

R É S U M É

BIOSYNTHÈSE DE POLYHYDROXYALCANOATES ET LEUR UTILISATION EN GÉNIE BIOMÉDICAL

Doctorant: ENE N. Nicoleta

Coordinateur scientifique: *Prof. univ. Dr. VAMANU Emanuel*

MOTS-CLÉS: *Polyhydroxyalcanoates, Biopolymères, Biodégradabilité, Pseudomonas putida, Bioprocédé de fermentation*

Ces dernières années, la pollution et l'accumulation de produits en plastique qui, non recyclés, finissent par polluer l'environnement et nuire à la santé ne sont que quelques-uns des sujets actuels à l'ordre du jour mondial. Une conséquence majeure de la pollution plastique est l'omniprésence des microplastiques, qui affectent l'équilibre des écosystèmes à travers le monde. Des microplastiques ont été découverts dans les eaux des océans, des lacs et des rivières, ainsi que dans les forêts, dans les hauteurs des montagnes ou encore dans l'atmosphère (Bhat et al., 2023). Sa présence affecte la biodiversité des organismes aquatiques et terrestres (Bordós et al., 2019), à travers des blessures physiques, des perturbations hormonales et une augmentation des taux de mortalité (par suffocation, blessures infectées, etc.).

Avec une quantité estimée à 25 milliards de tonnes de plastique d'ici 2050 (Xu et al., 2024), la nécessité d'identifier de nouveaux matériaux pour remplacer le plastique conventionnel a attiré l'attention de la recherche sur les polyhydroxyalcanoates. Fortes de ces résultats, de nombreuses grandes entreprises se sont fixé comme objectif jusqu'en 2025 l'utilisation de matières plastiques recyclées, 100 % biodégradables ou réutilisables (Tumu et al., 2023).

Les polyhydroxyalcanoates sont des biopolymères biodégradables, non toxiques pour l'environnement. Ils sont préférés pour être utilisés dans diverses industries, car à travers les processus de production, ils offrent la possibilité de réduire les émissions de polluants et de mettre fin à la dépendance aux ressources non renouvelables, utilisées pour les plastiques classiques. Les PHA sont principalement produits par les bactéries sous forme de dépôts intragranulaires dans certaines conditions de stress nutritionnel (Philip et al., 2007). Initialement coûteuse, la production de PHA devient pratique lorsque des substrats nutritifs renouvelables tels que l'amidon, le glucose, le saccharose, la graisse animale ou les déchets alimentaires (par exemple les coques de pois, les coques d'oignons, les coques de pommes de terre, la mélasse, le lactosérum) sont utilisés, etc.

Le travail intitulé "*Biosynthèse des polyhydroxyalcanoates et leur utilisation en génie biomédical*" a pour objectif principal de modéliser et d'optimiser les bioprocédés de synthèse des polyhydroxyalcanoates à l'aide de *Pseudomonas putida* ICCF 391, en utilisant différents substrats carbonés (acides gras, glucose, huiles végétales) et de tester les biopolymères en tant que tels. obtenu. La thèse est composée de deux parties : *Étude bibliographique* et *Recherches personnelles*.

Le premier chapitre, "*Chapitre I. Génie biomédical et polymères*" résume les informations sur le génie biomédical, ses applications et les principaux types de biopolymères (PLA, PLGA/PLG, PCL et PHBV). Le génie biomédical intègre les connaissances des sciences de l'ingénieur aux sciences biomédicales (électronique biomédicale, biomatériaux, biologie computationnelle, génie cellulaire, tissulaire et génétique, imagerie médicale, bioingénierie orthopédique, bionanotechnologie) et à la pratique clinique, pour développer des concepts révolutionnaires tels que les robots chirurgicaux (Edwards et al., 2018), prothèses biocompatibles (Shepherd R.K, 2016), nouveaux systèmes thérapeutiques médicamenteux, divers dispositifs médicaux

diagnostiques et thérapeutiques (Aruna et al, 2022), équipements d'imagerie conventionnels (IRM et ECG/ECG) (Thompson et al., 2016). Parallèlement, sa composition comprend les branches suivantes:

- Bioinformatique;
- Biomécanique;
- Création de tissus;
- Ingénierie génétique;
- Ingénierie neuronale;
- Génie pharmaceutique;
- Dispositifs médicaux (Classe I, Classe II et Classe III).

Les biopolymères sont des substances polymères synthétisées, pour la plupart, par des organismes vivants, notamment par des bactéries, ou synthétisées chimiquement à partir de systèmes biologiques de base, présentant un intérêt particulier en raison de leurs propriétés et de leurs domaines d'application très variés. Les biopolymères sont des molécules en forme de chaîne, constituées de blocs répétitifs de monomères. En tant que matériaux pouvant être utilisés pour des applications biomédicales (cicatrisation des plaies, administration de médicaments et ingénierie tissulaire), les biopolymères doivent répondre à certaines normes : être biocompatibles, biodégradables, avoir une faible antigénicité, une bioactivité élevée, une aptitude à la transformation sous des formes complexes avec une porosité adéquate et une capacité à soutenir les cellules. croissance et prolifération et propriétés mécaniques appropriées (Yousefi et Wnek, 2024). Les principaux types de biopolymères sont : les polynucléotides, les polypeptides, les polysaccharides (ces derniers peuvent être d'origine bactérienne, fongique, végétale/algale ou animale), les protéines et les polyesters d'origine microbienne. Parmi les biopolymères d'origine microbienne, les plus utilisés en génie biomédical sont : l'acide polylactique (PLA), l'acide polylactique-co-glycolique (PLGA/PLG), la polycaprolactone (PCL) et le poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate). (PHBV).

„Chapitre II. Les polyhydroxyalcanoates (PHA)“ comprennent des informations provenant de la littérature spécialisée sur leur formation, leur structure, leur classification, leurs propriétés physico-chimiques, les micro-organismes producteurs de PHA, en mettant l'accent sur la souche *Pseudomonas putida*, les paramètres importants qui influencent la production de PHA, ainsi que les voies métaboliques de biosynthèse. , applications PHA, biocompatibilité et biodégradabilité des biopolymères. Les polyhydroxyalcanoates sont des polyesters produits naturellement par de nombreuses espèces de micro-organismes, sous forme de granules intracellulaires qui constituent des réserves d'énergie et de carbone lorsque les cellules sont soumises à des déséquilibres (ils produisent du PHA par précaution contre la limitation des nutriments et les conditions extrêmes) (Koller et col., 2017). Le PHA s'accumule lorsque le milieu nutritif contient un excès de carbone, tandis que l'azote, le phosphore, l'oxygène ou le magnésium limitent la croissance cellulaire. Structurellement, les molécules de PHA contiennent entre 600 et 35 000 unités monomères d'acides hydroxyalcanoïques et environ 150 types de polymères ont été identifiés.

Selon le nombre d'atomes de carbone dans la chaîne principale monomère, les PHA peuvent avoir une chaîne latérale courte (scl-PHA), une chaîne latérale moyenne (mcl-PHA) ou une chaîne latérale longue (lcl-PHA). Les propriétés générales considérées comme communes aux polyhydroxyalcanoates (matériaux à haut degré de polymérisation) sont les suivantes :

- absence de toxicité;
- biodégradabilité;
- biocompatibilité;
- cristallinité;
- activité optique;
- propriétés isotactiques (avec régularité stéréochimique dans les unités répétitives);
- propriétés piézoélectriques;
- hydrophobie.

Parmi les espèces productrices de PHA les plus utilisées, nous citons *Alcaligenes latus*, *Bacillus megaterium*, *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas oleovorans* et *Pseudomonas putida*, qui sont capables d'utiliser diverses sources de carbone, notamment des huiles végétales ou des déchets. Ainsi, les PHA sont produits à partir d'une grande variété de substrats, issus de ressources renouvelables (amidon, cellulose, glycérol ou sous-produits - mélasse, lactosérum, glycérol) ou de ressources conventionnelles épuisables (méthane, huile minérale, acides organiques).

Le genre *Pseudomonas* est l'un des genres producteurs de PHA à chaîne latérale moyenne (mcl-PHA) les plus polyvalents, avec une grande importance médicale car certaines espèces peuvent produire des infections nosocomiales et opportunistes. La première souche caractérisée comme produisant des PHA avec une chaîne latérale moyenne était *Pseudomonas putida* (Solaiman et al., 2000), à la suite de quoi d'autres espèces/sous-espèces ont été identifiées et caractérisées : *Pseudomonas spp.* (*P. aeruginosa*, *P. mendocina*, *P. campisalis*, *P. stutzeri*, *P. chlororaphis*, *P. citronnellolis*), *Halomonas spp.* (*H. campisalis*, *H. elongata*) etc.

Pseudomonas putida est une espèce bien étudiée, d'une importance majeure dans la dégradation de certains polluants environnementaux (par exemple, le pétrole, dans les études impliquant le nettoyage des sols ou des eaux souterraines polluées par celui-ci, la bioabsorption du cuivre et du zinc, dans le cas de sols contaminés). avec des métaux lourds). Le principal avantage de l'utilisation de cette espèce est le faible coût requis par le procédé lui-même. Le PHA dépend de la source de carbone et des voies métaboliques impliquées. Les voies métaboliques les plus importantes de la synthèse du PHA sont: *la voie I*, de l'acétyl-CoA au 3-hydroxybutyryl-CoA, *la voie II*, la dégradation des acides gras, et *la voie III*, la biosynthèse *de novo* des acides gras.

La source de carbone joue un rôle crucial dans la production de polyhydroxyalcanoates (PHA), car elle représente la matière première nécessaire à la synthèse de ces polymères biodégradables, tout en représentant l'un des paramètres influençant la production et l'accumulation de PHA.

Environ la moitié des coûts totaux de production du PHA sont associés à la matière première utilisée. Le choix de la source de carbone est extrêmement important du point de vue de l'efficacité économique du processus de production de PHA ; le prétraitement du substrat influence l'augmentation de la disponibilité des sources de carbone, et la supplémentation du milieu de croissance complète les besoins en nutriments du milieu de croissance et modifie le rendement et la composition du PHA.

En raison de leurs qualités mécaniques exceptionnelles, de leur biodégradabilité et de leur potentiel d'utilisation comme matière première pour divers composés chimiques, les polyhydroxyalcanoates (PHA) sont utilisés dans diverses industries (a.Koller et Mukherjee, 2022). La biodégradabilité est l'avantage majeur du PHA par rapport aux plastiques conventionnels (qui se dégradent très durement, sur des décennies ou des centaines d'années). Cela permet aux micro-organismes de décomposer le polymère en composants simples. Ainsi, en raison de leur nature biodégradable, les PHA ne contribuent pas à la croissance des décharges et, contrairement aux plastiques conventionnels, les PHA peuvent être compostés après utilisation (Dilkes-Hoffman et al., 2019). Par conséquent, les PHA d'origine microbienne forment une chaîne industrielle précieuse, depuis la fermentation industrielle, les matériaux de formage, les médicaments et les biocarburants jusqu'aux produits chimiques.

La biocompatibilité et la biodégradabilité des PHA sont deux caractéristiques essentielles à leur utilisation dans l'industrie biomédicale. Ces matériaux doivent être biocompatibles, c'est-à-dire ne pas provoquer de réponse immunitaire et permettre la prolifération et l'adhésion cellulaires, respectivement biodégradables, garantissant leur non-toxicité par leur dégradation en dioxyde de carbone et en eau.

La transformation des polyhydroxyalcanoates est une étape essentielle pour leur analyse. Au „*Chapitre III. Modes de traitement du PHA. Méthodes d'analyse quantitatives et qualitatives*”, la méthode d'extraction par solvant est décrite, qui repose sur la modification de la perméabilité de la membrane cellulaire par le solvant et la libération de PHA. Après cette étape, une centrifugation est nécessaire pour éliminer le contenu indésirable et ne laisser que la biomasse cellulaire. Un autre type d'extraction peut être réalisé par la méthode de digestion de masse cellulaire sans PHA (NPCM), utilisant des traitements physiques (désintégration

mécanique avec chaleur, ultrasons), des traitements chimiques, tels que des tensioactifs, des alcalis ou des acides, et des traitements enzymatiques et enzymatiques. Suite au traitement choisi, les granules de PHA sont séparés des composants cellulaires par filtration ou centrifugation. La purification du biopolymère est effectuée pour éviter les contaminants et les réactions immunologiques et peut être effectuée en digérant la biomasse avec du méthanol et de l'éthanol. L'estimation de la biomasse se fait par lecture d'un spectrophotomètre à une absorbance de 550 nm et par mesure du poids des cellules lyophilisées. Un traitement et une caractérisation ultérieurs du PHA peuvent être effectués par chromatographie liquide haute performance (HPLC), chromatographie en phase gazeuse (GC), chromatographie liquide (LC) ou résonance magnétique nucléaire (RMN).

La deuxième partie de la thèse, dans laquelle sont présentées *Les propres recherches*, résume les chapitres expérimentaux (chapitres IV, V et VI) dans lesquels trois types d'expériences ont été réalisées :

1. Chapitre IV: Synthèse du PHA par des bioprocédés réalisés avec des sources de carbone conventionnelles, telles que les acides gras: acide octanoïque, acide nonanoïque, acide heptanoïque et acide hexanoïque ; interprétation de la dynamique des paramètres de développement ; discuter de la productivité des PHA.

2. Chapitre V: Bioprocédés réalisés à partir de sources de carbone conventionnelles, utilisant différents types d'huiles (huile de tournesol, huile d'olive, huile de tournesol usagée, marc de café, huile de marc de café, glycérol) comme seule source de carbone.

3. Chapitre VI: Biodégradabilité des biopolymères obtenus et leur vitesse de dégradation.

Pour les variantes expérimentales du „Chapitre IV. L'optimisation des bioprocédés et le traitement des polyhydroxyalcanoates obtenus en complétant le milieu avec des sources de carbone conventionnelles” ont été utilisés comme souche bactérienne *Pseudomonas putida* (ICCF 391), faisant partie de la collection de micro-organismes de l'Institut National de Recherche et de Développement Chimique et Pharmaceutique-ICCF de Bucarest. Afin de choisir le bon milieu d'inoculum, la comparaison du développement microbien sur trois milieux a été réalisée : milieu IPS, milieu LB et milieu TSB. Les meilleurs résultats de développement bactérien (densité optique mesurée au spectrophotomètre) ont été obtenus pour le milieu IPS, qui a été le milieu choisi pour la suite des bioprocédés. Un test préliminaire du milieu de fermentation a été réalisé parmi les milieux : E2, BSM, RMM et MSM, en constatant que le plus adapté était E2. Dans les études expérimentales réalisées dans ce chapitre, des sources conventionnelles ont été utilisées comme sources de carbone - précurseurs de type acides gras carboxyliques: acide octanoïque, acide nonanoïque, acide heptanoïque et acide hexanoïque.

Les acides gras (acide octanoïque, acide nonanoïque, acide heptanoïque et acide hexanoïque) sont métabolisés par *Pseudomonas putida* par la voie métabolique III, β -oxydation. Les preuves de leur métabolisme remontent à 1967, lorsque Chapman et Duggleby ont observé ce mécanisme chez *P. aeruginosa* (Chapman et Duggleby, 1967). Il est en outre généralement admis que la β -oxydation est la voie par laquelle les souches de *Pseudomonas sp.* dégrade les acides dicarboxyliques. L'évolution des bioprocédés expérimentaux a été suivie en analysant les informations sur les paramètres expérimentaux suivants : température, pH et densité optique – corrélés au développement bactérien.

Pour cette étape d'optimisation du bioprocédé de fermentation, il était prévu de tester différentes sources de carbone, en réalisant 11 variantes expérimentales:

1. Acide octanoïque (18 ml sous forme d'octanoate de sodium à 0 heure et à 24 heures);
2. Acide octanoïque (18 ml sous forme d'octanoate de sodium à 0 heure et 9 ml à 24 heures);
3. Acide nonanoïque (17 ml sous forme de nonanoate de sodium à 0 heure et 17 ml à 24 heures);
4. Acide nonanoïque (17 ml sous forme de nonanoate de sodium à 0 heure et 17 ml sous forme de nonanoate de sodium à 24 heures);
5. Acide nonanoïque (17 ml sous forme de nonanoate de sodium à 0 heure);
6. Acide nonanoïque et acide octanoïque (17 ml sous forme de nonanoate de sodium à 0 heure et 17 ml sous forme d'octanoate de sodium à 24 heures);

7. Acide nonanoïque et acide heptanoïque (17 ml sous forme de nonanoate de sodium à 0 heure et 17 ml sous forme d'heptanoate de sodium à 24 heures);
8. Acide heptanoïque et acide nonanoïque (17 ml d'heptanoate de sodium à 0 heure et 17 ml de nonanoate de sodium à 24 heures);
9. Acide octanoïque et acide hexanoïque (17 ml sous forme d'octanoate de sodium à 0 heure et 17 ml sous forme d'hexanoate de sodium à 24 heures);
10. Acide octanoïque et acide hexanoïque (17 ml sous forme d'octanoate de sodium à 0 heure et 14 ml sous forme d'hexanoate de sodium à 24 heures);
11. Acide hexanoïque et acide octanoïque (14 ml sous forme d'hexanoate de sodium à 0 heure et 14 ml sous forme d'octanoate de sodium à 24 heures).

Les meilleurs résultats ont été obtenus pour la variante expérimentale 9, où l'acide octanoïque et l'acide hexanoïque ont été utilisés respectivement comme précurseurs (17 ml sous forme d'octanoate de sodium à 0 heure et 17 ml sous forme d'hexanoate de sodium à 24 heures). Le développement bactérien a été le plus important et la plus grande quantité de biomasse sèche a été obtenue, ainsi que la plus grande quantité de PHA, respectivement 1,95 g/L de milieu de bioprocédé et une feuille pesant 4,6931 g.

Les variantes expérimentales suivantes avec un très bon résultat sont la variante expérimentale 3, pour laquelle on a utilisé de l'acide nonanoïque (17 ml sous forme de nonanoate de sodium à 0 heure et 17 ml à 24 heures), la feuille de PHA pesant 4,05 g, la variante expérimentale 10, avec le acide octanoïque et acide hexanoïque (17 ml sous forme d'octanoïque de sodium à 0 heure et 14 ml sous forme d'hexanoate de sodium à 24 heures), film de PHA pesant 3 882 g, et variante expérimentale 11, avec de l'acide hexanoïque et de l'acide octanoïque (14 ml sous forme d'hexanoate de sodium à 24 heures). 0 heures et 14 ml d'octanoate de sodium à 24 heures), le film de PHA ayant 3,1031 g Parmi les 4 types de substrats structurellement apparentés, la souche *Pseudomonas putida ICCF 391* préfère le substrat C8 (acide octanoïque) pour la biosynthèse d'un PHA élastomère avec. une composition dans laquelle le monomère C8 prédomine sur C6 et C10.

Le chapitre suivant, „Chapitre V. Optimiser les bioprocédés de production de PHA en complétant le milieu avec des sources de carbone renouvelables”, présente des bioprocédés réalisés avec la même souche, mais avec des substrats renouvelables, qui garantissent un faible coût de production de PHA. Les milieux utilisés étaient : pour l'inoculum – milieu IPS, pour la fermentation, milieu E2. Les variantes expérimentales ont été réalisées principalement avec différents types d'huiles végétales, mais aussi d'autres matériaux renouvelables, avec différentes concentrations, comme suit:

1. Marc de café (4% à 0 heures);
2. Marc de café (4% à 0 heures) et acide octanoïque (17 ml à 24 heures);
3. Glucose (2% à 0 heures);
4. Huile de tournesol (1% à 0 heure);
5. Huile de tournesol (1,5% à 0 heure);
6. Huile de tournesol (2% à 0 heure);
7. Huile d'olive (1% à 0 heure);
8. Huile d'olive (1,5% à 0 heure);
9. Huile d'olive (2% à 0 heure);
10. Huile végétale usagée (1% à 0 heure);
11. Huile végétale usagée (1,5% à 0 heure);
12. Huile végétale usagée (2% à 0 heure);
13. Huile de marc de café (1% à 0 heure);
14. Huile de marc de café (1,5% à 0 heure);
15. Huile de marc de café (2% à 0 heure);
16. Huile moteur (Castrol – 1% à 0 heure);
17. Huile moteur (Castrol – 1,5% à 0 heure);
18. Huile moteur (Castrol – 2 % à 0 heure).

En analysant les résultats obtenus, on peut conclure que certaines huiles sont plus faciles à utiliser dans le bioprocédé que d'autres qui nécessitent probablement des étapes de prétraitement supplémentaires pour la biodisponibilité du carbone et pour garantir la possibilité d'être consommées par la souche bactérienne. La plus grande quantité de biomasse a été obtenue pour les variantes expérimentales dans lesquelles de l'huile d'olive a été utilisée (variante expérimentale 8), suivies de la variante expérimentale 11, dans laquelle le milieu a été complété avec de l'huile de tournesol usagée, avec une biomasse de 2,3 g/IT. Les densités optiques les plus élevées ont été enregistrées pour les expériences avec de l'huile extraite du marc de café, et les résultats les plus faibles ont été enregistrés pour les variantes expérimentales dans lesquelles de l'huile moteur a été utilisée (variantes expérimentales 16, 17 et 18). Les résultats obtenus sont cohérents avec la littérature spécialisée puisqu'il existe de nombreuses études dans lesquelles *P. putida* utilise des huiles végétales pour synthétiser du PHA (Song et al., 2008 ; Solaiman et al., 2006).

Étant donné que les acides gras purs ont un prix très élevé, leur remplacement par des huiles végétales de différents types a été étudié pour une production de mcl-PHA à faible coût. Lors de leur élaboration, le même comportement que pour les acides carboxyliques est conservé ; la composition du substrat influence la composition des monomères PHA.

Au sein du „Chapitre VI. La biodégradabilité des biopolymères obtenus”, la biodégradabilité des PHA obtenus ont été vérifiées et le degré de leur perte de poids a été analysé. L'expérimentation s'est déroulée sur 24 mois, les échantillons étant pesés au bout d'un mois, trois mois, 6 mois, 12 mois et 24 mois. Pour les quatre échantillons soumis à l'expérience, une nette dégradation du polymère a été observée. Selon la formule de calcul du sous-chapitre 2.8.2. Biodégradabilité du PHA, les taux de perte de poids étaient:

- Échantillon 1 : 76,76%;
- Échantillon 2 : 54,67%;
- Échantillon 3 : 45,97%;
- Échantillon 4 : 87,43%;

et le taux de perte de poids moyen des biopolymères obtenus à partir de cette expérience était de 66,21 %, prouvant la dégradation du PHA par le microbiome.

La présente thèse a rempli ses objectifs de biosynthèse de polyhydroxycanoates à chaîne latérale moyenne (mcl-PHA) par biosynthèse microbienne, en utilisant la souche *Pseudomonas putida* ICCF 391. Suite à l'analyse de leur structure et en réalisant des tests de biodégradabilité, les résultats suivants ont été trouvés:

- La souche utilisée dans les expériences fait partie de la collection de micro-organismes de l'ICCF et est une bactérie capable d'accumuler des polyhydroxycanoates intracellulaires de PHA, dans des conditions de limitation de certains nutriments et d'excès de source de carbone (déséquilibre nutritionnel).

- Les résultats obtenus au cours de cette étude facilitent la compréhension du processus de biosynthèse contrôlée du mcl-PHA par le micro-organisme dans différentes conditions expérimentales, en utilisant des précurseurs qui influencent le rendement du bioprocédé et la qualité du polymère obtenu.

- De plus, différentes concentrations de substrats lipidiques (sources de carbone non conventionnelles) ont été testées et il a été possible d'évaluer quelle est la concentration la plus adaptée au bioprocédé ;

- Les biopolymères ont été dégradés dans le sol (à une température constante de 28-30°C), avec différents taux de biodégradabilité, étant des matériaux appropriés pour être utilisés dans l'industrie biomédicale (prothèses vasculaires, ligaments, sutures, stents, etc.).

L'étude de la production de PHA reste un sujet d'actualité, avec des substrats nombreux et diversifiés pouvant être utilisés comme source de carbone. L'obtention de PHA à partir de substrats renouvelables (huiles usagées, marc de café, écorces de plantes, etc.) contribue significativement à réduire les coûts des PHA. Les biopolymères PHA continuent d'être recherchés et améliorés, jouant un rôle important dans divers secteurs industriels. Les propriétés de ce matériau permettent son utilisation comme matériau biodégradable dans l'industrie cosmétique (pour l'emballage), dans la production de matières plastiques biodégradables ou en ingénierie biomédicale comme diverses prothèses, valvules cardiaques ou échafaudages implantables.

