux travaux sont effectués sur le devenir du cholestérol consommé par ces bactéries. L'ensemble de l'activité de dégradation des stérols par les *Rhodococci* est divisé en deux parties qui se font indépendamment, mais simultanément (Kreit, 1999) : la coupure de la chaîne latérale d'une part et la dégradation du squelette polycyclique d'autre part. Cette dernière fait intervenir des réactions d'oxydation, d'hydroxylation, d'aromatisation, d'hydrolyse et d'estérification (Zianveni, 1982).

Les premiers intermédiaires obtenus lors de la biotransformation de cholestérol sont les Δ^4 -3-oxo-stéroïdes (**Figure 18**) suite à l'action de la cholestérol-oxydase. Cet enzyme produit une oxydation de la fonction OH en C-3 et une isomérisation de la double liaison du C-5 (Ivshina et al., 2005). Les étapes amenant à ces molécules après coupure de la chaîne latérale ont été présentées dans la **Figure 15** (page 30).



20 **Figure 18:** Bioconversion de cholestérol en cholest-4-ène-3-one par la cholestérol-oxydase des *Rhodococci*

Simultanément à la coupure de la chaîne latérale, le squelette polycyclique des Δ^4 -3-oxo-stéroïdes est ensuite dégradé jusqu'au stade ultime de la respiration en eau et gaz carbonique (Zianveni, 1982).

La **Figure 19** montre le catabolisme de l'AD (Le Bec, 1981). Ce catabolisme se fait sur plusieurs étapes : La première est constituée par les oxydations sur les cycles A et B suivies de l'ouverture du cycle B, de la dégradation totale du cycle A et de la libération du dérivé perhydroindane-dione-propionate. La seconde étape est une β -oxydation induite par ce dérivé, se terminant probablement par la production d'une molécule analogue aux Δ^4 -3-oxo-stéroïdes, mais ne comportant plus que les cycles C et D. La dernière étape est l'oxydation et la dégradation des cycles C et D par des enzymes dont la synthèse pourrait être induite par des métabolites initiaux de cette troisième étape.

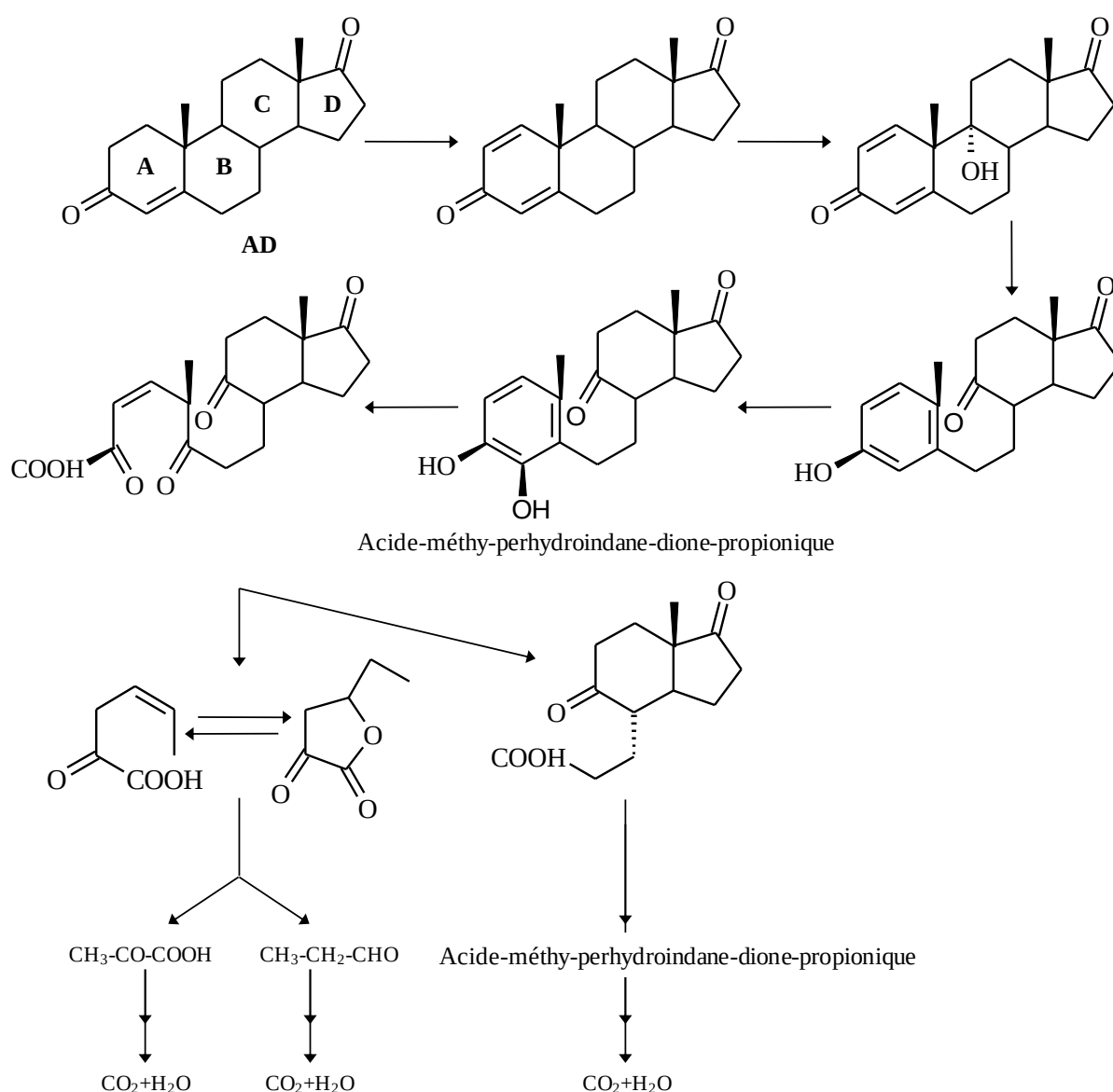


Figure 19 : Catabolisme de l'androst-4-ène-3,17-dione par des *Rhodococci*

Le 3,4-dihydroxy-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-triène-9,17-dione (**Figure 19**, page 34) est un intermédiaire principal dans la dégradation microbienne du noyau tétracyclique stéroïde (Kreit, 1999). Il résulte de la déshydrogénation du C-1 et l'hydroxylation du C-9 simultanément (Angelova et Schmauder, 1999). Cette dernière se fait par un monooxygénase :
 5 la 9 α -hydroxylase, une enzyme clé dans le catabolisme du noyau stéroïde (Ivshina et al., 2005). L'inhibition chimique de cet enzyme peut bloquer la dégradation du noyau stéroïde (Kreit, 1999). Le fer Fe²⁺ étant un élément essentiel pour certaines protéines de la 9 α -hydroxylase ; l'ajout dans le milieu d'agents chélatants comme le 2,2'-dipyridyle, le 1,10-phénanthroniline et le 8-hydroxyquinoline inactivent complètement l'enzyme 9 α -hydroxylase
 10 et permettent une accumulation d'androsténones (Malaviya et Gomes, 2008). Dans une étude effectuée sur 114 souches de *Rhodococcus*, l'ajout du 2,2'-dipyridyle à 0,007% dans le milieu de culture a permis d'accumuler l'AD et l'ADD à partir du β -sitostérol; la proportion du substrat dégradé est restée inférieure à 20% (Ivshina et al., 2005). Le β -sitostérol, le campesterol et le dihydrobrassicastérol subissent le même mécanisme de dégradation que le
 15 cholestérol par les *Rhodococci*.

A part la production d'androsténones, certains intermédiaires du métabolisme des stérols sont importants pour la synthèse de dérivés à valeur biologique ajoutée. Ainsi, le 9 α -OH-AD est un intermédiaire important pour la synthèse de la 9 α -fluorohydrocortisone caractérisée par une forte activité anti-inflammatoire et minéralcorticoïde par comparaison à
 20 son analogue naturel l'hydrocortisone. La production de la 9 α -OH-AD à partir de l'AD sans ouverture du cycle B est rendue possible avec les souches *Rhodococcus* sp. IOC-77 (Angelova et Schmauder, 1999) et *Rhodococcus erythropolis* RGI-UV29 (Fernandes et al., 2003). Lorsque l'AD est hydroxylée en C-14, l'hydroxylation au C-9 est achevée totalement en 2-4 heures par une souche de *Rhodococcus* sp. (Voïshvillo et al., 2004).

25 **4.1.3. Avantages des *Rhodococci***

Les *Rhodococci* contiennent et secrètent une variété importante d'enzymes leur permettant d'effectuer un grand nombre de réactions de bioconversion et de biodégradation. Des réactions d'oxydations, de déshydrogénations, d'époxydations, d'hydrolyses, d'hydroxylations, de déshalogénations et de désulfurations sont déjà étudiées dans la
 30 littérature avec différentes espèces de *Rhodococcus* (Carvalho et Fonseca, 2005). De ce fait, elles peuvent croître et consommer divers substrats hydrophobes naturels ou des xénobiotiques (Ivshina et al., 2005). Pour consommer les substrats hydrophobes dans un

milieu aqueux, les *Rhodococci* synthétisent des lipopolysaccharides et des surfactants non ioniques dans leur paroi (tréhalose non ionique) (Al-Araji et al., 2007). Cette capacité à changer la composition de leur membrane, leur confère une remarquable capacité d'adaptation à des conditions de stress comme la présence de solvants toxiques ; c'est en modifiant la composition de leur membrane et en formant des agrégats cellulaires qu'elles peuvent ainsi résister aux conditions de stress (Carvalho et Fonseca, 2005; Ivshina et al., 2005).

Pour résumer, les avantages de l'utilisation des *Rhodococci* sont : (i) leur forte activité oxygénase, (ii) leur capacité à consommer des substrats hydrophobes sur une large gamme de concentration, (iii) leur capacité à croître sur des milieux pauvres et (iv) leur résistance et leur stabilité aux différentes contraintes environnementales.

Ces caractéristiques et leur capacité à fonctionnaliser certains carbones dans le noyau stéroïde permettent d'envisager l'utilisation des *Rhodococci* pour la biotransformation d'autres catégories de triterpénoïdes comme les hopanoïdes par exemple.

4.2. Le genre *Mycobacterium*

4.2.1. Biologie des *Mycobacteriae*

Le genre *Mycobacterium* est le seul représentant de la famille des *Mycobacteriaceae* de l'ordre des Actinomycétales. Il est très homogène d'un point de vue morphologique et fonctionnel : toutes les mycobactéries ont la forme de bacilles droits incurvés plus ou moins branchés (0,2-0,6x1-10 µm) ou de cocobacilles ; difficiles à identifier avec la coloration de Gram, aérobies, asporulées et immobiles (Hartmans et al., 2006). Leur paroi contient des acides mycoliques qui peuvent comporter de 60 à 90 atomes de carbone ; la nature de cette paroi leur confère une acido-alcool-résistance, un caractère hautement hydrophobe une résistance à la dessiccation et à de nombreux désinfectants (Lyew et al., 2007). Les mycobactéries sont caractérisées par leur tendance à former des agrégats et des amas cellulaires et à adhérer aux surfaces. En dépit de leur nom, les mycobactéries ne sont pas plus proches des champignons que ne le sont les autres bactéries. Ce nom fait simplement référence à la nature hydrophobe de leur paroi, qui donne à leurs colonies un aspect s'approchant de celui d'une moisissure. Lorsqu'elles croissent sur un substrat liquide, elles forment des mycéliums ramifiés qui se fragmentent pour donner des bacilles et des éléments coccoïdes (Hartmans et al., 2006).

Les mycobactéries sont largement présentes dans l'eau et les sols. C'est l'un des 14 genres bactériens les plus abondants des sols, puisqu'ils représentent 2,6% des communautés microbiennes totales (Floyd et al., 2005). Les espèces incluent des bactéries pathogènes ou saprophytes et sont généralement réparties en deux sous-divisions : les mycobactéries « à croissance rapide » et les mycobactéries « à croissance lente », le temps de génération pouvant varier, selon l'espèce, de deux à plus de vingt heures (Hartmans et al., 2006).

Grâce à leur paroi complexe, à la présence d'acides mycoliques de longue chaîne et à un équipement enzymatique approprié, les mycobactéries sont bien équipées pour dégrader une grande variété de substances organiques y compris les triterpènes.

4.2.2. Métabolisme des stéroïdes

L'aptitude des mycobactéries à croître sur cholestérol a été observée dès le début du vingtième siècle (Kreit, 1999). Les espèces du genre *Mycobacterium* empruntent les mêmes voies de catabolisme des stéroïdes que ceux du genre *Rhodococcus* : dans une expérience où des cellules entières de *Mycobacterium* mises à incuber en présence de cholestérol marqué sur le C-4 et de cholestérol marqué sur le C-26, l'équipe de Stadman constate que le C-4 est oxydé 4 fois plus vite que le C-26 (Stadtman et al., 1954) et en conclue que le point de départ de la dégradation d'une molécule comme le cholestérol est l'attaque du cycle A (Zianveni, 1982). La 9 α -hydroxylation et la déshydrogénation sont deux étapes principales dans la transformation de l'AD en sécophénol et la dégradation du noyau stéroïde. La coupure de la chaîne latérale se fait selon un mécanisme de β -oxydation comme c'est le cas avec le genre *Rhodococcus*. Néanmoins, et selon le microorganisme, la dégradation du noyau stéroïde peut être plus ou moins rapide que le clivage de la chaîne latérale (Kreit, 1999).

La dégradation totale des stérols, par les microorganismes, sans accumulation d'intermédiaires à structure stéroïde s'est révélée être un résultat décevant. Pour cela, la découverte de l'inhibition de la 9 α -hydroxylase avait une importance capitale. Cependant, la plupart des inhibiteurs de la 9 α -hydroxylase sont toxiques et ont un effet inhibiteur sur la croissance des cellules (Malaviya et Gomes, 2008).

En 1972, l'équipe de Marsheck de la compagnie G.D. Searle (USA) a isolé deux mutants de *Mycobacterium* capables d'accumuler l'AD et l'ADD sans dégradation du noyau stéroïde et en absence de tout inhibiteur de la 9 α -hydroxylase. Ces mutants sont obtenus par irradiation à la lumière UV de mycobactéries du sol et ont été identifiés ultérieurement

comme *Mycobacterium* sp. NRRL-B3683 (i.e. DSM 2966) et *Mycobacterium* sp. NRRL-B3805 (i.e. DSM 2967). Le deuxième est déficient en Δ^1 -déshydrogénase et permet d'accumuler l'AD. Depuis, de nombreux travaux sont effectués sur la biotransformation des stérols en AD et ADD avec ces deux mutants. Nous les avons également choisis pour réaliser

5 notre étude.

4.2.3. Avantages des *Mycobacteria*

Les *Mycobacteria* ont les mêmes caractéristiques qui font des *Rhodococci* des biocatalyseurs efficaces : une croissance rapide, une hydrophobicité de leur membrane plasmique, une résistance aux conditions de stress ainsi que la capacité à consommer des

10 substrats hydrophobes grâce à un système enzymatique puissant (Lyew et al., 2007; Hartmans et al., 2006; Kreit, 1999). Les espèces du genre *Mycobacterium* sont les plus citées dans la littérature au niveau de la biotransformation des stérols (Sripalakit et al., 2006). Le clivage sélectif de la chaîne latérale des stérols est majoritairement effectué par les mutants ne nécessitant pas l'ajout d'inhibiteurs pour la 9 α -hydroxylase.

5. PROBLEMATIQUE

Deux problèmes majeurs sont rencontrés dans la plupart des systèmes de biotransformation : la faible solubilité du substrat et la stabilité limitée du biocatalyseur (Liese, 2000). Le problème de solubilité a des effets négatifs sur l'incorporation des substrats par les cellules ; celle-ci étant la première étape dans la biotransformation d'une substance

20 (Rajkhowa et al., 2000). En effet, pour être métabolisée, une substance doit être transportée à l'intérieur de la cellule en traversant la membrane cellulaire ; lorsqu'il s'agit de substrats à caractère lipophile insoluble, la biodisponibilité du substrat est faible.

Les mécanismes d'incorporation des substrats lipophiles par les microorganismes ne sont pas encore bien élucidés (Angelova et Schmauder, 1999). Dans le cas des substrats

25 lipophiles liquides comme certains alcanes (solubilité <0.1g/L), quatre hypothèses ont été avancées pour expliquer leur assimilation par les microorganismes (**Figure 20**, page 39) (Vandecasteele, 2005; Angelova et Schmauder, 1999):

(A) La fraction soluble du substrat est assimilée par les microorganismes directement ; le substrat pénètre donc dans la cellule sous forme solubilisée (**Figure 20A**).

(B) La deuxième hypothèse, illustrée dans la **Figure 20B** est l'accèsion interfaciale ; les microorganismes à paroi hydrophobe, adhèrent à la surface des gouttelettes de substrat présentes dans le milieu aqueux, souvent de taille très supérieure à celle des bactéries. Le substrat pénètre directement dans la cellule par diffusion ou transport actif sans dissolution préalable dans la phase aqueuse.

(C) Pour accélérer le transfert des hydrocarbures, les microorganismes produisent des biosurfactants pour augmenter l'aire interfaciale entre les phases hydrophobe et hydrophile ; Il s'agit alors d'une pseudosolubilisation (**Figure 20C**).

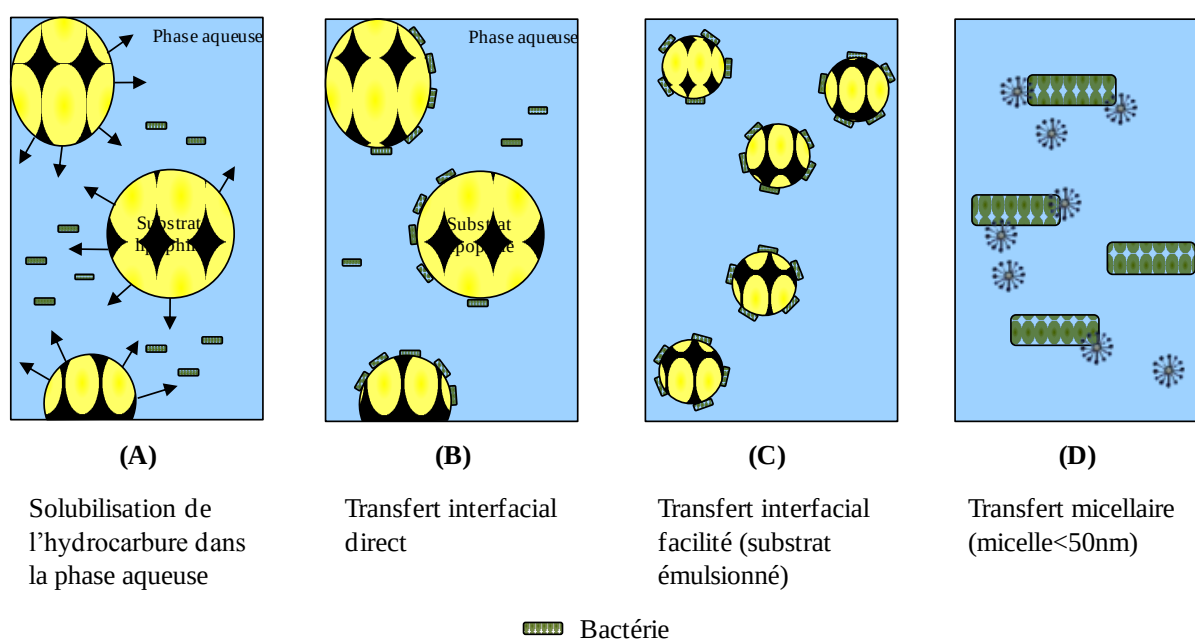


Figure 20: Les mécanismes d'accèsion des microorganismes aux substrats lipophiles (Nicolau, 2008).

(D) La quatrième et dernière hypothèse est la formation d'une microémulsion par des biosurfactants produits par le microorganisme. Les micelles ainsi formées, de taille inférieure aux bactéries, entrent en contact avec la cellule (**Figure 20D**).

Cependant, lorsqu'il s'agit de substances lipophiles solides, l'assimilation du substrat par le microorganisme est beaucoup plus compliquée. Les mécanismes d'incorporation des substrats solides par les microorganismes sont encore inconnus (Rajkhowa et al., 2000). Dans notre travail, les substrats étudiés, appartenant à la famille des triterpènes tétracycliques, sont pratiquement insolubles dans l'eau. La solubilité des stérols est inférieure à 1 μM (Goetschel

et Bar, 1992) ; la fraction soluble assimilée par la bactérie selon la première hypothèse est donc négligeable, le reste du substrat est dans le milieu sous forme de particules solides en suspension (Cresnar et Zakelj-Mavric, 2009).

La consommation et l'incorporation de ces particules solides s'expliquent par deux phénomènes : le contact direct entre le microorganisme et la particule de stérol par exemple (Atrat et al., 1991; Goswami et al., 1983), et le transfert, via la phase aqueuse, par pseudosolubilisation (Rajkhowa et al., 2000; Goswami et al., 1983). En effet, les microorganismes utilisés dans la biotransformation des triterpénoïdes, comme les *Mycobacteria* et les *Rhodococci*, ont une paroi hautement hydrophobe ; cette hydrophobicité élevée permet leur adhésion à la surface des particules solides (Angelova et Schmauder, 1999) et entraîne souvent une forte tendance à l'agrégation. L'incorporation du substrat par adhésion est cependant limitée par la surface des particules ; une diminution de la taille de ces particules permet d'avoir une plus grande surface pour l'adhésion des cellules et par suite augmenter le taux d'incorporation et de biotransformation du substrat (Malaviya et Gomes, 2008).

Le deuxième mode d'incorporation des substrats solides est la pseudosolubilisation ; il s'agit de la formation de particules d'environ 450 nm de diamètre dispersées uniformément dans le milieu aqueux. La production de protéines extracellulaires aidant à la pseudosolubilisation des stérols est observée chez *Arthrobacter simplex* (Rajkhowa et al., 2000) .

D'après ce qui précède, la biotransformation des substances hydrophobes dépend essentiellement de l'interaction entre le biocatalyseur et le substrat à transformer (Malaviya et Gomes, 2008). Dans le domaine de substances lipophiles, et en particulier les triterpénoïdes et les stérols, la recherche est ciblée vers l'augmentation de cette interaction. Les techniques étudiées dans la littérature sont présentées dans les paragraphes suivants et l'immobilisation des cellules fera l'objet du paragraphe 6.

5.1. Utilisation de solvants organiques miscibles à l'eau

Il s'agit de dissoudre le substrat dans un solvant organique miscible à l'eau tel que le méthanol (Yang et al., 2007; Arinbasarova et al., 1996), l'éthanol (Famarzi et al., 2008; Xiong et al., 2006; Holland et al., 1995), l'acétone (Srivastava et Shridhar, 1994; Lee et al., 1993), le diméthylformamide (Wang et al., 1997; Weber et al., 1995) ou le propane-1,2-diol

(El-Hadi, 2003). Comparé à l'éthanol et l'acétone, le méthanol a un effet solubilisant plus grand dans le milieu de culture et est moins toxique pour les microorganismes, conduisant de ce fait à un taux de bioconversion de substrat plus grand (Yang et al., 2007). Cependant, ces solvants restent d'une utilisation limitée à cause de leur effet inhibiteur vis-à-vis de la croissance des microorganismes ou vis-à-vis de leur activité de transformation (Kreit, 1999). En effet, le volume de la phase organique ne doit pas dépasser 5% de celui de la phase aqueuse pour éviter la désactivation des enzymes microbiennes (Fernandes et al., 2003).

5.2. Utilisation de tensioactifs

La dissolution des substrats dans des tensioactifs diminue leur caractère hydrophobe et augmente leur biodisponibilité pour les microorganismes. Une large gamme de tensioactifs est utilisée dans ce domaine : le Tween 80 (Pérez et al., 1995; Smith et al., 1993), le Tween 20 (Cruz et al., 2004) ou encore la lécithine (Fernandes et al., 1995; Lee et al., 1993). Cependant, les tensioactifs sont toxiques pour les microorganismes, même à faible concentration (3 g/L pour le Tween 80) et provoquent la formation de mousse qui est problématique dans les procédés de fermentation. En plus, il faut prendre en considération le temps et l'énergie nécessaire pour préparer les suspensions ou les émulsions et la difficulté de récupérer les produits à partir de ces substances amphiphiles (Wang et al., 2002).

5.3. Ajout de cyclodextrine

La cyclodextrine est une «molécule-cage» à surface externe hydrophile et cavité hydrophobe ; la complexation du substrat avec la cyclodextrine augmente la biodisponibilité de celui-ci (Manosroi et al., 2008). La complexation de la cortexolone avec la β -cyclodextrine (1:0,6) augmente son taux de bioconversion en cortisol de 45% à 75% par *Curvularia lanata* VKMF-644 (Mahato et Garai, 1997). De même, cette technique a un effet positif sur le clivage de la chaîne latérale des stérols et la production d'AD et d'ADD en facilitant le transport des substrats à travers la membrane cellulaire (Kumar et al., 2001; Hesselink et al., 1989). Les dérivés alkylés de la cyclodextrine, comme le diméthyl-, triméthyl- ou hydroxy-, propyl- β -cyclodextrine rendent plus efficaces les réactions d'oxydation par les microorganismes (Mahato et Garai, 1997). Cependant la complexation du substrat avec la cyclodextrine nécessite elle-même l'utilisation de grandes quantités de solvants.

5.4. Système biphasique

Dans ce système, les cellules microbiennes sont en suspension dans la phase aqueuse tandis que la phase organique renferme le substrat et le produit de sa transformation. La catalyse a lieu lors du contact entre les deux phases, généré par une agitation adéquate (León et al., 1998). Cependant, la toxicité des solvants organiques envers les microorganismes et la diminution du transfert de matière entre les deux phases, au fur et à mesure que la réaction progresse, rendent difficile le choix du solvant. Une agitation adéquate du milieu et l'utilisation des surfactants peuvent augmenter le transfert de matière entre les deux phases ; quant à l'effet toxique des solvants organiques sur les cellules, il peut être limité par l'immobilisation des cellules sur des supports solides (décrite ci-après) ainsi que par le choix de souches résistantes (Llanes et al., 2001; Fernandes et al., 1995). Dans ces systèmes biphasiques, les cellules se trouvent à l'interface entre les deux phases (organique et aqueuse), et adhèrent aux gouttelettes de solvant sans y pénétrer (Carvalho et al., 2004). Ainsi, une augmentation de la vitesse d'agitation doit conduire à une augmentation de l'interface et par conséquent une augmentation du taux de bioconversion. Cependant, l'équipe de Cruz (2001) a observé que la bioconversion est influencée principalement par le rapport volumique entre la phase organique et la phase aqueuse plutôt que par la vitesse d'agitation (150-300 rpm) (Cruz et al., 2001). Le rapport optimal entre la phase aqueuse et la phase organique dépend de la nature des substrats et des produits, de la composition de la phase aqueuse et du microorganisme utilisé pour la biotransformation. La production de la 6-méthylèneandrosta-1,4-diène-3,17-dione à partir de la 6-méthylèneandrost-4-ène-3,17-dione est réalisée par *Arthrobacter simplex* dans un système biphasique avec le toluène comme phase organique et un tampon phosphate de potassium comme phase aqueuse. Un rendement maximal de 99% de bioconversion est obtenu avec un rapport phase organique:phase aqueuse de 95:5 (v :v) ; la concentration initiale du substrat étant de 60 g/L (Fernandes et al., 2003). Dans les systèmes biphasiques, le substrat peut être ajouté à des concentrations élevées, pouvant aller jusqu'à 80 g/L comme dans le cas de la progestérone dans l'acétate d'éthyle (Houng et al., 1994).

L'inconvénient majeur de cette approche réside dans l'utilisation de grandes quantités de solvants souvent toxiques et non éco-compatibles. La catalyse en deux phases (solvant organique non miscible/milieu aqueux), a un intérêt particulier, notamment pour effectuer une transformation monoenzymatique, comme celle de la transformation de cholestérol en cholest-4-ène-3-one par *Arthrobacter simplex* U-S-3011 (Liu et al., 1996).

5.5. Encapsulation sous forme de liposomes

L'encapsulation des substrats dans des liposomes permet d'éviter les effets indésirables des solvants organiques (Fernandes et al., 2003), d'avoir une cinétique de conversion plus rapide et des taux de bioconversion plus élevés qu'avec les autres systèmes (Goetschel et Bar, 1992). L'AD est complètement transformé en ADD en deux heures lorsqu'il est encapsulé dans des liposomes, alors que la transformation de 50% d'AD ajouté sous forme de solution dans l'éthanol (4%) nécessite 3 heures (Llanes et al., 2001). L'oxydation de cholestérol en cholest-4-ène-3-one dans un milieu liposomal est étudiée ; le mécanisme de biotransformation dans ce système est interprété par une interaction directe entre les cellules microbiennes et les vésicules véhiculant le substrat (Goetschel et Bar, 1992). L'encapsulation des substrats a un intérêt uniquement dans les réactions de bioconversion monoenzymatiques. De plus, cette technologie est difficilement exploitable à l'échelle industrielle.

5.6. Système au point de trouble

L'utilisation de surfactants non ioniques à une température supérieure au point de trouble conduit à la formation d'une phase continue de surfactant contenant des vésicules d'eau dispersées (Malaviya et Gomes, 2008). Ces vésicules renferment les cellules qui seront protégées de la toxicité du substrat et de la phase organique. L'équipe de Wang (2005) a appliqué cette stratégie pour transformer le cholestérol et des phytostérols en ADD (Wang et al., 2005). L'application de cette technique dans des conditions d'aseptie et le coût de séparation des produits limitent son exploitation à grande échelle (Marques et al., 2010).

5.7. Augmentation de la perméabilité membranaire

La paroi et la membrane bactérienne constituent une barrière vis-à-vis du transport du substrat à l'intérieur du cytoplasme ce qui diminue le rendement du produit de biotransformation. Certaines substances, comme la vancomycine, la glycine ou la protamine, peuvent augmenter la perméabilité membranaire sans affecter la vitalité des cellules (Malaviya et Gomes, 2008). Par exemple, une augmentation d'environ 25% du taux de bioconversion des phytostérols (0,2 g/L) par *Mycobacterium vaccae* est observée après l'ajout de D,L-norleucine (400 µg/mL) et de surfactants dans le milieu. La D,L-norleucine agit comme inhibiteur de la biosynthèse des complexes lipidiques de la paroi cellulaire (Rumijowska-Galewicz A, 2000).

En résumé, les techniques présentées précédemment améliorent considérablement le rendement des réactions de biotransformation de substrats lipophiles, en particulier le clivage de la chaîne des stérols. Cependant, elles présentent certains inconvénients comme l'utilisation de grandes quantités de produits chimiques, en particulier dans le cas des systèmes biphasiques, et l'utilisation des tensioactifs, alors que la tendance est actuellement à la recherche d'alternatives aux solvants polluants. En outre, la préparation des milieux liposomaux et des émulsions est peu pratique à grande échelle.

Pour toutes ces raisons, nous avons étudié dans ce travail le piégeage des bactéries et des substrats dans ou sur des matériaux poreux comme une autre technique de rapprochement entre le microorganisme et le substrat à transformer. Les avantages et les méthodes d'immobilisation sont discutés dans le paragraphe suivant.

6. TECHNOLOGIE DES CELLULES IMMOBILISEES

Dès les années 1960, l'idée de fixer les biocatalyseurs a assez rapidement débouché sur des applications industrielles comme les électrodes à enzymes fixées, les bactéries adsorbées en vinaigrerie, ou encore les lits bactériens en dépollution. Le **Tableau 1** montre l'application à l'échelle industrielle de cellules immobilisées pour la fabrication de certains produits ; ce sont uniquement des réactions monoenzymatiques.

Tableau 1 : Exemples de produits obtenus à une échelle industrielle à l'aide de cellules immobilisées

Produits	Microorganismes	Auteurs
Vitamine B3	<i>Rhodococcus</i>	(Chuck, 2005)
Vitamine B5	<i>Fusarium oxysporum</i>	(Kataoka et al., 1995)
Acide malique	<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>	Yamamoto et al., 1976
Prednisolone	<i>Corynebacterium simplex</i>	Olhson et al., 1976

6.1. Définition et avantages

L'immobilisation cellulaire consiste à retenir et localiser des cellules microbiennes dans un espace précis du système de biotransformation afin d'obtenir de hautes densités de biomasse active et de conserver leurs activités biocatalytiques recherchées pour la réutilisation (Margaritis et Kilonzo, 2005; Karel et al., 1985). Cette technologie, comparativement aux

systèmes à cellules libres, permet d'augmenter la productivité grâce (i) aux opérations en continu, (ii) à la haute densité cellulaire maintenue dans les réacteurs, (iii) au microenvironnement protecteur des cellules contre les solvants organiques, (iv) à une meilleure stabilité du biocatalyseur et (v) à une potentielle réutilisation (Claudino et al., 2008; Wendhausen et al., 2005; Llanes et al., 2001; Fernandes et al., 1998). Il faut ajouter également que les cellules immobilisées sont moins susceptibles à la contamination et l'attaque par des phages que les cellules libres (Bergmaier, 2002).

Une grande stabilité, permettant 31 cycles de bioconversion sans perte d'activité, et une grande capacité de rétention de cellules sont observées lors de l'immobilisation des cellules d'*Arthrobacter globiformis* 193 dans un cryogel d'alcool polyvinylique pour la déshydrogénation $\Delta 1$ du cortisol (Fokina et al., 1995).

Au niveau de la stabilité, la culture en continu des cellules immobilisées semble plus efficace que la culture en batch. Les fluctuations dans les conditions de culture ayant lieu dans cette dernière affectent souvent le métabolisme cellulaire. Le rendement de la réaction de réduction en C-4 de l'ADD, par des cellules de *Clostridium paraputrificum* immobilisées sur un gel de polyacrylamide hydrazide, diminue de 30% après chaque cycle de bioconversion durant 5 heures ; alors qu'un rendement de conversion supérieur à 95% est maintenu pour 100 heures dans la culture en continu (Abramov et al., 1990). L'incubation dans un milieu nutritif des cellules immobilisées sur plusieurs cycles de bioconversion permet de préserver l'activité biocatalytique (Fernandes et al., 2003).

6.2. Méthodes d'immobilisation

Il existe différentes façons de classer les systèmes à cellules immobilisées. La classification basée sur la nature de l'interaction responsable de l'immobilisation est parmi celles qui sont les plus utilisées (Báleš, 1994). L'interaction peut être de nature chimique impliquant des liens chimiques, covalents ou autres, entre un groupement réactif de la surface cellulaire et le support, ou entre deux ou plusieurs cellules. Elle peut être aussi de nature physique, ce qui englobe toutes les autres méthodes n'impliquant pas de liens chimiques. Les principaux modes d'immobilisation de cellules sont l'adsorption, l'inclusion, l'encapsulation et la réticulation (Verbelen et al., 2006). La **Figure 21** (page 46) illustre schématiquement ces diverses méthodes.

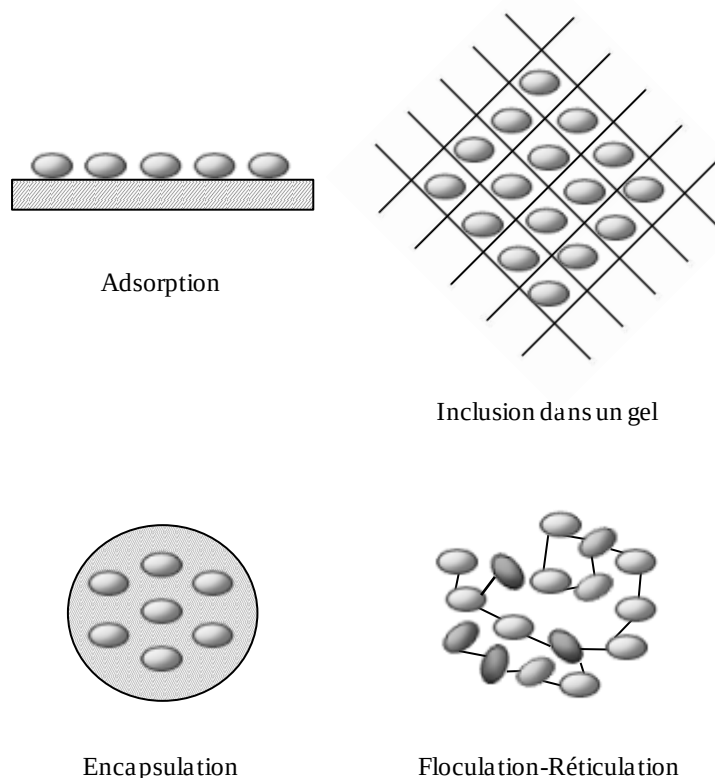


Figure 21 : Schémas des principales techniques d'immobilisation

Le choix de la technique d'immobilisation doit répondre à certains critères. Elle doit :

- être simple et non dangereuse,
 - être réalisable avec un petit nombre d'étapes et d'ingrédients,
 - ne pas générer de sous-produits,
 - être applicable à grande échelle,
 - être adaptable à l'automatisation,
 - conduire à des édifices stables à différents pH et températures
 - être économique
 - permettre de travailler avec de grandes concentrations de biomasses
- (Margaritis et Kilonzo, 2005; Kourkoutas et al., 2004; Bickerstaff, 1997).

Dans ce paragraphe, les méthodes d'immobilisation les plus fréquentes sont succinctement décrites tout en y adjoignant certains exemples concernant la bioconversion des stéroïdes quand cela est possible. L'adsorption sera détaillée dans un paragraphe indépendant.

6.2.1. Agrégation et floculation

Certains microorganismes forment des floccs et des agrégats naturellement. La floculation aide à maintenir une grande biomasse sans l'ajout d'un support pour la croissance (Margaritis et Kilonzo, 2005). Dans certains cas, l'ajout d'un réticulant comme le glutaraldéhyde ou d'agents floculants comme les polyamines est nécessaire (Bickerstaff, 1997). La floculation est influencée par différents facteurs tels que l'âge de la culture, la force ionique et le pH (Margaritis et Kilonzo, 2005). Cette technique est rarement utilisée comme seul moyen d'immobilisation mais elle est souvent associée aux autres techniques d'immobilisation (Bickerstaff, 1997).

6.2.2. Inclusion

La méthode d'immobilisation par inclusion est considérée comme la première méthode d'immobilisation moderne, et elle est attribuée à Mosbach (1966). L'auteur a réussi à immobiliser des cellules vivantes et à démontrer que ces cellules peuvent croître dans la matrice d'inclusion (Margaritis et Kilonzo, 2005).

La méthode d'immobilisation par inclusion semble être simple et douce ; cependant le support doit répondre à certains critères :

- la polymérisation doit se faire dans des conditions douces, sans utilisation de produits chimiques pouvant être toxiques pour les cellules ;
- le support doit prouver une stabilité mécanique ;
- la taille des pores du support doit être suffisamment grande pour laisser passer les substances à transformer tout en empêchant la libération des cellules ;
- le coût de préparation ne doit pas être élevé (Le Bec, 1981).

Dans cette méthode d'immobilisation, le polymère est ajouté à une suspension de cellules dans un tampon phosphate avant polymérisation. Diverses matrices d'inclusion sont connues : le gel d'alginate de calcium, de carraghénanes, de polyacrylamide, les résines epoxy ou la gélatine. Le **Tableau 2** (page 48) présente des réactions de bioconversions de stéroïdes par cellules immobilisées par inclusion, avec les microorganismes catalyseurs, les modes de fixation et leurs auteurs. La méthode d'immobilisation la plus couramment utilisée est l'inclusion dans un gel d'alginate ou de polyacrylamide.

Tableau 2 : Exemples de bioconversions de stéroïdes par cellules immobilisées par inclusion

Réaction Substrat→Produit	Microorganisme	Méthode d'immobilisation	Auteurs
11 α -hydroxylation progesterone→hydroxyprogesterone	<i>Aspergillus ochraceous</i>	Gel d'alginate	(Houng et al., 1994)
11 β -hydroxylation cortexolone→hydrocortisone	<i>Absidia orchidis</i>	Gel d'alginate	(Wang et al., 1998)
Coupure de la chaîne latérale β -sitostérol→AD, ADD	<i>Mycobacterium sp</i>	K-carraghénane	(Dias et al., 1994)
Oxydation TS→AD, ADD	<i>Nocardia rhodocrous</i>	Résine epoxy	(Fukui et al., 1980)
Δ 1-déshydrogénation hydrocortisone→Prednisolone	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	poly-hydroxy ethylmethacrylate	(Naim et al., 2003)
Aromatisation du cycle A 19-nortestosterone→estrone	<i>Rhodococcus sp</i>	Gel d'alginate	(El-Refai et al., 1995)
Oxydation Cholestérol→cholesténone	<i>Noctardia rhodocrous</i>	Gel de polyacrylamide	(Le Bec, 1981)

Le choix du support dépend des conditions opératoires et des réactions étudiées. Un inconvénient majeur des gels d'alginate, est leur instabilité dans le milieu en présence d'agents chélatants du calcium comme les phosphates, l'EDTA ou les ions K^+ et Mg^{2+} . Ces derniers dissocient les liaisons entre le calcium et l'alginate (Ramakrishna et Prakasham, 1999). Cependant, ils sont essentiels pour le contrôle de la biosynthèse des lipides, le maintien de l'intégrité de la paroi et la viabilité des cellules. Pour le gel polyacrylamide, c'est leur toxicité chimique et l'hypertonie induite par le monomère qui limite fortement leur utilisation ; alors que pour les carraghénanes, c'est la taille des pores du gel qui est assez petit pour empêcher le passage des substrats même à faible poids moléculaire (Margaritis et Kilonzo, 2005).

6.2.3. Encapsulation

La microencapsulation consiste au confinement des cellules à l'intérieur d'une microsphère creuse semi-perméable dont la paroi est faite d'un polymère. L'intérieur de la microsphère est rempli avec une solution aqueuse ou un hydrogel (León et al., 1998). Des méthodes d'encapsulation dans des membranes de collagène ou des fibres d'acétate de cellulose ont été décrites (Le Bec, 1981). L'encapsulation, par exemple, de

Mycobacterium fortuitum dans du chitosane pour la bioconversion du β -sitostérol a été étudiée (Steinert et al., 1987).

Ces méthodes présentent deux inconvénients majeurs, d'une part les conditions stressantes auxquelles sont soumises les cellules pour être encapsulées d'où le risque d'avoir des réactions secondaires en particulier lorsqu'il s'agit d'une réaction multienzymatique (Le Bec, 1981), d'autre part les barrières de diffusion dues aux parois et membranes cellulaires et la fragilité des matériaux d'encapsulation (Keshavarz, 2005).

6.3. Immobilisation par adsorption passive

6.3.1. Avantages

Dans le présent travail, nous avons choisi l'immobilisation par adsorption passive des cellules, sur des supports poreux (SP), pour la biotransformation de triterpénoïdes lipophiles. Par rapport aux autres techniques, l'adsorption présente les avantages suivants : (i) Elle est une méthode simple qui ne nécessite pas l'ajout de substances chimiques (Keshavarz, 2005; Ogbonna et al., 1996) ; (ii) Elle ne limite pas l'interaction entre les cellules et les substrats lipophiles (Huang et al., 2007) ; (iii) Elle est applicable à l'échelle industrielle alors que l'inclusion et l'encapsulation nécessite des équipements sophistiqués pour la production à grande échelle ce qui élève le coût du bioprocédé envisagé (Saudagar et al., 2008; Phisalaphong et al., 2007).

6.3.2. Principe

Toute surface en contact avec un milieu nutritif et des cellules en suspension sera colonisée par adsorption de cellules ; c'est le phénomène naturel d'immobilisation des cellules et de la formation de biofilms (Margaritis et Kilonzo, 2005). L'immobilisation par adsorption de cellules à des supports solides est un processus impliquant des interactions de surface entre les cellules et le matériel du support. Ces interactions sont non spécifiques et de nature électrostatique représentées essentiellement par des liens chimiques de type ioniques, liaisons hydrogènes ou encore des interactions hydrophobes (Bickerstaff, 1997).

6.3.3. Considérations

La rétention de grandes densités cellulaires ne peut être réalisée que lorsque des surfaces adéquates du support sont disponibles. De nombreux paramètres concernant la nature

et la structure de la surface du support gouvernent la réussite ou l'échec de l'adsorption des cellules (Bickerstaff, 1997).

Une infinité de structures solides peuvent remplir le rôle de support pour l'immobilisation de cellules. Selon leur nature chimique, ils se distribuent entre deux grandes classes : organique et inorganique. Les supports inorganiques se caractérisent par une très haute stabilité thermique et de bonnes propriétés rhéologiques. Les supports inorganiques les plus utilisés sont les silicates, l'aluminium, le verre, les céramiques et les oxydes de fer (Ramakrishna et Prakasham, 1999). Les supports organiques sont considérés supérieurs aux supports inorganiques, dans une large mesure, grâce à la très grande variété des groupements réactifs qui peuvent être disponibles à leur surface (Kourkoutas et al., 2004). Ces supports peuvent être d'origine naturelle tels que la cellulose (Kourkoutas et al., 2004), la bagasse (Keshavarz, 2005), la sciure de bois (Podorozhko et al., 2008) ou des polymères synthétiques tels que la silicone (Claudino et al., 2008) et les matières plastiques (Ramakrishna et Prakasham, 1999).

Un autre critère important de classification des supports solides concerne leur porosité. Les supports solides poreux sont beaucoup plus avantageux à utiliser que les supports non poreux, et cela autant pour l'immobilisation des enzymes que des cellules (Messing et al., 1979). Ils sont particulièrement désignés pour les procédures passives d'immobilisation cellulaire. Leur surface spécifique élevée, ainsi que leur structure poreuse favorisent considérablement l'immobilisation des cellules aussi bien à l'intérieur des pores qu'à la surface du support.

Pour les supports poreux (SP), principalement inorganiques, la dimension des pores représente une caractéristique majeure de la structure de la surface des supports. Une théorie concernant la dimension optimale des pores pour l'immobilisation de cellules a été proposée (Messing et al., 1979) ; elle devrait être 5 fois plus élevée que la dimension moyenne des cellules se multipliant par fission, et 16 fois plus élevée pour celles qui se multiplient par bourgeonnement.

Le support idéal est celui qui : (i) possède une grande surface massique et des fonctions auxquelles les cellules peuvent s'adhérer, (ii) est facile à manipuler et à régénérer, (iii) retient les cellules pour de longues périodes en conservant leur viabilité et stabilité, (iv) n'affecte pas l'activité catalytique des cellules après immobilisation, (v) présente une porosité uniforme

facilitant l'échange et le transport des substrats et des produits, (vi) présente une stabilité mécanique, chimique, thermique et microbiologique pour ne pas être dégradé par les enzymes, les solvants ou les contraintes hydrodynamiques, et enfin (vii) qui est facile d'utilisation, économique et applicable à l'échelle industrielle (Kourkoutas et al., 2004).

5 Les matériaux testés dans ce travail sont choisis d'une façon à ce qu'ils répondent, dans la mesure du possible, aux caractéristiques d'un support idéal. Ces matériaux sont présentés dans le chapitre Matériel et Méthodes.

6.3.4. Applications dans le domaine des stéroïdes

10 La coupure de la chaîne latérale des stéroïdes par des cellules immobilisées étudiées jusqu'à présent fait intervenir l'immobilisation passive des bactéries par adsorption sur des supports solides de nature minérale (Wendhausen et al., 2005; Llanes et al., 2001; Fernandes et al., 1998; Lee et Liu, 1992) et organique (Claudino et al., 2008; Lee et Liu, 1992).

15 Une productivité volumétrique de 0,19 g/L.j avec une conversion molaire en ADD de 77% est obtenue avec *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 immobilisée sur des supports d'oxyde d'aluminium activé (Lee et Liu, 1992). La concentration de cholestérol était de 1 g/L et la durée de demi-vie des cellules était de 45 jours. L'équipe de Dias (1994) a étudié plusieurs techniques d'immobilisation pour le clivage de la chaîne latérale du β -sitostérol par des mycobactéries. Par rapport à l'adsorption sur une mousse de polyuréthane et l'inclusion dans un gel de K-carraghénane, l'adsorption sur Célite® permet d'obtenir les meilleurs
20 résultats pour la bioconversion du β -sitostérol dans un solvant organique (Dias et al., 1994). Cependant, la présence d'une couche adéquate d'hydratation est nécessaire autour de la Célite® (Llanes et al., 2001; Fernandes et al., 1998).

Des supports organiques tels que les tablettes de silicone (1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 0,8 mm) ont été testées pour la bioconversion du BSS par *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 (Claudino et
25 al., 2008). Les auteurs ont constaté que le silicone est plus performant que la Célite® 560. Une accumulation en AD de 0,436 mM est obtenue avec 1,4 mg de cellules immobilisées (poids sec) sur une tablette de silicone ; alors qu'avec la Célite®, l'accumulation de l'AD n'était que de 0,220 mM avec 2,2 mg de cellules immobilisées (poids sec). Ces supports organiques ne sont cependant pas souvent applicables à l'échelle industrielle du fait de leur coût élevé, de la
30 diffusion restreinte du substrat à travers le support et de leur faible stabilité mécanique (Hideno et al., 2007). Ils sont, de plus, peu biodégradables et polluants pour l'environnement.

6.4. Effets physiologiques de l'immobilisation

En plus d'une stabilité accrue et d'une plus grande biomasse, l'immobilisation des microorganismes peut provoquer une modification de leur croissance, de leur physiologie ou de leur activité métabolique (Rong et al., 2007; Kourkoutas et al., 2004). En effet, il est connu que les conditions d'environnement de l'organisme ont une importance décisive dans l'induction et la répression de certaines de ses enzymes (Lefebvre, 1974). Les travaux de Karstrom, par exemple, sur l'utilisation des sucres par *Leuconostoc mesenteroides* lui permirent de faire une distinction entre enzyme constitutives, toujours présentes, et enzymes adaptatives uniquement présentes si le substrat de l'enzyme ou l'un de ses précurseurs, se trouve dans le milieu. Cette classification fut à l'origine de la distinction fondamentale qui s'imposa ensuite peu à peu, entre les variations phénotypiques et génotypiques. Les variations génotypiques sont dues à des mutations, peu dépendantes des conditions extérieures, spontanées, stables, héréditaires et qui ne touchent qu'une très faible fraction de la population. Par contre, les adaptations enzymatiques dépendent des conditions extérieures et sont des variations phénotypiques transitoires qui résultent de l'induction dans toute la population de caractères détenus par le génome, mais restant inexprimés tant que les facteurs inducteurs sont absents (Lefebvre, 1974). Ainsi, des expériences sur la modification de l'activité biocatalytique des cellules cultivées dans des conditions stressantes et en présence de matériaux poreux seront présentées dans le chapitre suivant.

Les supports d'immobilisation utilisés dans cette étude sont présentés dans le chapitre Matériel et Méthodes (paragraphe 3, page 130). Ces supports, de nature minérale ou organique, sont choisis en fonction de leur structure poreuse et des données bibliographiques, en particulier pour *Luffa cylindrica* qui fait l'objet du paragraphe suivant.

7. *LUFFA CYLINDRICA*

Luffa cylindrica est une plante grimpante de la famille des *Cucurbitaceae* vivant au Moyen-Orient et dans les pays tropicaux et subtropicaux (**Figure 22A**). Le fruit non comestible est cueilli à maturité et séché pour être utilisé comme éponge pour polir la peau (**Figure 22B**).

A *Luffa cylindrica*B Fruit sec de *Luffa cylindrica*Figure 22 : *Luffa cylindrica*

C'est un réseau de fibres interconnectées composées principalement de cellulose (66%), d'hémicellulose (17%) et de la lignine (15%) (Guimarães et al., 2009) formant des microcanaux avec un diamètre de 10-20 μm et des macropores allant jusqu'à 800 μm (Chen et Lin, 2006; Zampieri et al., 2006). La porosité de ces fibres est entre 79-93%, densité (0,02-0,04 g/cm^3) et le volume poreux spécifique est de 21-29 cm^3/g . La stabilité de *Luffa cylindrica* à des pH de 1 à 14 et après 5 cycles d'autoclavage à 120°C pour 20 min est étudiée (Ogbonna et al., 1994) et montre sa résistance comme matériau pouvant être utilisé en biotransformation. De ce fait, le fruit sec de *Luffa cylindrica* a été étudié ces dernières années pour l'immobilisation de différents types des cellules.

L'immobilisation de microalgues *Chlorella sorokiniana* sur *Luffa cylindrica* pour la décontamination des eaux polluées en métaux lourds a été étudiée par l'équipe de Akhtar et al. Les microalgues immobilisées fixent 97,9% de cadmium (10 mg/L) contre 92,7% avec les microalgues libres (Akhtar et al., 2003b). La bio-sorption du nickel (II) dans l'eau par *Chlorella sorokiniana* augmente de 48,08 $\text{mg}/\text{g}_{\text{biomasse}}$ à 60,38 $\text{mg}/\text{g}_{\text{biomasse}}$ lorsque les cellules sont immobilisées. Il faut noter que la présence de *Luffa* seule participe à une biosorption de 6,1 mg/g (Akhtar et al., 2003a).

L'immobilisation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* et du champignon *Rhizopus oryzae* pour la production de bioéthanol est réalisée en utilisant *Luffa cylindrica*

comme support d'immobilisation. *Luffa* assure une productivité volumétrique de 14 g/L.j contre 7,57 g/L.j avec les cellules libres (Chen et al., 2008). Par contre, la production du bioéthanol par les cellules immobilisées s'arrête après 3 jours à cause de la diminution du contact entre les cellules et l'amidon à transformer. Il faut ajouter que les fibres de *Luffa* sont constituées de cellulose et donc sont sujettes elles-mêmes à l'action de la cellulase d'où les travaux de Hiden et al., 2007 sur l'acétylation de *Luffa*. Le greffage de fonctions acétyles sur la cellulose protège *Luffa cylindrica* contre l'action des cellulases sécrétées par les champignons. Dans la production de glucoamylase par des cellules de *Thermomucor indica-seudaticae*, l'immobilisation sur *Luffa* assure une accumulation de 18,5 U/mL par comparaison à 22,7 U/mL obtenue avec les cellules immobilisées dans des billes d'alginate (Kumar et Satyanarayana, 2006). Une autre application de *Luffa* est l'immobilisation de consortiums pour la biodégradation de certains herbicides et fongicides polluants. Par rapport aux cellules planctoniques, l'immobilisation du consortium sur *Luffa* réduit à moitié le temps de biodégradation de ces polluants environnementaux (Pattanasupong et al., 2004).

Au niveau de bactéries, l'immobilisation de *Zymomonas mobilis* sur *Luffa* fait doubler la production de sorbitol par rapport au système à cellules libres (Vignoli et al., 2006). *Luffa cylindrica* a également prouvé son efficacité dans l'immobilisation de *Streptomyces clavuligerus* pour la production d'acide clavulanique (Saudagar et al., 2008).

D'autres applications de *Luffa cylindrica* concernent l'immobilisation de cellules végétales ou animales. La biomasse immobilisée de cellules de *Coffea arabica* est évaluée à 0,42 g_{cellules}/g_{Luffa} (Liu et al., 1998). Pour les hépatocytes de rat, une estimation de 1×10^7 cellules/cm³_{Luffa} est observée (Chen et Lin, 2006).

De ce qui précède, le fruit sec de *Luffa cylindrica* est un support poreux prometteur pour l'immobilisation de bactéries dans la biotransformation de substances lipophiles solides.

8. LES QUESTIONNEMENTS SCIENTIFIQUES ET LES OBJECTIFS

L'un des avantages majeurs des réactions de bioconversion résulte du fait que le milieu réactionnel des biocatalyseurs est l'eau. Ce dit avantage constitue l'une des principales limitations de ces réactions de bioconversion lorsqu'il s'agit de substances lipophiles non solubles dans l'eau (Cabral et al., 1997). L'efficacité d'un procédé de bioconversion de

substances lipophiles solides dépend essentiellement du contact et de l'interaction entre le biocatalyseur et ce substrat lipophile (Angelova et Schmauder, 1999).

Bien que plusieurs travaux aient porté sur l'augmentation de ce contact, ces études ont été focalisées sur les moyens « chimiques ». Ainsi, quatre approches principales ont été
5 décrites, à savoir :

- la bioconversion dans des systèmes biphasiques,
- la bioconversion dans des milieux liposomales ou dans des émulsions
- l'utilisation de surfactants
- la vectorisation avec des molécules cages comme la cyclodextrine.

10 Quant à l'immobilisation des cellules, elle a été étudiée pour son effet protecteur des cellules dans les milieux organiques.

Ces solutions décrites dans la littérature font perdre à la bioconversion son caractère de biotechnologie blanche. En effet, la recherche d'alternatives aux solvants polluants et aux auxiliaires de synthèse est devenue, ces dernières années, une notion importante dans le
15 contexte du développement durable et la tendance chimie verte.

Cette problématique provoque la question suivante : est-ce qu'il y a d'autres moyens pour augmenter l'interaction entre le biocatalyseur et la substance lipophile sans avoir recours aux solutions chimiques classiques ? Face à cette question, nous avons établi l'hypothèse suivante : l'immobilisation passive des cellules dans des supports poreux peut un être un outil
20 précieux pour le rapprochement entre les cellules et les substrats lipophiles, augmentant ainsi très sensiblement l'activité catalytique.

Dans le cas où l'hypothèse est vraie, plusieurs questions en découlent : est-ce que ces supports d'immobilisation peuvent moduler l'activité biocatalytique des cellules sous certaines conditions de stress ? Quels effets peuvent-ils avoir sur la croissance des cellules ?
25 Est-ce qu'ils sont exploitables à l'échelle industrielle ? A quel degré, peuvent-ils augmenter les rendements de la réaction dans un milieu aqueux ?...

L'objectif de ce travail est d'étudier l'immobilisation passive des cellules comme un moyen de rapprochement entre la cellule et la substance lipophile –à transformer- dans un milieu aqueux. La réaction modèle choisie est le clivage de la chaîne latérale du cholestérol

par les mycobactéries pour l'obtention de stéroïdes à forte valeur ajoutée. L'étude comporte alors les volets principaux suivants :

- 5 ○ Recherche sur la possibilité de modification de l'activité biocatalytique des cellules en interaction avec des supports poreux sous certaines conditions de stress. Ceci est fait en vue d'application à d'autres molécules que les stérols.
- Sélection des supports les plus performants pour l'immobilisation des mycobactéries dans la bioconversion des stérols.
- Compréhension du mécanisme d'action du système cellules immobilisées-support.
- 10 ○ Optimisation des conditions expérimentales permettant d'obtenir de taux de bioconversion élevés dans des fioles agitées.
- Bioconversion de stérols dans un réacteur en continu avec les cellules immobilisées.
- Bioconversion dans un fermenteur du laboratoire avant de passer à un fermenteur pilote.

NOTRE ÉTUDE

Note :

Pour faciliter la lecture de ce chapitre et éviter les redondances, les souches sont désignées par leur numéro DSM et les temps en jour par la lettre J. Ainsi :

DSM 43066 désigne la souche *Rhodococcus erythropolis* DSM 43066

5 DSM 43287 désigne la souche *Rhodococcus* sp. DSM 43287

DSM 2966 désigne la souche *Mycobacterium* sp. DSM 2966

DSM 2967 désigne la souche *Mycobacterium* sp. DSM 2967

J3 désigne le 3^{ème} jour d'incubation après l'ajout du substrat.

1. BIOTRANSFORMATION DE CHOLESTÉROL PAR *RHODOCOCCUS*

Les premières expériences de biotransformation de cholestérol, avec les deux souches *Rhodococcus erythropolis* DSM 43066 et *Rhodococcus* sp. DSM 43287, en présence d'un support poreux ont été faites sans ajout d'inhibiteurs de l'enzyme 9 α -hydroxylase qui permet d'éviter une décomposition totale du cholestérol en CO₂ et H₂O. L'objectif était de savoir si la présence d'un support d'immobilisation dans le milieu de culture pouvait moduler l'activité biocatalytique des bactéries.

Des fioles contenant 30 mL de milieu GSM (cf. chapitre Matériel et Méthodes- paragraphe 1.3) et 200 mg de support poreux sont repiquées avec 1,5 mL d'une pré-culture d'environ 48 h, soit un inoculum de 5% (v/v). Les fioles ne contenant pas de support poreux sont considérées comme témoins. La Célite[®]545 et l'Extrelut[®] ont été utilisées comme supports poreux. Le cholestérol à transformer (1,72 mM), dissous dans 1 mL d'acétone est ajouté 48 h après incubation à 30°C, 200 rpm. Cette addition est telle que l'acétone ne représente pas plus que 5% du milieu en rapport volumétrique. Ce milieu réactionnel est agité durant sept jours dans les mêmes conditions que la pré-culture (30°C, 200 rpm). Chaque étude est réalisée en triplicat aux jours 0, 2, 5, et 7; les stéroïdes dans le milieu sont extraits et analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Les figures suivantes présentent le pourcentage massique des produits obtenus en fonction du temps.

Dans la voie catabolique des stérols, la cholestérol-oxydase est la première enzyme agissant sur le cycle A, transformant le 3 β -ol-5-ène en dérivé 3-céto-4-ène. Un seul produit intermédiaire obtenu est identifié par CPG-SM comme étant la cholest-4-ène-3-one (CHO) qui se dégrade ultérieurement très rapidement en CO₂ et H₂O selon les voies de catabolisme présentées dans la **Figure 19** (page 34). Cependant, l'évolution de la biotransformation n'est pas la même en absence et en présence de support poreux dans le milieu pour les deux souches. La quasi-totalité de cholestérol est convertie en CHO (85%) à J2 avec DSM 43066 ; ce CHO se dégrade jusqu'à disparition complète dans le milieu à J7 (**Figure 23A-B-C**, page 60). L'ajout d'un support poreux accélère davantage cette dégradation dans un premier temps : la moitié du cholestérol est dégradée (40% avec l'Extrelut[®] et 60% avec la Célite[®]) et le reste étant converti en CHO ; la présence de cellules immobilisées plus stables que les cellules planctoniques peut expliquer cette augmentation de l'activité catalytique ; cependant la dégradation de CHO accumulée devient relativement lente au-delà de J2 par comparaison

au témoin. Ceci est probablement dû à l'inaccessibilité des cellules pour les molécules de la CHO enfouies dans les pores nanométriques des particules de Célite® et d'Extrelut®.

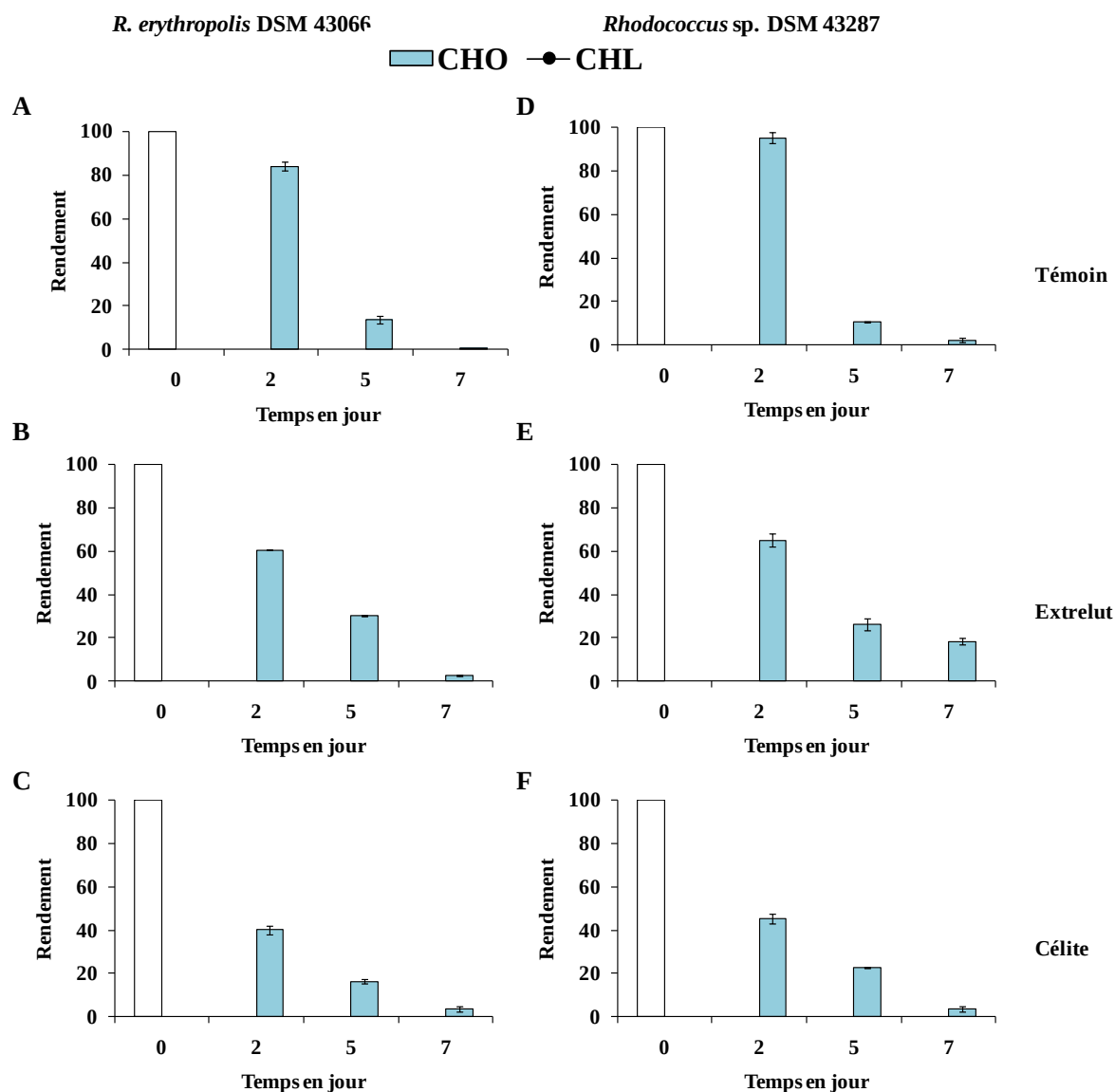


Figure 23 : Effet de la présence d'un support poreux sur la biotransformation de cholestérol par DSM 43066 (A-B-C) et DSM 43287 (D-E-F) dans le milieu GSM. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Support poreux : 200 mg. Inoculum : 5% (v/v). Température : 30°C. Agitation : 200 rpm. J0 = jour d'ajout de cholestérol soit 2 jours après la culture. Le cholestérol disparaît rapidement à J2 avec les deux souches en présence ou absence de supports poreux.

Ces observations sont confirmées avec la souche DSM 43287 (**Figure 23D-E-F**).

La présence d'un support poreux n'a agi que sur la cinétique de la dégradation de CHO sans modification des fonctions biocatalytiques provoquant l'apparition de nouveaux produits.

Un suivi de la dégradation de cholestérol (0,86 mM) pendant 48 h d'incubation avec les deux souches de *Rhodococcus* a été réalisé pour déterminer la durée nécessaire à l'accumulation de la quantité maximale de CHO. Ce CHO, bioproduit, va servir de substrat lors d'autres expériences présentées dans la suite de ce travail (paragraphe 2.4.1). Ainsi, des

5 prélèvements ont été faits après 5, 22 et 48 heures d'incubation. La **Figure 24A** montre que le maximum de CHO bioproduit par DSM 43066 peut être récolté après environ un jour d'incubation avant sa dégradation totale dans le milieu.

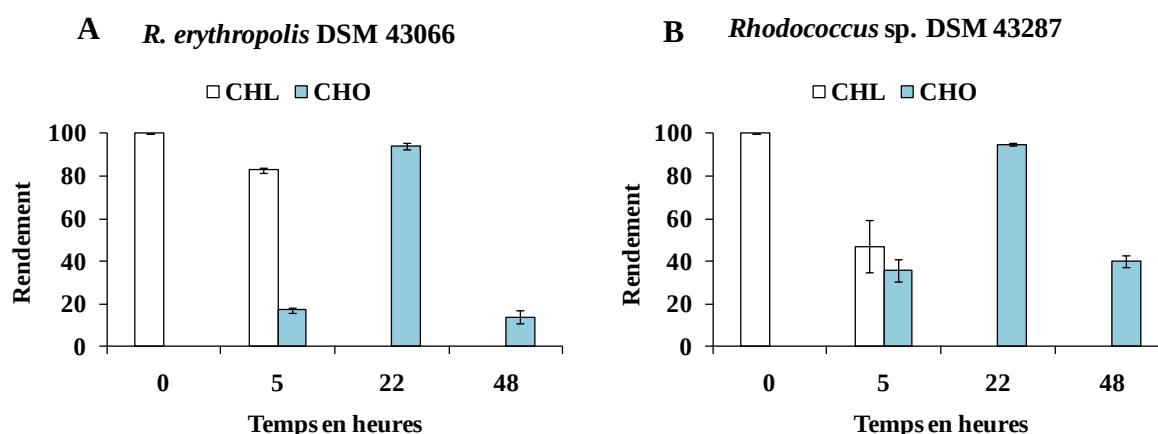


Figure 24: Production de CHO à partir de cholestérol par DSM 43066 (A) et DSM 43287 (B) dans le milieu GSM. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Inoculum : 5% (v/v). Température : 30°C. Agitation : 200 rpm. J0 = jour d'ajout de cholestérol soit 2 jours après la culture.

L'accumulation maximale de CHO (95%) est également observée à J1 avec DSM 43287 (**Figure 24B**). Environ 35% de cholestérol est converti en CHO dans les 5 premières heures d'incubation, soit deux fois plus que CHO obtenu avec DSM 43066

15 (**Figure 24A**). Cette différence entre les deux souches est probablement due à la cholestérol-oxydase impliquée dans la biotransformation. En effet, les espèces du genre *Rhodococcus* produisent l'enzyme sous forme extra et intracellulaire (MacLachlan et al., 2000) ; il est, en plus, connu que l'activité cholestérol oxydasique des cellules est liée principalement à la forme extracellulaire de l'enzyme (Kreit, 1999) et la majorité de la cholestérol-oxydase de

20 DSM 43287 est sous forme extracellulaire.

Pour vérifier cette hypothèse, le milieu riche GSM est remplacé par une solution saline PBS comme un milieu pauvre (cf. chapitre Matériel et Méthodes-paragraphe 1.1.4) et les cellules sont cultivées avec le cholestérol comme seule source de carbone. Dans ces

conditions de culture, l'enzyme extracellulaire est alors pratiquement absente (MacLachlan et al., 2000).

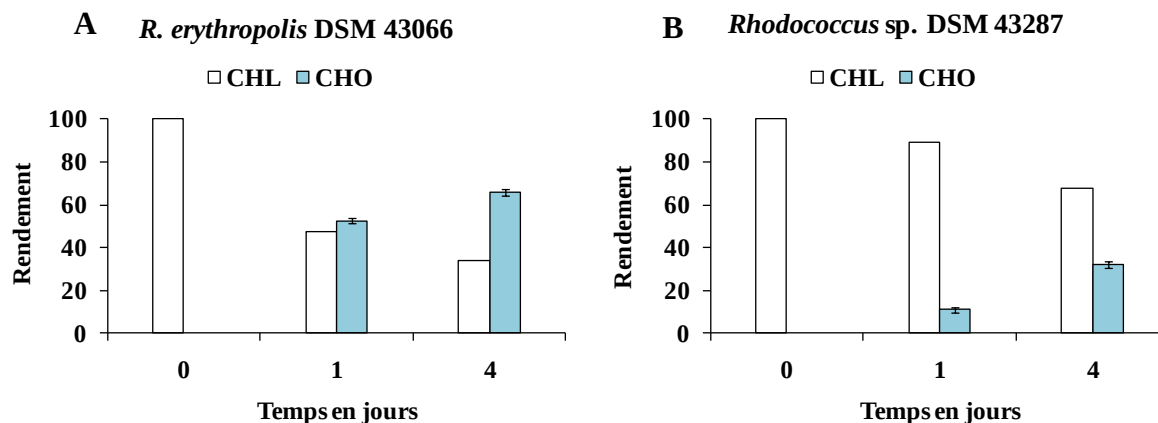


Figure 25 : Production de CHO à partir de cholestérol par DSM 43066 (A) et DSM 43287 (B) dans le milieu PBS. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Cellules : 50 mg (poids sec). Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

La **Figure 25A** montre que la moitié de cholestérol est convertie en CHO avec DSM 43066 à J1 alors qu'environ 10% seulement de CHO est produit par DSM 43287 dans les mêmes conditions (**Figure 25B**). Ce résultat, renforce l'hypothèse selon laquelle c'est l'oxydase extracellulaire qui est responsable de la quasi-totalité de la bioconversion du cholestérol en CHO.

2. BIOTRANSFORMATION DE CHOLESTEROL PAR *MYCOBACTERIUM*

Les résultats présentés dans les paragraphes suivants représentent les moyennes de trois répétitions pour chaque expérience. Certaines expériences sont répétées à leur tour deux ou trois fois. Les analyses ont été faites par CPG et CLHP (Chapitre Matériel et Méthodes, paragraphe 4). Les histogrammes représentent les résultats bruts obtenus et les calculs du taux de bioconversion, du rendement et de la sélectivité (Chapitre Matériel et Méthodes, paragraphe 5.5) sont faits à l'aide des courbes d'étalonnage.

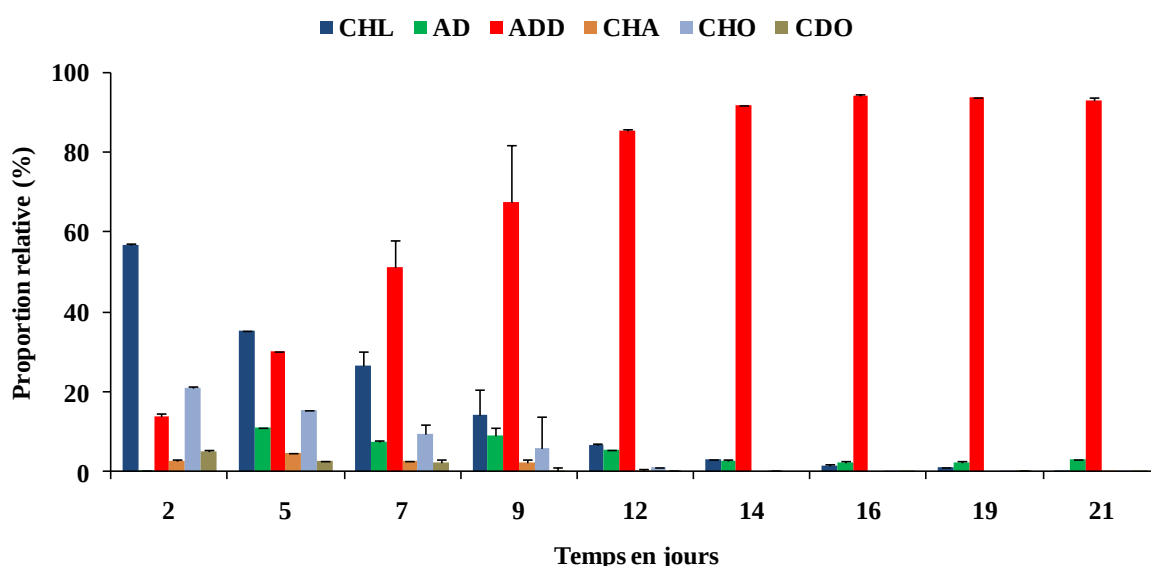
2.1. Identification des produits obtenus dans le milieu TSB

Dans une première étape, la conversion de cholestérol a été étudiée avec les cellules de *Mycobacterium* dans le milieu TSB (cf chapitre Matériel et Méthodes-paragraphe 1.1.2). Le

cholestérol (0,86 mM) en solution dans l'acétone (1 mL) est ajouté à une culture (30 mL) de 72 h de *Mycobacterium*. Le mélange réactionnel est agité durant 20 jours à 30°C et 200 rpm. Le cholestérol, en solution dans l'acétone mélangée au milieu de culture, donne un mélange trouble qui empêche toute possibilité de suivre la croissance par mesure de la densité optique.

- 5 L'étude a essentiellement porté sur l'identification des produits obtenus et la cinétique de disparition de cholestérol en fonction du temps.

Les résultats de biotransformation de cholestérol avec la souche DSM 2966 sont présentés dans la **Figure 26**.



- 10 **Figure 26 :** Biotransformation de cholestérol (0,86 mM) par DSM 2966 dans le milieu TSB. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Inoculum : 5% (v/v). Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

Quatre produits ont été identifiés par CPG-SM à J2 : ADD, CHO, la cholestan-3-one (CHA) et la cholest-1,4-diène-3-one (CDO) (**Figure 27**, page 64). L'AD n'est apparu en quantité détectable qu'à J5.

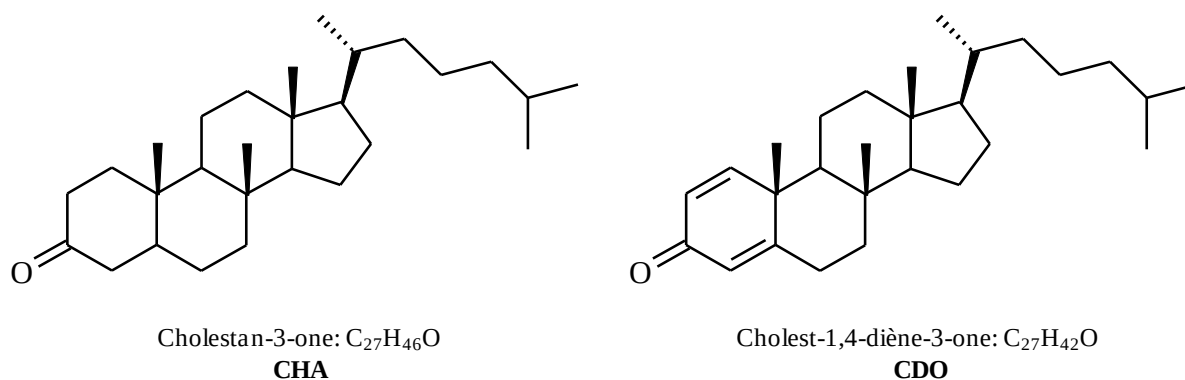


Figure 27 : Structures et formules brutes du cholestan-3-one et du cholest-1,4-diène-3-one

CHA et CDO apparaissent en quantités négligeables dans les 9 premiers jours et disparaissent totalement du milieu par la suite. Quant à CHO, elle atteint son accumulation maximale (20%) à J2 et diminue progressivement en faveur de l'augmentation de l'ADD par coupure de la chaîne latérale. La proportion d'AD est relativement constante ($\approx 10\%$) durant les premiers jours. Elle constitue un intermédiaire de la biosynthèse de l'ADD. Après 14 jours d'incubation, le cholestérol est converti presque totalement en ADD et aucun autre produit n'était observable en quantité significative.

La **Figure 28** (page 65) montre l'évolution dans le temps des diverses proportions de cholestérol et ses produits après incubation avec DSM 2967 dans le milieu TSB. Les produits obtenus sont identifiés par CPG-SM comme étant l'AD, l'ADD, l'androstane-3,17-dione (AND), la testostérone (TS), CHA et CHO. CHA, AND et TS sont produits en faibles quantités tout au long des 21 jours d'incubation ($<10\%$).

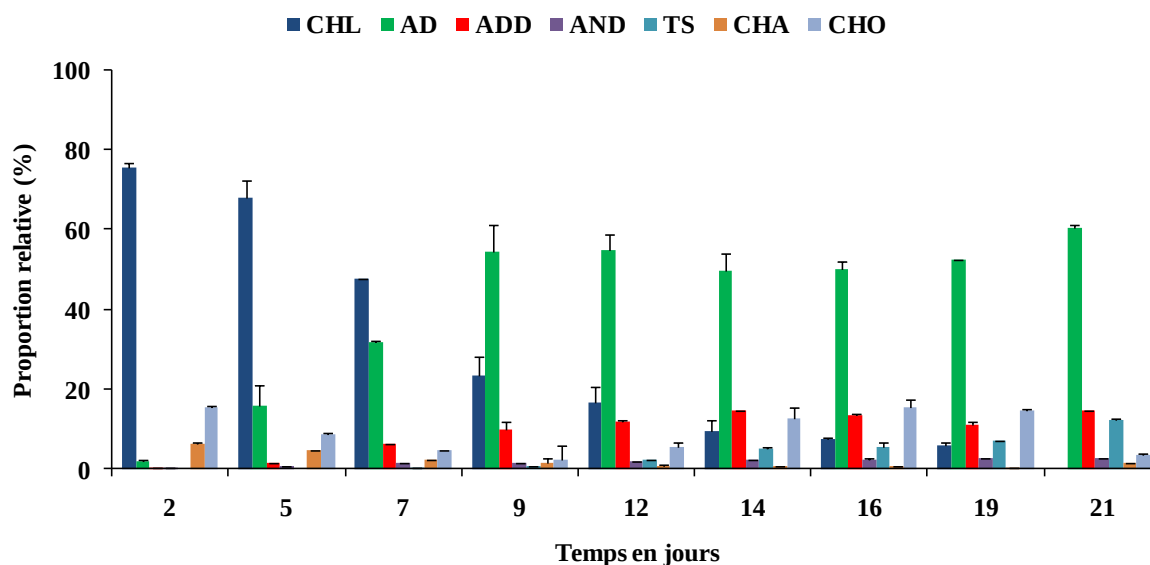


Figure 28 : Biotransformation de cholestérol (0,86 mM) par DSM 2967 dans le milieu TSB. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Inoculum : 5% (v/v). Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

Le maximum d'AD ($\approx 60\%$) est obtenu à J9. Cependant le cholestérol continue à diminuer avec réapparition de CHO dans le milieu. La perte de l'activité catalytique conduisant à l'AD est probablement due à une mort cellulaire après J9 ; la seule activité résiduelle consistant en la conversion de cholestérol en CHO n'était très probablement que le résultat de l'activité de la cholestérol-oxydase extracellulaire.

Conclusion : Tout au long des essais préliminaires, il est apparu que la réaction de dégradation de la chaîne latérale de cholestérol par les mycobactéries était une réaction modèle particulièrement bien adaptée à notre étude. L'ADD et l'AD sont les produits majeurs de la bioconversion de cholestérol par DSM 2966 et DSM 2967 respectivement. Dans la suite de ce travail, nous nous sommes intéressés principalement à ces deux composés ; les autres produits intermédiaires ne figureront que si nécessaire parmi les résultats.

2.2. Influence des conditions de culture sur le métabolisme de cholestérol

Cette série d'expériences a été faite en changeant les conditions expérimentales (la composition du milieu de culture, la concentration du substrat, la température, la présence de support poreux...). L'incubation a été faite sur de longues périodes (30 jours) afin de rechercher d'éventuelles modifications ultérieures des produits formés dans les premiers jours. A noter que les mycobactéries sont connues par leur capacité à survivre sur de très longues périodes dans des milieux minimums sans croissance (Hartmans et al., 2006). Le but

de ces expériences était d'induire des modifications phénotypiques du métabolisme bactérien. Ces modifications se manifestent par des adaptations enzymatiques (dépendantes des conditions extérieures) et par l'expression de capacités biocatalytiques non observées dans des conditions de culture usuelle. En effet, lors des travaux précédents, il a été observé qu'un microorganisme réagit lorsqu'une perturbation se produit dans son environnement parce que sa niche écologique est modifiée. (Fouchard, 2005; Joyeux, 2003). Cette réaction du microorganisme peut se traduire par un changement de son métabolisme. Ces phénomènes sont très étudiés, en particulier par les microbiologistes.

2.2.1. Biotransformation de cholestérol 0,43 mM par des cellules non proliférantes

(a) Témoin

Des cellules non proliférantes (NP) (Poids sec PS 50 mg), préparées après croissance sur le milieu TSB pendant 48 h, sont transférées dans 30 mL de tampon phosphate PBS. Le cholestérol (0,43 mM) est ajouté dissous dans de l'acétone (0,5 mL). Le mélange réactionnel est agité pendant 30 jours à 30°C et 200 rpm. La réaction est arrêtée à J7, J14 et J21. Chaque expérience était réalisée en triplicate pour en étudier la reproductibilité.

Ces expériences sont effectuées en utilisant des cellules non proliférantes, mises au repos dans le tampon PBS, afin de minimiser les interférences provenant du milieu de croissance des cellules. Les autres avantages concernant l'utilisation des cellules non proliférantes de *Mycobacterium* sont la possibilité d'utiliser de grandes concentrations cellulaires, la réutilisation des cellules et la possibilité de travailler dans des conditions non stériles (Wang et al., 2006).

La **Figure 29** (page 67) montre que la plus grande partie de cholestérol est transformée durant les 7 premiers jours d'incubation avec les deux souches ; la bioconversion augmente lentement au-delà de J7 jusqu'à stabilisation à J21. DSM 2967 a permis d'obtenir un plus grand taux de bioconversion de cholestérol à J7 ($X_{CHL} = 0,96$) au bout de 21 jours ; un meilleur rendement en AD ($\eta_{AD} = 0,87$) par comparaison à DSM 2966 ($\eta_{ADD} = 0,70$), souche pour laquelle l'ADD est le produit majoritaire.

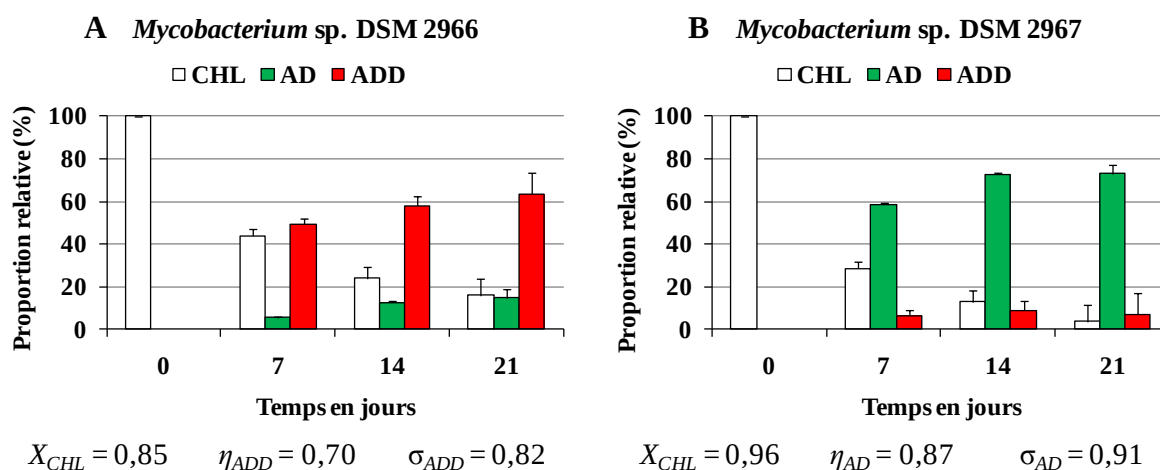


Figure 29 : Biotransformation de cholestérol (0,43 mM) par DSM 2966 (A) et DSM 2967 (B) dans le tampon phosphate PBS. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Cellules NP : 50 mg (poids sec). Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

- 5 Conclusion : Le cholestérol est transformé en ADD et AD par des cellules non proliférantes de *Mycobacterium* en milieu PBS. L'absence de nutriments dans le milieu n'a pas induit de modification de l'activité catalytique en vue de l'obtention d'autres produits que l'ADD et l'AD. La bioconversion de cholestérol est apparemment indépendante de la croissance bactérienne ; d'où la possibilité d'utiliser le milieu PBS comme milieu de biotransformation.
- 10 Ces observations sont en concordance avec les travaux de Wang *et al.*, 2005 sur l'utilisation des cellules non proliférantes comme biocatalyseurs.

(b) *Cellules non proliférantes adsorbées sur zéolithe*

- Les minéraux influencent profondément l'activité et le métabolisme bactérien (Rong et al., 2007). En effet, dans un milieu pauvre, les bactéries ont tendance à sécréter des agents chélatants pour fixer les nutriments et pour adhérer à la surface des minéraux (Perdrial et al., 2009; Hammer, 1990). Ainsi, une incubation semblable aux précédentes mais en présence de 200 mg de zéolithes, non préalablement déshydratées, a été réalisée. Les cellules non proliférantes (Poids sec 50 mg) sont incubées pour quelques heures dans le milieu PBS contenant la zéolithe avant l'ajout de cholestérol (0,43 mM). La zéolithe nous a été fournie
- 15 par l'équipe Matériaux à Porosité Contrôlée (MPC) de l'Institut de Science des Matériaux de Mulhouse (IS2M) sans caractérisation poussée.
- 20

En comparant les résultats présentés dans la **Figure 30A** (page 68) et la **Figure 29A**, nous avons constaté que l'ajout de zéolithes comme supports d'immobilisation des cellules

augmente légèrement le taux de bioconversion par DSM 2966 alors qu'aucun changement n'est observé avec DSM 2967 (**Figure 30B**).

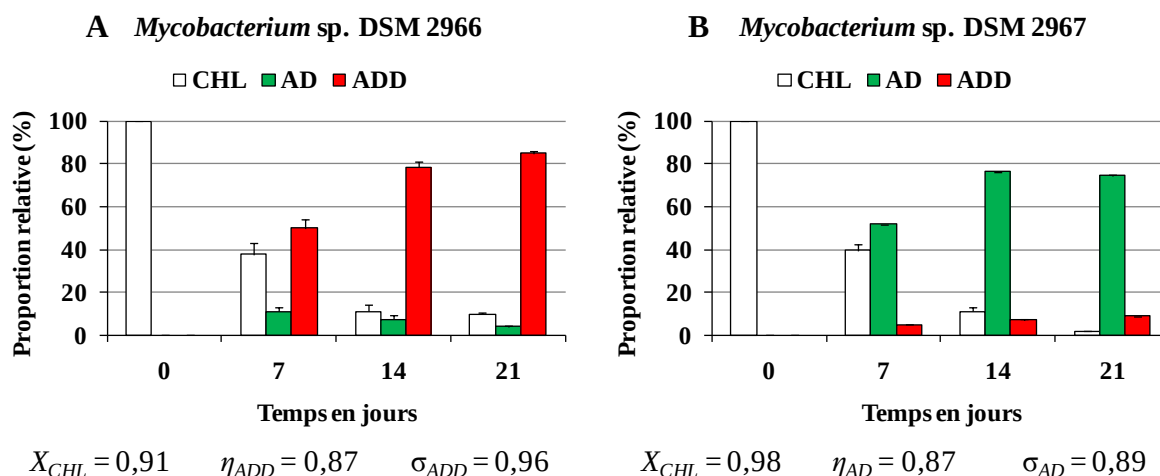


Figure 30 : Biotransformation de cholestérol (0,43 mM) par DSM 2966 (A) et DSM 2967 (B) adsorbées sur zéolites dans le tampon phosphate PBS. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Cellules NP : 50 mg (poids sec). Zéolites : 200 mg. Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

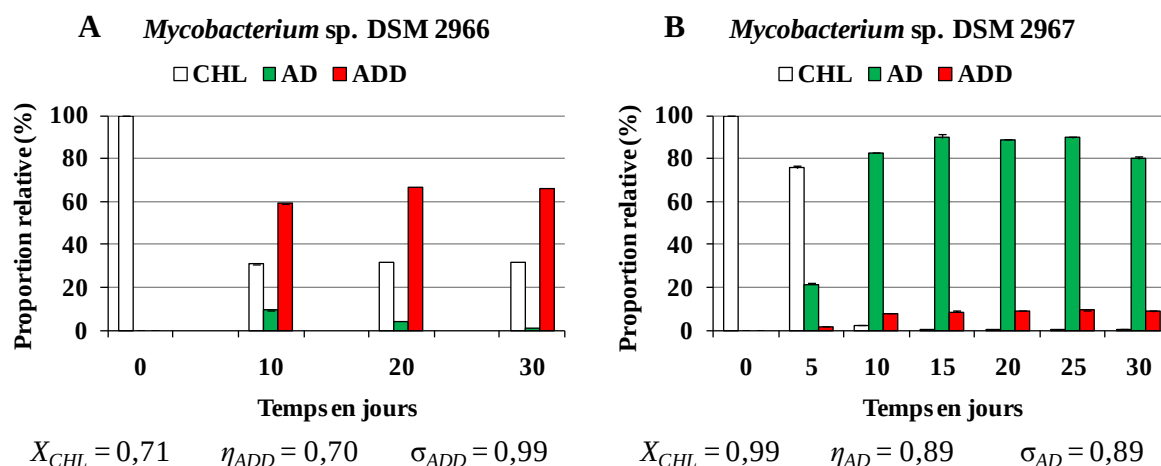
Conclusion : L'utilisation des zéolites comme support poreux n'a pas apporté de modification du métabolisme de cholestérol pour l'obtention de nouveaux produits. Le taux de bioconversion et les rendements sont restés pratiquement identiques. L'étude de l'effet des supports poreux doit se faire dans un milieu saturé en substrat ; sinon, le cholestérol ajouté est biotransformé au bout de quelques jours quelque soit le système étudié. Ainsi, dans les expériences suivantes, la quantité de cholestérol sera doublée.

2.2.2. Biotransformation de cholestérol 0,86 mM par des cellules non proliférantes

(a) Témoin

L'expérience précédente (paragraphe 2.2.1), sans zéolithe, a été réitérée mais en doublant la quantité de cholestérol dissous dans 1 mL d'acétone. La réaction est arrêtée à J10, J20 et J30. La **Figure 31A** (page 69) montre que la bioconversion maximale est obtenue à J10 pour les cellules DSM 2966; le taux de bioconversion de cholestérol est d'environ 0,71 et le rendement en ADD η_{ADD} est de 0,70. Ce dernier est connu par son effet inhibiteur de la respiration cellulaire (Szentirmai, 1990) ; cette inhibition peut expliquer l'arrêt de la réaction à J10 par la mort cellulaire. Cependant, une déshydrogénation de l'AD en ADD est observée après J10 ; cette activité catalytique est probablement due à une forme extracellulaire de

l'enzyme Δ^1 -déshydrogénase. La présence d'une fraction extracellulaire de l'enzyme Δ^1 -déshydrogénase sous forme soluble est observée chez plusieurs espèces d'actinomycètes y compris les *Mycobacterium* (Donova, 2007; Sukhodolskaya et al., 2007).



5 **Figure 31 :** Biotransformation de cholestérol (0,86 mM) par DSM 2966 (A) et DSM 2967 (B) dans le milieu PBS. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Cellules NP : 50 mg (poids sec). Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

La même expérience a été réalisée avec des cellules non proliférantes de la souche DSM 2967. Les prélèvements ont cependant été faits tous les 5 jours. Les résultats sont
10 présentés dans la **Figure 31B**.

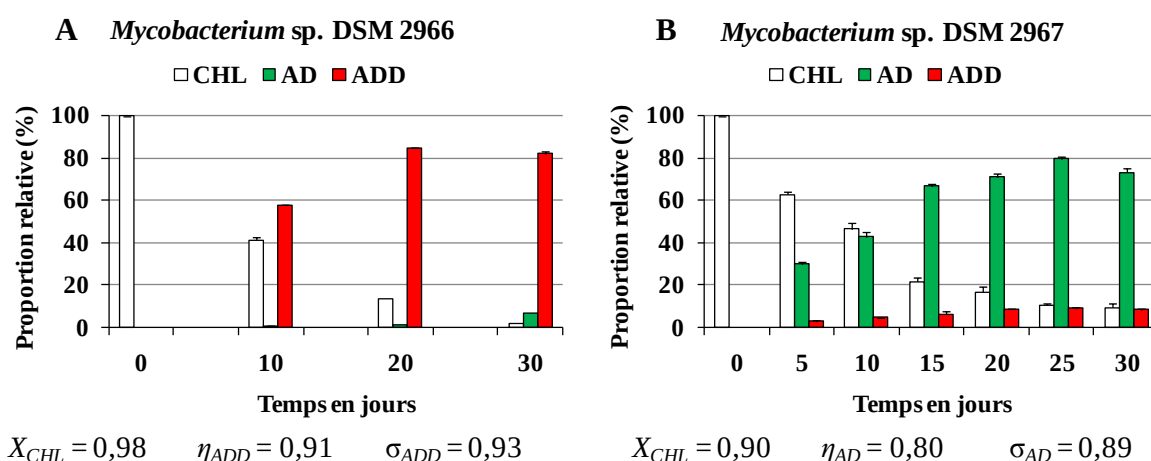
Comme pour DSM 2966, les principaux produits obtenus avec DSM 2967 sont identifiés comme étant l'AD et l'ADD. À J10, presque la quasi-totalité de cholestérol est transformée en AD et ADD ($X_{CHL} = 0,99$) ; les cellules passent par une phase d'adaptation au nouveau milieu avant d'exprimer leurs capacités à transformer le cholestérol ; par
15 conséquence, seulement une faible proportion d'AD est obtenue à J5 comparée à J10.

Les deux souches ont des sélectivités différentes pour leurs produits majoritaires : la sélectivité de DSM 2966 pour l'ADD ($\sigma_{ADD} = 0,99$) est plus grande que celle de DSM 2967 pour l'AD ($\sigma_{AD} = 0,89$). Cependant, la conversion de cholestérol $X_{CHL} = 0,99$ est plus importante avec DSM 2967 permettant d'avoir un meilleur rendement en AD ($\eta_{AD} = 0,89$).

Conclusion : Dans cette expérience, les observations du paragraphe 2.2.1 sont confirmées. Considérant X_{CHL} et σ_{AD} , la souche DSM 2967 paraît plus performante dans ces conditions expérimentales que la souche DSM 2966.

(b) Cellules non proliférantes adsorbées sur Célite®

5 L'immobilisation passive des cellules sur la Célite® a été étudiée selon le même protocole que celui présenté au paragraphe 2.2.1 (page 66). Aucun effet significatif de la présence de Célite® est observé avec DSM 2966 à J10 (**Figure 32A**) ; cependant, le taux de bioconversion de cholestérol ($X_{CHL} = 0,98$) et le rendement en ADD ($\eta_{ADD} = 0,91$) ont considérablement augmenté à la fin de la réaction par rapport à la même expérience menée en
10 absence de Célite® (**Figure 31A**, page 69). Ces résultats sont explicables par une meilleure viabilité des cellules en présence de particules de Célite®, plutôt qu'à la performance de l'activité catalytique proprement dite.



15 **Figure 32 :** Biotransformation de cholestérol (0,86 mM) par DSM 2966 (A) et DSM 2967 (B) adsorbées sur Célite® dans le milieu PBS. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Cellules NP : 50 mg (poids sec). Célite® 545 : 200 mg. Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

Pour DSM 2967, le rendement total en AD ($\eta_{AD} = 0,80$) à la fin de la réaction a diminué légèrement en présence de Célite® (**Figure 32B**). Contrairement aux cellules incubées en absence d'un support poreux (**Figure 31B**, page 69), moins de la moitié de cholestérol est
20 consommée à J10 ; cette observation permet de suggérer une phase d'adaptation des cellules DSM 2967 à la présence de Célite® dans le milieu.

Conclusion: L'adhésion des cellules sur Célite® comme support poreux peut influencer marginalement la cinétique de bioconversion de cholestérol sans toutefois modifier significativement l'activité catalytique en vue de l'obtention de nouveaux produits. Le rendement en ADD est significativement amélioré avec DSM 2966 en présence de Célite®.

- 5 Pour DSM 2967, la vitesse de consommation de cholestérol a légèrement diminué ; cependant le rendement global à la fin de la réaction reste pratiquement inchangé par rapport à l'expérience effectuée en absence de la Célite®.

(c) *Cholestérol adsorbé sur Célite®*

- 10 L'expérience précédente a été reprise de la manière suivante : le cholestérol (0,86 mM), dissous dans l'acétone (1 mL), est déposé sur 200 mg de Célite® puis le solvant est évaporé. Ensuite, les cellules non proliférantes sont ajoutées au milieu PBS contenant la Célite® préalablement préparée. L'idée était de voir si cette stratégie permet d'augmenter le contact entre le cholestérol et les cellules quand celles-ci s'attachent à leur tour sur les particules de Célite® enrobées par le cholestérol. En effet, ce contact direct entre les particules solides de
- 15 cholestérol et les cellules est l'un des deux phénomènes qui peuvent expliquer l'incorporation et la consommation de ces particules par les microorganismes (Atrat et al., 1991; Goswami et al., 1983). Le second phénomène est le transfert via la phase aqueuse par pseudosolubilisation (Rajkhowa et al., 2000; Goswami et al., 1983).

- 20 Les résultats de la **Figure 33B** (page 72) montrent que lorsque le cholestérol est sous forme adsorbé aux particules de Célite®, la conversion est augmentée ($X_{CHL} = 0,56$) par rapport à la même expérience effectuée sans Célite® ($X_{CHL} = 0,32$) (**Figure 33A**, page 72).

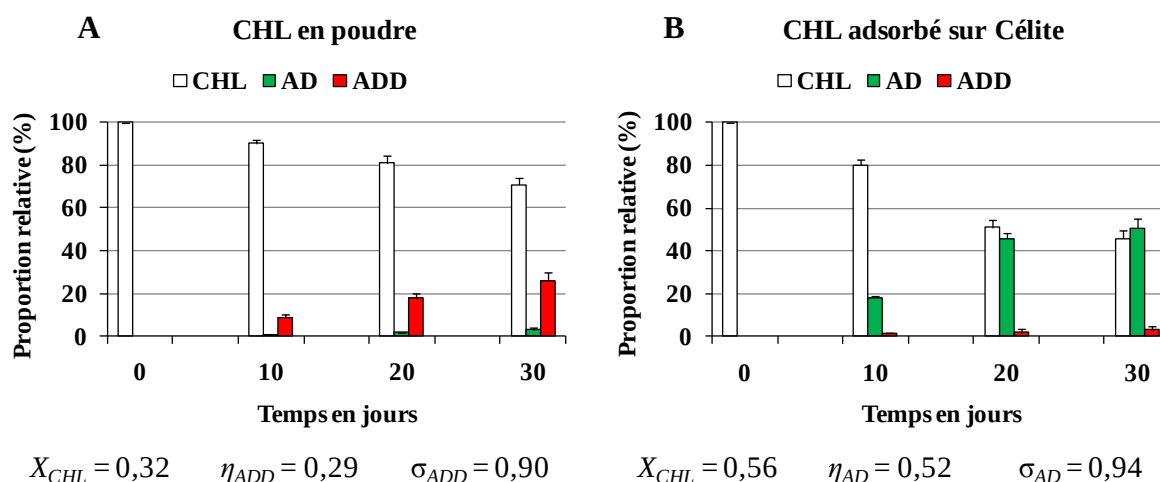


Figure 33 : Biotransformation de cholestérol (0,86 mM) en poudre (A) et adsorbé sur Célite® (B) par DSM 2966 dans le milieu PBS. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Cellules NP : 50 mg (poids sec). Célite® 545 : 200 mg. Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

5 Cet effet positif de l'adsorption de cholestérol sur la Célite® est également observé avec DSM 2967 (**Figure 34**) ; le taux de bioconversion de cholestérol a pratiquement doublé lorsque celui-ci était adsorbé préalablement sur la Célite® (**Figure 34B**).

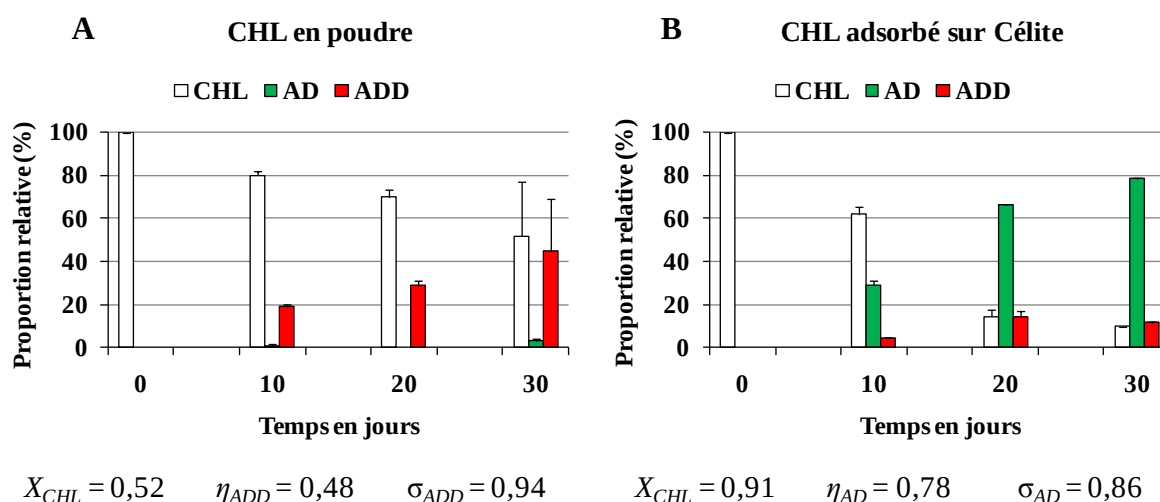


Figure 34 : Biotransformation de cholestérol (0,86 mM) en poudre (A) et adsorbé sur Célite® (B) par DSM 2967 dans le milieu PBS. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Cellules NP : 50 mg (poids sec). Célite® 545 : 200 mg. Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

Conclusion : Le contact direct entre les cellules et le cholestérol est favorisé lorsque celui-ci est ajouté sous forme adsorbé aux particules de Célite® ; par conséquent, la conversion de cholestérol et les rendements en ADD et AD sont augmentés. Cependant, ces résultats restent

moins satisfaisants par rapport à la même expérience (paragraphe 2.2.2 b) effectuée en ajoutant le cholestérol sous forme solubilisée dans de l'acétone. En effet, l'ajout de substrat sous forme micronisé est un outil puissant dans l'augmentation de sa biodisponibilité pour les biocatalyseurs (Malaviya et Gomes, 2008).

5 (d) Induction des cellules

Un fait remarquable qui se dégage des expériences décrites précédemment est le faible pourcentage de transformation de stéroïdes par rapport au temps d'incubation. Il est possible d'interpréter ce fait comme étant dû à un délai nécessaire à l'adaptation des cellules aux stéroïdes. En effet, le catabolisme de la chaîne latérale est régi par quatre groupes d'enzymes inductibles (Szentirmai, 1990). C'est le cas de certaines stéroïdes hydroxylases du cytochrome P450 dont la concentration augmente considérablement après induction par le substrat à transformer (Chen et al., 2007b). Nous avons cherché si la nécessité de l'adaptation des cellules aux stéroïdes - pour que se manifeste la capacité de catabolisme de la chaîne latérale - était due à une activation d'enzymes préformées ou à une biosynthèse de novo d'enzymes sous l'influence du stéroïde inducteur. Ainsi, deux expériences ont été menées de la manière suivante : dans la première, les cellules non proliférantes provenant de la pré-culture sont incubées une nuit dans le milieu PBS contenant 1 mg de cholestérol comme inducteur ; dans la deuxième, l'induction a été effectuée durant la phase de pré-culture. Par convention, les cellules non proliférantes de la première expérience seront désignées par le terme « induites » et les celles de la deuxième par le terme « pré-induites ». Les résultats présentés dans les **Figure 35** et **Figure 36** (page 74) sont à comparer avec ceux de la **Figure 31** (page 69).

Dans le cas des cellules non proliférantes induites de DSM 2966, plus que la moitié de cholestérol est converti à J5 (**Figure 35A**, page 74) ; la conversion totale est presque achevée à J10, alors qu'avec les cellules non induites (**Figure 31A**, page 69), la réaction s'arrête à J10 avec 30% de cholestérol non consommé. Quand l'inducteur est ajouté durant la phase de pré-culture, la plus grande partie de cholestérol (80%) est bioconvertie à J5 et il ne reste quasiment plus de cholestérol à J10. Ces résultats confirment le fait que les enzymes impliqués dans le catabolisme de la chaîne latérale sont inductibles (**Figure 35A**). Les meilleurs résultats étant obtenus en introduisant le substrat dans la pré-culture (cellules pré-induites) (**Figure 35B**).

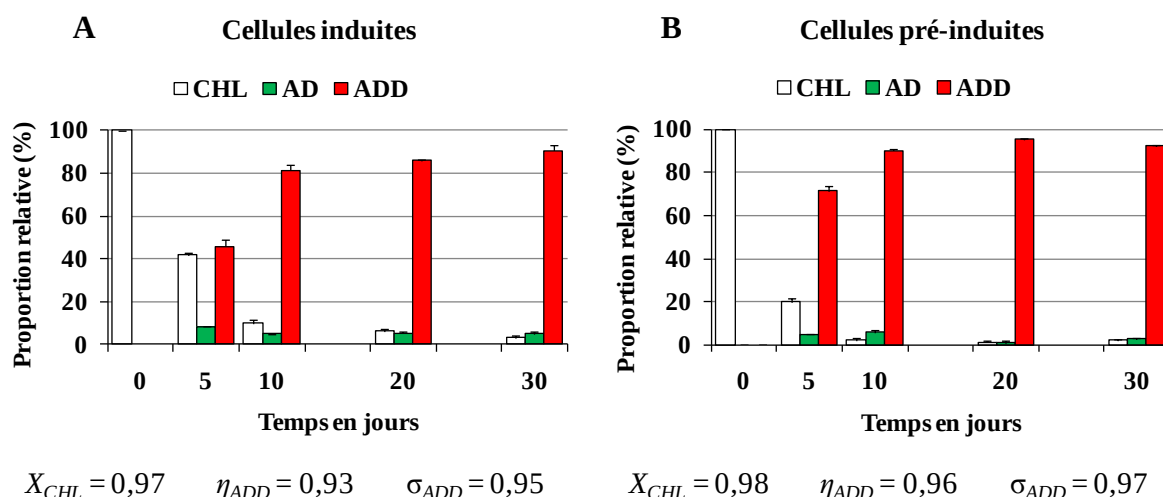


Figure 35 : Biotransformation de cholestérol (0,86 mM) par des cellules induites (A) et pré-induites (B) de DSM 2966 dans le milieu PBS. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Cellules NP : 50 mg (poids sec). Célite® 545 : 200 mg. Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

5 Ces résultats n'ont pas pu être confirmés avec la souche DSM 2967 car la totalité de cholestérol a été transformée à J5 avec les cellules induites (**Figure 36A**) et pré-induites (**Figure 36B**). Il aurait fallu faire l'expérience avec une plus grande concentration de cholestérol (pour les mêmes raisons cités dans la conclusion du paragraphe 2.2.1) et augmenter la fréquence des prélèvements. C'est pour cela que dans la suite les expériences

10 seront effectuées avec 1,72 mM de cholestérol.

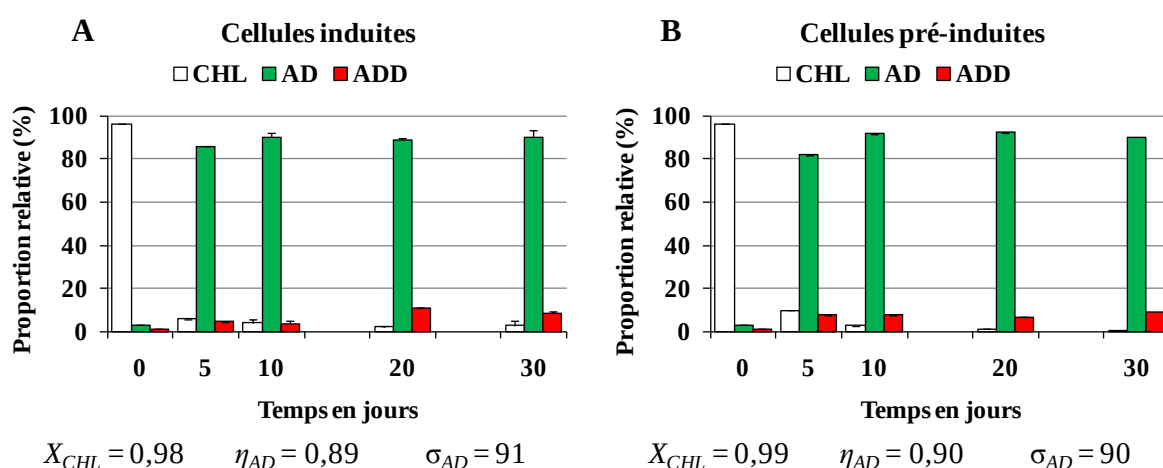


Figure 36 : Biotransformation de cholestérol (0,86 mM) par des cellules induites (A) et pré-induites (B) de DSM 2967 dans le milieu PBS. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Cellules NP : 50 mg (poids sec). Célite® 545 : 200 mg. Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

Conclusion : Dans les conditions étudiées précédemment, l'induction des cellules peut augmenter le taux de bioconversion de cholestérol. Aucun nouveau produit n'a toutefois été détecté pendant les 30 jours d'incubation.

(e) Milieu TSB dilué

5 Dans cette expérience, les cellules (Poids sec 2 mg) provenant d'une pré-culture de deux jours, sont introduites dans 30 mL du milieu TSB dilué au 1/10 dans le PBS et mises à incuber un jour avant l'ajout de cholestérol (0,86 mM). Les prélèvements ont été effectués à intervalles de temps irréguliers.

10 Les résultats montrent que la quasi-totalité de cholestérol est convertie avec DSM 2966 à J20 ($X_{CHL} = 0,96$) alors que DSM 2967 semble, par contre, moins performante dans le milieu TSB dilué avec seulement $X_{CHL} = 0,71$ au bout de 31 jours.

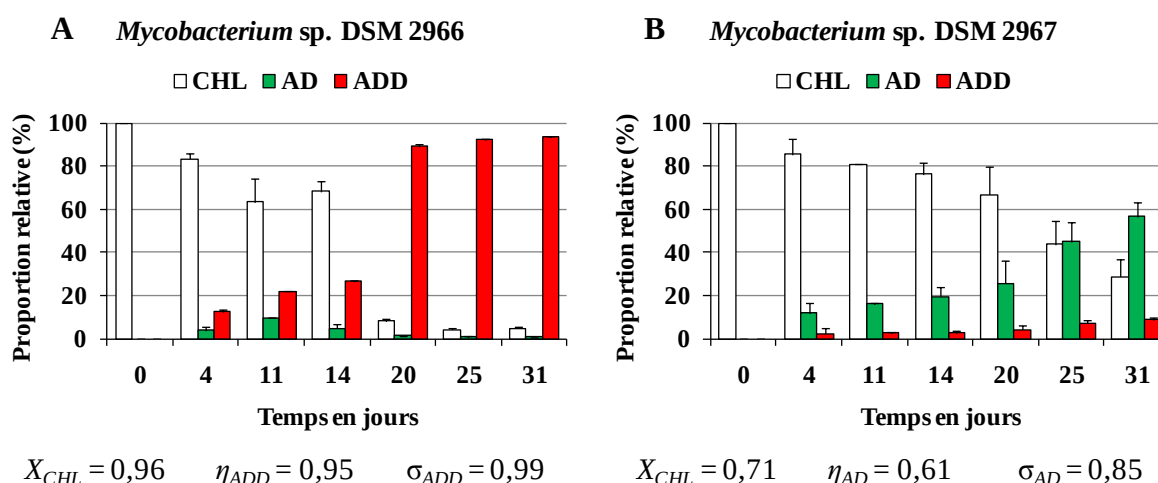


Figure 37 : Biotransformation de cholestérol (0,86 mM) par DSM 2966 (A) et DSM 2967 (B) dans le TSB dilué. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Inoculum : 5% (v/v). Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

La sélectivité de DSM 2966 pour l'ADD est alors à son maximum ($\sigma_{ADD} = 0,99$) (Figure 37A). En effet, quand le facteur limitant la croissance est le glucose, les déshydrogénations en position C-1 fournissant l'ADD dominant (Lefebvre, 1974).

Les analyses par CLHP ont également montré l'accumulation d'autres produits par les deux souches. Après séparation, collecte, et analyse par CLHP-MS, nous avons trouvé que ce sont de produits intermédiaires de formule moléculaires $C_{22}H_{32}O_2$, $C_{22}H_{34}O_2$ et $C_{23}H_{30}O_3$.

Conclusion : L'activité catalytique des deux souches est influencée par les nutriments présents dans le milieu. Dans ces conditions, le taux de bioconversion du cholestérol et la sélectivité obtenus avec DSM 2966 sont plus grands que ceux obtenus avec DSM 2967.

(f) *Milieux PBS, MS et TSB*

5 Pour étudier les liens entre l'activité de biotransformation et la croissance bactérienne, l'expérience précédente est reprise dans trois milieux différents. Le milieu PBS où seule l'activité de biotransformation aura lieu par manque d'azote nécessaire à la croissance. Le milieu TSB qui est un milieu riche supportant la croissance et la biotransformation simultanément. Un troisième milieu nommé MS contient l'acétate d'ammonium (Hartmans et
10 al., 2006) comme source d'azote et le cholestérol à biotransformer comme source de carbone supplémentaire.

Les milieux TSB et MS sont inoculés avec 1,5 mL d'une pré-culture de 2 jours (PS 2 mg) alors que pour le milieu PBS, les cellules d'une culture de deux jours sont récoltées (PS 50 mg) et introduites dans le milieu avant l'ajout de cholestérol.

15 Dans le tampon PBS, le taux de bioconversion de cholestérol par les cellules DSM 2966 à J7 est $X_{CHL} = 0,47$ (**Figure 38A**, page 77). Dans le milieu MS, la conversion est achevée à J3 avec $X_{CHL} = 0,95$ (**Figure 38B**, page 77) ; cette activité accrue est due à une augmentation de la biomasse par prolifération tout en utilisant le cholestérol et accumulant l'ADD et l'AD. Cette augmentation est également observée dans le milieu TSB ; cependant, 30% de
20 cholestérol ont été détectés dans le milieu à J3, ceci est probablement dû à une consommation préférentielle du glucose comme source de carbone en même temps que le cholestérol par les cellules en croissance (**Figure 38C**, page 77).

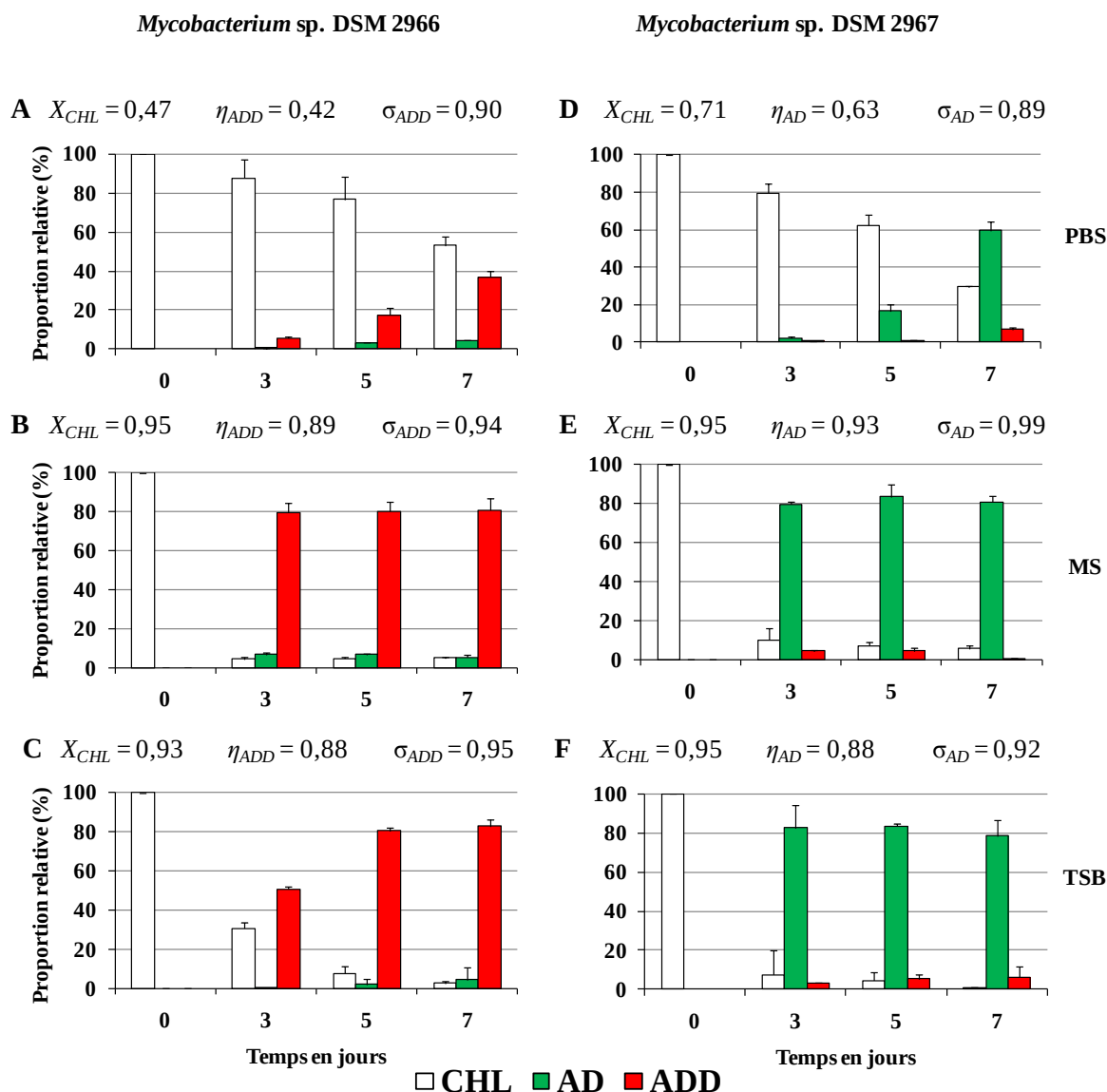


Figure 38 : Biotransformation de cholestérol (0,86 mM) par DSM 2966 dans les milieux PBS (A), MS (B) et TSB (C) et par DSM 2967 dans les milieux PBS (D), MS (E) et TSB (F). Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Cellules : 50 mg (poids sec). Température : 30°C. Agitation : 200 rpm. Pour les milieux MS et TSB l'inoculum est de 5% (v/v).

Dans le milieu PBS, le rendement d'AD accumulé par les cellules non proliférantes de DSM 2967, est de 0,63 (**Figure 38D**). L'incubation dans les milieux MS et TSB permet de transformer 90% de cholestérol à J3 avec un rendement en AD de 0,93 et 0,88 respectivement (**Figure 38E-F**). La bioconversion de cholestérol semble donc être optimale quand les cellules sont en phase de croissance.

Conclusion : Avec les cellules en croissance, le X_{CHL} et les $\eta_{AD(D)}$ sont plus grands qu'avec les cellules non proliférantes (milieu PBS) ; ceci est dû à la plus grande biomasse obtenue par

prolifération des cellules dans les milieux MS et TSB. Les résultats permettent de constater également que la croissance et la biotransformation de cholestérol peuvent se produire simultanément ; d'où l'utilisation du milieu TSB dans la suite de ce travail.

2.2.3. Biotransformation de cholestérol 1,72 mM par des cellules non proliférantes

5 (a) Température de 20°C

La série d'expériences suivantes a été effectuée avec 1,72 mM de cholestérol dissous dans 1 mL d'acétone (1 mL). La biotransformation de cholestérol par des cellules non proliférantes incubées à 20°C a été étudiée. Il est connu que le taux d'oxygène dissous augmente quand la température d'incubation diminue ; le stress oxydatif résultant permet d'envisager un changement dans le métabolisme du substrat.

La **Figure 39B** montre que l'incubation des cellules non proliférantes de DSM 2966 à 20°C diminue le taux de bioconversion de cholestérol par rapport aux cellules incubées à 30°C (**Figure 39A**). Cependant, aucun changement considérable n'est observé dans les proportions des produits extraits au-delà de J20, et ceci pour les deux températures d'incubation.

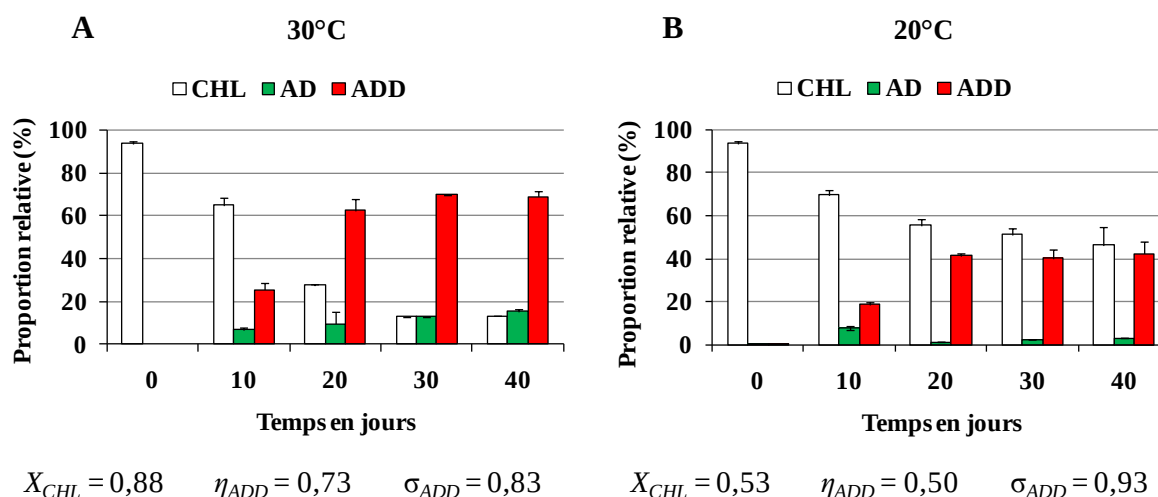
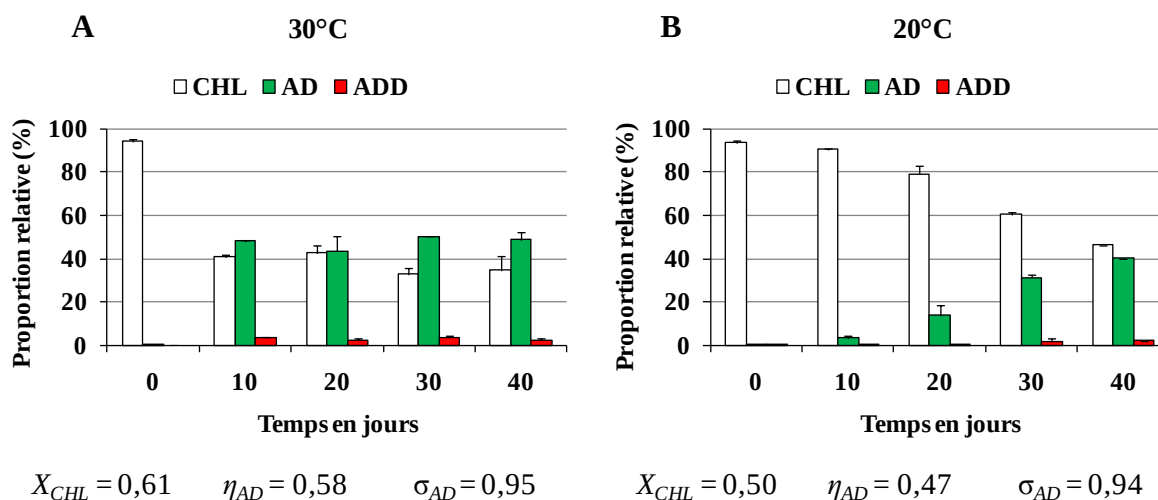


Figure 39 : Biotransformation de cholestérol (1,72 mM) par DSM 2966 à 30°C (A) et 20°C (B) dans le milieu PBS. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Cellules : 50 mg (Poids sec). Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

La bioconversion de cholestérol par DSM 2967 paraît plus influencée par la température que DSM 2966 (**Figure 40**, page 79). A 30°C, la bioconversion s'arrête pratiquement à J10

avec $X_{CHL} = 0,61$ (**Figure 40A**) ; alors qu'à 20°C, les cellules passent par une phase d'adaptation assez longue, de 10 jours, avant d'exprimer leur activité catalytique maintenue jusqu'à la fin de l'expérience (40 jours) (**Figure 40B**).



5 **Figure 40** : Biotransformation de cholestérol (1,72 mM) par DSM 2967 à 30°C (A) et 20°C (B) dans le milieu PBS. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Cellules : 50 mg (Poids sec). Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

Le taux de bioconversion reste pratiquement inchangé avec DSM 2966 après doublement de la quantité de cholestérol de départ (**Figure 31A**, page 69 vs **Figure 39A**, page 78) ; le maximum de bioconversion est cependant atteint à J10 avec le cholestérol à 0,86 mM (**Figure 31A**) contre J20 avec le cholestérol à 1,72 mM (**Figure 39A**). Quant à DSM 2967, le taux de bioconversion a diminué de $X_{CHL} = 0,99$ (**Figure 31A-B**) à $X_{CHL} = 0,61$ en doublant la quantité de cholestérol.

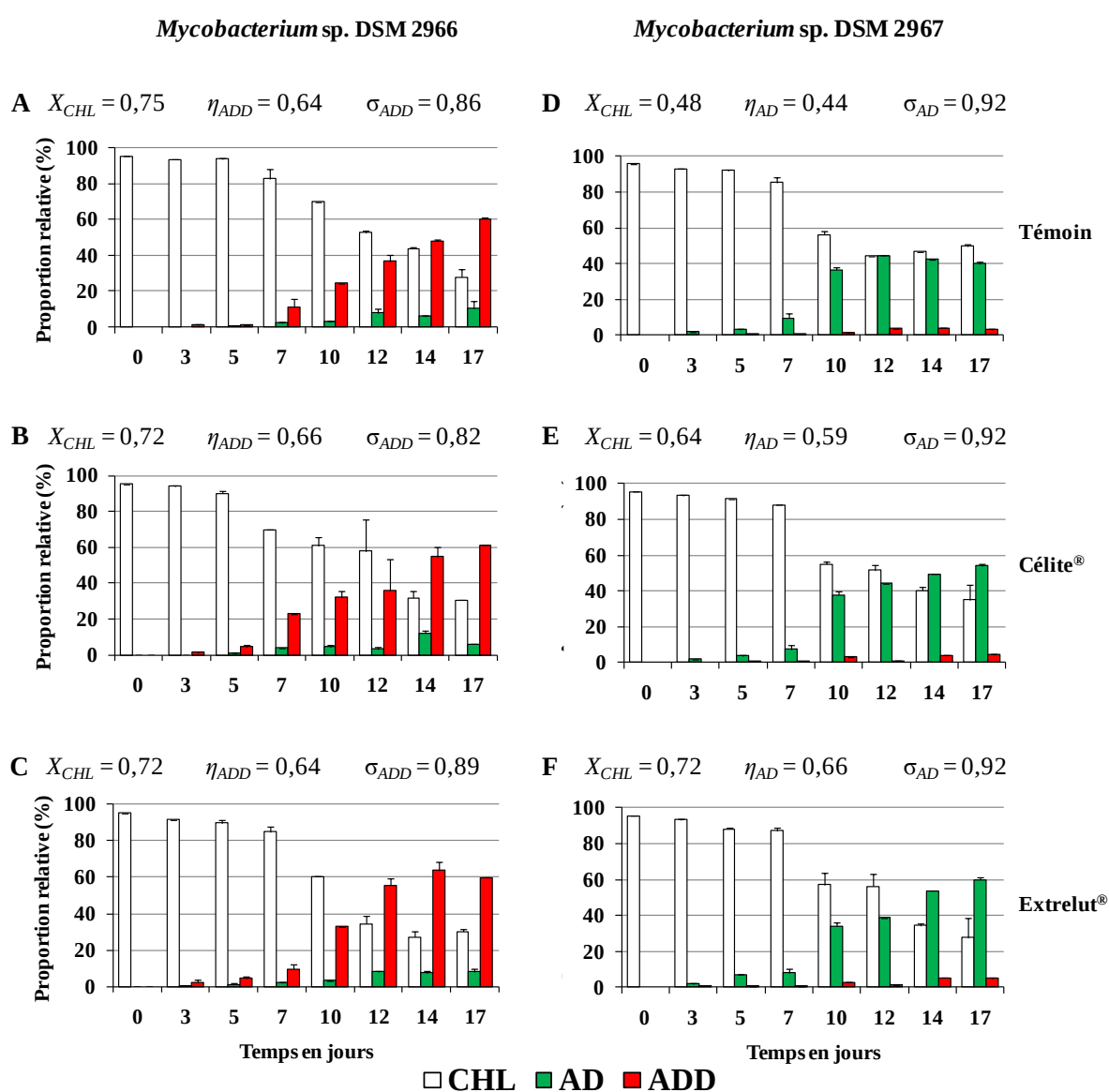
15 Conclusion : La diminution de la température d'incubation a un effet négatif sur la bioconversion de cholestérol par les cellules non proliférantes des deux souches étudiées. DSM 2967 retient son activité catalytique plus longtemps à 20°C. Les principaux produits accumulés sont l'AD, l'ADD avec de faibles proportions de CHO et CDO.

(b) *Cellules non proliférantes adsorbées sur Célite[®] et Extrelut[®]*

20 L'expérience précédente a été reprise uniquement à 30°C mais en augmentant la fréquence de prélèvements pour rechercher d'éventuels produits intermédiaires (**Figure 41A**–

B) avec ajout de 200 mg de Célite® (**Figure 41C-D**) ou d'Extrelut® (**Figure 41E-F**) comme support poreux.

Pour les deux souches, l'activité catalytique n'est pratiquement observée qu'à J7 dans les essais avec ou sans support poreux (**Figure 41**). La présence de ce dernier dans le milieu n'a conduit à aucun effet significatif sur la bioconversion de cholestérol avec DSM 2966 (**Figure 41A-B-C**) ; le maximum de conversion est atteint à J17 ($X_{CHL} = 0,75$). Avec DSM 2967, la bioconversion de cholestérol a augmenté en présence de Célite® ($X_{CHL} = 0,64$) et d' d'Extrelut® ($X_{CHL} = 0,72$) par rapport au témoin ($X_{CHL} = 0,48$) (**Figure 41D-E-F**).



10 **Figure 41 :** Biotransformation de cholestérol (1,72 mM) par DSM 2966 (A) en présence de Célite® (B), d'Extrelut® (C) et par DSM 2967 (D), en présence de Célite® (E) et d'Extrelut® (F) dans le milieu PBS. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Cellules : 50 mg (Poids sec). Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

Conclusion : En réduisant les intervalles de prélèvement, un temps de latence nécessaire est observé pour la bioconversion de cholestérol par des cellules non proliférantes. DSM 2967 semble légèrement influencée par la présence d'un support poreux telle que la Céliste® ou l'Extrelut®.

5 Dans toutes les expériences effectuées dans le paragraphe 2.2., aucune modification importante dans le métabolisme de cholestérol n'est observée. L'utilisation des cellules non proliférantes, l'ajout de support poreux dans le milieu, l'induction des cellules et le changement de température ont permis de modifier légèrement la cinétique de bioconversion de cholestérol avec l'obtention de l'AD et l'ADD. Les autres produits accumulés ne sont que
10 des intermédiaires connus de la bioconversion de cholestérol en AD(D) ; ils représentent environ 10% des produits obtenus.

2.3. Supports d'immobilisation pour la biotransformation de cholestérol

Lorsqu'un biocatalyseur adéquat pour une réaction spécifique est trouvé, un moyen possible pour l'amélioration de ses caractéristiques est son immobilisation (Liese, 2000). Pour
15 cela, nous avons étudié l'influence de différents supports poreux, utilisés comme matrices d'immobilisation, sur la croissance et la biotransformation de cholestérol. Les résultats présentés dans les paragraphes suivants représentent les moyennes d'au moins trois répétitions pour chaque expérience ; les analyses ont été faites par CPG et CLHP.

2.3.1. Influence d'un support sur la biotransformation de cholestérol

20 Des fioles de 100 mL contenant du milieu TSB (30 mL) et un support poreux (200 mg) sont inoculées avec environ 1,5 mL (poids sec 2 mg) d'une pré-culture de deux jours. Les fibres de *Luffa cylindrica* sont ajoutées sous forme de petits disques de 2,5 cm de diamètre et de 3-4 mm d'épaisseur. Ces fioles sont ensuite incubées (30°C, 200 rpm) pendant deux jours avant l'ajout de cholestérol (1,72 mM) dissous dans 1 mL d'acétone. Les stéroïdes dans le
25 milieu sont extraits et analysés par CPG aux J0, J3, J5 et J7. L'expérience a été reprise deux fois. La **Figure 42** (page 82) présente uniquement les résultats de J7 avec les principaux supports testés.

Par rapport au témoin ($X_{CHL} = 0,26$), le taux de bioconversion de cholestérol, par DSM 2966, est légèrement influencé par l'ajout de Céliste® ($X_{CHL} = 0,38$) ou de cordiérite
30 ($X_{CHL} = 0,32$) comme support poreux. Quant à la céramique, aucun effet sur la bioconversion

de cholestérol n'est observé et X_{CHL} demeure inchangé. En revanche, l'ajout de *Luffa cylindrica* dans le milieu permet de convertir presque la totalité de cholestérol ($X_{CHL} = 0,94$) en AD(D) avec $\eta_{ADD} = 0,86$ (**Figure 42A**). Cet effet positif est également observé avec DSM 2967 ($X_{CHL} = 0,76$) ; le rendement en AD ($\eta_{AD} = 0,65$) a considérablement augmenté en présence de *Luffa cylindrica* par rapport au témoin ($\eta_{AD} = 0,39$). En outre, la Célite®, la céramique et la cordiérine n'ont montré aucun effet sur la réaction dans ces conditions.

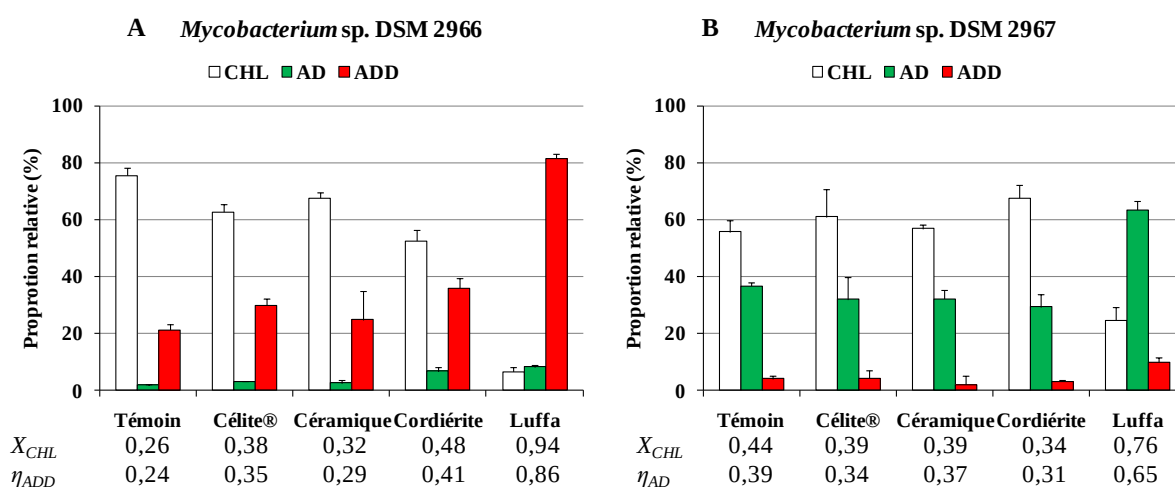


Figure 42 : Biotransformation de cholestérol (1,72 mM) par DSM 2966 (A) et DSM 2967 (B) dans le milieu TSB en présence d'une matrice d'immobilisation après 7 jours d'incubation. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Inoculum : 5% (v/v). Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

Conclusion : Les fibres de *Luffa cylindrica* constituent un support d'immobilisation intéressant pour les mycobactéries dans la biotransformation de cholestérol. L'ajout de ces fibres a permis de tripler le η_{ADD} avec DSM 2966 et de doubler le η_{AD} avec DSM 2967. Cette augmentation peut être attribuée en partie à une augmentation de la biomasse en présence de *Luffa cylindrica* comme support d'immobilisation. La vérification de cette hypothèse est présentée dans le paragraphe suivant.

2.3.2. Influence d'un support sur la croissance

Pour mieux comprendre l'effet de *Luffa cylindrica*, l'influence de la présence de supports poreux d'immobilisation sur la croissance a été étudiée en mesurant la biomasse totale (cellules planctoniques (CP) et cellules immobilisées (CI)). En pratique, elle est déterminée indirectement par l'évaluation du taux de protéines après établissement d'une

courbe d'étalonnage entre la densité microbienne (DM) et la teneur en protéines (TPR). Cette courbe est obtenue par pesée des cellules après dessiccation totale de suspensions cellulaires de volume et de TPR connus. L'équation de cette courbe est telle que : $TPR_{(mg/mL)} = 0,359 \times DM_{(mg/mL)} + 0,037$ pour DSM 2966 avec un coefficient de régression linéaire $R^2 = 0,98$; pour DSM 2967, l'équation est : $TPR_{(mg/mL)} = 0,322 \times DM_{(mg/mL)} + 0,201$ avec $R^2 = 0,97$. Les mesures de la TPR ont été faites sur des cultures de 3 jours dans le milieu TSB en présence des supports poreux testés dans l'expérience précédente.

La mesure de la biomasse totale (CI+CP) est présentée dans la **Figure 43**. Les deux souches n'ont pas le même comportement en présence d'un SP. En effet, la TPR, obtenue après 3 jours d'incubation de DSM 2966, est légèrement influencée par la présence de support poreux (**Figure 43A**). Cependant, une plus grande biomasse est obtenue lorsque les fibres de *Luffa cylindrica* sont ajoutés au milieu (TPR = 1,20 mg/mL) ; le témoin étant à une TPR = 1,09 mg/mL. Au contraire, une plus grande biomasse de DSM 2967 est obtenue en présence d'un support poreux à l'exception de cordiérîte. Cette augmentation est notamment observée avec *Luffa cylindrica* (TPR = 1,20 mg/mL) par comparaison au témoin (TPR = 0,84 mg/mL) (**Figure 43B**).

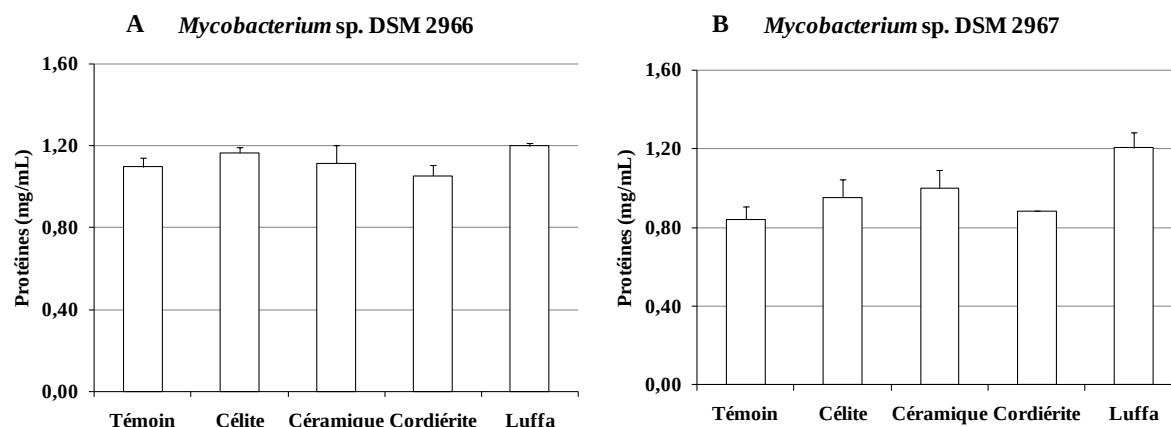


Figure 43 : Effet de la présence d'une matrice d'immobilisation (200 mg) sur la croissance de DSM 2966 (A) et DSM 2967 (B) après 3 jours d'incubation dans le milieu TSB. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Inoculum : 5% (v/v). Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

Conclusion : La densité microbienne reste pratiquement inchangée en présence d'un support poreux après 3 jours d'incubation excepté dans le cas de l'utilisation *Luffa cylindrica* où une augmentation de la biomasse est observée en particulier avec DSM 2967. Toutefois, la meilleure bioconversion de cholestérol obtenue dans les fioles avec *Luffa cylindrica* n'est pas explicable uniquement par l'augmentation de la biomasse par immobilisation, du moins pour DSM 2966.

2.3.3. Biotransformation de cholestérol en présence de *Luffa cylindrica*

Afin de mieux comprendre l'effet de *Luffa cylindrica* sur la bioconversion de cholestérol, une évaluation indirecte des cellules immobilisées (CI) et des cellules planctoniques (CP) est effectuée par le dosage des protéines. Ainsi, l'expérience du paragraphe 2.3.1 (page 81) a été reprise avec ajout simultané de cholestérol à la culture. Les résultats sont présentés dans la **Figure 44**.

Avec le témoin (**Figure 44A**), la bioconversion est due uniquement à l'activité des CP ; celles-ci entrent dans une phase de décélération après 3 jours d'incubation et diminuent d'environ 25% ($TPR_{CP-J3} = 0,92 \text{ mg/mL}$: $TPR_{CP-J7} = 0,69 \text{ mg/mL}$). Avec *Luffa cylindrica*, la biomasse totale (CP+CI) demeure plus élevée par rapport au témoin et n'entre dans la phase de décélération qu'à J5 (**Figure 44B**). Cependant, la diminution des CP entre J3 et J7 est plus importante dans les fioles contenant *Luffa cylindrica* ; la TPR_{CP} diminue de $0,58 \text{ mg/mL}$ à J3 avec $0,29 \text{ mg/mL}$ à J7, soit une diminution de 50% (**Figure 44B**).

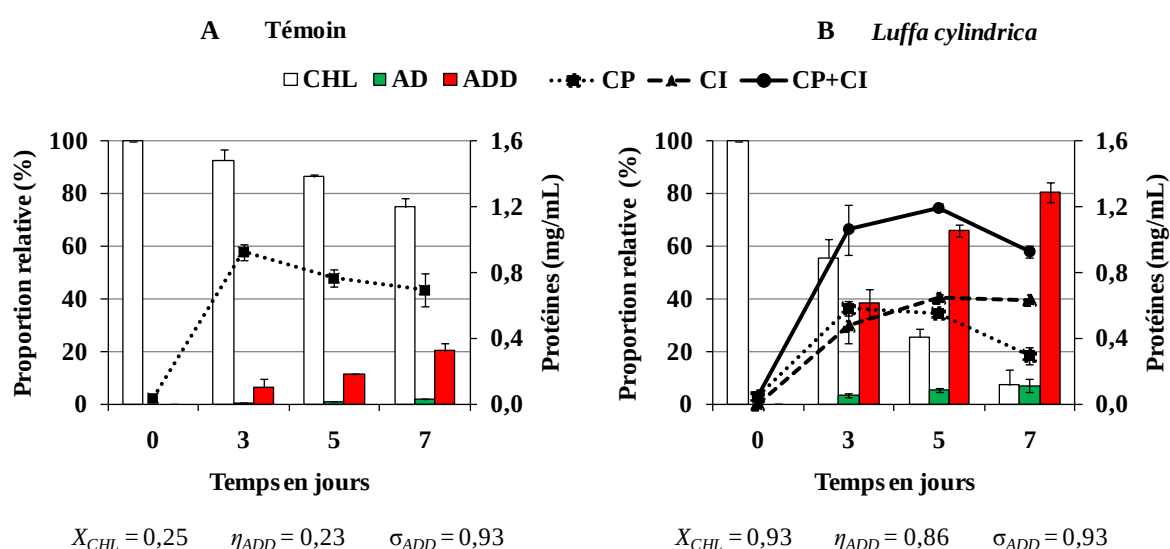


Figure 44 : Biotransformation de cholestérol (1,72 mM) par DSM 2966 dans le milieu TSB en absence (A) et en présence (B) de fibres de *Luffa cylindrica* ($\approx 200 \text{ mg}$). Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Inoculum : 5% (v/v). Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

Ceci est probablement dû à la plus grande accumulation d'AD(D) avec *Luffa cylindrica*, notamment l'ADD ($\eta_{ADD} = 0,86$) ; ce dernier étant un produit toxique pour les bactéries, il inhibe la respiration et contribue à la mort des cellules (Szentirmai, 1990). En revanche, les CI, représentant la moitié de la biomasse à J3, sont moins affectées par la toxicité d'ADD et gardent un niveau constant entre J5 et J7 ($TPR_{CI-J5} \approx TPR_{CI-J7} = 0,64$ mg/mL) (**Figure 44B**). De ce fait, un effet protecteur de *Luffa cylindrica* et une meilleure viabilité des CI sont suggérés.

Ces observations sont confirmées avec DSM 2967. Dans tous les fioles avec ou sans *Luffa cylindrica*, les CP restent en phase stationnaire entre J3 et J5 et entrent ensuite en phase de décélération (**Figure 45**). Les CI, au contraire, continuent leur croissance à J7 ($TPR_{CP-J3} = 0,53$ mg/mL : $TPR_{CP-J7} = 0,98$ mg/mL) (**Figure 45B**).

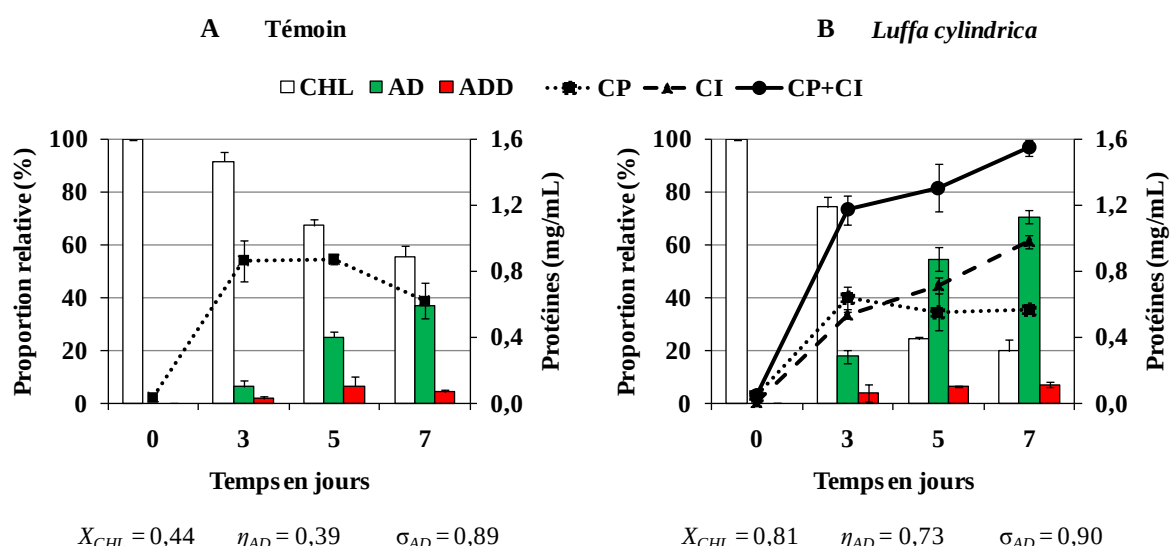


Figure 45 : Biotransformation de cholestérol (1,72 mM) par DSM 2967 dans le milieu TSB en absence (A) et en présence (B) de fibres de *Luffa cylindrica* (≈ 200 mg). Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Inoculum : 5% (v/v). Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

Toutefois, les meilleurs rendements obtenus en ajoutant *Luffa cylindrica* ne sont pas attribués uniquement à l'augmentation de la biomasse et à la meilleure stabilité des CI. La productivité spécifique (cf. chapitre Matériel et Méthodes-paragraphe 5.5.5) d'ADD $P_{S_{ADD}}$ avec DSM 2966 à J3 est de 23,18 $\mu\text{M/h.g}_{\text{cellules sèches}}$ contre 120,24 $\mu\text{M/h.g}_{\text{cellules sèches}}$ dans les essais avec *Luffa cylindrica*. De même, la $P_{S_{AD}}$ avec DSM 2967 à J3 vaut 25,52 et 48,68 $\mu\text{M/h.g}_{\text{cellules sèches}}$ en absence et en présence de *Luffa cylindrica* respectivement. Cette

augmentation de l'activité biocatalytique des cellules est probablement due à la meilleure disponibilité de cholestérol pour les CI. En effet, la grande surface massique et la structure poreuse de *Luffa cylindrica* favorisent le contact et l'interaction entre les particules de cholestérol et les CI ; ce contact étant nécessaire pour la consommation et l'incorporation de particules de cholestérol (Atrat et al., 1991; Goswami et al., 1983). D'autant plus, la structure poreuse de *Luffa cylindrica* avec ses microcanaux continus de 10-20 µm de diamètre et les macropores de 800 µm (Zampieri et al., 2006) constituent une excellente niche protectrice pour les mycobactéries ayant une taille de (0,2-0,6x1-10 µm) (Hartmans et al., 2006). La productivité volumétrique d'ADD P_{VADD} (0,07 g/L.j) par DSM 2966 est comparable à celle obtenue dans d'autres travaux utilisant le Tween 80 comme surfactant (Liu et Lo, 1997; Pérez et al., 1995; Smith et al., 1993).

Conclusion : Les fibres de *Luffa cylindrica* constituent une matrice d'immobilisation très intéressante pour l'immobilisation des mycobactéries. L'ajout de *Luffa cylindrica* dans le milieu augmente le rendement en AD(D) par augmentation de la biomasse totale, une meilleure viabilité des CI et notamment par l'augmentation du contact entre les particules de cholestérol et les cellules.

2.3.4. Analyse descriptive du système fibres de *Luffa cylindrica*/cellules immobilisées

Cette analyse repose sur la description de la structure du système *Luffa cylindrica*-CI, obtenue par microscopie électronique à balayage à différents grossissements. Le système analysé correspond à des réseaux de fibres d'environ 1 cm de longueur, 0,5 cm de largeur et 0,3 mm d'épaisseur. Ces réseaux sont prélevés des disques de *Luffa cylindrica* incubées pendant 2 jours avec les cellules dans le milieu TSB à 30°C, 200 rpm.

La **Figure 46A** (page 87) présente l'ultrastructure de *Luffa cylindrica* qui est constituée d'un réseau de fibres interconnectées entre elles avec de grands espaces d'où sa faible densité (0,02-0,04 g/cm³). Le diamètre de ces fibres évalué à partir des photos (**Figure 46B-C-D**, page 87) est de 250-400 µm et leur surface est relativement rugueuse (**Figure 46D**). Une coupe transversale d'une fibre (**Figure 46E**, page 87) montrent des microcanaux parallèles entre eux et dont le diamètre n'est pas mesurable directement sur les photos.

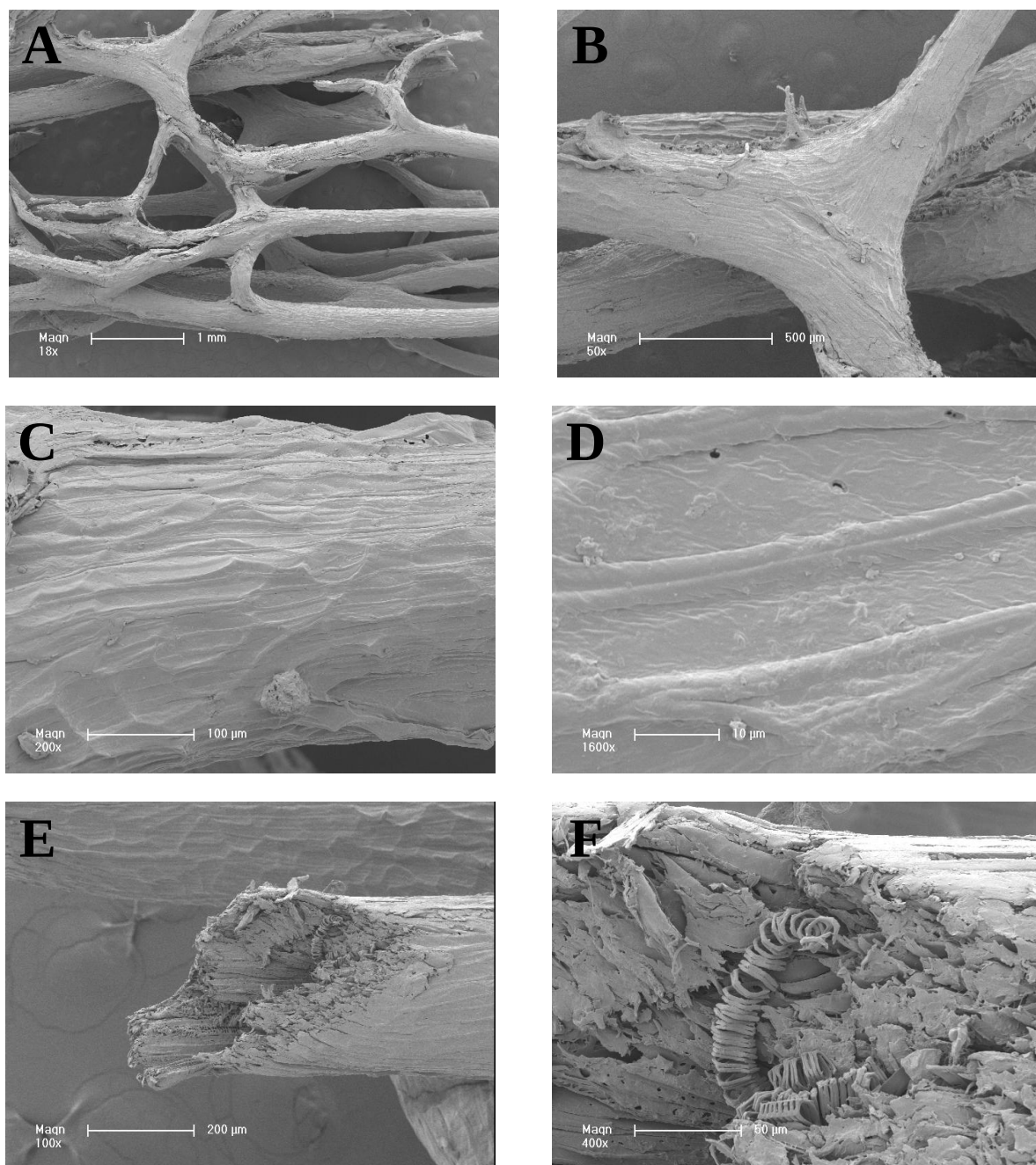


Figure 46 : Fibres de *Luffa cylindrica* observées à différents grossissements par la microscopie électronique à balayage. Photos prises par Mr Ludovic Josien à l'IS2M-Mulhouse.

En comparant les photos des fibres avec (**Figure 47B-D**, page 88) et sans cellules
 5 (**Figure 47A-C**, page 88), nous avons constaté que ces dernières tapissent la surface des
 fibres. Cette surface devient granuleuse après sa colonisation avec les cellules (**Figure 47B**,
 page 88). Leur distribution à travers l'ensemble de la surface des fibres est irrégulière et
 aléatoire, en particulier en ce qui concerne leur densité (**Figure 47D**, page 88) : deux zones
 voisines sur la même fibre, peuvent contenir des densités cellulaires différentes.

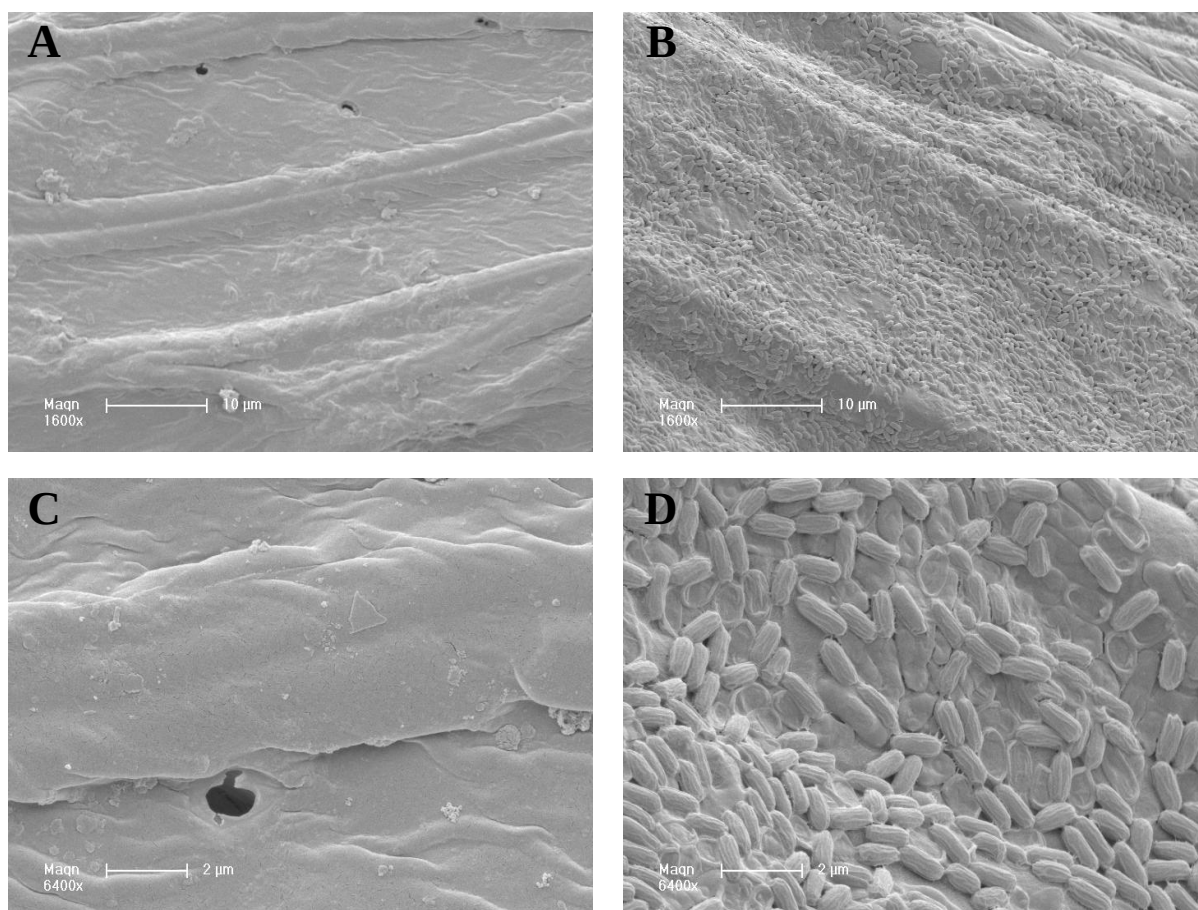


Figure 47 : Fibres de *Luffa cylindrica* avant (A-C) et après (B-D) deux jours d'incubation avec *Mycobacterium* sp. DSM 2966 dans le milieu TSB. Observation à différents grossissements par la microscopie électronique à balayage. Photos prises par Mr Ludovic Josien à l'IS2M-Mulhouse.

- 5 La capacité de rétention cellulaire des fibres serait de beaucoup supérieure à la quantité de cellules immobilisées, bien qu'une certaine réserve pourrait être émise concernant la perte potentielle de cellules mal adsorbées durant la culture. Le dénombrement exact des cellules immobilisées est pratiquement impossible à cause de la structure en amas ; s'il s'agit d'une seule couche cellulaire sur les fibres, la densité cellulaire peut être estimée à 1,4-10 1,8 cellules/ μm^2 . La dimension des cellules a diminué à cause de la déshydratation par séchage et le traitement nécessaire pour faire la microscopie ; cependant les cellules gardent leur forme en bâtonnet.

Conclusion : La grande surface massique des fibres de *Luffa cylindrica* et leur grande porosité permettent l'adsorption d'une grande quantité de cellules notamment sur la surface. La 15 distribution en amas des cellules est aléatoire et irrégulière ce qui complique leur dénombrement, la densité cellulaire moyenne pouvant être estimée à environ 1,5 cellules/ μm^2 .

2.3.5. Influence de la quantité de *Luffa cylindrica* sur la bioconversion de cholestérol

L'influence de la quantité de *Luffa cylindrica* sur l'immobilisation des mycobactéries et la bioconversion de cholestérol a été étudiée. Ainsi, l'expérience du paragraphe 2.3.1 (page 81) est reprise avec DSM 2966 en utilisant 2 ou 4 disques de *Luffa cylindrica*, soit environ 200 et 400 mg respectivement. Dans un troisième essai, nous avons recouvert le fond de la fiole d'un grand disque de *Luffa cylindrica*, de 5 cm de diamètre et 5 mm d'épaisseur et pesant environ 800 mg.

Les résultats montrent que le taux de bioconversion de cholestérol n'augmente pas avec l'augmentation de la quantité de *Luffa cylindrica* au-delà de 200 mg dans les 30 mL de milieu (Figure 48). La faible diminution du taux de bioconversion ($X_{CHL} = 0,84$) observée avec le grand disque de *Luffa cylindrica* peut être attribué aux erreurs expérimentales.

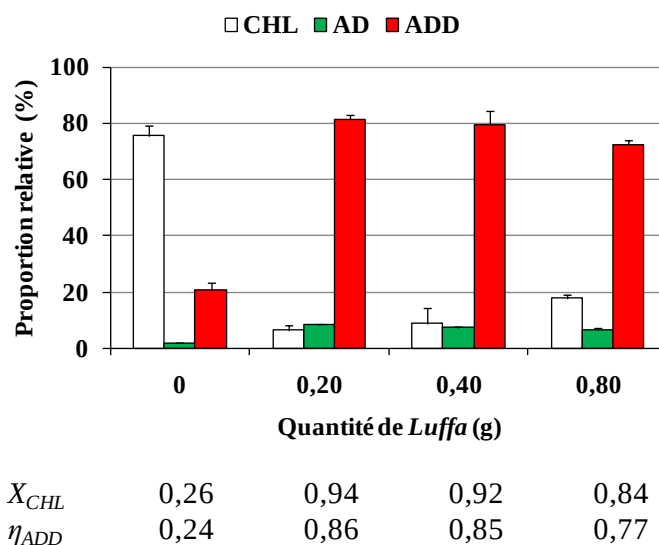


Figure 48 : Biotransformation de cholestérol (1,72 mM) par DSM 2966 dans le milieu TSB après 7 jours d'incubation en présence de différentes quantités des fibres de *Luffa cylindrica*. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Inoculum : 5% (v/v). Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

Pour mieux suivre l'évolution de la bioconversion après augmentation de la quantité de *Luffa cylindrica*, l'expérience a été reprise avec 400 mg de *Luffa cylindrica* et extraction à J3, J5 et J7. Les résultats ont montré que le doublement de la quantité de *Luffa cylindrica* accélère relativement la bioconversion de cholestérol par les mycobactéries ; la plus grande quantité des produits peut être récoltée à J5 (Figure 49, page 90) au lieu de J7 avec les 200 mg de *Luffa cylindrica* (Figure 44B page 84 et Figure 45B page 85).

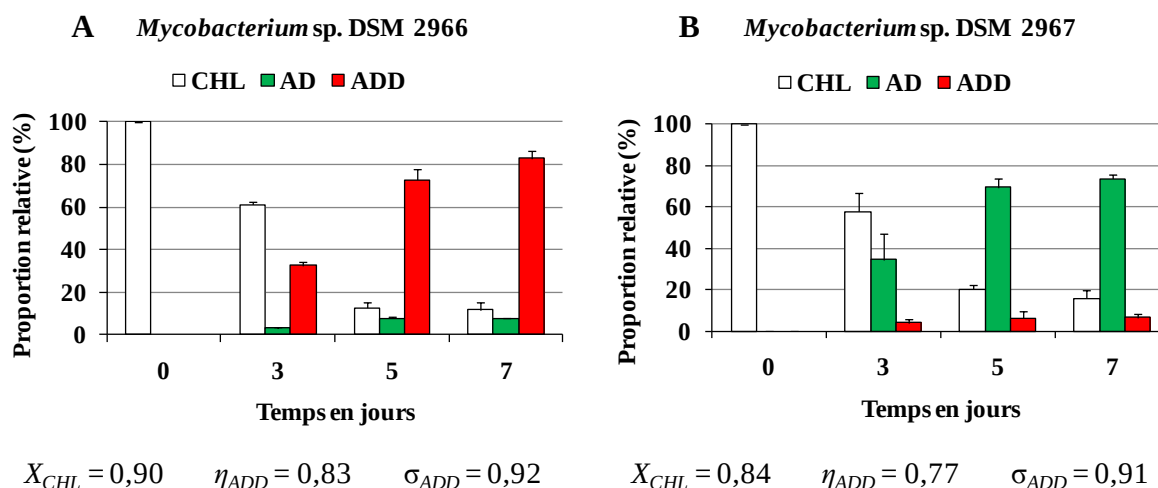


Figure 49 : Biotransformation de cholestérol (1,72 mM) par DSM 2966 (A) et DSM 2967 (B) en présence de *Luffa cylindrica* (≈ 400 mg) dans le milieu TSB. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Inoculum : 5% (v/v). Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

- 5 **Conclusion :** L'utilisation de grandes quantités de *Luffa cylindrica* accélère relativement la bioconversion de cholestérol. Dans les conditions expérimentales étudiées, un optimum d'environ 13,4 g_{Luffa}/L_{milieu} de milieu est envisagé vu l'obtention de la quantité maximale d'AD(D) à J5 au lieu de J7 avec 6,5 g_{Luffa}/L_{milieu}.

2.3.6. Influence de l'hydrophobisation de *Luffa cylindrica*

- 10 Les acides mycoliques présents dans la paroi des mycobactéries et comportant 60 à 90 atomes de carbone leur confèrent un caractère hautement hydrophobe (Lyew et al., 2007). Au contraire, la surface des fibres de *Luffa cylindrica*, composés principalement d'holocellulose (84%) est de nature hydrophile (Guimarães et al., 2009). En revanche, il est généralement admis que les surfaces hydrophobes sont plus favorables à l'adhésion de bactéries (à la
- 15 membrane hydrophobe) que les surfaces hydrophiles (Merritt et An, 2000). De ce fait, il est judicieux d'envisager l'hydrophobisation de la surface de *Luffa cylindrica* pour améliorer l'adhésion des cellules sur les fibres, et par suite augmenter le taux de bioconversion de cholestérol.

- 20 Deux protocoles d'hydrophobisation de *Luffa cylindrica* par acétylation ont été testés (voir paragraphe 3.6 dans Matériel et Méthodes). Le degré d'acétylation a été évalué à 25% en pourcentage de gain en masse. L'expérience du paragraphe 2.3.3 (page 84) a été reprise avec *Luffa* acétylé, *Luffa* non acétylé et sans *Luffa*.

L'acétylation de *Luffa cylindrica* n'a pas montré un effet toxique sur les cellules ni un effet inhibiteur de la bioconversion de cholestérol (**Figure 50**, page 92). Les rendements obtenus avec les fibres acétylées (**Figure 50C-F**, page 92) sont pratiquement restés les mêmes que ceux obtenus avec les fibres naturelles (**Figure 50B-E**, page 92).

5 Ces résultats reflètent l'absence de l'influence de l'hydrophobisation de *Luffa cylindrica* sur l'adsorption et l'immobilisation des mycobactéries. Deux explications sont proposées pour ces résultats : d'une part, la présence dans les fibres de *Luffa cylindrica* de lignine (15%) à caractère hydrophobe (Guimarães et al., 2009) d'où une surface avec des domaines hydrophiles et hydrophobes ; d'autre part, la structure en mosaïque de la membrane des
10 mycobactéries à dominance hydrophobe. Cette structure en mosaïque avec des domaines hydrophobes et hydrophiles est observée chez d'autres actinomycètes du genre *Rhodococcus* (Podorozhko et al., 2008). Toutefois, certaines études citent la capacité des bactéries hydrophobes à adhérer aux surfaces hydrophiles (Bruinsma et al., 2001). Un dernier facteur
15 déterminant dans l'adhésion des bactéries aux surfaces est la topographie : craquelures, pores et autres irrégularités de surface favorisent l'adhésion bactérienne lorsque leurs dimensions sont au moins égales aux dimensions bactériennes (Merritt et An, 2000). La surface des fibres de *Luffa cylindrica* semble présenter une topographie particulièrement intéressante pour l'adhésion de *Mycobacterium*.

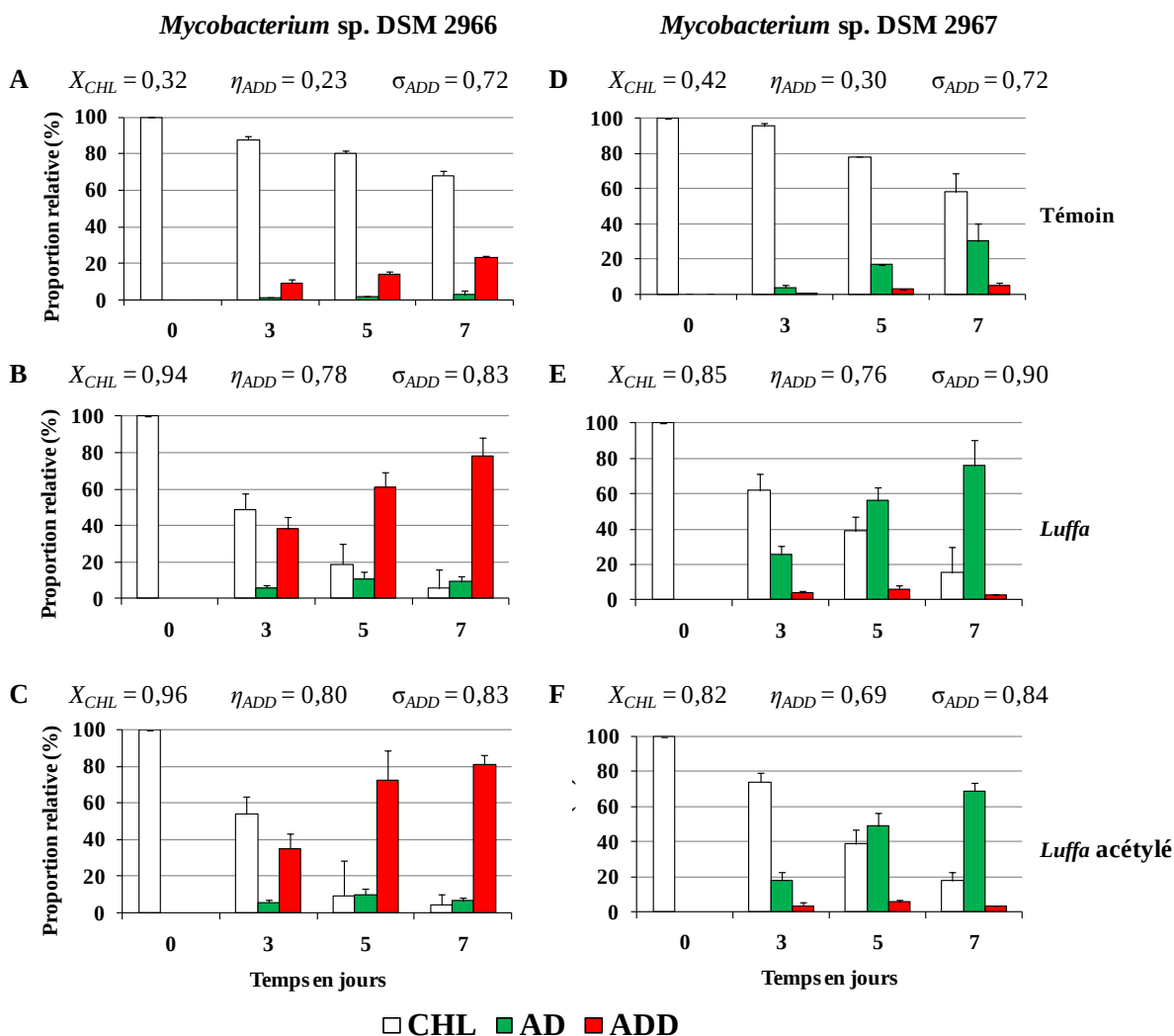


Figure 50 : Biotransformation de cholestérol (1,72 mM) par DSM 2966 sans *Luffa cylindrica* (A), avec *Luffa cylindrica* (B), avec *Luffa cylindrica* acétylé (C) et par DSM 2967 sans *Luffa cylindrica* (D), avec *Luffa cylindrica* (E), avec *Luffa cylindrica* acétylé (F) dans le milieu TSB. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Inoculum : 5% (v/v). *Luffa cylindrica* : ≈ 200 mg. Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

Conclusion : L'hydrophobisation de *Luffa cylindrica* n'améliore pas ses propriétés comme support d'immobilisation de mycobactéries. C'est la topographie des fibres et la présence de domaines hydrophiles (holocellulose) et hydrophobes (lignine) qui favorisent l'adhésion de mycobactéries à la paroi à dominance hydrophobe.

10 2.3.7. Réutilisation de *Luffa cylindrica*

La stabilité thermique et mécanique d'une matrice d'immobilisation est d'une grande importance pour sa réutilisation (Margaritis et Kilonzo, 2005; Kourkoutas et al., 2004; Bickerstaff, 1997). Cette stabilité a été testée après plusieurs cycles d'utilisation de *Luffa cylindrica* avec DSM 2966 ; chaque cycle d'utilisation est suivi d'un autoclavage

(120°C, 30 min) et d'une incubation dans un milieu nutritif pour vérifier la stérilité des fibres avant la nouvelle utilisation. Les conditions expérimentales ont été les mêmes que celles de l'expérience du paragraphe 2.3.3 (page 84). La **Figure 51** montre qu'après 10 cycles d'utilisation, les fibres de *Luffa cylindrica* n'ont perdu qu'environ 5% de leur performance comme support poreux pour les mycobactéries dans la bioconversion de cholestérol. Ces fibres ont prouvé une résistance mécanique et thermique et une stabilité remarquable après 10 cycles d'autoclavage.

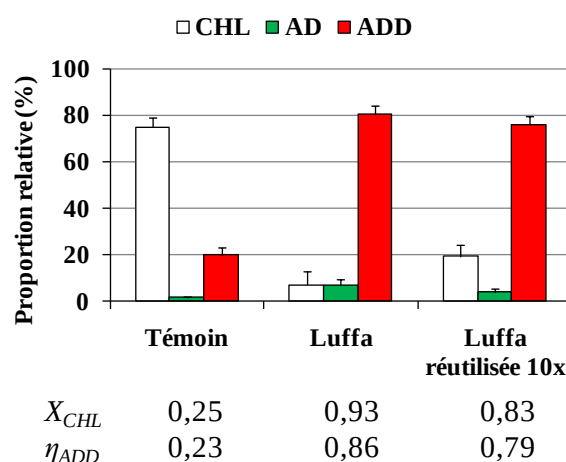
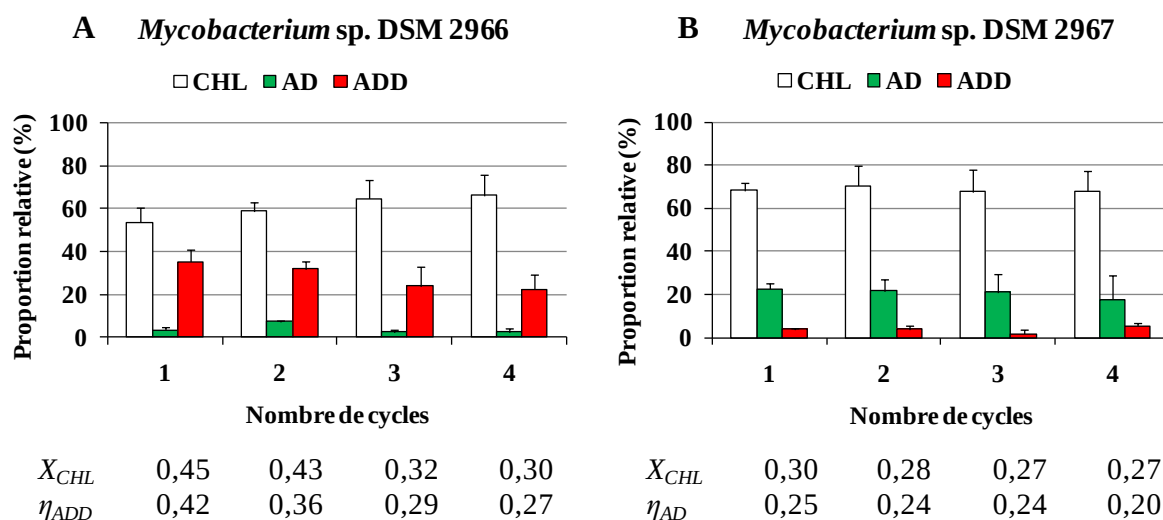


Figure 51 : Biotransformation de cholestérol (1,72 mM) par DSM 2966 avec des fibres de *Luffa cylindrica* réutilisées 10 fois dans le milieu TSB. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Inoculum : 5% (v/v). *Luffa cylindrica* : $\approx$ 200 mg. Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

Après la vérification de la stabilité des fibres de *Luffa cylindrica* comme matrice d'immobilisation après plusieurs cycles d'utilisation, il restait à étudier la stabilité des cellules immobilisées après leur utilisation sur *Luffa cylindrica* ; la stabilité d'un catalyseur étant un critère économique important en vue de son application industrielle. Nous avons donc étudié la réutilisation des cellules immobilisées sur *Luffa cylindrica*. La réutilisation d'un biocatalyseur est l'un des avantages majeurs de la technique d'immobilisation. Cette technologie conduit à des périodes plus courtes d'arrêt du système de fermentation, permettant ainsi plusieurs cultures en batch pour un intervalle de temps donné, ce qui augmente encore plus la productivité industrielle (Bergmaier, 2002). Une expérience a ainsi été réalisée sur la réutilisation des cellules immobilisées sur *Luffa cylindrica*. A une culture de deux jours dans 30 mL du milieu TSB et environ 300 mg de *Luffa cylindrica*, le cholestérol (1,72 mM) est ajouté dissous dans 1 mL d'acétone et l'ensemble est incubé à 30°C et 200 rpm. Après 3 jours

d'incubation, le milieu a été renouvelé stérilement avec ajout de cholestérol (1,72 mM) et le milieu prélevé est analysé. L'expérience est faite sur 4 cycles d'utilisation des cellules immobilisées sur *Luffa cylindrica*.



5 **Figure 52 :** Biotransformation de cholestérol (1,72 mM) par des cellules de DSM 2966 (A) et DSM 2967 (B) immobilisées sur *Luffa cylindrica* durant des cycles de 3 jours d'incubation et de renouvellement du milieu TSB. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. *Luffa cylindrica* : ≈ 300 mg. Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

Par comparaison à la **Figure 44** (page 84), la **Figure 52A** montre que les cellules
 10 immobilisées de DSM 2966 conservent leur activité biocatalytique après 4 cycles
 d'incubation et de renouvellement du milieu. Cependant, le taux de bioconversion de
 cholestérol a diminué considérablement entre le cycle 1 ($X_{CHL} = 0,45$) et le cycle 4 ($X_{CHL} =$
 0,30). Les mêmes observations ont été confirmées avec DSM 2967 (**Figure 52B**) mais la
 diminution de X_{CHL} était moins accentuée que dans le cas de DSM 2966. Il faut prendre en
 15 considération toutefois la contribution des cellules planctoniques qui se détachent de *Luffa*
cylindrica et se multiplient dans le milieu. L'expérience a été arrêtée au 4^{ème} cycle pour des
 raisons de formation de mousse et la persistance des cellules planctoniques sur les parois des
 fioles ce qui peut fausser les résultats. Bien qu'elle soit relativement stable, la P_{vADD}
 (0,045 g.L⁻¹.j⁻¹) obtenue avec les cellules immobilisées de DSM 2966 après 4 cycles
 20 d'utilisation est 4 fois inférieure à celle obtenue par Lee et al., 1992. Il faut noter que les
 auteurs ont utilisé 100 mg de support d'immobilisation par mL de milieu soit dix fois plus que
 la quantité de *Luffa cylindrica* que nous avons utilisé.

Conclusion : Une stabilité thermique et mécanique des fibres de *Luffa cylindrica* a été observée même après 10 cycles d'autoclavage et d'utilisation comme support d'immobilisation pour les mycobactéries. Les cellules immobilisées sur *Luffa cylindrica* ont conservé leurs activités biocatalytiques durant les 4 premiers cycles d'utilisation. Cependant, et pour des raisons techniques il était préférable d'étudier la réutilisation des cellules immobilisées sur *Luffa cylindrica* dans d'autres conditions expérimentales tout en respectant l'aseptie ; d'où l'idée d'étudier la bioconversion de cholestérol avec des cellules immobilisées sur *Luffa cylindrica* dans un procédé en mode continu. Les résultats de cette dernière étude sont présentés dans le paragraphe 2.5.

2.4. Optimisation de la bioconversion de cholestérol

Une fois le support poreux le plus performant (*Luffa cylindrica*) déterminé, une série d'essais a été faite pour augmenter la productivité de la bioconversion de cholestérol en utilisant cette matrice d'immobilisation. Diverses stratégies ont été étudiées telles que l'utilisation du CHO comme substrat de départ, le rapprochement bactérie-substrat dans des tubes, l'augmentation de la quantité de cholestérol à transformer et sa forme d'ajout dans le milieu. Ces essais font l'objet des paragraphes suivants.

2.4.1. Biotransformation du cholest-4-ène-3-one

Les premiers intermédiaires obtenus lors de la biotransformation de cholestérol sont les Δ^4 -3-oxo-stéroïdes suite à l'action de la cholestérol-oxydase. Cet enzyme produit une oxydation de la fonction OH en position C-3 et une isomérisation de la double liaison du C-5 (Ivshina et al., 2005). En revanche, nous avons parlé dans le paragraphe 1 (page 59) de la conversion totale de cholestérol en CHO avec les souches de *Rhodococcus* après 24 heures d'incubation (**Figure 24**, page 61). Suite à nos études précédentes, nous avons pensé utiliser CHO bioproduit par les *Rhodococci* comme substrat pour le clivage de la chaîne latérale et la production d'AD(D) par les *Mycobacteria*. La réduction du temps mis par DSM 2966 et DSM 2967 pour produire l'ADD et l'AD permet d'augmenter la productivité de la réaction. Le but de l'expérience était d'arriver à une conversion maximale par incubation de cholestérol pour un jour avec les *Rhodococci* et par incubation du CHO bioproduit pour un jour avec les *Mycobacteria*.

Des cultures de *Rhodococcus erythropolis* DSM 43066 dans le milieu GSM sont incubées avec de cholestérol dans les mêmes conditions que celles décrites au paragraphe 1.

Le seul produit extrait (≈ 100 mg) a été identifié par CPG-SM comme étant CHO. Des cellules de DSM 2966 et DSM 2967 (Poids sec 60 mg) âgées de deux jours sont introduites dans 30 mL de PBS. Le CHO bioproduit est dissous dans l'acétone (1 mg/mL) et ajouté aux fioles de PBS (0,86 mM). Après un jour d'incubation (30°C, 200 rpm), l'analyse par CPG-SM a montré que CHO n'a subi aucune biotransformation par les *Mycobacteria*. Le temps d'incubation n'était pas suffisant pour convertir CHO par les cellules non proliférantes de *Mycobacterium*. Ces résultats sont en concordance avec ceux de l'équipe de Marschek, 1972 qui a décrit la préférence de la souche *Mycobacterium* sp. NRRL-B3683 (i.e. DSM 2966) aux substrats $3\beta\text{OH}-\Delta^5$ plutôt que les structures 3-ceto- Δ^4 . Les auteurs ont obtenu un rendement de 78% d'ADD à partir de cholestérol (2,59 mM) après 144 heures d'incubation dans un fermenteur de 5 L ; alors que le taux de bioconversion du CHO dans les mêmes conditions expérimentales était de 44% après 168 heures. Cette étude a été abandonnée car un temps d'incubation plus long du CHO fait perdre tout son intérêt à la stratégie.

2.4.2. Confinement du système cellules immobilisées-*Luffa cylindrica* et cholestérol

Le contact direct entre le microorganisme et la particule de cholestérol est l'un des deux phénomènes qui expliquent la consommation et l'incorporation de ces particules solides dans le milieu aqueux (Atrat et al., 1991; Goswami et al., 1983). Ainsi, nous avons pensé à biotransformer le cholestérol dans des tubes pour des meilleurs confinements et rapprochement dans l'espace entre les cellules immobilisées sur *Luffa cylindrica* et les particules de cholestérol. En effet, dans les fioles agitées une partie des fibres de *Luffa cylindrica* émergent du milieu à cause de la nature spongieuse des fibres. L'utilisation de *Luffa cylindrica* comme un réseau tridimensionnel d'immobilisation des cellules dans un système tubulaire devait augmenter le taux de bioconversion de cholestérol et le rendement en AD(D).

L'expérience a été réalisée dans les mêmes conditions que le paragraphe 2.3.3 (page 84) en remplaçant les fioles par des tubes de 80 mL de volume et de 1,8 cm de diamètre. Dans les tubes avec les fibres de *Luffa cylindrica*, un taux de bioconversion de cholestérol X_{CHL} 0,45 est obtenu, soit 4 fois plus que dans les tubes sans *Luffa cylindrica* ($X_{CHL} = 0,10$). Cependant ce taux de bioconversion reste inférieur aux résultats obtenus dans les fioles. Ceci peut être attribué aux meilleures conditions d'aérations dans les fioles sous agitation. L'oxygène est un élément indispensable aussi bien pour les réactions d'oxydation impliquées dans le clivage de la chaîne latérale des stérols que pour la viabilité et le métabolisme cellulaire. Ces

observations sont en concordance avec les travaux de (Wang et al., 2002). Cette stratégie a été appliquée dans un réacteur tubulaire qui sera présenté au paragraphe 2.5.

2.4.3. Biotransformation de cholestérol à l'état particules solides

L'idée de l'utilisation de cholestérol à l'état de particules solides vient de l'échec d'un plan d'expérience visant à augmenter la productivité de la réaction de bioconversion de cholestérol. Ce plan est présenté brièvement dans ce qui suit.

En effet, dans le but d'augmenter la productivité, de plus grandes concentrations de cholestérol sont étudiées : 1,72 mM, 2,59 mM et 3,45 mM. Comme la solubilité de ce dernier dans l'acétone ne dépasse pas les 20 mg/mL, nous étions obligés de dissoudre le cholestérol dans 2 mL d'acétone pour tous les essais. L'acétone permet de disperser les particules de cholestérol et d'assurer un ajout homogène dans toutes les fioles. Trois milieux de biotransformations ont été testés : le PBS, le TSB et le TSB dilué 1/10. L'effet de contribution des cellules planctoniques et des cellules immobilisées dans la bioconversion est également étudié. Les cellules planctoniques d'une culture de 48 h, dans le milieu TSB en présence de *Luffa cylindrica*, sont récoltées par centrifugation à 5000 rpm et introduites dans 30 mL d'un milieu de biotransformation frais ; en revanche 30 mL de ce milieu sont ajoutés aux cellules immobilisées sur *Luffa cylindrica* persistants dans la fiole de départ. Simultanément, les fioles dans lesquelles nous n'avons pas séparé les cellules planctoniques et immobilisées ont servi de fioles témoins avec renouvellement du milieu. Dans ces conditions, les taux de bioconversion et les rendements en AD(D) n'ont pas dépassé 20% à J4. Après J4, aucune activité de bioconversion n'est détectée. Ceci est probablement dû à une certaine mortalité des cellules après récolte par centrifugation et en particulier à la grande quantité d'acétone ajoutée (6,66% ; v/v) ; ce phénomène est observé dans des travaux précédents (Lee et al., 1993). Cependant, il faut signaler qu'avec les cellules planctoniques, la bioconversion de cholestérol s'arrête au stade cholesta-1,4-diène-3-one (CDO) sans coupure de la chaîne latérale alors que dans les fioles avec *Luffa cylindrica*, une accumulation d'ADD (20%) à partir de cholestérol (2,59 mM) est observée. Ce résultat est en faveur de l'effet protecteur de *Luffa cylindrica* pour les cellules immobilisées.

Suite à ces résultats, nous avons pensé à remplacer l'acétone par de l'éther diéthylique qui permet de dissoudre jusqu'à 70 mg/mL de cholestérol et dont une grande partie s'évapore une fois dans le milieu. Cependant, une proportion d'environ 5% d'éther (par rapport au

volume du milieu) était nécessaire pour avoir des résultats équivalents à ceux obtenus avec 3,33% d'acétone pour 1,72 mM de cholestérol après 7 jours d'incubation dans le TSB. Pour ces raisons, et pour ne pas s'éloigner de notre objectif visant à minimiser l'utilisation de solvants, nous avons décidé de tester l'ajout de cholestérol sous forme de particules solides. Il est connu que le rendement en AD(D) est significativement influencée par la taille et la forme des particules de cholestérol (Voïshvillo et al., 2004). Ainsi, deux types de particules de cholestérol sont testées : des fines particules (50-100 μm de diamètre) et de particules plus grosses (200-300 μm de diamètre). Le cholestérol (20 mg) et les fibres de *Luffa cylindrica* (400 mg) sont ajoutées à 30 mL du milieu TSB avant autoclavage ; ensuite, les cellules (Poids sec 60 mg) d'une culture de 48 h dans le milieu TSB sont ensuite récoltées par centrifugation (5000 rpm, 4°C) et ajoutées aux fioles contenant le milieu TSB et le cholestérol. L'objectif de l'expérience était principalement d'étudier l'influence de *Luffa cylindrica* dans la bioconversion de cholestérol à l'état solide.

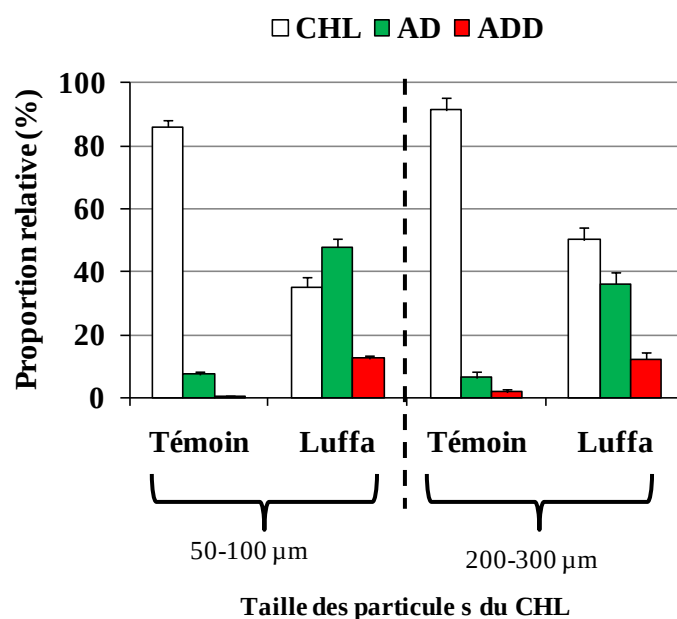


Figure 53 : Biotransformation de cholestérol (1,72 mM) ajouté sous forme de particules solides de différentes tailles par DSM 2967 après 3 jours d'incubation dans le milieu TSB. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Cellules : poids sec 60 mg. *Luffa cylindrica* : $\approx$ 400 mg. Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

Par rapport aux témoins, la présence de *Luffa cylindrica* dans le milieu multiplie par un facteur de 6 le rendement en AD produit à partir de fines (50-100 μm) et de grosses (200-300 μm) particules de cholestérol (**Figure 53**). Entre les deux populations de particules, le rendement en AD était légèrement plus grand avec les particules de plus petite taille. Ce petit

écart de taille entre les deux populations peut expliquer l'absence d'effet de ce paramètre. Par ailleurs, du fait de la nature hydrophobe de cholestérol, les fines particules forment des agrégats plus grands dans le milieu aqueux. Pour obtenir de meilleurs rendements, il faut utiliser des particules de plus petite taille ($\approx 5 \mu\text{m}$) légèrement plus grand que les mycobactéries (Atrat et al., 1991).

Conclusion : L'augmentation de la concentration de cholestérol dans le milieu, tout en conservant un taux de bioconversion et de rendement élevé, permet d'augmenter la productivité en AD(D) ; ce qui impose l'utilisation de plus grandes quantités de solvants chimiques. Pour palier ce problème, nous avons testé la bioconversion de cholestérol sous forme de particules solides en présence de *Luffa cylindrica* ; les résultats sont encourageants, d'où les essais d'augmentation de la productivité dans les paragraphes suivants.

2.4.4. Biotransformation de cholestérol solide 1,72 mM, 2,59 mM et 3,45 mM

Suite aux résultats du paragraphe précédent, trois concentrations de cholestérol sont étudiées : 1,72 mM, 2,59 mM et 3,45 mM soient respectivement 20, 30 et 40 mg dans 30 mL du milieu TSB. Le cholestérol pesé est stérilisé avec le milieu avant la culture ; le milieu est inoculé avec les cellules (PS 2 mg) d'une culture de 48 h dans le milieu TSB. L'accumulation d'AD(D) est présentée dans la **Figure 54**.

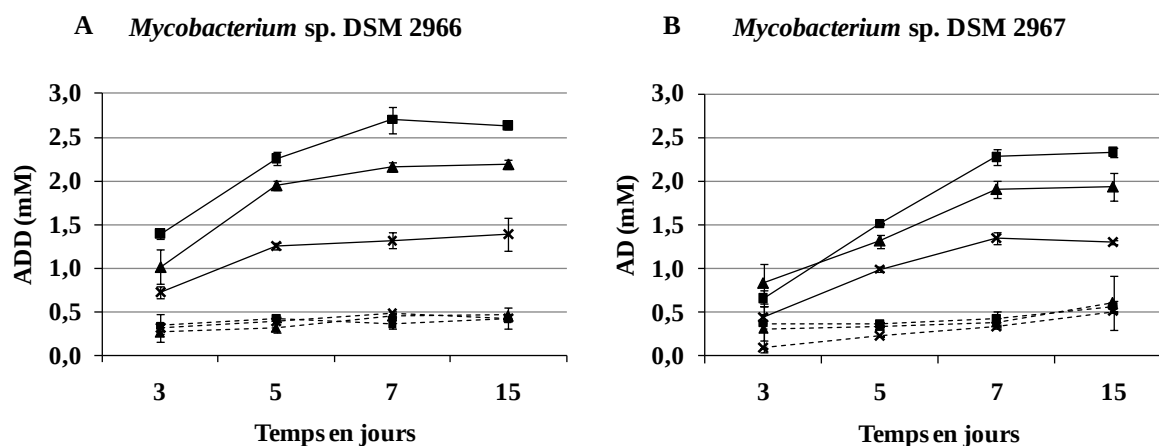


Figure 54 : Accumulation d'ADD par DSM 2966 (A) et d'AD par DSM 2967 (B) à partir de cholestérol solide (× : 1,72 mM, ▲ : 2,59 mM, ■ : 3,45 mM) avec (—) et sans (---) *Luffa cylindrica* dans le milieu TSB. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Inoculum : 5% (v/v). *Luffa cylindrica* : ≈ 400 mg. Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

En absence de *Luffa cylindrica* dans le milieu, l'accumulation d'ADD par DSM 2966 atteint un maximum de 0,48, 0,47 et 0,43 mM pour les trois concentrations de cholestérol

1,72, 2,59 et 3,45 mM respectivement (**Figure 54A**). La diminution du rendement en ADD avec l'augmentation de la quantité de cholestérol est déjà connue (Lee et al., 1993). Au contraire, dans les essais effectués avec *Luffa cylindrica* (≈ 400 mg), l'activité biocatalytique des cellules est conservée et le rendement en ADD reste pratiquement stable ($\eta_{ADD} \approx 0,8$) aux différentes concentrations de cholestérol ; ceci permet d'accumuler jusqu'à 2,7 mM d'ADD à partir de 3,45 mM de cholestérol (**Figure 54A**). Avec les trois concentrations de cholestérol étudiées, la bioconversion s'arrête sans transformation totale du substrat. Ces observations sont confirmées avec DSM 2967 (**Figure 54B**).

Le rapport produit majoritaire/produit minoritaire est beaucoup plus important avec DSM 2966 (ADD/AD) qu'avec DSM 2967 (AD/ADD) (**Figure 55**).

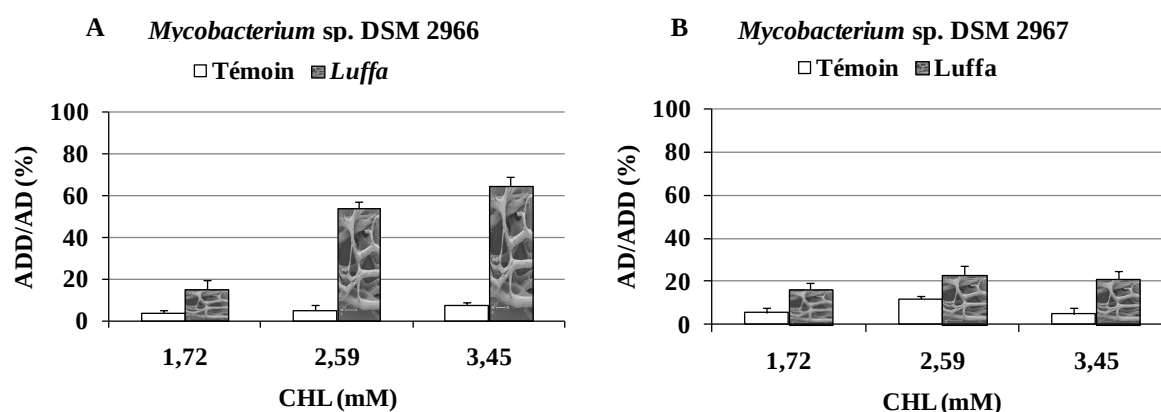


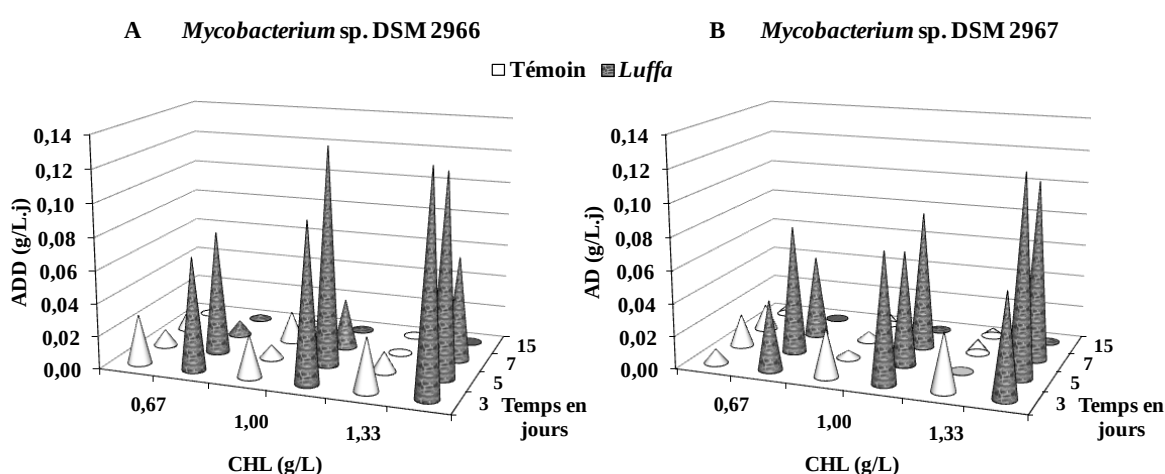
Figure 55 : Rapport ADD/AD avec DSM 2966 (A) et AD/ADD avec DSM 2967 (B).

Ce rapport élevé avec DSM 2966 est dû au plus faible η_{AD} obtenu avec DSM 2967 que le η_{ADD} obtenu avec DSM 2966 ; en plus, les composés déshydrogénés en position C-1 dominant quand le glucose est un facteur limitant dans le milieu (5 g/L) (Lefebvre, 1974) ce qui est notre cas avec le TSB qui contient du glucose à 5g/L. En se basant sur ce rapport élevé (**Figure 55**), il ressort qu'il est plus avantageux de travailler avec DSM 2966 pour l'obtention d'un androsténone pur ; un rapport ADD/AD élevé permet d'obtenir un produit pratiquement pur et facilite la séparation et la récupération du produit (Wang et al., 2002).

Avec les deux souches, les cellules cultivées sans ajout de *Luffa cylindrica* utilisent le cholestérol comme source de carbone pour leur croissance en accumulant l'AD(D) ; après J3 ; quand les cellules entrent en phase stationnaire, la bioconversion et par suite $P_{VAD(D)}$ diminuent (**Figure 56**, page 101). L'ajout de *Luffa cylindrica* assure le maintien de P_v élevée

jusqu'à J5 à cause de l'augmentation de l'interaction entre les cellules et les particules de cholestérol à la surface des fibres de *Luffa cylindrica*. La productivité volumétrique P_{VADD} maximale est de 0,13 g/L.j à J3 lorsque le cholestérol est à 1,33 g/L au départ (**Figure 56A**). Ensuite, elle diminue avec le temps pour deux raisons distinctes :

- 5
 - l'accumulation d'ADD toxique pour les cellules et
 - la diminution de la quantité du substrat à transformer et donc la diminution de la surface de contact entre les cellules et les particules de cholestérol.



10 **Figure 56** : Evolution de la productivité volumétrique d'ADD accumulée par DSM 2966 (A) et d'AD accumulée par DSM 2967 (B) à partir de cholestérol dans le milieu TSB avec et sans *Luffa cylindrica*.

Contrairement à DSM 2966, les cellules de DSM 2967 maintiennent plus longtemps leur activité biocatalytique et P_{VAD} ne diminue qu'au-delà du J7 (**Figure 56B**). P_{VAD} maximale est de 0,12 g/L.j à J5 avec 1,33 g/L de cholestérol au départ ; X_{CHL} est à son maximum d'environ 0,8 à J7 ce qui explique la diminution de P_{VAD} après J7.

- 15 Ces résultats sont encourageants par rapport à d'autres études effectuées avec une concentration de cholestérol de 1 g/L et utilisant des surfactants et de solvants chimiques pour obtenir P_{VADD} de 0,035 g/L.j (Smith et al., 1993), 0,074 g/L.j (Liu et Lo, 1997) et 0,073 g/L.j (Pérez et al., 1995). P_{VADD} de 0,137 g/L.j peut être obtenue en utilisant la lécithine pour préparer des suspensions colloïdales de cholestérol (1 g/L) ; cependant, il faut prendre en
- 20 considération le temps et l'énergie nécessaire pour préparer ces suspensions et la difficulté de récupérer les produits qui collent sur les parois du fermenteur (Wang et al., 2002).

Pour augmenter davantage la productivité volumétrique P_v , nous avons augmenté la concentration de cholestérol dans le milieu à 1,66 g/L. Un certain effet inhibiteur de la croissance a été observé par l'équipe de Wang (2002) pour une concentration de cholestérol de 1,8 g/L. Pour palier ce problème, l'auteur (Wang) a étudié la bioconversion de cholestérol dans le milieu au point de trouble (*cloud point system*) ; il s'agit de transformer le milieu de bioconversion en une microémulsion : phase aqueuse dans phase organique pour maintenir le cholestérol à une concentration modérée ; la phase organique constituera une réserve de substrat. Ce système permet de dissoudre jusqu'à 15 g/L de cholestérol et d'avoir P_{vADD} de 1,21 g/L.j. Cependant ces systèmes requièrent l'utilisation de grandes quantités de surfactants ioniques (60 g/L) et une méthode délicate de préparation des milieux (Wang et al., 2005).

Conclusion : La bioconversion de cholestérol à l'état solide est limitée par le faible contact entre les cellules et les particules de cholestérol. D'autre part, les rendements en AD(D) diminuent avec l'augmentation de la concentration de cholestérol ce qui limite la productivité des systèmes à cellules libres. L'utilisation de *Luffa cylindrica* comme support poreux pour l'immobilisation des cellules de DSM 2966 et de DSM 2967 permet de conserver des rendements élevés en AD(D) avec l'augmentation de la concentration de cholestérol. Ainsi, P_v d'environ 0,13 g/L.j est obtenue avec les deux souches. Cependant, le rapport produit majoritaire/produit minoritaire montre qu'il est plus avantageux de travailler avec la souche DSM 2966 qui présente un rapport ADD/AD élevé.

2.5. Système continu

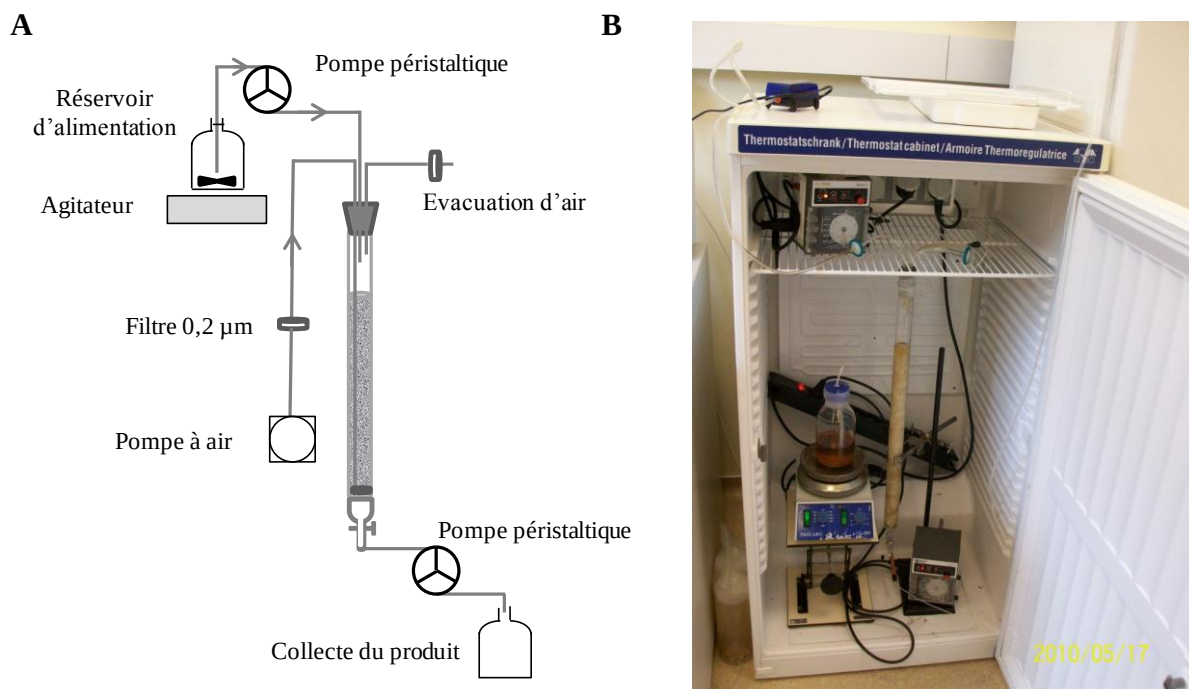
L'accumulation d'ADD au-delà 1 g/L (352 μ M) inhibe la croissance et l'oxydation de cholestérol (Wang et al., 2002; Smith et al., 1993; Szentirmai, 1990). Certains polymères hydrophobes et des résines augmentent la productivité des systèmes de bioconversion de cholestérol en adsorbant *in situ* l'ADD toxique pour les cellules (Szentirmai, 1990). L'amberlite XAD-7 est la résine la plus utilisée à cet égard. En effet, l'ajout de l'amberlite XAD-7 (30 g/L) dans le milieu de bioconversion double l'accumulation d'ADD (13,53 mM) par rapport au même essai effectuée sans amberlite (6,53 mM) (Lee et al., 1993). Depuis, plusieurs études sur la bioconversion des stérols en ADD ont été faites en ajoutant l'amberlite XAD-7 aux milieux de bioconversion (Huang et al., 2006; Staebler et al., 2004; Lo et al., 2002). Une autre solution pour palier cette accumulation d'ADD toxique est la bioconversion dans des systèmes biphasiques (Wendhausen et al., 2005; Carvalho et al., 2004; Staebler et al., 2004; Cruz et al., 2004; 2001) ou dans des milieux organiques (Llanes et al., 2001;

Fernandes et al., 1998) qui assurent une extraction *in situ* de l'ADD ; dans ces systèmes, la phase organique constitue également un réservoir de substrat.

Cependant, la réduction de l'utilisation des solvants organiques dans l'industrie est exigée actuellement dans le contexte de la nécessité de favoriser les procédés éco-compatibles et du respect des contraintes du développement durable (Marques et al., 2010; Wang et Dai, 2010). Pour ces raisons, nous avons essayé d'établir un procédé continu de bioconversion de cholestérol par des cellules immobilisées. En effet, par le renouvellement continu du milieu de fermentation, et le soutirage d'un volume équivalent du milieu épuisé, il est possible d'éviter l'accumulation de l'ADD ; les AD(D) étant 100 fois plus solubles dans la phase aqueuse que le cholestérol (Fernandes et al., 2003). Par ailleurs, un tel procédé permet de maintenir les cellules en phase exponentielle de croissance, ce qui a pour conséquence une conversion plus rapide du substrat. Les avantages les plus notables liés aux procédés continus, sont la réduction drastique du volume des installations et du matériel employés, ainsi que celui des coûts générés par l'arrêt, le drainage, le remplissage et le redémarrage de la fermentation inhérents aux procédés discontinus. Un rendement de 100% en 9(11)-sécocholestérol à partir de cholestérol (0,01 g/L) est obtenu avec une colonne d'enzymes immobilisées (Pomponi, 1999). Des colonnes de cellules immobilisées sont également étudiées ; il s'agit souvent de réaction monoenzymatique telle que la bioconversion de l'AD (0,2 g/L) en ADD par des *Rhodococci* immobilisés dans un gel d'alginate (Le Bec, 1981).

Nous avons par la suite essayé d'établir un procédé continu de bioconversion de cholestérol dans une colonne à cellules immobilisées sur *Luffa cylindrica*. Plusieurs systèmes d'alimentation et de colonnes de dimensions différentes ont été testés. La colonne la plus adéquate à notre système était de type colonne de chromatographie en verre (60 cm de longueur ; 4 cm de diamètre) munie d'un filtre de porosité 2 et d'un robinet (**Figure 57**, page 104). La colonne a été remplie avec environ 15 g (45 cm de hauteur) de disques de *Luffa cylindrica* et 250 mL du milieu TSB ou PBS. Un tuyau métallique de 1 mm de diamètre est relié à un diffuseur d'air au dessus du fritté, en bas de la colonne. La colonne est fermée avec un bouchon laissant passer le tuyau d'air, le tuyau d'alimentation et le tuyau d'évacuation d'air. L'air apporté par une pompe traverse 1 filtre de 0,2 µm de porosité avant d'arriver au fond de la colonne ; le débit est réglé avec un débitmètre de façon à avoir une aération de 1 vvm. L'alimentation par le milieu frais contenant le cholestérol en suspension et le soutirage sont assurés par des pompes péristaltiques dont les débits sont réglés en fonction

des conditions expérimentales (**Figure 57**). La pompe de soutirage est reliée à une bouteille placée à 4°C dans le réfrigérateur pour arrêter l'activité biocatalytique après collecte du milieu.



5 **Figure 57 :** Représentation schématique (A) simple du montage expérimental (B) réalisé du système de mycobactéries immobilisées sur les fibres de *Luffa cylindrica* et opéré en continu dans une configuration lit fixe.

Le calcul du temps de séjour de cholestérol, du débit d'alimentation, du volume réactionnel et la concentration en cholestérol nécessaires pour avoir un taux de bioconversion élevé est difficile à appliquer à notre système. En effet, ces calculs peuvent être appliqués
 10 dans des systèmes souvent homogènes, où le substrat est soluble dans l'eau avec une nature d'écoulement connue ; ce n'est pas le cas avec la colonne de *Luffa cylindrica*. Nous avons donc été obligés d'approcher les bonnes valeurs par approximation successives.

Les premiers essais ont été faits avec des cellules non proliférantes de DSM 2967, récoltées par centrifugation (3000 rpm, 5 min) ; ces cellules sont ensuite introduites
 15 stérilement avec les disques de *Luffa cylindrica* dans la colonne avec 250 mL du tampon PBS. Dans ces conditions, les risques de contamination sont minimisés. Le cholestérol (40 mg), en suspension dans 1 L de tampon PBS, est introduit dans la colonne avec un débit d'environ 40 mL/h. L'ensemble est incubé dans une enceinte à 30°C. Après extraction du milieu récolté, nous avons trouvé qu'environ 25% de cholestérol est resté dans la colonne et que le produit

majoritaire était le CHO (75% de l'extrait) avec des traces d'AD(D). Il apparaît que le temps de séjour de cholestérol dans la colonne n'était pas suffisant pour le clivage de la chaîne latérale et l'obtention des AD(D). La mortalité des cellules lors de la récolte et le remplissage de la colonne peut également expliquer le faible rendement en AD(D) ; dans ce cas, l'oxydation de cholestérol en CHO n'était que le résultat de l'action de la cholestérol-oxydase extracellulaire.

Pour ne pas faire subir aux cellules des conditions stressantes comme dans l'expérience précédente, les cellules sont cultivées dans la colonne. Celle-ci est remplie avec 250 mL du milieu TSB avec les disques de *Luffa cylindrica*. La colonne est inoculée (12%) avec une pré-culture de 2 jours de la souche DSM 2967. L'incubation est faite à 30°C et l'aération est réglée à 1 vvm. Après 3 jours d'incubation, le milieu est renouvelé et l'ensemble est réincubé pendant deux jours supplémentaires. Ensuite, le cholestérol (40 mg), en suspension dans 1 L du milieu TSB, est ajouté à la colonne avec un débit plus faible que lors de l'expérience précédente, soit environ 10 mL/h. Le milieu collecté et les disques de *Luffa cylindrica* sont extraits. Les principaux produits obtenus sont l'AD (48%), l'ADD (10%), le CHO (24%) et 8% de cholestérol résiduel. D'autres produits intermédiaires ont été détectés, la proportion de chacun de ces produits est inférieure à 2%. Dans ces conditions, la $P_{VAD(D)}$ est de 6,25 mg/L, soit 8 fois plus petite que celle obtenue dans les fioles agitées à J5 (paragraphe 2.4.4, page 99). L'augmentation de la productivité nécessite l'augmentation de la concentration de cholestérol dans le milieu d'alimentation ; celle-ci résulte en un dépôt de particules de stérols sur les bords de la colonne et un colmatage des tuyaux d'alimentation.

La répartition des cellules immobilisées tout le long de la colonne a été également étudiée pour vérifier la répartition homogène des cellules le long de la colonne. Dans le cas échéant, le contact entre les particules de cholestérol et les cellules, nécessaire pour la bioconversion, serait diminuée. Ainsi, la colonne est divisée en trois fractions de même hauteur : la fraction supérieure, la fraction moyenne et la fraction inférieure. Les cellules immobilisées sont estimées à 0,62 g/g, 0,53 g/g et 0,48 g/g (Poids sec de cellules par masse de *Luffa cylindrica*) dans les fractions inférieures, moyennes et supérieures respectivement. Ces résultats montrent que la répartition des cellules est relativement homogène à travers la hauteur de la colonne.

Conclusion : La réalisation d'un système continu de bioconversion de cholestérol permet d'éviter l'accumulation des produits toxiques dans le milieu. Un montage expérimental a été

fait dans cet objectif. Les cellules de DSM 2967 sont immobilisées sur les disques de *Luffa cylindrica* dans une colonne. Une productivité de 6,25 mg/L.j est obtenue ; l'augmentation de la productivité par augmentation de la concentration de cholestérol est limitée par la faible solubilité de ce dernier dans la phase aqueuse. La productivité volumétrique obtenue est certainement faible par rapport à celle obtenue dans les fioles agitées ; cependant, c'est la première étude de bioconversion en continu de cholestérol à l'état solide sans l'utilisation de solvants organiques. D'autres travaux ont été effectués avec un milieu d'alimentation constitué d'une dispersion de phase organique et phase aqueuse (Wendhausen et al., 2005).

3. BIOTRANSFORMATION DES PHYTOSTEROLS PAR *MYCOBACTERIUM*

Les phytostérols avec les sapogénines tels que la diosgénine, l'hécongénine et la solasodine constituent des matières premières pour la production des hormones stéroïdes (Fernandes et al., 2003). Plusieurs milliers de tonnes de stéroïdes sont produites au niveau mondial à partir de la diosgénine extraite des racines des *Dioscorea* (Oksman-Caldentey et Inzé, 2004). Cependant, les phytostérols des plantes tels que le stigmastérol, le β -sitostérol et le campestérol sont les plus utilisés dans l'industrie des stéroïdes vue leur abondance dans la nature ; le β -sitostérol, en particulier, est la matière première la plus abondante et la moins chère pour la production de stéroïdes (Donova et al., 2005). Les effluents des industries papetières et de soja constituent une source économique de phytostérols (Claudino et al., 2008; Voishvillo et al., 2003). La boue résultant de l'industrie de canne à sucre contient des phytostérols (0,4%) répartis entre le β -sitostérol (42%), le campestérol (25%) et le stigmastérol (33%) (Pérez et al., 2005).

Pour ces raisons, nous avons testé la bioconversion d'un mélange de phytostérols par les mycobactéries immobilisées sur *Luffa cylindrica*. L'objectif était : d'une part, prouver que *Luffa cylindrica* peut être utilisée comme matrice d'immobilisation de mycobactéries dans la bioconversion d'autres stérols que le cholestérol et d'autre part l'optimisation de la production d'androsténones à partir de phytostérols. Les premiers essais sont effectués dans des fioles agitées comme pour le cholestérol ; ensuite, dans une seconde étape, l'applicabilité du système CI-*Luffa cylindrica* a été étudiée dans un fermenteur de 5 L.

3.1. Bioconversion des phytostérols dans des fioles agitées

3.1.1. Bioconversion des phytostérols solubilisés par l'acétone

L'expérience du paragraphe 2.3.1 (page 81) est reprise en substituant le cholestérol par un mélange de phytostérols composé approximativement de 56% de β -sitostérol BSS, 30% de campestérol CAM et 13% de dihydrobrassicastérol DBS. La quantité de *Luffa cylindrica* est cependant augmentée à environ 400 mg. Les histogrammes et les courbes de la **Figure 58** présentent respectivement les proportions relatives des produits et la biomasse exprimée en mg de protéines/mL de culture.

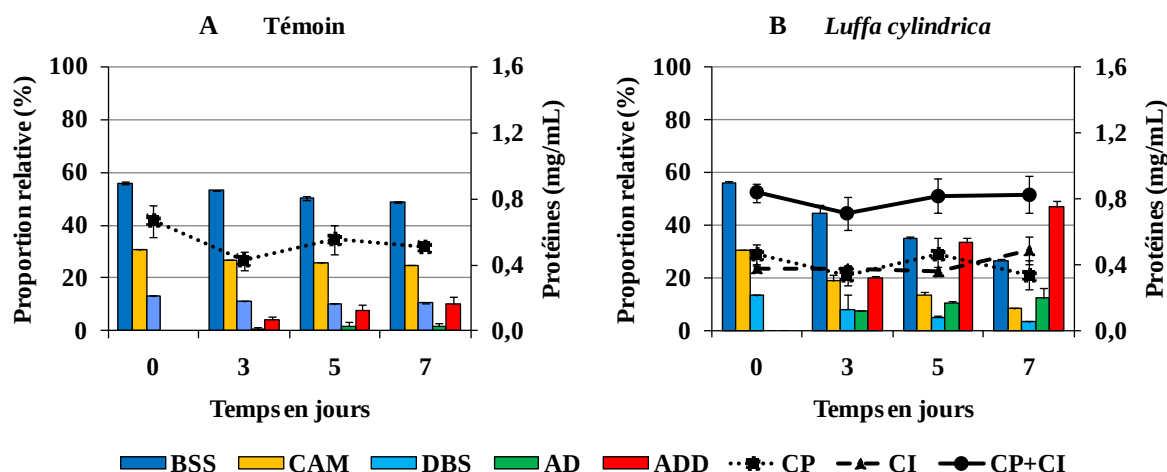


Figure 58 : Biotransformation d'un mélange de phytostérols (0,66 g/L) par DSM 2966 dans le milieu TSB en absence (A) et en présence (B) de fibres de *Luffa cylindrica*. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Inoculum : 5% (v/v). *Luffa cylindrica* : $\approx$ 400 mg. Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

L'utilisation préférentielle de différents stérols a été l'objet de nombreuses études et les données bibliographiques sont relativement contradictoires. Dans leurs travaux sur la bioconversion du *tall oil*, l'équipe de Conner a trouvé que le campestérol, le β -sitostérol et le stigmastérol sont utilisés sans aucune préférence nutritionnelle par les mycobactéries (Conner et al., 1976). Cependant, d'autres travaux postulent que la capacité des bactéries à transformer les stérols en dérivés 17-céto-stéroïdes diminuent dans l'ordre suivant : cholestérol, campestérol, β -sitostérol, stigmastérol et ergostérol (Donova, 2007; Voïshvillo et al., 2003) (d'après les travaux de Akhrem et al. 1970 ; Wise et al. 1968 ; Nagasawa et al. 1970). En effet, la présence d'une ramification en C-24 et d'une double liaison en C-22 ou C-7 diminue la capacité bactérienne à dégrader la chaîne latérale (Donova, 2007) (d'après Voïshvillo et al.

1976 ; Chichikalova et al. 1988). Dans nos expériences, avec et sans *Luffa cylindrica*, une préférence de consommation est observée entre les trois stérols : avec *Luffa* $X_{DBS-J7} = 0,75$, $X_{CAM-J7} = 0,73$ et $X_{BSS-J7} = 0,52$; sans *Luffa* : $X_{DBS-J7} = 0,20$, $X_{CAM-J7} = 0,19$ et $X_{BSS-J7} = 0,13$ (**Figure 58**, page 107). Le taux de bioconversion obtenu pour les trois phytostérols est inférieur à celui obtenu quand le substrat est le cholestérol (sans *Luffa* $X_{CHL-J7}=0,25$; avec *Luffa* $X_{CHL-J7}=0,93$) (cf. paragraphe 2.3.3, page 84).

L'accumulation d'androsténones AD(D) par DSM 2966 à J7 est de 0,273 g/L avec *Luffa cylindrica* contre 0,055 g/L avec le témoin soit une productivité volumétrique cinq fois plus grande $P_{VAD(D)} = 0,039$ g/L.j. Comme dans le cas de cholestérol (cf. paragraphe 2.3.3, page 84), cette meilleure productivité est due à :

- une plus grande biomasse bactérienne ($TPR_{CP+CI-J7} = 0,9$ mg/mL) en présence d'une matrice d'immobilisation (**Figure 58B**, page 107) par rapport au témoin ($TPR_{CP-J7} = 0,56$ mg/mL) (**Figure 58A**) mais aussi à
- une meilleure activité des cellules en présence de *Luffa cylindrica* ; la présence de cette matrice d'immobilisation augmente le contact entre les cellules et les stérols conduisant ainsi à des meilleurs taux de bioconversion.

Ce résultat est relativement intéressant par rapport à $P_{VAD(D)}$ de 0,154 g/L.j obtenu par ajout de phytostérols (1 g/L) sous forme d'une émulsion dans la lécithine (Rumijowska et al., 1997) ; le rapport massique stérol: lécithine est de 1:40 et $P_{VAD(D)}$ du témoin était de 0,128 g/L.j.

L'activité des cellules peut être mesurée par le calcul de la productivité spécifique Ps . Celle-ci diminue progressivement avec le temps, tout en restant plus grande dans les fioles contenant *Luffa cylindrica* ($Ps_{AD(D)-J7} = 0,59$ g/g_{cellules sèches}.L.j) par rapport aux fioles sans *Luffa* ($Ps_{AD(D)-J7} = 0,20$ g/g_{cellules sèches}.L.j) (**Figure 59**, page 109). Cette diminution est expliquée par la diminution de la quantité du substrat et par suite la quantité de produits obtenus.

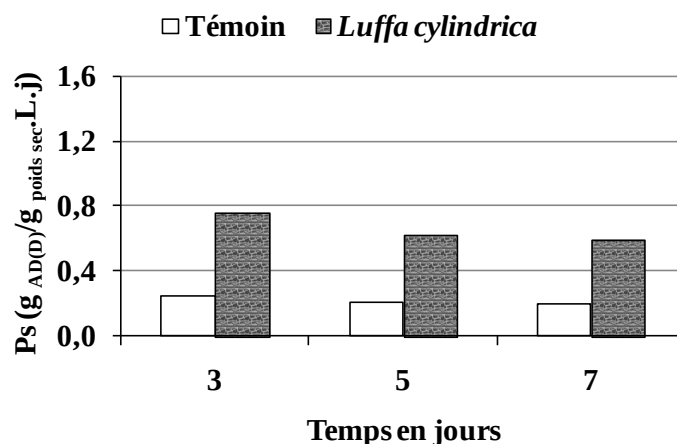


Figure 59 : Productivité spécifique en AD(D) par DSM 2966 dans le milieu TSB à partir d'un mélange de phytostérols (0,66 g/L) dissous dans 1 mL d'acétone.

Pour l'ADD, produit majoritaire obtenu par DSM 2966, P_{VADD} est de 0,030 g/L.j en présence de *Luffa cylindrica*. Ce résultat est encourageant par rapport à $P_{VADD} = 0,032$ g/L.j obtenu avec *Mycobacterium* sp NRRL B-3683 dans un milieu contenant du diméthylformamide à 10% (v/v) (Conner et al., 1976) ; le substrat étant composé de sitostérol-stigmastanol (61%), du campestanol-campesterol (35%) et de stigmastérol (4%). La même souche assure P_{VADD} de 0,058 g/L.j à partir d'un mélange (1 g) de β -sitostérol (42%), de stigmastérol (33%) et de campesterol (25%) dissous dans 5 g de Tween-80 pour 1 L de milieu de culture (Pérez et al., 1995).

La même expérience a été effectuée avec DSM 2967 (**Figure 60**, page 110). Comme pour DSM 2966, au bout du 7^{ème} jour, les taux de bioconversion de CAM ($X_{CAM-J7} = 0,69$) et de DBS ($X_{DBS-J7} = 0,72$) étaient plus grands que celui de BSS ($X_{BSS-J7} = 0,51$) (**Figure 60B**) tout en restant plus grand que $X_{CHL-J7} = 0,81$ (cf paragraphe 2.3.3, page 84).

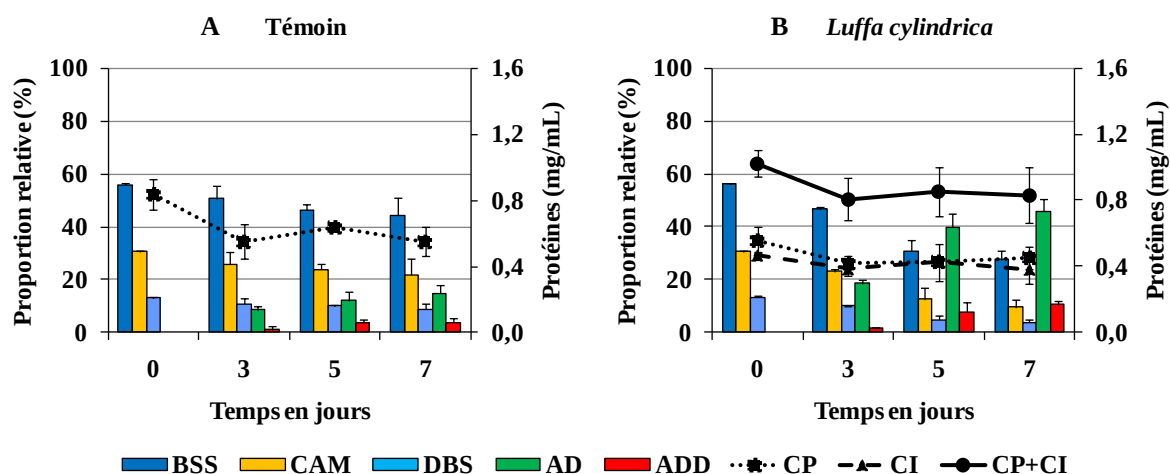
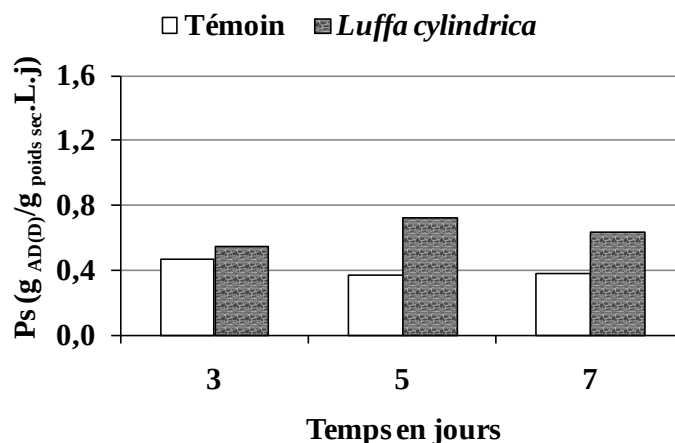


Figure 60 : Biotransformation d'un mélange de phytostérols (0,66 g/L) par DSM 2967 dans le milieu TSB en absence(A) et en présence (B) de fibres de *Luffa cylindrica*. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Inoculum : 5% (v/v). *Luffa cylindrica* : $\approx$ 400 mg. Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

- 5 L'accumulation des androsténones, en présence de *Luffa*, par DSM 2967 ($P_{VAD(D)} = 0,037$ g/L.j) est légèrement plus faible que celle obtenue avec DSM 2966 ($P_{VAD(D)} = 0,039$ g/L.j). L'ajout de *Luffa cylindrica* augmente également $P_{SAD(D)}$ au-delà de J3 par rapport au témoin (**Figure 61**).



- 10 **Figure 61 :** Productivité spécifique en AD(D) par DSM 2967 dans le milieu TSB à partir d'un mélange de phytostérols (0,66 g/L) dissous dans 1 mL d'acétone.

- Concernant l'AD, produit majoritaire de DSM 2967, P_{SAD} à J7 est de 0,52 g/g_{cellules sèches}.L.j soit environ 11 fois plus petit que P_{SAD} de 6,86 g/g_{cellules sèches}.L.j obtenue avec *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 dans un système biphasique (Cruz et al., 2001). Les auteurs ont utilisé le bis(2-éthylhexyle)-phtalate (10% en volume du milieu) comme phase organique avec une biomasse au départ estimée à 10 mg_{cellules humides}/mL ; BSS

était à 0,5 g/L et la durée de l'expérience était de 24 heures d'incubation. Notre résultat reste intéressant en considérant la simplicité et le coût de notre approche. Le meilleur prix constaté pour l'achat de bis(2-éthylhexyle)-phtalate (BEHP) est de l'ordre de 1500 \$/tonnes (Liaoning, China Mainland). *Luffa cylindrica* n'est pas disponible en si grandes quantités ; seule la vente au détail est possible dans des boutiques spécialisées du Moyen-Orient. En comparant le prix de quantités similaires, *Luffa cylindrica* est 400 fois moins cher que le BEHP ; 1 € les 50 g de *Luffa cylindrica* contre 213 € les 25 mL de BEHP (Sigma-Aldrich). De plus, il faut prendre en compte les quantités utilisées de BEHP (98,5 g/L de milieu) et de *Luffa cylindrica* (≈ 13 g/L de milieu pour cette expérience). Finalement, ce procédé est presque 3000 fois moins cher.

Conclusion : Dans les paragraphes précédents, nous avons montré que *Luffa cylindrica* constitue une matrice d'immobilisation efficace pour les mycobactéries dans la bioconversion de cholestérol en androsténones. Dans cette expérience, nous avons montré que cette technique d'immobilisation des cellules sur *Luffa cylindrica* peut être également appliquée pour la bioconversion d'un mélange de phytostérols. L'optimisation des rendements en androsténones constitue l'objectif du paragraphe suivant.

3.1.2. Bioconversion des phytostérols à l'état solide

Dans le but d'augmenter $P_{VAD(D)}$, nous avons augmenté la concentration des phytostérols dans le milieu à 1 g/L, soit 30 mg dans 30 mL de milieu de culture. Cette quantité n'étant pas soluble dans 1 mL d'acétone (volume maximale toléré par les mycobactéries dans 30 mL de milieu), les cristaux de phytostérols sont pesés et ajoutés au milieu à l'état solide comme dans l'expérience du paragraphe 2.4.3 (page 97).

Tout le long de l'expérience, environ la moitié des cellules est fixée sur les fibres dans les fioles *Luffa cylindrica* ($TPR_{CI} = 0,46$ mg/mL ; $TPR_{CP} = 0,43$ mg/mL) (**Figure 62B**, page 112). Dans les deux cas, la biomasse totale diminue au-delà de J3 avec accumulation des déchets du métabolisme cellulaire (**Figure 62**) et en particulier l'accumulation des AD(D) dans les fioles avec *Luffa* (**Figure 62B**). L'effet positif de l'ajout de *Luffa* sur la bioconversion des phytostérols s'observe par la quantité d'AD(D) accumulée à J7 ; elle est de 0,307 g/L (**Figure 62B**) dans les fioles avec *Luffa* contre 0,041 g/L dans les fioles témoins (**Figure 62A**).

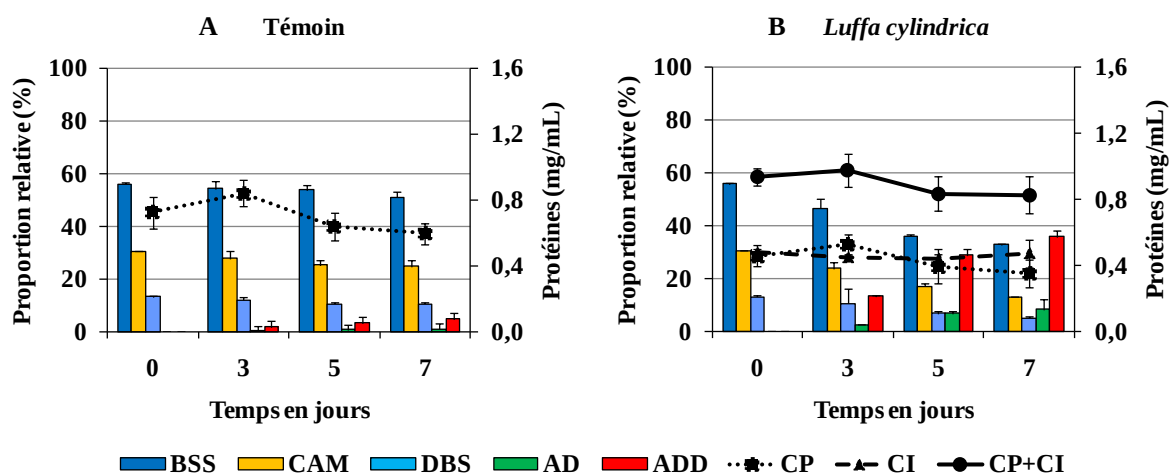


Figure 62: Biotransformation d'un mélange de phytostérols (1 g/L) par DSM 2966 dans le milieu TSB en absence(A) et en présence (B) de fibres de *Luffa cylindrica*. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Inoculum : 5% (v/v). *Luffa cylindrica* : ≈ 400 mg. Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

5 L'ajout des phytostérols (1 g/L) sous forme de cristaux fait diminuer le rendement en ADD ($\eta_{ADD}=0,07$) par rapport à l'expérience du paragraphe 3.1.1 ($\eta_{ADD}=0,15$) où les phytostérols (0,66 g/L) sont ajoutés dissous dans 1 mL d'acétone. Cependant, $P_{VAD(D)}$ (0,043 g/L.j) se trouve augmentée d'environ 10%, dans ces conditions, par rapport à l'expérience précédente (0,039 g/L.j). En plus, l'activité des cellules n'a pas diminué avec les

10 phytostérols ajoutés à l'état solide (**Figure 63**) ; $P_{SAD(D)-J7}$ est de 0,59 g/g_{cellules sèches}.L.j avec les phytostérols dissous dans l'acétone (**Figure 63A**) et de 0,66 g/g_{cellules sèches}.L.j lorsque ceux-ci sont ajoutés sous forme de cristaux (**Figure 63B**). Par contre, dans ce dernier cas, $P_{SAD(D)}$ du témoin diminue considérablement par rapport au témoin de l'expérience avec ajout d'acétone.

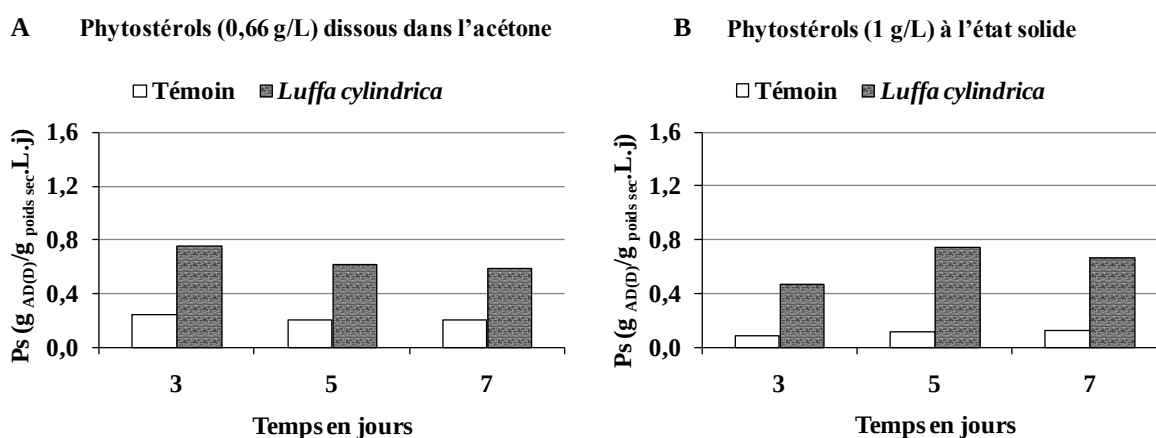


Figure 63: Productivité spécifique en AD(D) par DSM 2966 à partir d'un mélange de phytostérols (0,66 g/L) dissous dans l'acétone (A) et de phytostérols (1 g/L) ajouté à l'état solide (B) dans le milieu TSB.

Une productivité volumétrique de 0,058 g/L.j en ADD est obtenue après 6 jours d'incubation de *Mycobacterium* sp NRRL B-3683 ; les phytostérols (1 g/L) sont ajoutés dans le milieu de biotransformation avec le Tween 80 (5 g/L) (Pérez et al., 1995). Dans notre expérience, et uniquement par l'ajout de *Luffa* (400 mg/30 mL milieu), nous avons obtenu

Les résultats de la même expérience effectuée avec DSM 2967 sont présentés dans la **Figure 64**. Le rendement en AD augmente de 0,08 (**Figure 64A**) à 0,50 (**Figure 64B**) par ajout de *Luffa cylindrica* dans le milieu.

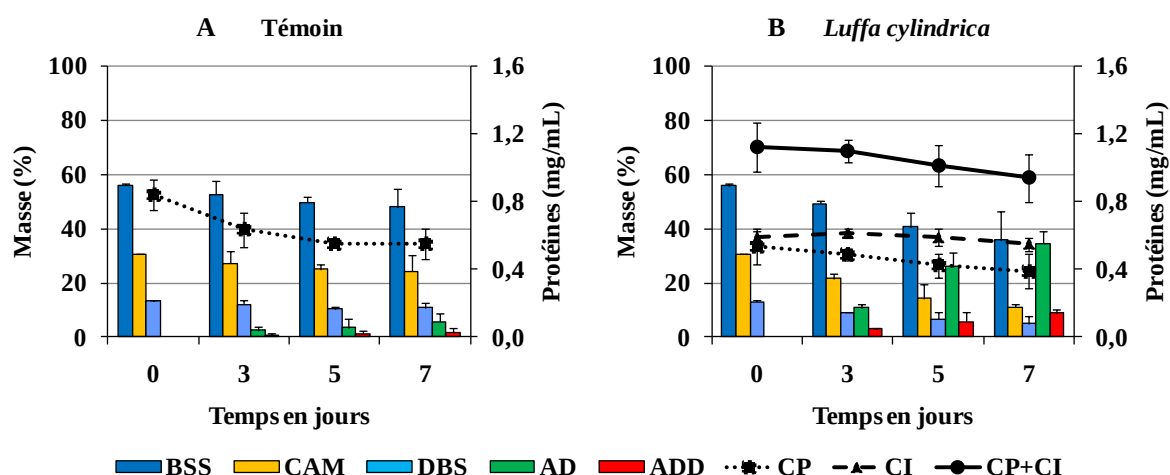


Figure 64 : Biotransformation d'un mélange de phytostérols (1 g/L) par DSM 2967 dans le milieu TSB en absence(A) et en présence (B) de fibres de *Luffa cylindrica*. Volume fiole : 100 mL. Volume milieu : 30 mL. Inoculum : 5% (v/v). *Luffa cylindrica* : $\approx$ 400 mg. Température : 30°C. Agitation : 200 rpm.

La **Figure 64B** montre, en plus, que la biomasse immobilisée (CI) demeure relativement constant durant les 7 jours d'incubation contrairement à la biomasse planctonique (CP) qui diminue progressivement après l'ajout de phytostérols à J0.

En termes de P_{VAD} , l'équipe de Rumijowska-Galewicz A et al. 2000 augmente P_{VAD} de 0,034 à 0,046 g/L.j par ajout du D,L-norleucine (400 μ g/mL) dans une culture de *Mycobacterium vaccae* NRRL B-3805 ; le β -sitostérol (0,2 g/L) est dissous dans le Tween 80 (2 g/L de milieu de culture) (Rumijowska-Galewicz A, 2000). La D,L-norleucine inhibe la biosynthèse des complexes lipidiques de la paroi des mycobactéries ; la perméabilité de ce dernier aux substances hydrophobes se trouve ainsi augmentée (Rumijowska-Galewicz A, 2000). Dans notre étude, P_{VAD} augmente de 0,005 g/L.j à 0,034 g/L.j par le seul ajout de *Luffa* dans le milieu.

D'autres techniques visant à augmenter P_{VAD} sont étudiées dans la littérature, telle que la bioconversion dans des solvants organiques, tolérés par les mycobactéries ; ces solvants permettent de dissoudre une grande quantité de substrat à transformer. Ainsi, P_{VAD} de 0,411 g/L.j est obtenue à partir de β -sitostérol (2 g/L) lorsque la réaction est faite dans un système biphasique (bis(2-éthylhexyle)-phtalate BEHP : Tampon phosphate, 1 :1) avec des cellules de *Mycobacterium* sp NRRL B-3805 immobilisées sur des fibres de chrysotile 5R (Wendhausen et al., 2005) ; ces derniers ont augmenté P_{VAD} de 34% par rapport aux cellules planctoniques (0,274 g/L.j). Cet effet positif des fibres de chrysotile n'est pas observé lorsque la concentration de β -sitostérol dans le milieu est de 1 g/L (Wendhausen et al., 2005).

Le dioctyl phtalate en système biphasique avec le tris-HCl (100 mM) comme phase aqueuse permet d'accumuler jusqu'à 4,53 g/L.j d'AD avec *Mycobacterium* sp NRRL B-3805 à partir du β -sitostérol (2,5 g/L) (Staebler et al., 2004). En considérant la biomasse (70 g/L) investie dans cette expérience, la productivité spécifique P_{SAD} est de 0,543 g/g_{cellules sèches}.L.j (Staebler et al., 2004) soit supérieure d'environ 8% à $P_{SAD} = 0,503$ g/g_{cellules sèches}.L.j que nous avons obtenu avec *Luffa* dans un milieu aqueux.

Conclusion : La bioconversion de phytostérols à l'état solide dans un milieu aqueux est 6 fois plus grande lorsque des fibres de *Luffa cylindrica* sont ajoutées au milieu. De plus grandes productivités volumétriques en AD(D) sont obtenues dans les systèmes biphasiques ; cependant en considérant la biomasse investie dans ces systèmes et leur toxicité pour les bactéries, la productivité spécifique en AD(D) des mycobactéries dans ces systèmes est dans le même ordre de grandeur que celle avec les mycobactéries cultivées dans un milieu aqueux en présence de *Luffa*.

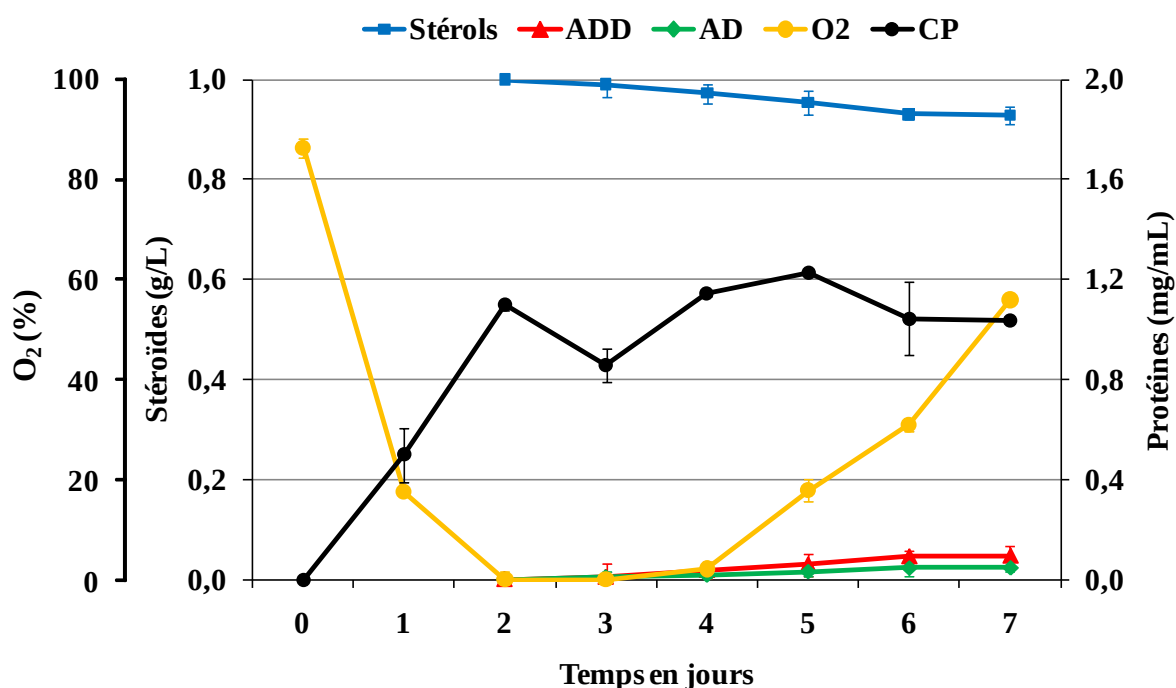
3.2. Bioconversion dans un fermenteur de 5 L

Lors des expériences précédentes, nous avons montré que *Luffa cylindrica* constitue une matrice d'immobilisation intéressante pour les mycobactéries dans la bioconversion du cholestérol et d'un mélange de phytostérols. Ces résultats sont obtenus dans des fioles incubées sous agitation à 200 rpm. Il est connu, par contre, que lors du passage à une plus grande échelle de production, les rendements de réactions de bioconversion obtenus dans les fioles agitées risquent de changer totalement (Doble et al., 2004c). Ceci est dû, entre autres, au changement de vitesse d'agitation, à la forme du conteneur et à son rapport surface/volume. Ainsi, du stade laboratoire où les cultures sont de l'ordre de quelques cm³ au

stade production où les fermenteurs atteignent plusieurs centaines de m³, il sera nécessaire d'effectuer des étapes successives et croissantes de propagation : d'abord le passage des fioles agitées au fermenteur de laboratoire (2 à 20 L), ensuite le fermenteur pilote (5 L à 5 m³) et enfin le fermenteur industriel (10 à plusieurs à centaines de m³).

5 Dans cette étude, la bioconversion de phytostérols par les mycobactéries immobilisées sur les fibres de *Luffa cylindrica* a été étudiée dans un fermenteur de 5 L (cf chapitre Matériel et Méthodes-paragraphe 5.2, page 137). Chaque expérience est répétée deux fois, et les prélèvements sont effectués en triplicat.

10 Les conditions expérimentales sont détaillées dans la légende de la **Figure 65**. La mesure du taux d'oxygène dissous est faite par une mesure relative en % où le 100% représente une aération du milieu à 1 vvm avec une agitation de 200 rpm pendant une heure après l'autoclavage.



15 **Figure 65** : Bioconversion de phytostérols (1 g/L) par DSM 2966 dans un fermenteur de 5 L. Volume utile : 3 L de TSB. Acétone : 5%. Température : 30±1°C. pH = 7,2±0,5. Aération : 1 vvm. Agitation : 200 rpm. Inoculum : 2%. Anti-mousse : 500 ppm.

Deux jours après l'inoculation du milieu, le taux d'oxygène dissous diminue à 0. La suspension de phytostérols (3 g) dans l'acétone (150 mL) est ajoutée à J2 avec une pompe péristaltique (25 mL/h). L'acétone fait diminuer la biomasse planctonique qui recommence sa

multiplication au J3. Dans ces conditions, $P_{vAD(D)}$ est de 0,014 g/L.j soit identique à celle obtenue dans l'expérience effectuée dans les fioles sous agitation (cf paragraphe 3.1.1, page 107). A J4, le taux d'oxygène dissous augmente progressivement jusqu'à 55% à J7. Cette courbe en V de l'évolution du taux d'oxygène est connue dans la fermentation des stérols (Gulla et al., 2010; Huang et al., 2006; Lo et al., 2002; Liu et Lo, 1997). Une augmentation rapide du pH (compensée par l'ajout d'acide grâce au régulateur du fermenteur), est observée le premier jour après l'ajout de phytostérols ; le pH continue ensuite à augmenter légèrement jusqu'à la fin de la réaction. Ce phénomène est également observée par Huang et al., 2006. Selon plusieurs études, le pH du milieu n'a qu'un effet marginal sur l'accumulation des AD(D) (Gulla et al., 2010) ; le pH optimal est défini entre 7 et 8 pour les systèmes de biotransformation en phase aqueuse (Staebler et al., 2004).

L'expérience est répétée en ajoutant 20 g de *Luffa cylindrica* dans le milieu (3 L) avant l'autoclavage. Les prélèvements effectués représentent la composition du milieu sans tenir compte des stéroïdes et de la biomasse fixés sur *Luffa cylindrica*. Les stéroïdes, à l'état solide en phase aqueuse, ne sont pas répartis d'une façon homogène dans le fermenteur d'une part ; et d'autre part, il est impossible de prélever de disques de *Luffa cylindrica* tout en conservant la stérilité dans le fermenteur. Ainsi, les résultats de la **Figure 66** (page 117) représentent le taux de cellules planctoniques CP et le pourcentage en masse des stéroïdes extraits à partir des aliquotes de volume connu.

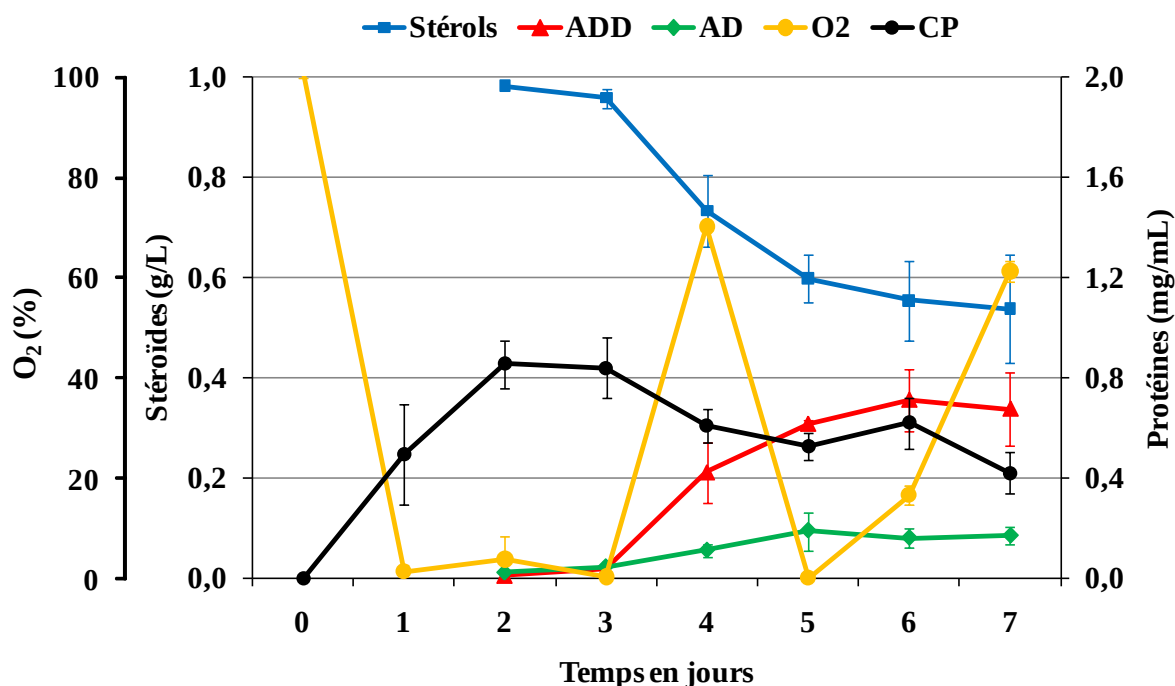


Figure 66 : Bioconversion de phytostérols (1 g/L) par DSM 2966 dans un fermenteur de 5 L. Volume utile : 3 L de TSB. *Luffa cylindrica* : 20 g. Acétone : 5%. Température : 30±1°C. pH = 7,2±0,5. Aération : 1 vvm. Agitation : 200 rpm. Inoculum : 2%. Anti-mousse : 500 ppm.

5 Avec *Luffa cylindrica*, l'accumulation des AD(D) dans le milieu est estimée à 0,127 g/L à J6 (4 jours après l'ajout de phytostérols) avec $P_{VAD(D)} = 0,031$ g/L.j soit le double de $P_{VAD(D)}$ obtenue en absence de *Luffa cylindrica*. A J7, la réaction est arrêtée ; les disques de *Luffa cylindrica* ont été séparés du milieu et extraits. L'extrait obtenu (≈2 g) est composé essentiellement du mélange de phytostérols dans les proportions suivantes : 8,8% de dihydrobrassicastérol, 27,8% de campestérol et 52,5% de β-sitostérol. En effet, la plus grande fraction des AD(D), 100 fois plus soluble que les stérols dans l'eau, restent dans le milieu alors que ces derniers à l'état solide restent déposés sur les disques de *Luffa cylindrica*. Ceci est intéressant pour l'élaboration de procédés de bioconversion de stérols en mode continu : les stérols restent dans le fermenteur lors du soutirage du milieu contenant la majorité d'AD(D) produits.

L'expérience effectuée dans les fioles agitées (paragraphe 3.1.1, page 107) avec 0,66 g/L de phytostérols a permis d'avoir $P_{VAD(D)} = 0,056$ g/L.j. Ce résultat n'a pas pu être extrapolé à l'échelle du fermenteur probablement à cause du plus faible inoculum (2%) dans ce dernier. Pour cela, l'expérience a été reprise en augmentant le volume d'inoculum à 5%

comme dans les expériences du paragraphe 3.1.1. Les résultats sont présentés dans la **Figure 67**.

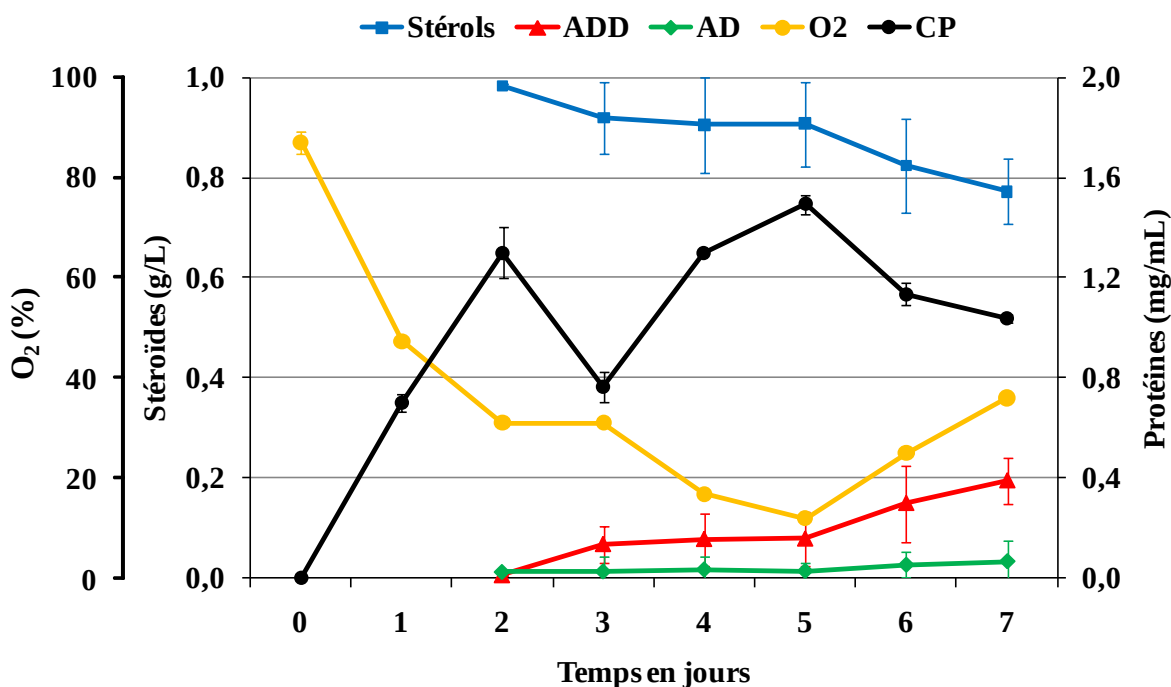


Figure 67 : Bioconversion de phytostérols (1 g/L) par DSM 2966 dans un fermenteur de 5 L. Volume utile : 3 L de TSB. Acétone : 5%. Température : 30±1°C. pH = 7,2±0,5. Aération : 1 vvm. Agitation : 200 rpm. Inoculum : 5%. Anti-mousse : 500 ppm.

La courbe du taux d'oxygène (**Figure 67**) et le pH dissous conservent la même allure que précédemment. L'augmentation de l'inoculum de 2 à 5% fait augmenter $P_{VAD(D)}$ de 0,014 g/L.j à 0,045 g/L.j. L'augmentation du volume de l'inoculum au-delà de 5% n'a pas été étudiée. Selon les travaux de Wang et al., 2005, une augmentation de l'inoculum entre 10 et 30% n'a pas d'effet sur la biotransformation de phytostérols dans un système au point de trouble. Cependant, un inoculum optimal de 15% est déterminé par Gulla et al., 2010.

L'ajout de *Luffa cylindrica* au milieu a permis de tripler $P_{VAD(D)}$, soit 0,144 g/L.j au J3 (**Figure 68**, page 119). Cet effet positif de *Luffa* est atténué par rapport à celui observé dans les fioles sous agitation (paragraphe 3.1.1, page 107) ; cependant, il faut signaler que la concentration en phytostérols dans ces dernières était de 0,66 g/L.

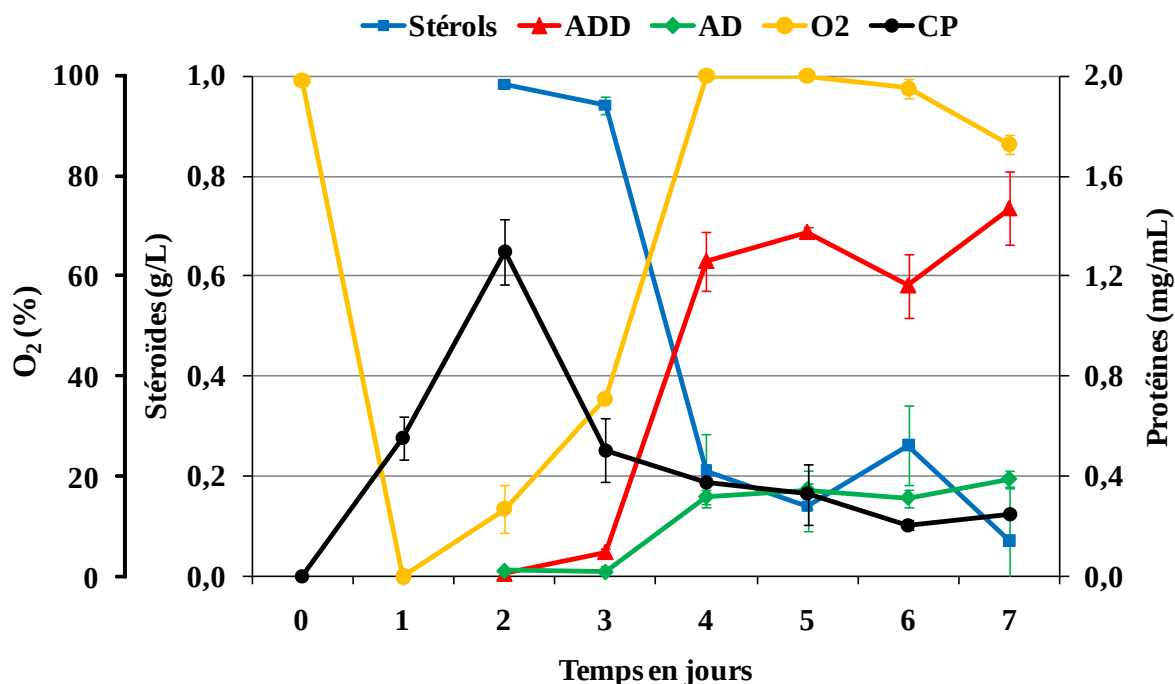


Figure 68 : Bioconversion de phytostérols (1 g/L) par DSM 2966 dans un fermenteur de 5 L. Volume utile : 3 L de TSB. *Luffa cylindrica* : 20 g. Acétone : 5%. Température : $30 \pm 1^\circ\text{C}$. pH = $7,2 \pm 0,5$. Aération : 1 vvm. Agitation : 200 rpm. Inoculum : 5%. Anti-mousse : 500 ppm.

5

A J3, la productivité volumétrique en ADD, comme produit majoritaire, est de 0,123 g/L.j. Ce résultat est très intéressant par rapport à $P_{VADD} = 0,038$ g/L.j (Marsheck et al., 1972) en utilisant le Tween 80 (1 g/L) et à $P_{VADD} = 0,110$ g/L.j (Huang et al., 2006) en utilisant des mutants et de l'amberlite XAD7 (20 g/L). L'amberlite permet de fixer les AD(D) *in situ* protégeant ainsi les cellules de l'effet toxique des AD(D).

10

De plus grandes P_v sont obtenues dans les travaux de Gulla et al., 2010 et Egorova et al., 2009. Des cellules de *Mycobacterium fortuitum* subsp. *fortuitum* NCIM 5239 accumulent jusqu'à 0,325 g/L.j d'AD comme produit majoritaire à partir de phytostérols (3 g/L) dissous dans le propylène glycol-400 (10% en volume du milieu) (Gulla et al., 2010). Une autre approche permet d'avoir $P_{VAD} = 0,592$ g/L.j avec des cellules de *Mycobacterium* sp. VKMAc-1816D ; il s'agit d'ajouter les phytostérols (5 g/L $\approx$ 12,08 mM) sous forme d'une suspension aqueuse obtenue par ultra-sonication ; 13,3 g/L ($\approx$ 11,7 mM) de β -cyclodextrine méthylée sont également ajoutés au milieu (Egorova et al., 2009). Cependant, en considérant la difficulté de séparation de produits, le coût et la simplicité de la technique, nous trouvons que l'utilisation de *Luffa cylindrica* est largement avantageuse.

15

20

Une dernière fermentation effectuée avec *Luffa cylindrica* dans les mêmes conditions que les précédentes à la différence que les phytostérols (1 g/L) sont ajoutés au milieu sous forme de cristaux avant autoclavage et l'inoculum a été de 2%. Dans les prélèvements effectués à J1, J2 et J3, la concentration totale de stéroïdes a été de 0,18 g/L soit environ 5 fois plus petite que la concentration de départ (1 g/L). En réalité, les disques de *Luffa* -formant un grand réseau de fibres autour de l'axe d'agitation- collectent les cristaux de phytostérols en suspension et les cellules planctoniques. Les AD(D) représentent 90-95% de la masse de l'extrait ; et donc $P_{VAD(D)} = 0,057$ g/L.j. Ce résultat est intéressant car il permet d'envisager une procédure « blanche » de production de stéroïdes.

- 10 Conclusion : Les résultats de bioconversion de phytostérols obtenus dans les fioles sous agitation, en présence de *Luffa cylindrica*, peuvent être extrapolés à l'échelle d'un fermenteur de laboratoire de 5 L. Cependant, les résultats obtenus dans le fermenteur sont encore en phase embryonnaire ; une optimisation des différents paramètres de fermentation est encore nécessaire. Le taux d'aération est le paramètre le plus important dans cette réaction et le plus
- 15 difficile à contrôler (Szentirmai, 1990). L'accumulation dans le milieu des AD(D) et la persistance de phytostérols sur les fibres de *Luffa cylindrica* permet de collecter des fractions du milieu riches en produits. Suite à cette « purification » *in situ*, une procédure continue de production de stéroïdes peut être envisagée.

CONCLUSION

Conclusion

L'objectif général de nos travaux consistait à améliorer la bioconversion de substances lipophiles en utilisant en particulier, des techniques d'immobilisation passive les plus éco-compatibles. Le caractère lipophile limite la bioconversion dans l'eau, milieu réactionnel des biocatalyseurs. Le rapprochement entre les substrats lipophiles et les microorganismes augmente leur interaction lorsque les derniers sont immobilisés au sein de matériaux poreux. Le contact direct entre ces substrats lipophiles et les microorganismes est, en effet, indispensable pour leur bioconversion (Atrat et al., 1991; Goswami et al., 1983).

L'analyse bibliographique effectuée montre que le clivage de la chaîne latérale des stérols est une réaction modèle de bioconversion de substances lipophiles solides (Angelova et Schmauder, 1999). Les stérols, en particulier le β -sitostérol, sont des produits naturellement abondants et constituent un stock de matières premières intéressant pour l'industrie pharmaceutique (Donova et al., 2005). Ils sont les précurseurs naturels de molécules à forte valeur ajoutée tels que les glucocorticoïdes, les hormones sexuelles et les minéralcorticoïdes. La production mondiale de stéroïdes excède un million de tonnes par an (Znidarsic-Plazl et Plazl, 2010) avec un chiffre d'affaire mondial de l'ordre de dix milliards de dollars (Muffler et al., 2011; Bureik et Bernhardt, 2007). Les deux androsténones AD et ADD représentent quant à elles un chiffre d'affaire de 750 millions dollars (Pérez et al., 2005). De nombreux travaux sont publiés sur l'augmentation de taux de bioconversion des stérols par les mycobactéries. Ces travaux font souvent appel aux solvants habituels ce qui fait perdre à la bioconversion des stérols son caractère de biotechnologie blanche. De plus, ces solutions proposées ne sont pas applicables à l'échelle industrielle (Malaviya et Gomes, 2008).

En premier lieu, nous nous sommes intéressés à l'étude de la modification de l'activité biocatalytique des mycobactéries sous certaines conditions de stress. L'utilisation des cellules non proliférantes, la température, la présence de support poreux et la bioconversion dans des milieux pauvres n'ont agi que sur la cinétique et le taux de bioconversion du cholestérol. Les produits majoritaires obtenus étaient toujours l'AD et l'ADD auxquelles nous nous sommes intéressés.

La deuxième partie du travail a consisté en une sélection d'une matrice d'immobilisation performante et en une étude détaillée de son utilisation. Parmi plusieurs, nous avons trouvé que le fruit sec de *Luffa cylindrica* est la matrice la plus performante. La

topographie des fibres de *Luffa* et la présence de domaines hydrophiles (holocellulose) et hydrophobes (lignine) favorisent l'adhésion de mycobactéries dont la paroi est à dominance hydrophobe. La grande surface massique et la structure poreuse de *Luffa cylindrica* ont permis de construire un réseau tridimensionnel de mycobactéries dans le milieu. L'interaction entre les particules de cholestérol et les cellules immobilisées est donc favorisée.

Cette observation confirme notre hypothèse sur l'augmentation de taux de bioconversion par le rapprochement substrat-cellules via l'immobilisation de ces dernières. Les résultats de cette étude ont montré en plus, que les cellules immobilisées sur *Luffa cylindrica* ont une meilleure stabilité que les cellules planctoniques. Dans la suite du travail :

1. Nous avons montré la stabilité mécanique et thermique de *Luffa* ; caractéristiques importantes pour sa réutilisation. L'activité biocatalytique des cellules immobilisées sur *Luffa* diminue légèrement (environ 30%) après 4 cycles d'incubation.
2. Nous avons réalisé une accumulation d'ADD d'environ 0,13 g/L.j à partir du cholestérol 1,33 g/L en présence de *Luffa cylindrica*. Le cholestérol est ajouté au milieu à l'état solide. Ce résultat est intéressant par rapport à d'autres études effectuées avec de solvants chimiques et des surfactants. Pour ces dernières, il faut prendre en considération le temps et l'énergie nécessaire pour préparer ces suspensions et la difficulté de récupérer les produits qui collent sur les parois du fermenteur (Wang et al., 2002).
3. Nous avons mis en place un système de bioconversion en continu du cholestérol, toujours sans l'utilisation de solvants organiques. Bien que l'accumulation d'AD(D) avec ce système soit restée inférieure aux systèmes discontinus, nous sommes les premiers à réaliser la biotransformation du cholestérol à l'état solide dans un réacteur en colonne sans utiliser de solvants.
4. Nous avons montré que l'efficacité du fruit sec de *Luffa cylindrica* comme matrice d'immobilisation s'étend à la bioconversion d'autres stérols que le cholestérol. L'effet positif de *Luffa* était le même que dans le cas du cholestérol.
5. Nous avons testé l'immobilisation des mycobactéries sur *Luffa cylindrica* dans un fermenteur de 5 L. Les résultats primaires sont encourageants et permettent d'envisager un système de production semi-continu. En effet, nous avons observé

l'accumulation des produits AD(D) dans le milieu et la persistance des stérols solides sur le réseau de fibres colonisé par les mycobactéries.

En conclusion, ce travail ouvre la voie à une nouvelle piste d'étude dans le domaine de bioconversion de substances lipophiles solides. L'immobilisation de mycobactéries a été
5 largement étudiée comme une technique auxiliaire lorsque la bioconversion est réalisée dans un milieu organique ou un système biphasique. Dans le présent travail, nous avons montré qu'en plus de ses avantages connus, l'immobilisation passive de mycobactéries au sein de support poreux peut favoriser l'interaction cellule-substrat lipophile et augmenter le taux de bioconversion sans utiliser de solvants et de produits chimiques. Ces derniers peuvent avoir
10 des effets néfastes envers les microorganismes, le personnel opérateur et l'environnement ; ils sont souvent de nature explosive, inflammable et toxique.

En termes d'immobilisation, le fruit sec de *Luffa cylindrica* constitue une matrice d'immobilisation de mycobactéries très intéressante. Par rapport aux supports organiques classiques tels que les gels de polyacrylamide, les mousse de polyuréthanes, la silicone et les
15 plastique, le fruit sec de *Luffa cylindrica* présente les avantages suivants : (i) c'est un produit naturel, (ii) biodégradable, (iii) peu onéreux, (iv) non toxique pour les microorganismes, (v) stable du point de vue mécanique et thermique, (vi) et réutilisable.

PERSPECTIVES

Stratégies futures

Nos travaux ont ouvert de nombreuses pistes pour la poursuite des études de la bioconversion des stérols par des procédés « propres ». Plusieurs expériences sont encore à faire :

- 5 ○ Dans un premier temps, il serait intéressant d'optimiser l'utilisation de *Luffa cylindrica* dans le fermenteur du laboratoire afin de passer à l'échelle d'un fermenteur pilote. Cette optimisation devra surtout porter sur la régulation du taux d'aération. Il n'est pas facile, en effet, de définir un taux d'aération optimal.
- 10 ○ L'établissement d'une procédure semi-continue de bioconversion de stérols sera également intéressant ; une telle procédure avec les cellules immobilisées sur *Luffa cylindrica* pourra faciliter la récupération des AD(D) à partir du milieu soutiré.
- De plus, la réutilisation de cellules immobilisées sur *Luffa cylindrica* devra être étudiée au-delà de quatre cycles d'incubation.
- 15 ○ L'étude de la bioconversion du cholestérol dans un réacteur en colonne doit être approfondie.
- Une étude économique poussée et une évaluation de l'impact environnemental de notre approche par rapport aux techniques classiques serait intéressante.

Perspectives de recherche

20 Ce travail n'était qu'un début pour l'étude de la bioconversion de substances lipophiles par des microorganismes immobilisées dans des matériaux poreux. Les stérols ont été étudiés comme molécules modèles de ces substances lipophiles solides en milieu aqueux. La réussite de notre approche avec les stérols permet d'envisager la bioconversion d'autres molécules lipophiles non bio-convertibles actuellement tels que les triterpènes des familles hopane et dammarane. L'intérêt de travailler avec ces substances vient de :

- 25 ○ Leur abondance dans la nature. Les hopanoïdes sont très répandus dans tous les sédiments (10^{12} tonnes) (Ourisson & Albrecht 1992).
- Leur origine bactérienne, ce qui fait des hopanoïdes une matière première renouvelable.
- Leur analogie structurale avec les stérols laisse espérer des activités biologiques comparables voire meilleurs.
- 30

MATERIEL ET METHODES

1. BIOCATALYSEURS ET CULTURE

Toutes les souches étudiées dans ce travail sont de la collection « Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen » (DSMZ).

Mycobacterium sp DSM 2966

5 *Mycobacterium* sp DSM 2967

Rhodococcus sp DSM 43287

Rhodococcus erythropolis DSM 43066

1.1. Milieux de culture et préparation

Quatre milieux de culture et de biotransformation ont été utilisés. Les constituants des milieux de culture sont pesés avec une balance de précision et dissous dans de l'eau distillée. Le pH des milieux a été ajusté avant autoclavage avec de l'acide chlorhydrique (4 N) et de la soude à (4N). Le milieu est réparti dans des fioles de 100 mL de volume total. Le volume utile sera toujours de 30 mL. Les fioles ont été bouchées avec du coton cardé puis recouvert du papier aluminium. La stérilisation des milieux a été effectuée par autoclavage à 121°C pendant 30 min.

1.2. Tryptone Soy Broth (TSB)

Le milieu TSB est utilisé pour la culture des deux souches *Mycobacterium* sp. DSM 2966 et *Mycobacterium* sp. DSM 2967. Le milieu TSB (Becton, Dickinson and company; Sparks-USA) est un milieu nutritif qui permet la croissance d'un grand nombre de microorganismes, en particulier les bactéries aérobies et anaérobies facultatives courantes. Sa composition en g/L est la suivante :

	Digestion pancréatique de caséine	17 g/L
	Digestion peptique de soja	3 g/L
	Dextrose	2,5 g/L
25	NaCl	5 g/L
	K ₂ HPO ₄	2,5 g/L

Dans le milieu TSB, les produits de la digestion enzymatique de caséine et de soja apportent des aminoacides et autres composés azotés complexes nécessaires à la croissance. Le glucose constitue une source d'énergie. Le chlorure de sodium assure l'équilibre osmotique. Le phosphate de potassium dibasique agit comme un tampon et permet de contrôler le pH ajusté à 7,3.

1.3. Gym Streptomyces Medium (GSM)

Le Gym Streptomyces Medium (Becton, Dickinson and company; Sparks-USA) est le milieu de culture préconisé par DSM pour les deux souches *Rhodococcus erythropolis* DSM 43066 et *Rhodococcus* sp. DSM 43287. Sa composition en g/L est la suivante :

10	Glucose	4 g/L
	Extrait de levure	4 g/L
	Extrait de malt	10 g/L

L'extrait de levure fournit une source d'acides aminés, de vitamines et d'azote ; l'extrait de malt est la source de carbone, des peptones (protéines animales, de poisson, de caséine de lait) source d'azote organique. Le pH du milieu est ajusté à 7,2. En cas de préparation d'un milieu solide, le carbonate de calcium CaCO_3 (2 g/L) est ajouté avec l'agar (15 g/L).

1.4. Tampon phosphate (PBS)

Le tampon phosphate est utilisé pour le lavage des cellules si nécessaire mais aussi comme milieu de biotransformation dans certains cas. Sa composition en g/L est la suivante :

20	Chlorure de sodium (NaCl)	8 g/L
	Chlorure de potassium (KCl)	0,2 g/L
	Hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4)	1,44 g/L
	Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4)	0,24 g/L

1.5. Milieu synthétique MS

Ce milieu est utilisé pour étudier la capacité des bactéries à consommer les substrats à transformer comme seule source de carbone et l'ammonium comme source d'azote. Ce

dernier est indispensable pour la multiplication et la croissance bactérienne. Sa composition en g/L est la suivante :

	Acétate d'ammonium ($C_2H_7NO_2$)	1,5 g/L
	Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4)	0,8 g/L
5	Hydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4)	0,4 g/L
	Sulfate de magnésium ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,2 g/L
	Sulfate de fer ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,005 g/L
	Sulfate de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,002 g/L
	Dichlorure de manganèse ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,1 g/L

10 2. PROTOCOLE GENERALE DE CULTURE BACTERIENNE

La culture bactérienne a été réalisée sur deux étapes :

Une étape de pré-culture, consistant à réactiver la souche conservée au réfrigérateur, précède chaque expérience. La pré-culture est préparée dans 30 mL de milieu contenu dans une fiole de 100 mL et inoculé à partir de la souche préservée au réfrigérateur. La pré-culture se déroule à 30°C avec une agitation de 200 rpm pour environ 48 heures. Les souches sont repiquées dans du milieu frais toutes les semaines, pour éviter les problèmes de mutations éventuelles.

Ces fioles de pré-culture vont servir à inoculer celles destinées aux essais de biotransformation qui se dérouleront dans les mêmes conditions. Les conditions d'aseptie et de stérilité sont assurées en manipulant sous une hotte à flux laminaire (SKAN AG, VS-120-AFX, Basel).

3. MATERIAUX

Nous avons testé plusieurs matériaux dont les principales caractéristiques sont mentionnées ci-dessous.

3.1. Célite[®]

La Célite[®] est un produit obtenu à partir de restes d'algues microscopiques appelées diatomées qui ont pour particularité une enveloppe siliceuse. La poudre de silice une fois récupérée est ensuite séchée, malaxée, agglomérée et enfin séparée pour donner la Célite[®] elle-même. Ce matériau est surtout utilisé pour effectuer des filtrations (*world minerals*, 1999).

Lors de nos travaux nous avons utilisé la Célite[®] 545 (Fluka). La taille de ces particules est en moyenne de 38,9 μm . Elle se présente sous forme de poudre blanche de 2,3 g/cm^3 de densité avec des pores moyens de 17 μm .

3.2. Extrelut[®]

L'extrelut[®] NT (Merck Chemicals) est constituée d'une terre siliceuse de structure granuleuse et d'un volume de pores élevé. La matrice de terre siliceuse granulée est chimiquement inerte et peut être utilisée pour des pH compris entre 1 et 13. Sa porosité est supérieure à 80% avec différentes tailles de pores allant de quelques centaines de nanomètres à plusieurs μm .

3.3. Cordiérite

La cordiérite nous a été fournie par l'« Instituto Nacional de Engenharia »-Lisboa-Portugal. La cordiérite est une mousse céramique fabriquée par un mécanisme de réplication : Une suspension de particules de céramique et de liants est infiltrée dans une mousse de polyuréthane (PU) suivie par une calcination de cette dernière pour obtenir un réplikat en céramique de la mousse PU. La cordiérite est caractérisée par une taille de pores de 50-500 μm et une porosité de 70% environ (Oliveira et al., 2006).

3.4. Céramique poreuse

Fournie par « Céramiques Techniques et Industrielles »-Usine de Salindres-France. Il s'agit de céramiques poreuses sous forme de cylindre de 16 mm de longueur, 12 mm de diamètre externe et 3,7 mm de diamètre interne. Ses caractéristiques physiques sont les suivantes : densité apparente 1,1 g/cm^3 ; porosité 0,5053 g/cm^3 ; diamètre moyen de pores 13 μm (deux familles : 19 μm et 0,5 μm).

3.5. *Luffa cylindrica*

Le fruit sec de *Luffa cylindrica* peut être acheté dans les magasins de produits cosmétiques. Dans cette étude, le fruit utilisé est fourni par un agriculteur au Liban ; le prix d'1 Kg est d'environ 20 €. Avant chaque utilisation, le fruit sec de *Luffa cylindrica* est coupé en petits disques de 2,5 cm de diamètre et de 3-4 mm d'épaisseur. Ces disques sont mis dans l'eau bouillante pour 30 min, lavés à l'eau de robinet et mis à tremper dans de l'eau distillée pendant 24 heures en changeant l'eau 3-4 fois. Après un séchage dans l'étuve à 70°C de 24 heures, les disques sont conservés dans un dessiccateur.

3.6. *Luffa cylindrica* acétylée

L'acétylation de *Luffa cylindrica* a été faite dans le but d'hydrophobiser les fibres et d'étudier l'influence de la nature hydrophile/hydrophobe sur l'immobilisation des bactéries. Deux protocoles d'acétylation du *Luffa cylindrica* sont testés :

3.6.1. Acétylation par autoclavage

C'est une méthode développée par Hiden et al. en 2007 qui vise à greffer des fonctions acétyles sur les fibres pour leur protection contre la dégradation dans les bioprocédés utilisant les cellulases. Ainsi, les disques secs sont mis dans une fiole contenant 200 mL d'anhydride acétique et autoclavés à 120°C pendant 30 min. Après autoclavage, les disques sont rincés par de l'eau distillée et séchés à 70°C pendant 24 heures (Hiden et al., 2007).

3.6.2. Acétylation en présence du NBS

Cette méthode est développée par (Sun et al., 2004) pour l'hydrophobisation des fibres de cellulose de la canne à sucre. 15 g de disques sont mis dans une fiole de 500 mL contenant 300 mL d'anhydride acétique avec 3 g de N-bromosuccinimide. Le mélange est chauffé à reflux à 120°C pendant 1 h à pression atmosphérique. Après un rinçage à l'éthanol et l'acétone pour éliminer l'excès d'anhydride acétique et ses sous-produits, les disques sont séchés à 70°C pendant 24 h.

Dans les deux protocoles, l'acétylation est mesurée par le pourcentage de gain en masse après traitement et qui est estimé à 25%.

3.7. CytolineTM 1

La CytolineTM 1, de GE Healthcare, est une matrice inerte de polyéthylène et de silice à structure macroporeuse. Ces supports sont caractérisés par leur surface hydrophobe grâce au polyéthylène et où la silice est ajoutée pour augmenter la densité. La taille moyenne des particules est de 0,5-1 mm d'épaisseur et de 1,7-2,5 mm de diamètre ; le diamètre des pores varie entre 10 et 40 μm , la surface massique est de 0,3 m^2/g et la densité de 1,32 g/cm^3 .

4. METHODES ANALYTIQUES

Plusieurs méthodes analytiques ont été utilisées afin d'étudier tous les aspects de la bioconversion des stérols en stéroïdes. Ces techniques peuvent être divisées en plusieurs catégories. Ainsi certaines sont biologiques classiques, d'autres biochimiques ou physico-chimiques. Ces différentes techniques sont présentées dans les paragraphes qui suivent.

4.1. Mesure de la biomasse

La croissance est suivie en fonction du temps par mesure de la densité microbienne DM exprimée en g de cellules sèches par litre de milieu ou en mg/mL . D'un point de vue pratique, elle a été faite indirectement soit par mesure de la turbidité du milieu soit par le dosage des protéines après établissement de la correspondance avec les densités microbiennes. Cette correspondance est établie par pesée des cellules d'une culture de volume et d'absorbance connus. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 5000 rpm pendant 5 min, lavées avec un tampon phosphate pour éliminer les traces du milieu de culture et séchées à 105°C pour 24 h. La pesée est faite après refroidissement du culot dans un dessiccateur.

4.2. Turbidité dans le visible : Population cellulaire

Cette méthode consiste à mesurer la turbidimétrie du milieu de culture à une longueur d'onde donnée. Elle est appliquée dans le cas des suspensions cellulaires en absence d'un support d'immobilisation des cellules. Les mesures ont été effectuées dans une cuve en verre de trajet optique 10 mm à 595 nm (spectrophotomètre UV-visible double faisceau).

La corrélation entre la densité optique et la concentration cellulaire est linéaire pour des valeurs inférieures à 0,8. Au-delà de cette valeur, les échantillons sont dilués et la densité

optique corrigée est définie comme l'absorbance lue multipliée par le facteur de dilution utilisé pour l'échantillon. L'erreur de répétabilité déterminée sur 10 mesures d'une même suspension de bactéries est de 1%.

4.3. Dosage des protéines

5 Le dosage des protéines est fait selon la méthode développée par (Meyers et al., 1998) pour la mesure de la croissance des *Mycobacterium*. 1 mL de milieu de culture est centrifugée à 13800 g pour 5 min (Thermo Fisher centrifuge-Hearus Multifuge 3SR+), le tube est retourné de 180° et centrifugé de nouveau. Le culot des cellules est rincé avec 1 mL de PBS de pH 7 et une troisième centrifugation est effectuée. Le culot est resuspendu avec 0,1 mL de
10 NaOH (1 M) et porté à ébullition pendant 10 min. L'échantillon est neutralisé par 0,02 mL d'une solution de HCl (5 M) et le volume est ajusté à 1 mL par ajout de 0,88 mL de PBS. Une dernière centrifugation à 13800 g pour 30 min précède la mesure de l'absorbance du surnageant aux longueurs d'ondes de 230 et 260 nm (Thermo Nanodrop 1000 spectrophotometer). La quantité de protéines est obtenue par la relation [Protein] ($\mu\text{g/mL}$) =
15 $(183 \times A_{230}) - (75.8 \times A_{260})$. Les avantages de cette méthode se résument par sa simplicité, sa rapidité ; elle se fait sur un petit volume du milieu et ne nécessite pas un équipement spécifique comme dans le cas du dosage de l'ATP.

4.4. Chromatographie en phase gazeuse

Un chromatographe Thermo-scientific modèle Trace GC Ultra à passeur automatique, à
20 injecteur et à détecteur d'ionisation de flamme a été utilisé. Une colonne capillaire DB-5 (30 m×0.25 mm de diamètre interne×0.25 μm d'épaisseur de film) est utilisée avec l'hélium comme gaz vecteur à 30 kPa. L'injection se fait *on-column*.

Pour l'analyse des stérols, les températures de l'injecteur et du détecteur sont fixées à 225 et 310°C respectivement. D'abord maintenue à 225°C pendant 0,5 min, la température du
25 four augmente ensuite jusqu'à 280°C à la vitesse de 1°C/min puis jusqu'à 310°C à la vitesse de 15°C/min. Cette température est maintenue pendant 15 min. La durée totale de l'analyse est de 72 min.

Le dosage des stérols et leurs sous produits a été fait soit par un étalon interne : le nonacosane $\text{C}_{29}\text{H}_{60}$ (Chemika) utilisé comme standard de référence, soit par le biais d'une
30 courbe d'étalonnage pour les différents produits. Les équations des courbes d'étalonnage

expriment l'aire du pic A d'un produit en fonction de sa concentration [produit]_{mg/mL}. Pour le cholestérol $A_{CHL}=22897556,44 \times CHL_{(mg/mL)}$ ($R^2=0,99$) ; pour ADD, $A_{ADD}=26860448,08 \times ADD_{(mg/mL)}$, ($R^2=0,98$) ; pour AD $A_{AD}=28945166,4 \times AD_{(mg/mL)}$, ($R^2=0,99$).

5 4.5. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Les analyses CPG-SM sont faites avec un chromatographe Shimadzu GCMS-QP 2010 avec injection en mode splitless ; une colonne BP-X5 (25 m×0,15 mm de diamètre interne×0,25 µm d'épaisseur de film). L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à 20 psi. La méthode du chauffage du four est la même utilisée avec la CPG. La spectrométrie de masse en introduction directe a été effectuée à 70 eV sur un appareil Finnigan TSQ70 en utilisant la méthode d'ionisation EI.

4.6. Chromatographie liquide à haute performance

Les analyses sur la CLHP des stérols et du DPT sont faites avec un appareil Agilent 1100 series avec un détecteur à barrette de diodes avec une colonne C18 octyl ultrasphère 4,6×250 mm, avec un diamètre des billes de 5 µm. Le gradient d'élution est le suivant : méthanol :acétonitrile (45 :27,5 :27,5 ; v/v :v) pour 0,5 min ; de 0,5 min à 15 min la quantité d'eau est diminuée à 0 tout en gardant des quantités égales de méthanol et d'acétonitrile, et de 15 min à 25 min, l'éluant est fixé à 50% méthanol 50 % acétonitrile. Le débit est de 1 mL/min et la température du thermostat de la colonne est de 45°C. La détection des androsténones est faite à 238 nm et celle des stérols à 204 nm. Des courbes d'étalonnage ont été faites pour le dosage des stérols et leurs sous produits. Pour le cholestérol, $A_{CHL}=3012,7 \times CHL_{(mg/mL)}+55,47$, ($R^2=0,99$) ; pour ADD, $A_{ADD}=25094 \times ADD_{(mg/mL)}+447,48$, ($R^2=0,99$) ; pour AD, $A_{AD}=30913 \times AD_{(mg/mL)}+194,7$, ($R^2=0,99$) ; pour BSS, $A_{BSS}=2388,8 \times BSS_{(mg/mL)}+46,155$, ($R^2=0,99$) ; pour CAM, $A_{CAM}=3971,5 \times CAM_{(mg/mL)}+41,63$, ($R^2=0,99$) ; pour DHB, $A_{DHB}=3897,7 \times DHB_{(mg/mL)}+17,07$, ($R^2=0,97$).

4.7. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse

Les produits, à identifier, ont été collectés lors d'une séparation CLHP et analysés tels quels grâce à un système CLHP (Agilent technologies 1100 series) couplé à un spectromètre de masse (Q-TOF Agilent Technologies MSD 6510). CLHP a été utilisé en mode isocratique avec un mélange acétonitrile : méthanol (1 :1, v/v) comme éluant. Pour chaque analyse, les paramètres de la source sont fixés comme suit : la source utilisée est une source APCI en mode positif ; température du vaporisateur fixée à 350°C ; température du gaz à 325°C ; tension du capillaire à 3000 V ; intensité de l'aiguille corona à 4 μ A. Le voltage de fragmentation est balayé pour chaque analyse à 150, 175 et 200 V. La détection des ions est effectuée pour des valeurs de m/z entre 100 et 1000.

4.8. Microscopie électronique à balayage

Une observation par microscopie électronique à balayage des fibres de *Luffa cylindrica* a été faite avant et après incubation avec les bactéries avec un microscope Philips XL30 FEG. Les fibres, séchées à 105°C pendant 24 heures, sont préalablement métallisées avec de l'or afin d'assurer la conduction des électrons, et ainsi éviter les effets de charge.

5. BIOTRANSFORMATION

Dans une première étape, les expériences de biotransformation ont été faites dans des fioles pour tester différents matériaux. Ensuite, l'utilisation de ces matériaux a été testée dans un fermenteur de 5 L et dans un réacteur en colonne.

5.1. Biotransformation dans les fioles

Les expériences de biotransformations sont faites dans des fioles de 100 mL contenant 30 mL de milieu. Ces fioles sontensemencées avec 1,5 mL d'une pré-culture de 2 jours et mis à incuber à 30°C, 200 rpm. Après 36-48 heures, le substrat à transformer est ajouté stérilement sous forme d'une solution. Pour certaines expériences, les cellules de la pré-culture sont récoltées et ajoutées aux fioles contenant le milieu avec le substrat à transformer. Ces fioles de biotransformation sont ensuite incubées à 30°C, 200 rpm. Pour les expériences

de biotransformation faites en présence d'un support poreux, 200 mg de cette dernière ont été ajoutés à la fiole avant autoclavage.

5.2. Biotransformation dans un fermenteur

Des essais de biotransformations ont été faits dans un fermenteur de 5 L Biostat Aplus (Sartorius) équipé d'un axe d'agitation, un manteau chauffant, un doigt de gant de refroidissement et une évacuation d'air en aval d'un réfrigérateur. L'apport de dioxygène est assuré par injection d'air stérilisé par un filtre de 0,2 μm . Des sondes de pH, de température, d'oxygène et de mousse permettent la mesure de ces différents paramètres en mode continu. Le contrôle de ces derniers est fait par le logiciel $\mu\text{DCU-Touch Panel}$ et les données sont enregistrées avec le logiciel MFCS-DA. L'anti-mousse M de Dow Corning est ajouté au milieu à 500 ppm.

5.3. Biotransformation dans une colonne

Des essais de biotransformations de cholestérol ont été faits dans une colonne de 300 mL avec un diamètre de 3 cm afin de réaliser un système continu. La colonne est remplie au 2/3 avec environ 10 g de *Luffa cylindrica* et 200 mL du milieu, l'aération à un débit de 1 vvm est assurée par une pompe à air et une filtre de porosité 0,2 μm branchée en amont de la colonne. L'ajout du substrat dissout dans le milieu et la récolte sont fait stérilement avec deux pompes péristaltiques situées en amont et en aval de la colonne respectivement. Le tout est mis à incuber dans une étuve à 30°C.

5.4. Extraction

L'extraction liquide/liquide des milieux de culture est faite avec du chloroforme. Les phases organiques sont ensuite combinées, séchées avec du MgSO_4 anhydre, filtrées et évaporées à sec.

5.5. Calcul des paramètres cinétiques

5.5.1. La bioconversion

Le taux de bioconversion noté X représente le nombre de molécules bioconverties par rapport au nombre de molécules initiales. Il est donné par la formule :

$$X_s = \frac{n_{s0} - n_s}{n_{s0}}$$

Avec n_{s0} est le nombre de moles du substrat au temps $t_0=0$

n_s est le nombre de moles du substrat à la fin de la réaction

Un taux de bioconversion élevé permet d'éviter le recyclage des molécules non bioconverties et de diminuer le volume des réacteurs. Cependant, des taux de bioconversion élevés nécessitent un temps d'incubation long ou de grandes quantités de biomasse ; ainsi, les risques de dégradation des produits recherchés et l'apparition de sous-produits sont agrandis.

5.5.2. Le rendement

Le rendement noté η représente le nombre de molécules de produits obtenus par rapport au nombre de molécules de substrats. Il est calculé selon la formule suivante :

$$\eta_p = \frac{n_p - n_{p0}}{n_{s0}} \cdot \frac{|v_s|}{|v_p|}$$

Avec n_{p0} est le nombre de moles du produit à temps $t_0=0$

n_p est le nombre de moles du produit à la fin de la réaction

v_s est le coefficient stœchiométrique du substrat

v_p est le coefficient stœchiométrique du produit

5.5.3. La sélectivité

La sélectivité notée σ représente le nombre de molécules du produit obtenu par rapport au nombre de molécules de substrat converties. La sélectivité est telle que :

$$\sigma_p = \frac{n_p - n_{p0}}{n_{s0} - n_s} \cdot \frac{|v_s|}{|v_p|}$$

Pour une procédure de bioconversion efficace, la sélectivité doit être proche de 1 ; elle dépend du rendement et du taux de bioconversion :

$$\eta = \sigma.X$$

La sélectivité représente le facteur économique le plus important.

5.5.4. La productivité volumétrique

5 La productivité volumétrique notée P_v est la masse de produit obtenu dans un volume donnée du milieu et après un certain temps d'incubation. Elle est exprimée en g/L.j et calculée selon la formule :

$$P_{v_p} = \frac{(m_p - m_{p0})}{V.(t - t_0)}.$$

Avec m_{p0} est la masse du produit à temps $t_0=0$

m_p est la masse du produit à la fin de la réaction ou un certain temps t

10 V est le volume du milieu

t et t_0 représentent le temps

5.5.5. La productivité spécifique

En plus que la productivité volumétrique P_v , la productivité spécifique notée P_s prend en considération la quantité de biomasse utilisée. Elle est donnée par la formule :

15
$$P_{s_p} = \frac{P_v}{m_c}$$

Où m_c est la masse de cellules ou de biocatalyseurs. Dans ce travail, m_c représente la masse de cellules sèches. Le traitement des résultats a été effectué par le biais du logiciel Microsoft Office Excel 2007.

RÉFÉRENCES

A

- Abramov, S., Aharonowitz, Y., Harnik, M., Lamed, R., et Freeman, A. (1990). Continuous stereospecific [Δ]4-3-keto-steroid reduction by PAAH bead-entrapped *Clostridium paraputrificum* cells. *Enzyme and Microbial Technology* 12, 982-988.
- 5 Akhtar, N., Iqbal, J., et Iqbal, M. (2003a). Microalgal-luffa sponge immobilized disc: a new efficient biosorbent for the removal of Ni(II) from aqueous solution. *Letters in Applied Microbiology* 37, 149-153.
- Akhtar, N., Saeed, A., et Iqbal, M. (2003b). *Chlorella sorokiniana* immobilized on the biomatrix of vegetable sponge of *Luffa cylindrica*: a new system to remove cadmium from contaminated aqueous medium. *Bioresource Technology* 88, 163-165.
- 10 Al-Araji, L., Basri, M., et Salleh, A.-B. (2007). Microbial surfactant. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 15, 99-105.
- Ambrus, G., Ilkoy, É., Jekkel, A., Horváth, G., et Böcskei, Z. (1995). Microbial transformation of [β]-sitosterol and stigmasterol into 26-oxygenated derivatives. *Steroids* 60, 621-625.
- 15 Andhale, M., et Sambrani, S. (2006). Cholesterol biotransformation in monophasic systems by solvent tolerants *Bacillus subtilis* AF 333249. *Indian Journal of Biotechnology* 5, 389-393.
- Angelova, B., et Schmauder, H.-P. (1999). Lipophilic compounds in biotechnology--interactions with cells and technological problems. *Journal of Biotechnology* 67, 13-32.
- 20 Arinbasarova, A. Y., Karpov, A. V., Fokina, V. V., Medentsev, A. G., et Koshcheyenko, K. A. (1996). Kinetic characteristics of 1-en-dehydrogenation of 6[α]-methylhydrocortisone by cells of *Arthrobacter globiformis* 193. *Enzyme and Microbial Technology* 19, 501-506.
- Atrat, P., Hösel, P., Richter, W., Meyer, H. W., et Hörhold, C. (1991). Interactions of *Mycobacterium fortuitum* with solid sterol substrate particles. *Journal of Basic*
- 25 *Microbiology* 31, 413-422.

B

- Báleš, V. (1994). Bioprocesses with immobilized biocatalyst-engineering aspects. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 48, 5-10.
- Bensasson, C. S., Chevolot, Y., Hanson, J. R., et Quinton, J. (1999). The microbiological hydroxylation of 4[β]-hydroxy-4[α]-methyl-5[α]-androstanes by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry* 50, 25-30.
- 30 Bergmaier, D. (2002). Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *LB. rhamnosus* RW-9595M d'un milieu à base de perméat de lactosérum. Université Laval, Le-Mans.
- 35 Bickerstaff, G. F. (1997). Immobilization of enzymes and cells: Some practical considerations. Dans *Immobilization of enzymes and cells Methods in biotechnology*.

(Totowa: Humana Press), p. 1-12.

Bortolini, O., Medici, A., et Poli, S. (1997). Biotransformations on steroid nucleus of bile acids. *Steroids* 62, 564-577.

- 40 Bruinsma, G. M., van der Mei, H. C., et Busscher, H. J. (2001). Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. *Biomaterials* 22, 3217-3224.

Bureik, M., et Bernhardt, R. (2007). Steroid Hydroxylation: Microbial Steroid Biotransformations Using Cytochrome P450 Enzymes. Dans *Modern biooxidation: enzymes, reactions and applications* (Weinheim: Wiley-VCH), p. 155-171.

45 C

Cabral, J. M. S., Aires-Barros, M. R., Pinheiro, H., et Prazeres, D. M. F. (1997). Biotransformation in organic media by enzymes and whole cells. *Journal of Biotechnology* 59, 133-143.

- 50 Carvalho, C. C. C. R., Cruz, A., Angelova, B., Fernandes, P., Pons, M. N., Pinheiro, H. M., Cabral, J. M. S., et Fonseca, M. M. R. (2004). Behaviour of *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 whole cells in aqueous, organic-aqueous and organic media studied by fluorescence microscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64, 695-701.

Carvalho, C. C. C. R., et Fonseca, M. M. R. (2005). The remarkable *Rhodococcus erythropolis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67, 715-726.

- 55 Chen, G.-T., Yang, M., Song, Y., Lu, Z.-Q., Zhang, J.-Q., Huang, H.-L., Wu, L.-J., et Guo, D.-A. (2007a). Microbial transformation of ginsenoside Rb1 by *Acremonium strictum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77, 1345-1350.

Chen, J.-P., et Lin, T.-C. (2006). High-density culture of hepatocytes in a packed-bed bioreactor using a fibrous scaffold from plant. *Biochemical Engineering Journal* 30, 192-198.

- 60 Chen, J.-P., Wu, K.-W., et Fukuda, H. (2008). Bioethanol production from uncooked raw starch by immobilized surface-engineered yeast cells. *Applied. Biochemistry and Biotechnology* 145, 59-67.

- 65 Chen, K., Tong, W.-Y., Wei, D.-Z., et Jiang, W. (2007b). The 11[beta]-hydroxylation of 16,17[alpha]-epoxyprogesterone and the purification of the 11[beta]-hydroxylase from *Absidia coerulea* IBL02. *Enzyme and Microbial Technology* 41, 71-79.

Chen, Q.-he, Liu, J., Zhang, H.-feng, He, G.-qing, et Fu, M.-liang (2009). The betulinic acid production from betulin through biotransformation by fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 45, 175-180.

- 70 Chuck, R. (2005). Technology development in nicotinate production. *Applied Catalysis A: General* 280, 75-82.

Claudino, M. J. C., Soares, D., Van Keulen, F., Marques, M. P. C., Cabral, J. M. S., et Fernandes, P. (2008). Immobilization of mycobacterial cells onto silicone - Assessing the

feasibility of the immobilized biocatalyst in the production of androstenedione from sitosterol. *Bioresource Technology* 99, 2304-2311.

- 75 Conner, A. H., Nagaoka, M., Rowe, J. W., et Perlman, D. (1976). Microbial Conversion of Tall Oil Sterols to C19 Steroids. *Applied and Environmental Microbiology* 32, 310-311.

Connolly, J. D., et Hill, R. A. (2007). Triterpenoids. *Natural Product Reports* 24, 465-486.

Connolly, J. D., et Hill, R. A. (2002). Triterpenoids. *Natural Product Reports* 19, 494-513.

- 80 Cresnar, B., et Zakelj-Mavric, M. (2009). Aspects of the steroid response in fungi. *Chemico-Biological Interactions* 178, 303-309.

Cruz, A., Fernandes, P., Cabral, J. M. S., et Pinheiro, H. M. (2004). Solvent partitioning and whole-cell sitosterol bioconversion activity in aqueous-organic two-phase systems. *Enzyme and Microbial Technology* 34, 342-353.

- 85 Cruz, A., Fernandes, P., Cabral, J. M. S., et Pinheiro, H. M. (2001). Whole-cell bioconversion of [beta]-sitosterol in aqueous-organic two-phase systems. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11, 579-585.

D

- 90 De Palma, A. (2000). Forbes Medi-Tech Granted Patent on Microbial Conversion of Phytosterols to Steroid Drugs. *Pharmaceutical Online The Magazine*. Available at: <http://www.drugdiscoveryonline.com/article.mvc/Forbes-Medi-Tech-Granted-Patent-on-Microbial-0001>.

Dias, A. C. P., Cabral, J. M. S., et Pinheiro, H. M. (1994). Sterol side-chain cleavage with immobilized *Mycobacterium* cells in water-immiscible organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology* 16, 708-714.

- 95 Doble, M., Kruthiventi, A. K., et Gaikar, V. G. (2004a). Biotransformation. Dans *Biotransformations and bioprocesses* (Marcel Dekker), p. 67-130.

Doble, M., Kruthiventi, A. K., et Gaikar, V. G. (2004b). Experimental techniques. Dans *Biotransformations and bioprocesses* (New York: Marcel Dekker), p. 131-143.

- 100 Doble, M., Kruthiventi, A. K., et Gaikar, V. G. (2004c). Scale-Up of Biochemical Processes. Dans *Biotransformations and bioprocesses* (Marcel Dekker), p. 67-130.

Dogra, N., et Qazi, G. N. (1999). Biotransformation of cholesterol by *Micrococcus* species mediated by plasmid DNA. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15, 411-415.

Donova, M. V. (2007). Transformation of steroids by actinobacteria: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 43, 1-14.

- 105 Donova, M. V., Egorova, O. V., et Nikolayeva, V. M. (2005). Steroid 17[beta]-reduction by microorganisms--a review. *Process Biochemistry* 40, 2253-2262.

Dzubak, P., Hajduch, M., Vydra, D., Hustova, A., Kvasnica, M., Biedermann, D., Markova,

L., Urban, M., et Sarek, J. (2006). Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Product Reports* 23, 394-411.

110 **E**

Egorova, O. V., Nikolayeva, V. M., Sukhodolskaya, G. V., et Donova, M. V. (2009). Transformation of C19-steroids and testosterone production by sterol-transforming strains of *Mycobacterium* spp. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 57, 198-203.

115 El-Hadi, A. A. (2003). Factors affecting the production of prednisolone by immobilization of *Bacillus pumilus* E601 cells in poly(vinyl alcohol) cryogels produced by radiation polymerization. *Process Biochemistry* 38, 1659-1664.

El-Refai, A.-M. H., El-Abyad, M. S., Sallam, L. A., El-Menofi, H. A., et Adham, N. Z. (1995). Bioconversion of 19-nortestosterone by *Rhodococcus* sp. DSM 92-344. II: utilization of cell-free-extract and immobilization techniques. *Process Biochemistry* 30, 35-39.

120 **F**

Faber, K. (2000). *Biotransformations in organic chemistry: a textbook* (Springer).

Faramarzi, M. A., Aghelnejad, M., Tabatabaei Yazdi, M., Amini, M., et Hajarolasvadi, N. (2008). Metabolism of androst-4-en-3,17-dione by the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Steroids* 73, 13-18.

125 Fernandes, P., Cabral, J. M. S., et Pinheiro, H. M. (1995). Bioconversion of a hydrocortisone derivative in an organic-aqueous two-liquid-phase system. *Enzyme and Microbial Technology* 17, 163-167.

130 Fernandes, P., Cabral, J. M. S., et Pinheiro, H. M. (1998). Influence of some operational parameters on the bioconversion of sitosterol with immobilized whole cells in organic medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 5, 307-310.

Fernandes, P., Cruz, A., Angelova, B., Pinheiro, H. M., et Cabral, J. M. S. (2003). Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzyme and Microbial Technology* 32, 688-705.

135 Floyd, M. M., Tang, J., Kane, M., et Emerson, D. (2005). Captured Diversity in a Culture Collection: Case Study of the Geographic and Habitat Distributions of Environmental Isolates Held at the American Type Culture Collection. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2813-2823.

140 Fokina, V., Arinbasarova, A., Zubov, A., Lozinskij, V., et Koshcheyenko, K. (1995). Dehydrogenation of steroid substrates by bacterial cells of *Arthrobacter globiformis* incorporated in poly(vinylalcohol) cryogels. *Prikladnaya Biokhimiya i Microbiologiy* 31, 213-219.

Fouchard, S. (2005). Influence des conditions de culture sur la composition membranaire et la

production de métabolites secondaires chez les bactéries. Université de Haute Alsace, Mulhouse.

- 145 Fukui, S., Ahmed, S. A., Omata, T., et Tanaka, A. (1980). Bioconversion of lipophilic compounds in non-aqueous solvent. Effect of gel hydrophobicity on diverse conversions of testosterone by gel-entrapped *Nocardia rhodocrous* cells. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 10, 289-301.

G

- 150 Gagnault, J.-C., Bidet, D., Gaillard, M., et Perronnet, J. (1997). Stérols et stéroïdes (Ellipses Marketing).

Goetschel, R., et Bar, R. (1992). Formation of mixed crystals in microbial conversion of sterols and steroids. *Enzyme and Microbial Technology* 14, 462-469.

- 155 Goodfellow, M., et Maldonado, L. A. (2006). The Families Dietziaceae, Gordoniaceae, Nocardiaceae and Tsukamurellaceae. Dans *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria. Ecophysiology and biochemistry* (New York: Springer), p. 843-888.

Goswami, P. C., Singh, H. D., Bhagat, S. D., et Baruah, J. N. (1983). Mode of uptake of insoluble solid substrates by microorganisms. I: Sterol uptake by an arthrobacter species. *Biotechnology and Bioengineering* 25, 2929-2943.

- 160 Guimarães, J. L., Frollini, E., da Silva, C. G., Wypych, F., et Satyanarayana, K. G. (2009). Characterization of banana, sugarcane bagasse and sponge gourd fibers of Brazil. *Industrial Crops and Products* 30, 407-415.

- 165 Gulla, V., Banerjee, T., et Patil, S. (2010). Bioconversion of soysterols to androstenedione by *Mycobacterium fortuitum* subsp. *fortuitum* NCIM 5239, a mutant derived from total sterol degrader strain. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 85, 1135-1141.

H

Hammer, G. (1990). Immobilized microbes: Interfaces gradients and physiology. Dans *Physiology of immobilized cells* (Amsterdam: Elsevier), p. 15-24.

- 170 Hartmans, S., De Bont, J. A. M., et Stackebrandt, E. (2006). The Genus *Mycobacterium*—Nonmedical. Dans *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria. Ecophysiology and biochemistry* (Springer), p. 889-918.

Hautevelle, Y. (2005). Géochimie organique des séries argilo-carbonatées du Callovo-Oxfordien de l'Est du bassin de Paris et d'Angleterre. Université Henri Poincaré, Nancy.

- 175 Hesselink, P. G. M., van Vliet, S., de Vries, H., et Witholt, B. (1989). Optimization of steroid side chain cleavage by *Mycobacterium* sp. in the presence of cyclodextrins. *Enzyme and Microbial Technology* 11, 398-404.

Hideno, A., Ogbonna, J. C., Aoyagi, H., et Tanaka, H. (2007). Acetylation of loofa (*Luffa*

cylindrica) sponge as immobilization carrier for bioprocesses involving cellulase. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 103, 311-317.

- 180 Holland, H. L., Nguyen, D. H., et Pearson, N. M. (1995). Biotransformation of corticosteroids by *Penicillium decumbens* ATCC 10436. *Steroids* 60, 646-649.

Houng, J. Y., Chiang, W. P., Chen, K. C., et Tiu, C. (1994). 11 α -Hydroxylation of progesterone in biphasic media using alginate-entrapped *Aspergillus ochraceus* gel beads coated with polyurea. *Enzyme and Microbial Technology* 16, 485-491.

- 185 Huang, C.-L., Chen, Y.-R., et Liu, W.-H. (2006). Production of androstenones from phytosterol by mutants of *Mycobacterium* sp. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 296-300.

- 190 Huang, J., Yamaji, H., et Fukuda, H. (2007). Immobilization of *Escherichia coli* cells using porous support particles coated with cationic polymers. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104, 98-103.

I

Ishige, T., Honda, K., et Shimizu, S. (2005). Whole organism biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology* 9, 174-180.

- 195 Ivshina, I. B., Grishko, V. V., Nogovitsina, E. M., Kukina, T. P., et Tolstikov, G. A. (2005). Bioconversion of β -Sitosterol and Its Esters by Actinobacteria of the Genus *Rhodococcus*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 41, 551-557.

J

Joyeux, C. (2003). Impacts des conditions de culture sur la composition lipidique membranaire de micro-organismes. Université de Haute Alsace, Mulhouse.

200 **K**

Karel, S. F., Libicki, S. B., et Robertson, C. R. (1985). The immobilization of whole cells: Engineering principles. *Chemical Engineering Science* 40, 1321-1354.

- 205 Kataoka, M., Shimizu, K., Sakamoto, K., Yamada, H., et Shimizu, S. (1995). Optical resolution of racemic pantolactone with a novel fungal enzyme, lactonohydrolase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43, 974-977.

Keshavarz, T. (2005). Production of Biopharmaceuticals Through Microbial Cell Immobilisation. Dans *Applications of Cell Immobilisation Biotechnology Focus on Biotechnology*. (Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag), p. 407-422. Available at: <http://www.springerlink.com/content/t08m08736g720m72/>.

- 210 Klyne, W. (1966). La chimie des stéroïdes (Gauthier-Villars).

Kolek, T. (1999). Biotransformation XLVII: transformations of 5-ene steroids in *Fusarium culmorum* culture. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 71, 83-90.

215 Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I. M., Marchant, R., et Koutinas, A. A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology* 21, 377-397.

Kreit, J. (1999). Catabolisme microbien des stérols : caractérisation de la cholestérol oxydase, de la cholestérol ester hydrolase et d'une alcool secondaire déshydrogénase chez *rhodococcus* sp. CIP 105 335. Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy.

220 Kumar, P., et Satyanarayana, T. (2006). Production of thermostable and neutral glucoamylase using immobilized *Thermomucor indicae-seudaticae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 509-517.

Kumar, R., Dahiya, J. S., Singh, D., et Nigam, P. (2001). Biotransformation of cholesterol using *Lactobacillus bulgaricus* in a glucose-controlled bioreactor. *Bioresource Technology* 78, 209-211.

225 **L**

Le Bec, C. (1981). Bioconversion de stéroïdes dans des réacteurs à cellules libre ou immobilisées. Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy.

230 Lee, C.-Y., Chen, C.-D., et Liu, W.-H. (1993). Production of androsta-1,4-diene-3,17-dione from cholesterol using two-step microbial transformation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38, 447-452.

Lee, C.-Y., et Liu, W.-H. (1992). Production of androsta-1,4-diene-3,17-dione from cholesterol using immobilized growing cells of *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 adsorbed on solid carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36, 598-603.

235 Lefebvre, G. (1974). Etude de la régulation du catabolisme des stéroïdes chez les actinomycétales. Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy.

León, R., Fernandes, P., Pinheiro, H. M., et Cabral, J. M. S. (1998). Whole-cell biocatalysis in organic media. *Enzyme and Microbial Technology* 23, 483-500.

Liese, A. (2000). Basics of Bioreaction Engineering. Dans *Industrial biotransformations* (Weinheim: Wiley-VCH), p. 57-91.

240 Liese, A., et Villela Filho, M. (1999). Production of fine chemicals using biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology* 10, 595-603.

Liu, W. H., et Lo, C. K. (1997). Production of testosterone from cholesterol using a single-step microbial transformation of *Mycobacterium* sp. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19, 269-272.

245 Liu, W.-H., Horng, W.-C., et Tsai, M.-S. (1996). Bioconversion of cholesterol to cholest-4-en-3-one in aqueous/organic solvent two-phase reactors. *Enzyme and Microbial Technology*

18, 184-189.

250 Liu, Y.-K., Seki, M., Tanaka, H., et Furusaki, S. (1998). Characteristics of loofa (*Luffa cylindrica*) sponge as a carrier for plant cell immobilization. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 85, 416-421.

Llanes, N., Fernandes, P., Léon, R., Cabral, J. M. S., et Pinheiro, H. M. (2001). Conversion of [beta]-sitosterol by *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 cells immobilized on Celite supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11, 523-530.

255 Lo, C.-K., Pan, C.-P., et Liu, W.-H. (2002). Production of testosterone from phytosterol using a single-step microbial transformation by a mutant of *Mycobacterium* sp. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 28, 280-283.

Loughlin, W. A. (2000). Biotransformations in organic synthesis. *Bioresource Technology* 74, 49-62.

260 Lyew, D., Guiot, S., Monot, F., et Fayolle-Guichard, F. (2007). Comparison of different support materials for their capacity to immobilize *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012 and to adsorb MtBE. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 1524-1530.

M

265 MacLachlan, J., Wotherspoon, A. T., Ansell, R. O., et Brooks, C. J. (2000). Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 72, 169-195.

Mahato, S. B., et Garai, S. (1997). Advances in microbial steroid biotransformation. *Steroids* 62, 332-345.

Malaviya, A., et Gomes, J. (2008). Androstenedione production by biotransformation of phytosterols. *Bioresource Technology* 99, 6725-6737.

270 Manosroi, A., Saowakhon, S., et Manosroi, J. (2008). Enhancement of androstadienedione production from progesterone by biotransformation using the hydroxypropyl-[beta]-cyclodextrin complexation technique. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 108, 132-136.

275 Margaritis, A., et Kilonzo, P. M. (2005). Production of Ethanol Using Immobilised Cell Bioreactor Systems. Dans *Applications of Cell Immobilisation Biotechnology* (Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag), p. 375-405.

Marques, M. P. C., Carvalho, F., de Carvalho, C. C. C. R., Cabral, J. M. S., et Fernandes, P. (2010). Steroid bioconversion: Towards green processes. *Food and Bioproducts Processing* 88, 12-20.

280 Marsheck, W. J., Kraychy, S., et Muir, R. D. (1972). Microbial Degradation of Sterols. *Applied and Environmental Microbiology* 23, 72-77.

Merritt, K., et An, Y. H. (2000). Factors Influencing Bacterial Adhesion. Dans *Handbook of*

bacterial adhesion: principles, methods, and applications (Totowa, NJ: Humana Press), p. 53-72.

285 Messing, R. A., Oppermann, R. A., et Kolot, F. B. (1979). Pore dimensions for accumulating biomass. II. Microbes that form spores and exhibit mycelial growth. *Biotechnology and Bioengineering* 21, 59-67.

Meyers, P. R., Bourn, W. R., Steyn, L. M., van Helden, P. D., Beyers, A. D., et Brown, G. D. (1998). Novel Method for Rapid Measurement of Growth of Mycobacteria in Detergent-Free Media. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 2752-2754.

290 Moreau, R. A., et Hicks, K. B. (2001). United States Patent: 6177415 - Bacteriohopanetetrol and related compounds useful for modulation of lipoxygenase activity and anti-inflammatory applications.

Muffler, K., Leipold, D., Scheller, M.-C., Haas, C., Steingroewer, J., Bley, T., Neuhaus, H. E., Mirata, M. A., Schrader, J., et Ulber, R. (2011). Biotransformation of triterpenes. *Process Biochemistry* 46, 1-15.

N

Naim, N., Adham, N. Z., Abd El-Rehim, H., et Abd El-Hady, A. (2003). Prednisolone production using *Pseudomonas fluorescens* cells immobilized with polymer carrier produced by radiation polymerization. *Process Biochemistry* 38, 1083-1089.

300 Newman, D. J., Cragg, G. M., et Snader, K. M. (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports* 17, 215-234.

Nicolau, E. (2008). Biodégradation du 2-éthylhexyl nitrate par *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173. Université Joseph Fourier-Grenoble 1.

O

305 Ogbonna, J. C., Tomiyama, S., et Tanaka, H. (1996). Development of a method for immobilization of non-flocculating cells in loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. *Process Biochemistry* 31, 737-744.

Ogbonna, J. C., Liu, Y.-C., Liu, Y.-K., et Tanaka, H. (1994). Loofa (*Luffa cylindrica*) sponge as a carrier for microbial cell immobilization. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 78, 437-442.

Oksman-Caldentey, K.-M., et Inzé, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science* 9, 433-440.

315 Oliveira, F. A. C., Dias, S., Vaz, M. F., et Fernandes, J. C. (2006). Behaviour of open-cell cordierite foams under compression. *Journal of the European Ceramic Society* 26, 179-186.

P

- 320 Pattanasupong, A., Nagase, H., Sugimoto, E., Hori, Y., Hirata, K., Tani, K., Nasu, M., et Miyamoto, K. (2004). Degradation of carbendazim and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by immobilized consortium on loofa sponge. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 98, 28-33.
- Perdrial, J. N., Warr, L. N., Perdrial, N., Lett, M.-C., et Elsass, F. (2009). Interaction between smectite and bacteria: Implications for bentonite as backfill material in the disposal of nuclear waste. *Chemical Geology* 264, 281-294.
- 325 Pérez, C., Falero, A., Hung, B. R., Tirado, S., et Balcinde, Y. (2005). Bioconversion of phytosterols to androstanes by mycobacteria growing on sugar cane mud. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32, 83-86.
- Pérez, C., Pérez, I., et Hervé, E. (1995). Isolation and partial characterization of a new mutant for sterol biotransformation in *Mycobacterium* sp. *Biotechnology Letters* 17, 1241-1246.
- 330 Phisalaphong, M., Budiraharjo, R., Bangrak, P., Mongkolkajit, J., et Limtong, S. (2007). Alginate-loofa as carrier matrix for ethanol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104, 214-217.
- Podorozhko, E. A., Lozinsky, V. I., Ivshina, I. B., Kuyukina, M. S., Krivorutchko, A. B., Philp, J. C., et Cunningham, C. J. (2008). Hydrophobised sawdust as a carrier for immobilisation of the hydrocarbon-oxidizing bacterium *Rhodococcus ruber*. *Bioresource Technology* 99, 2001-2008.
- 335 Pomponi, S. A. (1999). The bioprocess-technological potential of the sea. *Journal of Biotechnology* 70, 5-13.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A., Bacq-Calberg, C.-M., et Dusart, J. (2003). *Microbiologie* (De Boeck Université).

R

- 340 Rajkhowa, R. C., Goswami, P., et Singh, H. D. (2000). Mode of uptake of sterol by *Arthrobacter simplex*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16, 63-68.
- Ramakrishna, S. V., et Prakasham, R. S. (1999). Microbial fermentations with immobilized cells. *Current Science* 77, 87-100.
- 345 Robertson, D. E., et Bornscheuer, U. T. (2005). Biocatalysis and biotransformation: New technologies, enzymes and challenges. *Current Opinion in Chemical Biology* 9, 164-165.
- Rohmer, M., et Vandecasteele, J.-P. (2005). Les hydrocarbures naturels dans l'environnement. Dans *Microbiologie pétrolière: concepts, implications environnementales, applications industrielles* Publications de l'institut français du pétrole. (Paris), p. 41-73.
- 350 Rong, X., Huang, Q., et Chen, W. (2007). Microcalorimetric investigation on the metabolic activity of *Bacillus thuringiensis* as influenced by kaolinite, montmorillonite and goethite.

Applied Clay Science 38, 97-103.

355 Rumijowska, A., Lisowska, K., Ziółkowski, A., et Sedlacek, L. (1997). Transformation of sterols by *Mycobacterium vaccae*: effect of lecithin on the permeability of cell envelopes to sterols. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13, 89-95.

Rumijowska-Galewicz A, Ziolkowski A, Korycka-Machala M, et Sedlacek L (2000). Alterations in lipid composition of *Mycobacterium vaccae* cell wall outer layer enhance beta-sitosterol degradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16, 237-244.

S

360 Saudagar, P. S., Shaligram, N. S., et Singhal, R. S. (2008). Immobilization of *Streptomyces clavuligerus* on loofah sponge for the production of clavulanic acid. *Bioresource Technology* 99, 2250-2253.

Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., et Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409, 258-268.

365 Simon, et Meunier (1970). *Microbiologie industrielle et génie biochimique* (Dunod).

Smith, M., Zahnley, J., Pfeifer, D., et Goff, D. (1993). Growth and cholesterol oxidation by *Mycobacterium* species in Tween 80 medium. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1425-1429.

370 Sripalakit, P., Wichai, U., et Saraphanchotiwitthaya, A. (2006). Biotransformation of various natural sterols to androstenones by *Mycobacterium* sp. and some steroid-converting microbial strains. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 41, 49-54.

Srivastava, A., et Shridhar, P. (1994). Investigation of some physico-chemical parameters involved in the biotransformation of cholesterol to 17 ketosteroids by *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8153. *Journal of microbial biotechnology* 9, 101-112.

375 Stadtman, T. C., Cherkes, A., et Anfinsen, C. B. (1954). Studies on the microbiological degradation of cholesterol. *Journal of Biological Chemistry* 206, 511-523.

Staebler, A., Cruz, A., van der Goot, W., Pinheiro, H. M., Cabral, J. M. S., et Fernandes, P. (2004). Optimization of androstenedione production in an organic-aqueous two-liquid phase system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 29, 19-23.

380 Steinert, H.-J., Vorlop, K. D., et Klein, J. (1987). Steroid side chain cleavage with immobilized cells in organic medium. Dans *Biocatalysis in organic media* (Amsterdam: Elsevier), p. 51-63.

Straathof, A. J. J., Panke, S., et Schmid, A. (2002). The production of fine chemicals by biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 548-556.

385 Sukhodolskaya, G., Nikolayeva, V., Khomutov, S., et Donova, M. (2007). Steroid-1-dehydrogenase of *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1817D strain producing 9 α -hydroxy-androst-4-ene-3,17-dione from sitosterol. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74, 867-873.

Sun, X. F., Sun, R. C., et Sun, J. X. (2004). Acetylation of sugarcane bagasse using NBS as a catalyst under mild reaction conditions for the production of oil sorption-active materials. *Bioresource Technology* 95, 343-350.

Szentirmai, A. (1990). Microbial physiology of sidechain degradation of sterols. *Journal of Industrial Microbiology* 6, 101-115.

T

Taylor, R. F. (1984). Bacterial triterpenoids. *Microbiological Reviews* 48, 181-198.

Tritz, J.-P., Herrmann, D., Bisseret, P., Connan, J., et Rohmer, M. (1999). Abiotic and biological hopanoid transformation: towards the formation of molecular fossils of the hopane series. *Organic Geochemistry* 30, 499-514.

V

Vandecasteele, J.-P. (2005). *Microbiologie pétrolière: concepts, implications environnementales, applications industrielles* (Editions Technip).

Vasic-Racki, D. (2000). History of Industrial Biotransformations- Dreams and Realities. Dans *Industrial biotransformations* (Wiley-VCH), p. 3-29.

Verbelen, P., De Schutter, D., Delvaux, F., Verstrepen, K., et Delvaux, F. (2006). Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnology Letters* 28, 1515-1525.

Vignoli, J. A., Celligoi, M. A. P. C., et Silva, R. S. F. (2006). Development of a statistical model for sorbitol production by free and immobilized *Zymomonas mobilis* in loofa sponge *Luffa cylindrica*. *Process Biochemistry* 41, 240-243.

Voïshvillo, N. E., Andriushina, V. A., Savinova, T. S., et Stytsenko, T. S. (2004). Conversion of androstenedione and androstadienedione by sterol-degrading bacteria. *Prikladnaya Biokhimiya i Microbiologiy* 40, 536-543.

Voïshvillo, N. E., Andriushina, V. A., Savinova, T. S., Stytsenko, T. S., Vasil'eva, N. A., Turova, T. P., Kolganova, T. V., et Skriabin, K. G. (2003). Identification of a new steroid transforming strain of mycobacteria as *Mycobacterium neoaurum*. *Prikladnaya Biokhimiya i Microbiologiy* 39, 173-179.

W

Wang, J., Chen, C., Li, B., Zhang, J., et Yu, Y. (1998). Production of Hydrocortisone from Cortisol-21-Acetate by Immobilized *Absidia orchidis* in Cosolvent-Containing Media. *Enzyme and Microbial Technology* 22, 368-373.

Wang, K. C., Wang, P.-H., et Lee, S.-S. (1997). Microbial Transformation of Protopanaxadiol

and Protopanaxatriol Derivatives with *Mycobacterium* sp. (NRRL B-3805). *Journal of Natural Products* 60, 1236-1241.

Wang, Z. F., Huang, Y. L., Rathman, J. F., et Yang, S.-T. (2002). Lecithin-enhanced biotransformation of cholesterol to androsta-1,4-diene-3,17-dione and androsta-4-ene-3,17-dione. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 77, 1349-1357.

Wang, Z., et Dai, Z. (2010). Extractive microbial fermentation in cloud point system. *Enzyme and Microbial Technology* 46, 407-418.

Wang, Z., Zhao, F., Chen, D., et Li, D. (2006). Biotransformation of phytosterol to produce androsta-diene-dione by resting cells of *Mycobacterium* in cloud point system. *Process Biochemistry* 41, 557-561.

Wang, Z., Zhao, F., Chen, D., et Li, D. (2005). Cloud point system as a tool to improve the efficiency of biotransformation. *Enzyme and Microbial Technology* 36, 589-594.

Weber, A., Kennekke, M., Klages, U., Nickisch, K., et Rhode, R. (1995). Process for the production of 17-oxosteroids via the fermentative oxidation of 17 beta-hydroxysteroids by *mycobacterium*. 129-130(2).

Wendhausen, R., Frigato, M., Fernandes, P., Carvalho, C. C. C. R., Cruz, A., Pinheiro, H. M., et Cabral, J. M. S. (2005). Chrysotile as a support for the immobilisation of *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 cells for the bioconversion of [beta]-sitosterol in an organic-aqueous two-liquid phase system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 32, 61-65.

X

Xiong, Z., Wei, Q., Chen, H., Chen, S., Xu, W., Qiu, G., Liang, S., et Hu, X. (2006). Microbial transformation of androst-4-ene-3,17-dione by *Beauveria bassiana*. *Steroids* 71, 979-983.

Y

Yang, J., Yang, S., Yang, Y.-L., Zheng, H., Weng, L., et Liu, L. (2007). Microbial hydroxylation of 16[alpha],17[alpha]-dimethyl-17[beta]-(1-oxopropyl)androsta-1,4-dien-3-one to rimexolone by *Curvularia lunata* AS 3.4381. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 47, 155-158.

Z

Zampieri, A., Mabande, G. T. P., Selvam, T., Schwieger, W., Rudolph, A., Hermann, R., Sieber, H., et Greil, P. (2006). Biotemplating of *Luffa cylindrica* sponges to self-supporting hierarchical zeolite macrostructures for bio-inspired structured catalytic reactors. *Materials Science and Engineering: C* 26, 130-135.

Zianveni, Y. (1982). Bioconversion des stéroïdes par les actinomycètes. Institut National

455 Polytechnique de Lorraine, Nancy.

Znidarsic-Plazl, P., et Plazl, I. (2010). Development of a continuous steroid biotransformation process and product extraction within microchannel system. *Catalysis Today* 157, 315-320.