

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE & BIOCHIMIE

N°:



DOMAINE : SCINCE DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : SCIENCES BIOLOGIQUES

OPTION : BIOCHIMIE APPLIQUEE

**Mémoire présenté pour l'obtention**

**Du diplôme de Master Académique**

Par : SOULDI Achwaq

SOUACHE Rym Rayane

OGBI Ramla

**Intitulé**

**Approche d'optimisation de la fermentation microbienne pour la production d'acide hyaluronique : Apport des plans d'expériences**

Soutenu devant le jury composé de :

|                   |                                   |             |
|-------------------|-----------------------------------|-------------|
| Dr CHABANE Sara   | Université Mohamed Boudiaf M'sila | Président   |
| Pr BOUDJELAL Amel | Université Mohamed Boudiaf M'sila | Rapporteur  |
| Dr BELBAHI Amine  | Université Mohamed Boudiaf M'sila | Examinateur |

Année universitaire : 2024 /2025

## Dédicace

*C'est avec une profonde émotion et un immense honneur que je dédie ce travail à mon père bien-aimé.*

*À toi, papa, mon pilier, mon refuge face aux tempêtes de la vie.*

*Aucun mot ne saurait exprimer pleinement l'amour infini que je te porte.*

*À ma mère adorée, lumière de mes jours et source de tous mes efforts,*

*Toi qui représentes à la fois ma force, ma douceur et mon bonheur,*

*Je t'adresse toute ma gratitude, mon amour et ma reconnaissance sincère.*

*Cette réussite est le fruit de l'énergie que tu as su m'insuffler.*

*Et de l'espoir que tu n'as jamais cessé d'entretenir en moi.*

*À mon précieux neveu Ilyes, dont l'arrivée a illuminé nos vies,*

*Tu es une source de joie, une étincelle de tendresse.*

*Un rayon de soleil qui éclaire même mes jours les plus sombres.*

*Que ce travail, empreint de l'amour, de l'espoir et de la force que tu m'inspires,*

*Te sert un jour de guide et d'encouragement dans la poursuite de tes rêves.*

*À mon frère bien-aimé Ibrahim,*

*À mon frère Ali et son épouse Safa,*

*À ma sœur Fatima et son époux Yacine,*

*Vous qui occupez une place si chère à mon cœur,*

*Je vous dédie ce travail avec l'espoir sincère d'un avenir empli de bonheur, de paix et de réussite.*

*À mes chères amies Rayane, Meryem, Lydia, Houda, Safia et Chahinez,*

*Merci pour toutes ces années partagées, les souvenirs précieux et les épreuves traversées ensemble.*

*Votre amitié fidèle dans les moments les plus difficiles a été un soutien inestimable.*

*Je vous adresse toute ma tendresse et ma reconnaissance, du fond du cœur.*

**Achwaq**

## Dédicace

*Après des années de parcours et d'efforts, me voilà enfin au seuil de mon diplôme, le cœur rempli de fierté. Je rends grâce à Dieu avant sa satisfaction, lorsqu'il est satisfait, et après sa satisfaction, car c'est grâce à lui que j'ai pu achever ce travail et réaliser mon rêve.*

*C'est avec tout mon amour que je dédie ma réussite et l'obtention de mon diplôme :*

*À mon père, que Dieu m'a honoré de compter parmi les hommes, Mon guide et mon modèle, Celui qui m'a toujours soutenu sans compter, offert sans jamais rien attendre en retour, et qui m'a appris que la vie est une lutte dont les armes sont le savoir et la connaissance. Tu es mon pilier, ma force et mon refuge, après Dieu.*

*À ma mère, n'existe pas de mots assez vastes pour contenir tout l'amour que je te porte, pas de phrases assez fortes pour traduire ce que ton cœur a semé dans le mien. Mais aujourd'hui, je t'offre ce simple cadeau, fait de mes pensées, de ma reconnaissance, et de tout ce que je n'ai pas toujours su dire. Tu es ce refuge sûr dans mes tempêtes, cette lumière douce quand tout devient flou, cette voix qui m'apaise, ce regard qui comprend. Tu es la force qui m'a portée quand mes pas tremblaient, le souffle qui a ravivé mes espoirs quand tout vacillait. Ce que je suis, je te le dois. Et ce que je deviendrai encore portera toujours la trace de ton amour. Alors, en ce jour, je ne t'offre ni or, ni bijou. Je t'offre mon cœur, rempli de gratitude, et cette promesse silencieuse te rendre, un jour, ne serait-ce qu'un peu de tout ce que tu m'as donné, je t'aime, maman.*

*À ma sœur Ihsane, qui repose désormais en paix. Ma joie, aujourd'hui, est incomplète, Car tu n'es plus là, à mes côtés. J'ai tant rêvé de vivre ce jour avec toi, tant attendu ce moment, avec ton regard fier posé sur moi. Mais la mort t'a emportée loin de moi, et me voilà seule face à cette réussite que nous aurions dû partager. Je porterai la casquette de diplômée, les félicitations résonneront autour de moi, mais tu ne seras pas parmi ceux qui me félicitent. Toi qui étais la plus précieuse de tous. Comme j'aurais voulu que tu sois là, près de moi, ce jour où je reçois ce diplôme, que tu sois le témoin d'accomplissement Dont tu es, en vérité, l'une des fondations. Que Dieu te couvre de sa miséricorde, toi qui as été mon monde, ma vie tout entière.*

*À ma sœur Zohra, Rayon de lumière dans mes jours, Et à mes frères Rida, Wail et Ahmed, les piliers solides de mon existence, vous êtes les étoiles qui guident mes pas, À travers votre présence, j'ai découvert la valeur de l'amour sincère, la richesse d'une fraternité authentique, avec tout mon amour et ma reconnaissance.*

*À ma chère Achwaq, amie de l'âme, Toi qui as partagé chaque moment à mes côtés, dans la joie comme dans l'épreuve, qui as été un pilier sur le chemin du savoir et une partenaire précieuse dans la réalisation de ce travail, je t'offre toute mon affection, ainsi que ma gratitude la plus sincère.*

*À mes amies de cœur houda safia chahinaz, non pas simplement liées par les années, mais par les épreuves partagées, fidèles compagnes de ce long chemin, vous êtes la véritable lumière qui éclaire ce chemin, les alliées précieuses de mon âme, irremplaçables et uniques. De mon cœur, naît un souffle de reconnaissance, rien que pour vous.*

*À ma grand-mère et à mes tantes, Lumières douces sur mon cœur et mon chemin, j'ai compris la joie d'aimer et d'être aimé. Elles ont été mon refuge, mon soutien, et cette seconde famille que la vie m'a si généreusement offerte.*

**Rayane**

## **Dédicace**

*À celle qui a toujours été et restera la source de tendresse, de générosité et de prières...*

*À ma chère mère, qui a tout sacrifié pour que je devienne ce que je suis aujourd'hui : je te dois tout, et je t'en remercie du fond du cœur.*

*À mon cher époux, mon soutien inébranlable, mon compagnon de vie et de savoir : merci pour ta patience, ton amour et ton appui constant tout au long de ce parcours.*

*À mes enfants Teym, Iyas, Yamen bien-aimés, qui m'ont donné la force et la motivation de persévérer. Vous êtes mon rêve réalisé et mon avenir espéré.*

*À mes amis et collègues d'études, avec qui j'ai partagé les moments de fatigue, de doute, mais aussi les joies des réussites : merci pour votre précieuse amitié et votre entraide sincère.*

*Je vous dédie ce travail modeste, car vous êtes mes véritables trésors dans ce voyage académique.*

***Ramla***

## Remerciement

*Avant tout, nous remercions Allah de nous avoir accordé la force, la patience et la persévérance nécessaires pour mener à bien ce travail.*

*Nous exprimons notre sincère gratitude à l'ensemble des membres du jury, pour leur bienveillance, leur disponibilité et la richesse de leurs remarques.*

*Nos remerciements les plus chaleureux vont tout particulièrement au Professeur Boudjelal A., notre encadrant, pour son accompagnement constant, ses conseils judicieux, son écoute attentive et sa patience exemplaire. Sa disponibilité et Son soutien tout au long de ce parcours a été essentiel à l'aboutissement de ce travail.*

*Nous exprimons également notre reconnaissance au Docteur Chabane S. et au Docteur Belbahi A, pour avoir accepté d'évaluer notre mémoire et pour l'intérêt qu'ils y ont porté.*

*En dernier lieu, nous adressons nos remerciements les plus sincères à tous nos enseignants, dont l'implication et la qualité de l'enseignement ont profondément marqué notre parcours académique.*

# Sommaire

|   |            |
|---|------------|
| <b>Résumé .....</b>   | <b>i</b>   |
| <b>Liste des abréviations .....</b>   | <b>ii</b>  |
| <b>Liste des figures .....</b>  | <b>iii</b> |
| <b>Liste des tableaux.....</b>  | <b>iv</b>  |
| <b>Introduction .....</b>   | <b>1</b>   |
| <b>I. Généralités sur l'acide hyaluronique.....</b>   | <b>3</b>   |
| I.1. Définition de l'acide hyaluronique .....   | 3          |
| I.2. Structure de l'acide hyaluronique.....   | 3          |
| I.3. Localisation et rôles biologiques de l'acide hyaluronique.....   | 5          |
| I.4. Applications de l'acide hyaluronique .....   | 6          |
| I.5. Méthodes de production de l'acide hyaluronique .....   | 6          |
| I.5.1. Extraction à partir de sources animales.....   | 6          |
| I.5.2. Synthèse chimique .....  | 7          |
| I.5.3. Production enzymatique.....  | 7          |
| I.5.4. Production par ADN recombinant .....   | 7          |
| I.5.5. Production par fermentation microbienne.....   | 8          |
| <b>II. Approches expérimentales.....</b>  | <b>10</b>  |
| II.1. Le plan d'expérience (DoE - Design of Experiments) : un outil pour optimiser les essais expérimentaux ..... | 10         |
| II.2. Intérêt stratégique des plans d'expérience dans l'optimisation des essais .....                             | 11         |
| II.3. Les principaux Types de plans d'expériences .....   | 11         |
| II.3.1. Les plans de criblages .....  | 12         |
| II.3.1.1. Plan factoriel complet (Full Factorial Experiment, FFE).....  | 12         |
| II.3.1.2. Plans factoriels fractionnaires.....  | 13         |
| II.3.1.3. Plans Plackett-Burman .....   | 13         |
| II.3.2. Plans de surface de réponse (Response Surface Methodology, RSM) .....                                     | 14         |

|   |           |
|---|-----------|
| II.3.2.1. Le plan composite centré ( <i>Central Composite Design</i> , CCD) .....                         | 14        |
| II.3.2.2. Plan Box-Behnken .....  | 16        |
| II.3.3. Plans de mélange .....  | 16        |
| II.4. Applications des Plans Expérimentaux dans la Production Biotechnologique .....                      | 16        |
| II.5. Paramètres et niveaux de conception de composite centrale .....                                     | 17        |
| II.6. Approches alternatives au DOE pour améliorer la production microbienne d'acide<br>hyaluronique..... | 18        |
| <b>Conclusion et perspectives.....</b>  | <b>22</b> |
| <b>Références bibliographiques .....</b>  | <b>23</b> |

## الملخص

يُعد حمض الهيالورونيك (HA) بوليمراً طبيعياً يتميز بخصائص استثنائية، خاصة فيما يتعلق بالترطيب وتجديد الأنسجة، مما يجعله مستخدماً على نطاق واسع في التطبيقات الطبية والصيدلانية والتجميلية. وتُعد تقنية التخمير الميكروبي الطريقة المفضلة حالياً لإنتاجه، نظراً لسلامتها وكفاءتها الاقتصادية وقابليتها للتطبيق الصناعي. إلا أن تغيّر ظروف الزراعة قد يؤثر بشكل كبير على مردود الإنتاج. وفي هذا السياق، تُعد التصاميم الإحصائية للتجارب، مثل تصميم التركيب المركزي (Central Composite Design)، أدوات فعّالة لتحليل تأثير عدة عوامل في آن واحد، كدرجة الحموضة (pH)، ودرجة الحرارة، وسرعة التحريك، ومدة الحضانة. تتيح هذه المنهجية بناء نماذج تنبؤية، وتحديد التفاعلات بين المتغيرات، وتحديد الظروف المثلى للزراعة. ويعرض هذا العمل منظوراً نظرياً حول مساهمة هذه الأساليب في تحسين إنتاج حمض الهيالورونيك، كما يقترح توجهات مستقبلية لتجارب أكثر دقة واقتصاداً في الوقت والموارد.

## الكلمات المفتاحية

حمض الهيالورونيك، التخمير الميكروبي، التحسين النظري، عوامل الزراعة، التصميم التجريبي، تصميم التركيب المركزي

## **Abstract**

Hyaluronic acid (HA) is a natural biopolymer with outstanding properties, particularly in hydration and tissue regeneration, making it widely used in biomedical, pharmaceutical, and cosmetic applications. Microbial fermentation is currently the preferred production method due to its safety, cost-effectiveness, and industrial scalability. However, variations in culture conditions can significantly affect HA yield. In this context, statistical experimental designs, such as the Central Composite Design, serve as powerful tools for simultaneously analyzing the influence of multiple factors, including pH, temperature, agitation speed, and incubation time. These methods enable the construction of predictive models, the identification of variable interactions, and the determination of optimal culture conditions. This work presents a theoretical perspective on the contribution of such approaches to improving HA production. It also outlines avenues for future experimentation that are more targeted, time-efficient, and resource-conscious.

## **keywords**

Hyaluronic acid, microbial fermentation, theoretical optimization, culture parameters, experimental design, Central Composite Design

## **Résumé**

L'acide hyaluronique (AH) est une molécule naturelle aux propriétés remarquables, notamment en termes d'hydratation et de régénération tissulaire, ce qui lui confère une large gamme d'applications biomédicales et cosmétiques. La fermentation microbienne représente aujourd'hui une voie de production privilégiée, en raison de sa sécurité, de sa rentabilité et de son adaptabilité industrielle. Toutefois, la variabilité des conditions de culture peut influencer significativement la productivité en AH. Dans ce contexte, les plans d'expériences statistiques, tels que le Central Composite Design, constituent des outils méthodologiques efficaces pour étudier de manière simultanée l'effet de plusieurs facteurs, comme le pH, la température, la vitesse d'agitation et le temps d'incubation. Leur application permet de construire des modèles prédictifs, d'identifier les interactions entre variables et de définir des conditions de culture optimales. Ce travail propose une réflexion théorique sur l'apport de ces approches dans l'amélioration du rendement en AH. Il ouvre également des pistes pour la mise en place future d'expérimentations plus ciblées, économes en temps et en ressources.

## **Mots clés**

Acide hyaluronique, fermentation microbienne, optimisation théorique, variables de culture, plan d'expériences, Central Composite Design

## Liste des abréviations

AH. : *acide hyaluronique*  
AMDEC. *Analyse des Modes de Défaillance, de leurs Effets et de leur Criticité*  
ANN. *Réseaux de neurones artificiels*  
CCD. : *Central Composite Design (Plan composite centré)*  
CD44. : *Cluster de Differentiation 44*  
COBRA. *CO*nstraints-*B*ased *R*econstruction and *A*nalysis  
CPPs. *paramètres critiques du procédé*  
CRISPR-Cas9. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR associated protein 9*  
DoE. : *Design of Experiments*  
FBA. *Flux Balance Analysis*  
FFE. : *Full Factorial Experiment (Plan factoriel complet)*  
FMM. : *Faible Poids Moléculaire (Low Molecular Mass)*  
GA. *Algorithme génétique*  
GAG. : *glycosaminoglycanes*  
HACCP. *Hazard Analysis and Critical Control Points*  
HAS. : *hyaluronan synthases, : hyaluronane synthases*  
HMM. : *Haut Poids Moléculaire (High Molecular Mass)*  
JMP. *John's Macintosh Project*  
KPIs. *indicateurs clés de performance*  
MEC. : *matrice extracellulaire*  
MODDE. *Modelling and Design of Experiments*  
NIR. *spectroscopie proche infrarouge*  
OSFD. *Optimal Space-Filling Designs*  
PAT. *Process Analytical Technology*  
PCA. *Analyse en Composantes Principales*  
PDGF-AB. : *Platelet-Derived Growth Factor-AB*  
PLS. *Partial Least Squares*  
QbD. *Quality by Design*  
RHAMM. : *Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility*  
RSM. : *Response Surface Methodology (Méthodologie de surface de réponse)*  
SIMCA. *Soft Independent Modeling of Class Analogy*  
TOPSIS. *Technique for Order Preference by Similarity to Ideal Solution*

## Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| FIGURE I. 1 . STRUCTURE CHIMIQUE DE L'ACIDE HYALURONIQUE. ....   | 3  |
| FIGURE I-2. B) THE SECONDARY STRUCTURE SHOWING INTRAMOLECULAR<br>HYDROGEN BONDS (DOTTED LINES). C) WATER BRIDGES PROPOSED TO BE<br>INVOLVED IN THE SECONDARY STRUCTURE (MODIFIED FROM WITH<br>PERMISSION). D) THE TERTIARY STRUCTURE OF HA FORMED BY<br>HYDROPHOBIC INTERACTIONS BETWEEN HYDROPHOBIC REGIONS (SHADED)<br>ON THE RING (HEXAGON) AND INTERMOLECULAR HYDROGEN BONDING<br>(ARROWS) BETWEEN ANTIPARALLEL HA CHAINS PROPRIÉTÉS PHYSICO-<br>CHIMIQUES ET RHÉOLOGIQUES DE L'ACIDE HYALURONIQUE. .... | 4  |
| FIGURE I-3. LOCALISATION DE L'ACIDE HYALURONIQUE AU NIVEAU CUTANE.....   | 5  |
| FIGURE II. 1.PROCESSUS D'UNE EXPERIENCE.....   | 10 |
| FIGURE II. 2. LE CHAMP DE DIFFERENCE DU "FACTEUR. ....   | 10 |
| FIGURE II. 3.STRUCTURE FONCTIONNELLE D'UN PLAN D'EXPERIENCE : ENTREE –<br>SYSTEME – SORTIE. ....   | 11 |
| FIGURE II. 4 DISPOSITION DES POINTS EXPERIMENTAUX D'UN PLAN $2^3$ .....  | 13 |
| FIGURE II. 5 PLAN FACTORIEL FRACTIONNAIRE $2^{3-1}$ .....  | 13 |
| FIGURE II. 6.SURFACE DE REPONSE. ....  | 14 |
| FIGURE II. 7. PLAN COMPOSITE CENTRE.....   | 15 |
| FIGURE II.8. PLAN DE Box-Behnken POUR TROIS FACTEURS .....   | 16 |

## Liste des tableaux

|  |   |
|--|---|
| TABLEAU I.1. MICRO-ORGANISMES UTILISES POUR LA PRODUCTION<br>BIOTECHNOLOGIQUE DE L'ACIDE HYALURONIQUE : CARACTERISTIQUES<br>COMPARATIVES ..... | 8 |
|--|---|

# **Introduction**

## Introduction

L'acide hyaluronique (AH) est un polymère linéaire composé d'unités disaccharidiques répétées de N-acétyl-D-glucosamine et d'acide glucuronique. Découvert en 1934 par Karl Meyer et John Palmer, ce glycosaminoglycane est naturellement présent dans de nombreux tissus de l'organisme tels que la peau, le cartilage, le liquide synovial, la crête de coq, le cordon ombilical et l'humeur vitrée. On le retrouve également dans la paroi cellulaire de certaines bactéries, notamment *Streptococcus zooepidemicus* (Shiedlin *et al.*, 2004 ; Vázquez *et al.*, 2009).

Grâce à sa structure particulière et à ses propriétés physico-chimiques, en particulier sa forte capacité de rétention d'eau et sa viscoélasticité, l'AH joue un rôle essentiel dans l'hydratation, la protection et la réparation des tissus. Ces caractéristiques lui confèrent une grande valeur dans les domaines médical, pharmaceutique et cosmétique, où la demande mondiale ne cesse de croître (Fallacara *et al.*, 2018 ; Wu *et al.*, 2024).

Historiquement, l'AH était extrait de tissus animaux, mais cette méthode présente plusieurs inconvénients : risque de contamination biologique, variabilité des rendements, préoccupations éthiques, et coûts élevés. Pour répondre aux exigences industrielles actuelles, la production par fermentation microbienne s'est imposée comme une alternative plus sûre, plus contrôlable et économiquement viable. Cette approche permet d'obtenir un produit de haute pureté, avec un poids moléculaire adapté aux usages ciblés (Boeriu *et al.*, 2013 ; Liu *et al.*, 2011 ; Chong *et al.*, 2004).

Cependant, la performance de cette voie de production repose largement sur les conditions de culture, qui influencent directement la croissance bactérienne et la biosynthèse de l'AH. Le système biologique étant complexe et multifactoriel, une optimisation empirique basée sur la variation d'un seul paramètre à la fois s'avère souvent insuffisante. D'où l'intérêt croissant pour les plans d'expériences (Design of Experiments, DoE), qui offrent une approche statistique rigoureuse permettant d'évaluer simultanément l'effet de plusieurs facteurs, d'analyser leurs interactions et de prédire les conditions optimales de production (Montgomery, 2017 ; Antony, 2023).

Contrairement aux méthodes classiques, les DoE réduisent le nombre d'essais nécessaires tout en augmentant la fiabilité des résultats. Le recours à des modèles expérimentaux comme le Central Composite Design permet ainsi d'orienter plus efficacement le développement de milieux de culture adaptés à la fermentation microbienne de l'AH.

Ce mémoire propose une stratégie théorique d'optimisation de la production d'acide hyaluronique (AH) par fermentation microbienne, à travers l'utilisation des plans d'expériences

statistiques, notamment le *Central Composite Design (CCD)*, afin d'identifier les conditions de culture optimales et d'augmenter le rendement de production. Dans un premier temps, les propriétés, fonctions biologiques et applications industrielles de l'AH seront présentées. Ensuite, nous exposerons les principes et l'intérêt des plans d'expériences dans le cadre de l'optimisation biotechnologique. Enfin, une proposition d'approche expérimentale sera formulée à partir des données recueillies, en vue de guider de futures investigations pratiques.

**Chapitre I**

**Généralités sur l'acide**

**hyaluronique**

## I. Généralités sur l'acide hyaluronique

### I.1. Définition de l'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique (AH), aussi appelé hyaluronane ou hyaluronate, est un polymère linéaire de glycosaminoglycane naturellement présent dans la matrice extracellulaire de nombreux tissus vertébrés, notamment le cartilage, la peau et le liquide synovial (Gupta *et al.*,2019). Synthétisé par les hyaluronan synthases (HAS1, HAS2, HAS3), il joue un double rôle en tant que molécule structurale et de signalisation, selon son poids moléculaire et ses interactions avec des récepteurs spécifiques. Présent chez divers organismes (animaux, certaines bactéries, algues, levures), il est absent chez les champignons, les plantes et les insectes (Fallacara *et al.*,2018).

Sa dégradation se fait par des enzymes spécifiques (hyaluronidases) ou par des mécanismes non spécifiques (stress oxydatif), localement ou via les systèmes lymphatique et hépatique (Fallacara *et al.*,2018).

### I.2. Structure de l'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique est un polysaccharide acide de la famille des glycosaminoglycane (GAGs), caractérisé par des chaînes polysaccharidiques complexes impliquées notamment dans la mobilité cellulaire, le transport des nutriments et la synthèse du collagène (Paiva,2019). À la différence des autres GAGs, l'AH, se distingue par une structure primaire plus simple, dépourvue de peptides. C'est est un glycosaminoglycane linéaire non sulfaté composé d'unités répétées d'acide D-glucuronique et de N-acétyl-D-glucosamine, reliées par des liaisons glycosidiques alternées  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) et  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3). Sa chaîne possède plusieurs groupes fonctionnels carboxyliques, hydroxyles et acétamides susceptibles de subir diverses modifications chimiques (Figure I-1) (Paiva,2019).

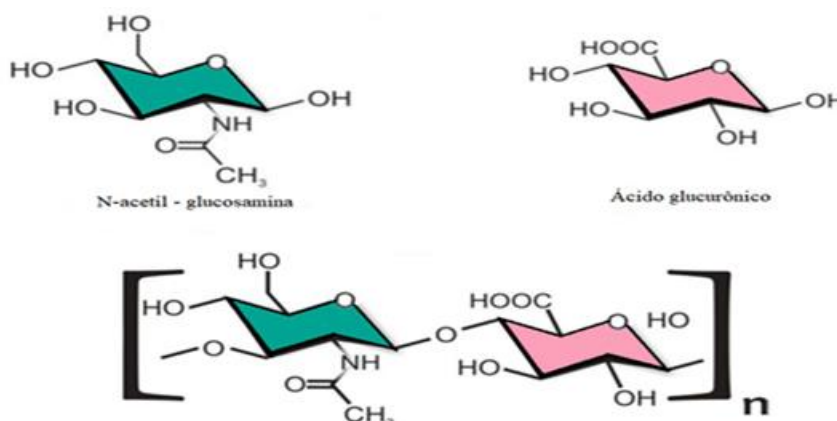


Figure I. 1 . Structure chimique de l'acide hyaluronique (Paiva ,2019).

En solution aqueuse, l'AH forme des structures secondaires et tertiaires stabilisées par des liaisons hydrogène (Figure I.2). Sa masse moléculaire, qui peut varier de  $10^2$  à plus de  $10^4$  kDa, influe directement sur ses propriétés biologiques : les formes de haut poids moléculaire sont impliquées dans l'hydratation et la protection des tissus, tandis que celles de bas poids moléculaire peuvent exercer des effets pro-inflammatoires ou pro-angiogéniques (Wu *et al.*,2024).

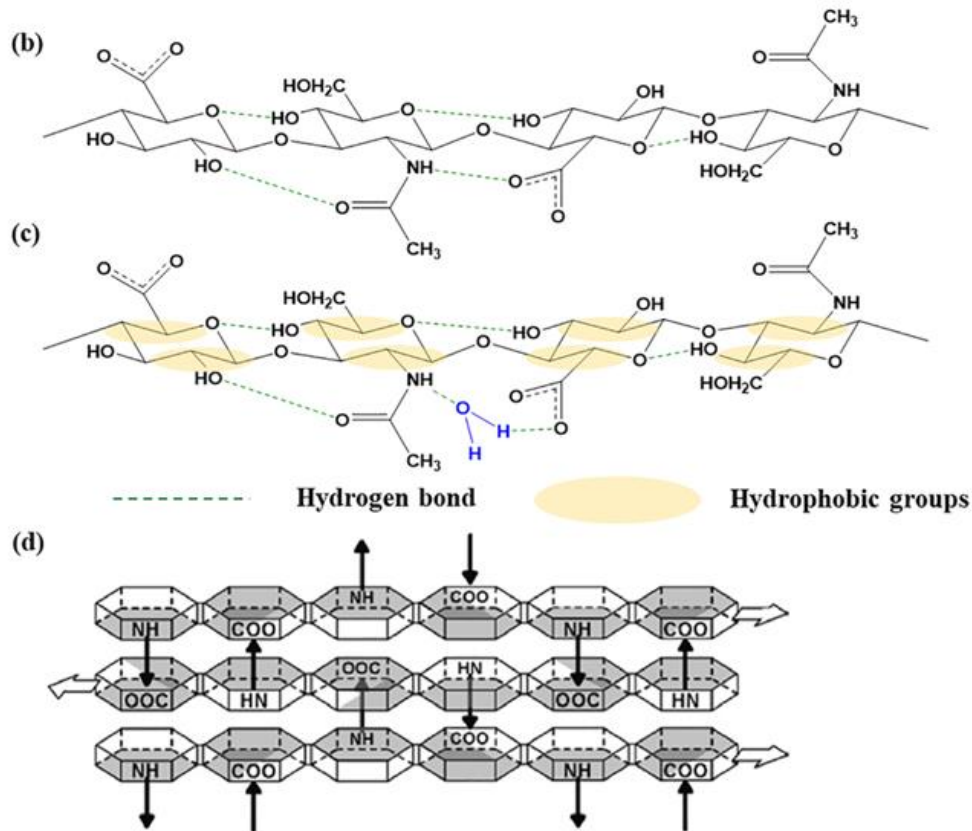


Figure I-2. b) The secondary structure showing intramolecular hydrogen bonds (dotted lines). c) Water bridges proposed to be involved in the secondary structure (modified from with permission). d) The tertiary structure of HA formed by hydrophobic interactions between hydrophobic regions (shaded) on the ring (hexagon) and intermolecular hydrogen bonding (arrows) between antiparallel HA chains Propriétés physico-chimiques et rhéologiques de l'acide hyaluronique (Wu *et al.*,2024).

L'AH, grâce à sa structure hélicoïdale riche en sucres et à ses nombreux groupes fonctionnels hydrophiles, présente une capacité exceptionnelle à capter l'eau et les ions, pouvant absorber jusqu'à 1000 fois son poids en eau. Cette aptitude lui permet de former un gel volumineux et résistant aux pressions extérieures, jouant ainsi un rôle majeur dans l'hydratation des tissus, le maintien de leur structure et la diffusion de nutriments favorables à la croissance cellulaire (Koscher,2023).

Sur le plan rhéologique, l'AH se distingue par ses propriétés viscoélastiques remarquables. À concentration élevée, ses polymères interagissent via des domaines hydrophiles et hydrophobes,

formant des structures en rubans torsadés appelées *twisting ribbons*. Cela entraîne une augmentation de la viscosité et permet à l'AH de remplir l'espace extracellulaire sous forme de gel, assurant des fonctions mécaniques telles que l'absorption des chocs (notamment dans les cartilages) et la modulation des tensions au niveau cutané (Koscher,2023). Sa taille moléculaire importante et sa conformation spatiale en font aussi une barrière de diffusion, régulant le passage de molécules à travers les tissus et agissant comme réservoir de cytokines et de facteurs signalétiques (Koscher,2023).

### I.3. Localisation et rôles biologiques de l'acide hyaluronique

L'AH joue un rôle fondamental dans divers processus physiologiques, et ses fonctions varient en fonction de son poids moléculaire, de sa capacité à retenir l'eau, de sa localisation tissulaire et de ses interactions avec certains récepteurs cellulaires tels que CD44 et RHAMM (Tavianatou *et al.*,2019).

Dans le corps humain, la teneur totale en AH d'un adulte de 70 kg est d'environ 15 g (Fallacara *et al.*,2018). Il est principalement distribué autour des cellules, formant un revêtement péricellulaire et dans la matrice extracellulaire (MEC) des tissus conjonctifs. Environ 50 % de l'AH total se trouve dans la peau, à la fois dans le derme et l'épiderme (Figure I-3)

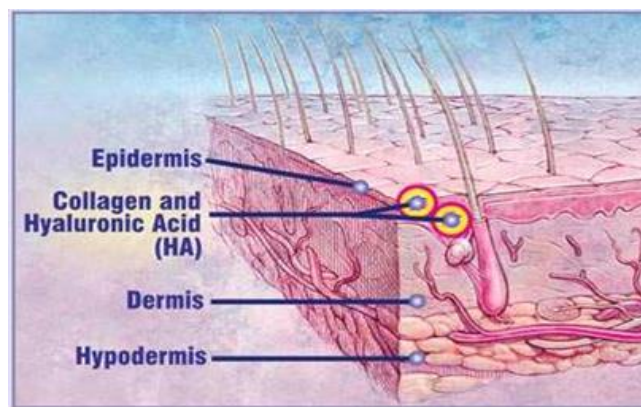


Figure I-3. Localisation de l'acide hyaluronique au niveau cutané (Poinsot, 2011).

Il est également présent dans le liquide articulaire synovial et le corps vitré de l'œil, qui contiennent respectivement 3-4 mg/mL et 0,1 mg/mL (poids humide) d'hyaluronane (Fallacara *et al.*,2018).

L'AH joue un rôle clé dans la plasticité et l'organisation des tissus dans les espaces extracellulaires. Il est impliqué dans la régulation de plusieurs fonctions biologiques essentielles, notamment l'embryogenèse, la régénération tissulaire cutanée (cicatrisation), les processus inflammatoires et immunitaires, ainsi que l'angiogenèse (Aissaoui,2024).

L'acide hyaluronique influence également des phénomènes biologiques tels que l'adhérence, la migration, la différenciation cellulaire et la prolifération dans le contexte du cancer.

Par ailleurs, il participe à la transduction des signaux, au transport des nutriments, des hormones et des cellules, à l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, et à la libération du facteur de croissance PDGF-AB par les plaquettes (Aissaoui, 2024).

Grâce à sa structure hélicoïdale, l'AH possède des propriétés hydrophiles et viscoélastiques qui sont essentielles pour l'hydratation de la matrice extracellulaire (MEC) et des tissus. De plus, ses caractéristiques visqueuses et flexibles lui confèrent des propriétés d'amortissement et de lubrification naturelles. Son rôle dans l'organisation et la fonctionnalité des tissus fait de l'AH un élément essentiel pour maintenir l'homéostasie et protéger les tissus contre diverses agressions (Rousselle *et al.*, 2019).

#### **I.4. Applications de l'acide hyaluronique**

L'acide hyaluronique (AH) est une molécule largement exploitée dans divers domaines médicaux et paramédicaux. En médecine, il est couramment utilisé dans le traitement de l'arthrose pour ses propriétés lubrifiantes et anti-inflammatoires, ainsi qu'en chirurgie ophtalmique, notamment lors des interventions de la cataracte, en raison de sa capacité à protéger et à hydrater les tissus oculaires. Le AH joue également un rôle important dans la cicatrisation des plaies cutanées, en favorisant la régénération tissulaire. En dermatologie et en cosmétique, il est apprécié pour ses effets hydratants, contribuant à restaurer l'élasticité, la turgescence et l'hydratation de la peau (Gall, 2010 ; Pan *et al.*, 2016).

#### **I.5. Méthodes de production de l'acide hyaluronique**

L'AH peut être produit par diverses méthodes, allant de l'extraction naturelle à des procédés biotechnologiques avancés. Le choix de la méthode dépend de l'usage final (pharmaceutique, cosmétique, médical) et des exigences en termes de pureté, de poids moléculaire et de sécurité.

##### **I.5.1. Extraction à partir de sources animales**

Historiquement, l'acide hyaluronique était obtenu à partir de tissus animaux riches en matrice extracellulaire tels que les crêtes de coq, l'humeur vitrée de l'œil bovin ou encore le cordon ombilical humain (Vázquez *et al.*, 2013). Toutefois, cette méthode présente plusieurs limites, notamment la difficulté de contrôler la qualité des tissus d'origine, les coûts élevés de production, ainsi que des préoccupations éthiques liées à l'utilisation de matières premières animales. Ces contraintes ont progressivement conduit au développement de méthodes de production alternatives, notamment par fermentation microbienne (Liu *et al.*, 2011 ; Boeriu *et al.*, 2013).

### I.5.2. Synthèse chimique

Des avancées récentes ont permis l'ingénierie génétique de micro-organismes non pathogènes (comme *Bacillus subtilis* ou *Escherichia coli*) pour produire l'AH, contournant les risques liés aux souches streptococciques.

### I.5.3. Production enzymatique

La production d'acide hyaluronique (AH) par voie enzymatique repose sur l'utilisation d'enzymes spécifiques, notamment les hyaluronane synthases (HAS), qui catalysent in vitro l'assemblage des précurseurs UDP-glucuronate et UDP-N-acétylglucosamine en longues chaînes de AH. Cette méthode présente plusieurs avantages : elle offre un contrôle rigoureux des conditions de réaction, réduit considérablement les risques de contamination microbienne et permet d'obtenir des polymères de poids moléculaire bien défini (Liu *et al.*, 2011).

Parmi les atouts majeurs de cette approche figurent la grande pureté du produit final, l'absence d'endotoxines (souvent présentes dans les procédés microbiens), et une reproductibilité élevée. Toutefois, elle reste limitée par des contraintes telles que le coût élevé des enzymes purifiées, la complexité des systèmes de régénération des cofacteurs, et une productivité généralement inférieure comparée aux procédés microbiens ou recombinants (Liu *et al.*, 2011 ; Jiang *et al.*, 2021).

### I.5.4. Production par ADN recombinant

La méthode de production par ADN recombinant consiste à insérer les gènes de la biosynthèse de l'AH (tels que ceux codant pour l'hyaluronane synthase, *glmU*, *ugd*, etc.) dans des micro-organismes génétiquement modifiés, comme *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* ou *Bacillus subtilis*. Contrairement à l'utilisation de bactéries naturellement productrices comme *Streptococcus zooepidemicus*, cette approche permet de travailler avec des souches non pathogènes, renforçant ainsi la sécurité du procédé (Chong *et al.*, 2021).

Les avantages de cette technique incluent un rendement élevé compatible avec la production industrielle, un contrôle génétique fin, et la possibilité d'optimiser les voies métaboliques. Cependant, elle présente aussi des inconvénients : la mise en œuvre nécessite un savoir-faire poussé en génie génétique, les coûts de développement des souches recombinantes peuvent être élevés, et des défis persistent, comme l'instabilité génétique ou le contrôle précis du poids moléculaire de l'AH obtenu (Yu *et al.*, 2021 ; Patil *et al.*, 2023).

### I.5.5. Production par fermentation microbienne

La méthode de production microbienne de l'acide hyaluronique est largement utilisée, elle présente de nombreux avantages par rapport aux autres méthodes de production. Elle permet d'obtenir des rendements de production plus élevés, un acide hyaluronique de poids moléculaire supérieur, ainsi qu'une qualité de polymère améliorée. De plus, la culture des micro-organismes est généralement simple et économique à grande échelle, produisant un polymère plus pur, avec un faible taux de protéines associées. Cette approche réduit considérablement les risques sanitaires, notamment ceux liés à la transmission inter-espèces de maladies, ce qui en fait une alternative plus sûre et éthiquement acceptable. Toutefois, cette méthode n'est pas exempte d'inconvénients. Elle nécessite des conditions de culture strictes et un environnement stérile, avec un risque potentiel de contamination du milieu par des endotoxines bactériennes. De plus, le processus de fermentation doit être rigoureusement contrôlé, et les coûts initiaux d'installation peuvent être élevés. Enfin, des étapes de purification supplémentaires sont souvent nécessaires pour garantir la qualité pharmaceutique du produit final (Chong *et al.*, 2004 ; Armstrong *et al.*, 1997).

#### A/ Les facteurs influencent la fermentation microbienne

La fermentation microbienne repose sur plusieurs paramètres essentiels qui influencent la production d'acide hyaluronique.

- Les micro-organismes utilisés

Le choix du microorganisme est primordial, les espèces les plus couramment utilisées incluent *Streptococcus zooepidemicus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* modifiée génétiquement, et *Lactococcus lactis*. Ces souches diffèrent par leur rendement, leur sécurité d'utilisation et leur capacité à produire de l'acide hyaluronique de haut poids moléculaire. Le tableau 1 regroupe les microorganismes les plus utilisés pour la production d'AH.

Tableau I.1. Micro-organismes utilisés pour la production biotechnologique de l'acide hyaluronique : caractéristiques comparatives

| Micro-organisme                    | Avantages   | Inconvénients   | Références                       |
|------------------------------------|---|---|----------------------------------|
| <i>Streptococcus zooepidemicus</i> | Production d'AH HMM<br>Excellente biocompatibilité<br>Rendement élevé | Pathogène opportuniste<br>Processus coûteux<br>Traitement en aval | (Ferreira <i>et al.</i> , 2021)  |
| <i>Bacillus subtilis</i>           | Production d'HA FMM<br>Croissance rapide<br>Rendement élevé           | Non pathogène<br>Culture difficile<br>Coûts de production bas     | (Westbrook <i>et al.</i> , 2017) |

|                                       |  |   |  |
|---------------------------------------|--|---|--|
| <i>Escherichia coli</i><br>(Modifiée) | Production d'HA FMM<br>Large gamme d'outils<br>génétiques disponibles<br>Croissance rapide<br>Rendement faible | Non pathogène<br>Coûts de production<br>élevés<br>Traitement en aval<br>coûteux | (Lai <i>et al.</i> , 2016 ; Woo <i>et al.</i> ,<br>2019) |
| <i>Lactococcus lactis</i>             | Production d'HA FMM<br>Croissance rapide<br>Rendement faible   | Non pathogène<br>Coûts de production<br>élevés<br>Traitement en aval            | (Badri <i>et al.</i> , 2019)                             |

- Les facteurs nutritionnels et opérationnels

La production optimale d'acide hyaluronique (AH) repose sur la maîtrise conjointe des facteurs nutritionnels et opérationnels. Les premiers incluent les sources de carbone, d'azote, de minéraux et de vitamines, indispensables à la croissance microbienne et à la biosynthèse du AH, bien que reconnus pour leur importance, ont été exclus de notre analyse en raison de leur complexité et des coûts élevés associés à leur manipulation.

Les seconds concernent les conditions de culture, telles que la température, le pH et l'oxygénation, qui doivent être strictement contrôlées. Le mode de fermentation joue également un rôle clé, influençant la concentration, la viscosité et le poids moléculaire du AH, paramètres qu'il convient d'ajuster selon les exigences industrielles (Serra *et al.*, 2023).

Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur l'optimisation de la production d'acide hyaluronique en étudiant quatre paramètres opérationnels liés aux conditions de fermentation.

1. Température : La température optimale pour la croissance des micro-organismes et la production d'acide hyaluronique varie en fonction de l'espèce utilisée. La plage de température la plus favorable à la production d'AH se situe généralement entre 30 et 37 °C.
2. pH : Le pH du milieu de culture est une autre condition importante qui doit être déterminée. Le pH doit être maintenu dans une plage spécifique favorable à la croissance des micro-organismes et à la production d'acide hyaluronique. La plage de pH optimale pour la production d'AH se situe généralement entre 6,5 et 7,5.
3. Aération : La quantité d'air fournie au milieu de culture peut être ajustée afin d'atteindre le niveau d'aération optimal pour les micro-organismes utilisés (Serra *et al.*, 2023).
4. Temp d'incubation : Le temps d'incubation influence directement le rendement en acide hyaluronique. Il doit permettre une production maximale sans entraîner sa dégradation. En général, il varie entre 24 et 72 heures, selon la souche et les conditions de culture.

L'optimisation de la production microbienne d'acide hyaluronique repose sur une approche multicritère, utilisant une planification expérimentale pour ajuster les paramètres clés identifiés.

# **Chapitre II**

## **Approches expérimentales**

## II. Approches expérimentales

### II.1. Le plan d'expérience (DoE - Design of Experiments) : un outil pour optimiser les essais expérimentaux

Le plan d'expérience (Design of Experiments, DoE) est une méthode rigoureuse et systématique qui permet d'organiser les essais expérimentaux afin d'obtenir des résultats fiables, en optimisant le temps et les ressources. Il repose sur le principe fondamental qu'une expérimentation soigneusement planifiée facilite non seulement l'analyse statistique des données, mais aussi l'interprétation des résultats.

Une expérience consiste à modifier intentionnellement les paramètres d'un système afin d'observer ou de mesurer les effets induits par ces changements (Figure II.1) (Allalata, 2023).

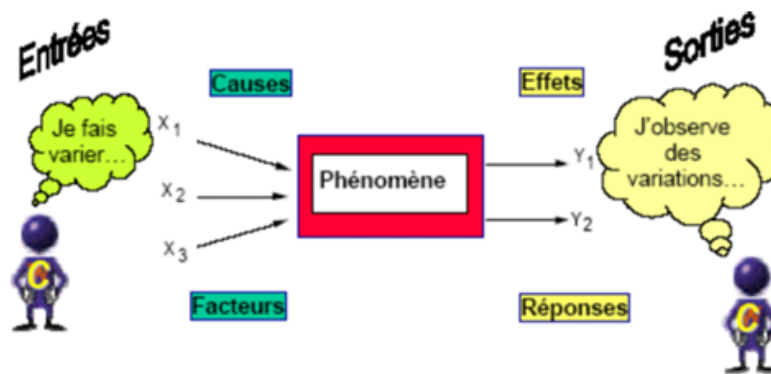


Figure II. 1. Processus d'une expérience (Bchitou, 2023).

De manière générale, une conception expérimentale vise à étudier et quantifier l'effet de l'interaction entre deux catégories de variables (Figure II-2)

- ✓ **Les facteurs** : variables indépendantes ou paramètres contrôlés, dont l'influence est évaluée au cours de l'expérience.

À titre d'exemple, le codage d'un facteur continu pouvant prendre deux niveaux "naturels" — à savoir un niveau bas (niv1) et un niveau haut (niv2) — consiste à transformer ces valeurs respectivement en -1 et +1 (Gauchi, 2016).

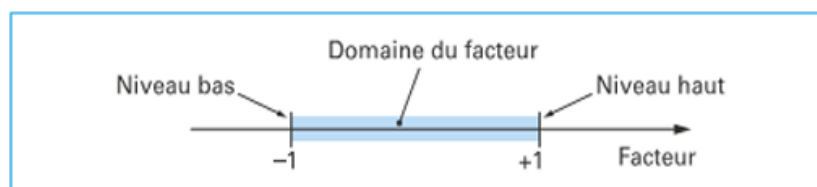


Figure II. 2. Le champ de différence du "facteur" (Belfegas et Djendi, 2020).

- ✓ **Les réponses** : variables dépendantes ou résultats mesurés, reflétant l'effet des facteurs étudiés (Figure II.3).

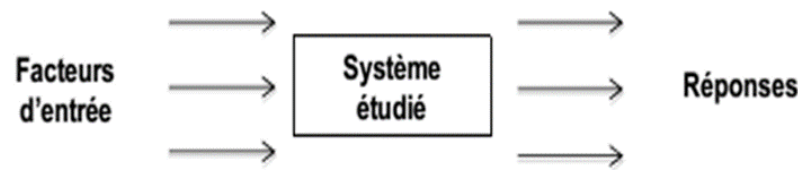


Figure II. 3. Structure fonctionnelle d'un plan d'expérience : entrée – système – sortie (Allalata, 2023).

Les objectifs :

- Identifier et hiérarchiser les facteurs influents à travers un criblage systématique.
- Analyser quantitativement l'effet des facteurs sélectionnés, en évaluant à la fois leurs contributions individuelles et les interactions éventuelles entre eux.
- Modéliser de manière prédictive les réponses du système, afin de comprendre le comportement global du phénomène étudié et anticiper les effets des variations des paramètres.
- Déterminer les conditions optimales de fonctionnement permettant de maximiser (ou minimiser) la réponse d'intérêt, en s'appuyant sur les résultats du modèle prédictif (Bchitou,2023).

## II.2. Intérêt stratégique des plans d'expérience dans l'optimisation des essais

L'un des principaux avantages des plans d'expérience (DoE) réside dans leur capacité à optimiser le processus expérimental en limitant le nombre d'essais nécessaires. En structurant méthodiquement les expérimentations, cette approche permet d'identifier de manière précoce les facteurs ou combinaisons de facteurs ayant une influence significative sur les réponses du système étudié. Ainsi, elle contribue à réduire le temps, les coûts et les ressources mobilisées, tout en garantissant la fiabilité des résultats obtenus (Belkadi et Makked, 2016).

## II.3. Les principaux Types de plans d'expériences

De nos jours, une large gamme de plans expérimentaux est disponible, chacun possédant des caractéristiques propres qui le rendent particulièrement adapté à la résolution de problématiques spécifiques. Les plans d'expériences peuvent néanmoins être répartis en deux grandes catégories :

- les plans exploratoires, destinés à étudier, estimer et comparer les effets des différents paramètres sur la réponse étudiée ;
- les plans d'optimisation, visant à ajuster les paramètres afin d'identifier les conditions permettant d'atteindre un optimum (Allalata ,2023).

### II.3.1. Les plans de criblages

Le criblage est une méthode de sélection visant à identifier, parmi un ensemble initial de facteurs, ceux ayant une influence significative sur la réponse étudiée (Belfegas et Djendi, 2020).

Son objectif est d'identifier les facteurs ayant l'influence la plus marquée sur une réponse donnée, tout en minimisant le nombre d'expériences à réaliser.

#### II.3.1.1. Plan factoriel complet (Full Factorial Experiment, FFE)

Le plan factoriel complet permet d'explorer toutes les combinaisons possibles des niveaux des différents facteurs ou paramètres d'un procédé au sein d'une même expérience. Cette approche donne la possibilité d'évaluer les effets conjoints, notamment les interactions entre deux facteurs, en modifiant simultanément leurs niveaux.

Les plans factoriels présentent de nombreux avantages :

- Leur construction est simple, car chaque facteur ne prend que deux niveaux, ce qui facilite la mise en œuvre expérimentale.
- Les essais sont faciles à maîtriser, réduisant ainsi les risques d'erreur expérimentale.
- Le calcul des effets principaux et des interactions est aisé, ne nécessitant pas de logiciels statistiques complexes.
- Les résultats sont facilement interprétables, même par des expérimentateurs ne disposant pas de connaissances approfondies en statistiques.
- La modélisation mathématique initiale est directe, souvent sous forme de modèles linéaires.
- Les résultats obtenus peuvent être réutilisés, partiellement ou totalement, pour :

-Explorer d'autres régions du domaine expérimental ;

-Ou élaborer un modèle mathématique plus élaboré, incluant par exemple des termes quadratiques ou des interactions supplémentaires (Yahiaoui,2015).

Le seul point négatif de ces plans est qu'ils nécessitent rapidement un grand nombre d'essais. Par exemple, l'étude de seulement six facteurs demande 64 expériences (Yahiaoui,2015).

#### A. Plans factoriels complets à deux niveaux ( $2^k$ )

Ces plans sont les plus couramment utilisés en raison de leur simplicité et de leur rapidité de mise en œuvre. Ils sont désignés par la notation «  $2^k$  », où le chiffre 2 représente les deux niveaux (minimum et maximum) attribués à chaque facteur, et « k » correspond au nombre total de facteurs étudiés dans l'expérimentation (Figure II.4)

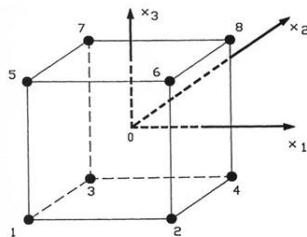


Figure II. 4 Disposition des points expérimentaux d'un plan  $2^3$ (Yahiaoui,2015).

### II.3.1.2. Plans factoriels fractionnaires

Pour cibler les facteurs les plus influents sur des caractéristiques critiques de qualité, les expérimentateurs ont souvent recours aux plans factoriels fractionnaires, qui réduisent le nombre d'essais tout en conservant la capacité à détecter les paramètres majeurs (Antony, 2023) (Figure II.5).

Comme Exemple : Vous souhaitez étudier 4 facteurs pouvant influencer la production d'acide hyaluronique par fermentation microbienne, Un plan factoriel complet demanderait  $2^4 = 16$  expériences, Mais si vous souhaitez réduire le nombre d'essais tout en conservant un maximum d'informations sur les effets principaux, vous pouvez utiliser un plan fractionnaire  $2^{4-1} = 8$  essais, On crée un demi-plan factoriel.

Ce plan permet d'estimer les effets principaux avec un certain degré de confusion contrôlé (aliasing), ce qui est acceptable pour un criblage initial.

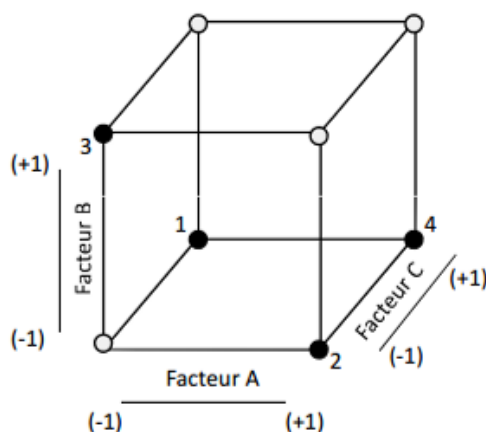


Figure II. 5 Plan factoriel fractionnaire  $2^{3-1}$  (Daas, 2020).

### II.3.1.3. Plans Plackett-Burman

Ces plans constituent une catégorie particulière de plans factoriels fractionnaires à deux niveaux, conçus pour analyser principalement les effets principaux en minimisant la prise en compte des interactions. Ils se caractérisent généralement par un nombre minimal d'essais

soigneusement choisis, souvent saturés, afin de maximiser l'information extraite avec un effort expérimental limité (Daas, 2020).

Par Exemple : Plan Plackett-Burman à 8 essais pour le criblage de 7 facteurs

Objectif : Identifier les facteurs significatifs influençant la production d'acide hyaluronique par *Streptococcus zooepidemicus*, Le plan Plackett-Burman permet de tester 7 facteurs avec seulement 8 expériences (au lieu de  $2^7 = 128$  si on utilisait un plan factoriel complet).

### II.3.2. Plans de surface de réponse (Response Surface Methodology, RSM)

Les plans de surface de réponse représentent une approche statistique visant à modéliser et optimiser un procédé influencé par plusieurs facteurs. Cette méthodologie permet d'établir une relation mathématique approximative, généralement via un modèle polynomial de second ordre, entre les variables indépendantes (facteurs) et les variables dépendantes (réponses) (Figure II.6) (Box *et al.*, 1992).

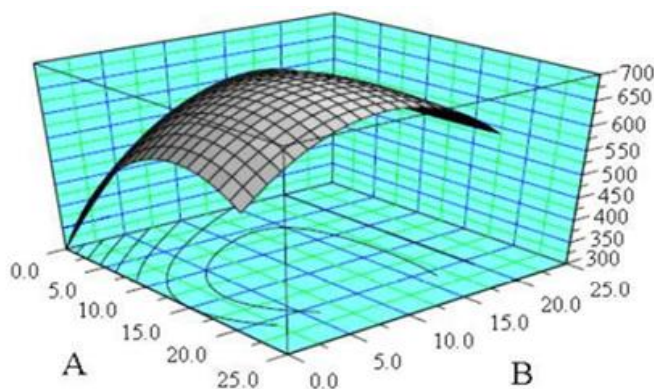


Figure II. 6.Surface de réponse (Dali et Allout, 2022).

#### II.3.2.1. Le plan composite centré (*Central Composite Design*, CCD)

En 1951, Box et Wilson ont introduit le plan composite centré comme une méthode expérimentale efficace pour ajuster des modèles de surface de réponse de second ordre. Ce plan permet de construire un modèle quadratique pour la variable de réponse sans nécessiter l'utilisation d'un plan factoriel complet à trois niveaux, ce qui en fait une approche plus économique et plus flexible (Gauchi, 2016). Le CCD est aujourd'hui considéré comme le plan de référence dans le cadre des plans d'expériences. Il permet de réaliser une exploration structurée de l'espace expérimental, en fournissant un ensemble d'expériences de dépistage capables de révéler les tendances globales du système étudié. Cette capacité de modélisation initiale facilite ensuite la mise en œuvre de stratégies plus ciblées et efficaces, telles que les plans optimaux de remplissage

d'espace (*Optimal Space-Filling Designs – OSFD*), qui permettent d'affiner la recherche des conditions optimales (Ugbe *et al.*, 2023).

La démarche séquentielle est constituée de trois parties (Figure II .7) :

A / Plan factoriel : repose sur la combinaison de plusieurs facteurs, chacun étudié à deux niveaux codés généralement  $-1$  (niveau bas) et  $+1$  (niveau haut).

Ce type de plan permet :

- D'analyser les effets d'interaction entre les facteurs étudiés ;
- De déterminer un modèle mathématique décrivant le comportement de la réponse en fonction des variables expérimentales (Yahiaoui,2015).

Le nombre d'essais du plan factoriel : ( $k$  : facteurs,  $2$  : niveaux ( $-1$  et  $+1$ ))  $N_F = 2^k$

B/ Plan en étoile : (aussi appelé plan axial) comporte deux expériences spécifiques par facteur, positionnées aux extrémités de l'axe de chaque variable. Ainsi, chaque facteur est évalué à cinq niveaux distincts, ce qui permet d'introduire des termes quadratiques dans le modèle et d'améliorer la précision de l'approximation de la surface de réponse.

Le nombre d'essais du plan en étoile :  $N_a = 2.k$  (Yahiaoui,2015).

C/ Les points au centre du domaine d'étude : On inclut systématiquement des points expérimentaux situés au centre du domaine d'étude (Dali et Allout, 2022).

Ils remplissent plusieurs fonctions essentielles :

- Vérifier la validité du modèle linéaire (de premier degré) ;
- Contrôler la stabilité entre différentes séries d'essais et détecter tout décalage éventuel ;
- Estimer l'erreur expérimentale ;
- Réduire l'erreur de prédiction à proximité du centre du domaine étudié (Yahiaoui,2015).

Le nombre d'essais au centre c'est :  $N_0$

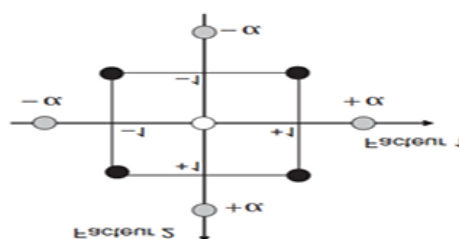


Figure II. 7. Plan composite centré (Dali et Allout, 2022).

### II.3.2.2. Plan Box-Behnken

Ce plan RSM se distingue par sa simplicité, nécessitant uniquement trois niveaux de facteurs pour conduire les expériences (Figure II .8). Il est notamment caractérisé par l'absence de points expérimentaux placés aux extrémités (sommets) de la région étudiée, ce qui peut réduire le coût expérimental tout en fournissant une bonne couverture du domaine (Daas, 2020).

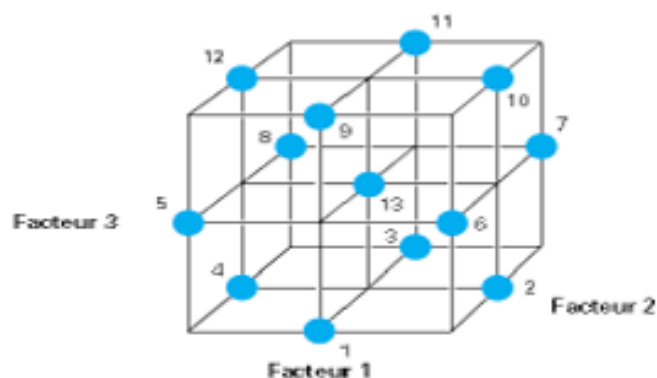


Figure II. 8. Plan de Box-Behnken pour trois facteurs (Dali et Allout, 2022).

### II.3.3. Plans de mélange

À l'instar des plans RSM, les plans de mélange visent à optimiser des systèmes où plusieurs composants sont combinés, mais se différencient par le fait que les facteurs (les proportions des composants) ne sont pas indépendants, étant soumis à des contraintes spécifiques telles que la somme des proportions égale à 100 % (Daas, 2020).

On distingue notamment plusieurs types : plans de mélange en réseau, plans centrés, ainsi que des plans contraints comme les plans aux sommets extrêmes, adaptés à des domaines expérimentaux limités.

## II.4. Applications des Plans Expérimentaux dans la Production Biotechnologique

L'optimisation des milieux de culture consiste à déterminer les concentrations idéales de carbone, d'azote, d'oligoéléments, ainsi que les conditions de pH et de température, afin de maximiser la croissance cellulaire ou la productivité (Elibol *et al.*, 2002). Parallèlement, l'optimisation des paramètres de fermentation s'appuie souvent sur la méthodologie de surface de réponse (RSM) pour ajuster des facteurs tels que la durée, l'agitation, l'aération et la température, dans le but d'améliorer les rendements de production.

Le criblage rapide des souches et des variables influentes peut être réalisé grâce aux plans de Plackett-Burman, qui permettent d'identifier efficacement les facteurs clés parmi un grand nombre

de paramètres. Enfin, l'optimisation de la production de biomolécules vise à accroître la synthèse d'enzymes, d'antibiotiques, de protéines recombinantes ou de métabolites secondaires par des micro-organismes, contribuant ainsi à une production biotechnologique plus performante et contrôlée.

### **II.5. Paramètres et niveaux de conception de composite centrale**

Dans le cadre d'une étude expérimentale par exemple : production d'enzymes, croissance microbienne, nous avons adopté la méthode du plan composite central (Central Composite Design, CCD), une composante reconnue de la Response Surface Methodology (RSM). Cette méthode permet d'évaluer de manière efficace les effets individuels et croisés de plusieurs facteurs, en réduisant le nombre d'expériences nécessaires tout en assurant une modélisation robuste.

Dans notre protocole, quatre facteurs clés ont été sélectionnés :

1. pH : niveaux explorés de 6,5 (bas) à 8,5 (haut), avec un niveau central à 7,5.
2. Température (°C) : intervalle de 31 °C à 39 °C, centre à 35 °C.
3. Agitation (rpm) : de 50 à 250 rpm, avec une valeur centrale fixée à 150 rpm.
4. Durée d'incubation (heures) : entre 6 h et 30 h, centre à 18 h.

Ces niveaux sont conformes aux pratiques classiques en CCD, qui utilisent cinq niveaux par facteur ( $-\alpha$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $+1$ ,  $+\alpha$ ), assurant ainsi une couverture complète des espaces de réponse.

Par exemple, une étude sur *Haemophilus influenzae* a employé un schéma similaire avec trois facteurs (température, pH, agitation), six points centraux et six extrémités, totalisant 20 tests pour modéliser précisément la croissance microbienne.

L'usage conjoint de la RSM et du CCD permet :

D'optimiser l'efficacité expérimentale (moins d'expériences pour plus d'informations), de détecter les effets principaux et interactions, d'ajuster un modèle quadratique fiable ( $2^{\text{e}}$  degré), de modéliser le système par une équation polynomiale de second ordre, et d'identifier des conditions optimales avec un bon degré de confiance (souvent  $R^2 > 0,9$ ).

Les différentes combinaisons de ces facteurs, issues du plan expérimental Central Composite Design, permettent d'étudier non seulement l'effet individuel de chaque paramètre sur la production d'acide hyaluronique, mais aussi leurs interactions potentielles. En effet, certains facteurs peuvent agir de manière synergique ou antagoniste, influençant de façon non linéaire le rendement global.

Fin de modéliser et d'optimiser le processus expérimental, un plan composite central (CCD) a été mis en œuvre, générant une matrice de 29 essais expérimentaux. Cette matrice comprend des combinaisons systématiques des niveaux des quatre facteurs sélectionnés précédemment.

Les essais 1 à 16 représentent les combinaisons factoriales à deux niveaux (-1 et +1), tandis que les essais 17 à 20 correspondent aux points axiaux ( $\alpha$ ), utilisés pour évaluer la courbure du modèle quadratique. Les expériences 21 à 29 sont des répétitions du point central (pH = 7,5 ; Température = 35 °C ; Agitation = 150 rpm ; Temps = 18 h), permettant d'estimer la pureté de l'erreur expérimentale et de valider la reproductibilité du modèle.

Chaque combinaison a été soigneusement choisie afin de permettre une estimation fiable des effets principaux, des interactions bilatérales ainsi que des termes quadratiques. Ce type de plan est reconnu pour son efficacité dans l'étude de systèmes complexes, notamment en biotechnologie ou en ingénierie biochimique (Myers *et al.*, 2016).

## **II.6. Approches alternatives au DOE pour améliorer la production microbienne d'acide hyaluronique**

Ces méthodes sont issues de la littérature scientifique et sont souvent utilisées seules ou en complément des plans d'expériences :

### 1. Les méthodes multicritères (en optimisation bioprocédés ou production microbienne)

La prise en compte de plusieurs critères dans un problème conduit généralement à l'identification d'un ensemble de solutions, communément appelées solutions optimales (Pantel *et al.*, 2006).

Exemple dans la production d'AH : Optimiser à la fois le rendement, la viscosité, la consommation de substrat, et la stabilité du produit.

- Méthode de desirability (fonction de désirabilité)

Elle transforme chaque critère en une fonction de "désirabilité" entre 0 (inacceptable) et 1 (optimal), puis on combine toutes les fonctions pour obtenir une solution globale.

Ex : Maximiser le rendement (objectif : >5 g/L)

Minimiser le coût du substrat → On cherche la combinaison la plus "désirable" (Derringer et Suich, 1980).

- TOPSIS (Technique for Order Preference by Similarity to Ideal Solution)

Méthode d'aide à la décision multicritère basée sur la distance d'une solution idéale. Utilisée parfois dans le choix des milieux de culture ou des souches (Sianaki, 2020).

## 2. L'optimisation par approche "One Factor At à Time" (OFAT) :

Consiste à modifier un seul paramètre à la fois (comme le pH, la température ...) tout en maintenant les autres constantes. Cette méthode offre l'avantage d'être simple à mettre en œuvre et permet une compréhension claire des effets individuels de chaque facteur sur le processus étudié. Cependant, son principal inconvénient réside dans le fait qu'elle ne prend pas en compte les éventuelles interactions entre les différents facteurs, ce qui peut conduire à des résultats sous-optimaux ou incomplets, notamment dans les systèmes complexes où ces interactions jouent un rôle significatif (Chen *et al.*, 2009).

3. La microfermentation : un méthode complémentaire aux plans d'expériences (DOE) comme le plan factoriel ou Box-Behnken, mais utilisée au tout début pour orienter le choix des conditions testées dans les plans d'expériences.

C'est une méthode expérimentale de criblage ("screening") très utilisée en :

Optimisation des milieux de culture, Sélection de souches à haut rendement, Evaluation de la tolérance à des inhibiteurs et Amélioration de la production de l'acide hyaluronique.

Elle permet donc de cribler un grand nombre de conditions expérimentales rapidement, avec peu de ressources (milieu, énergie, matériel).

## 4. Algorithmes évolutifs et intelligence artificielle :

a. Algorithme génétique (GA) : Inspiré de la sélection naturelle pour trouver les meilleures combinaisons de paramètres, Cette approche est particulièrement utile pour résoudre des problèmes complexes où les interactions entre facteurs sont importantes, permettant ainsi d'identifier des solutions optimales là où les méthodes traditionnelles, comme OFAT, échouent. Grâce à sa capacité à traiter un large espace de recherche, le GA est largement utilisé en biotechnologie pour optimiser les milieux de culture et améliorer les rendements de production.

Les algorithmes d'intelligence artificielle peuvent analyser de grands volumes de données issues des opérations de bioprocédés afin d'identifier des schémas et d'optimiser les paramètres du procédé (Ubaid *et al.*, 2023).

b. Réseaux de neurones artificiels (ANN) : est une série de régressions non linéaires interconnectées, ce qui lui confère une grande capacité d'ajustement (ou d'adaptation aux données). Une composante importante de la technologie de l'intelligence artificielle, qui constitue un outil utile pour résoudre des problèmes complexes.

Les modèles ANN a été utilisés pour simuler et calculer les nombreuses relations implicites dans le processus de fermentation (Huang *et al.*,2024).

➤ Les logiciels utilisés :

- MODDE "Modelling and Design of Experiments" ou JMP "John's Macintosh Project" : Plans d'expériences (DoE) et surfaces de réponse (RSM), Optimisation des paramètres (pH, température, nutriments).
- Python (SciKit-Learn, TensorFlow) Algorithmes d'IA (réseaux de neurones, Random Forest) pour prédire les rendements, Traitement des données NIR/Raman pour le contrôle en ligne.

#### 5. Analyse multivariée (PCA, PLS)

- PCA (Analyse en Composantes Principales) : pour identifier les variables les plus influentes.
- PLS (Partial Least Squares) : utilisé pour créer des modèles de prédiction.

#### 6. Biologie synthétique et ingénierie métabolique

- Modifier génétiquement les souches bactériennes (ex : *Streptococcus zooepidemicus*) pour augmenter la production via :

- CRISPR-Cas9 « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR associated protein 9 » : pour l'édition génomique (pour améliorer la biosynthèse de l'AH) (Schulte, 2018).

- Synthetic promoters : pour réguler l'expression des gènes.

➤ Les logiciels utilisés :

- OptFlux ou CellNetAnalyzer : Spécificité pour Identification des cibles génétiques pour augmenter la production d'HA (ex : surexprimer *hasA*), Simulation des knock-outs de gènes compétiteurs.
- Geneious (pour CRISPR-Cas9) : Utilité pour Conception de guides RNA pour l'édition génomique de souches productrices.

#### 7. Approches basées sur la qualité (QbD : Quality by Design)

- Analyse des risques (p.ex., HACCP « Hazard Analysis and Critical Control Points », AMDEC « Analyse des Modes de Défaillance, de leurs Effets et de leur Criticité ») : Cibler les paramètres critiques pour la qualité de l'acide hyaluronique.

#### 8. Modélisation Cinétique et Contrôle en Temps Réel (PAT)

- Contrôle en ligne (PAT – Process Analytical Technology) : Utiliser des capteurs (pH, viscosité, spectroscopie) pour ajuster les paramètres en temps réel.

La technologie analytique de procédé (PAT) et l'analyse de données jouent un rôle essentiel dans les bioprocédés, en améliorant l'efficacité, la fiabilité et la montée en échelle des opérations dans les industries des sciences de la vie et de la biotechnologie.

Le système PAT, instauré par la FDA en 2004, vise à favoriser la compréhension et le contrôle des procédés de fabrication grâce à des mesures réalisables des paramètres critiques du procédé (CPPs) et des indicateurs clés de performance (KPIs)(Ubaïd *et al.*,2023).

➤ Le logiciel utilisé :

SIMCA « Soft Independent Modeling of Class Analogy » (Sartorius) ou Unscrambler (CAMO) permet d'Analyse multivariée (PLS, PCA) des données spectroscopiques (NIR, Raman), Surveillance de la concentration et du poids moléculaire de l'AH.

- spectroscopie proche infrarouge (NIR)

Est une méthode analytique puissante pour le contrôle en ligne de la production d'acide hyaluronique (AH). Elle permet une surveillance en temps réel des paramètres critiques (concentration, poids moléculaire, pureté) sans interruption du procédé, et Résultats en quelques secondes. (Puvendran *et al.*,2018).

➤ Les logiciels utilisés :

- SuperPro Designer (Intelligen) qui permet la Modélisation des procédés de fermentation et purification de l'AH, Simulation des bilans de masse et d'énergie, Optimisation des coûts de production.
- COBRA « CONstraints-Based Reconstruction and Analysis » Toolbox (pour MATLAB) permet l'Ingénierie métabolique via des modèles de flux (FBA « Flux Balance Analysis »), Optimisation des voies de biosynthèse de l'AH chez *Streptococcus zooepidemicus* ou *Bacillus subtilis*.

# **Conclusion**

## Conclusion et perspectives

Ce mémoire met en évidence le rôle crucial de l'optimisation du milieu de culture dans la production biotechnologique de l'acide hyaluronique (AH), une molécule aux multiples applications dans les secteurs médical, pharmaceutique et cosmétique. À travers une revue bibliographique détaillée, nous avons approfondi la compréhension des caractéristiques physico-chimiques de l'AH, des mécanismes de sa biosynthèse ainsi que des nombreux paramètres influençant sa production par fermentation microbienne.

L'étude souligne particulièrement l'efficacité des plans d'expériences (DoE), notamment du Central Composite Design, comme outil statistique performant pour ajuster les conditions de culture. Cette approche permet d'identifier les paramètres essentiels (pH, température, agitation, temps d'incubation), d'évaluer leurs interactions complexes, et de construire un modèle prédictif fiable pour optimiser la production d'AH. Ces avancées contribuent non seulement à augmenter les rendements, mais aussi à réduire les coûts et à mieux maîtriser le fonctionnement du système biologique.

Cependant, ce travail reste essentiellement théorique et basé sur la littérature existante. Plusieurs pistes méritent d'être explorées pour approfondir cette démarche :

- ✓ La validation expérimentale du protocole d'optimisation proposé, afin de confronter les prévisions aux résultats en laboratoire.
- ✓ L'intégration de variables supplémentaires, telles que le taux d'aération, la composition spécifique du milieu (en incorporant par exemple des substrats agro-industriels alternatifs) ou l'ajout de précurseurs métaboliques.
- ✓ L'étude de souches microbiennes alternatives, qu'elles soient non pathogènes ou génétiquement modifiées (comme *Bacillus subtilis* ou des *Escherichia coli* recombinants), afin d'améliorer la sécurité, la pureté et les performances du processus.
- ✓ Le développement de systèmes automatisés combinant modélisation et contrôle en temps réel, en vue d'une production industrielle plus efficace et reproductible.
- ✓ Une évaluation technico-économique et environnementale, indispensable pour garantir la viabilité et la durabilité du procédé à grande échelle.

En résumé, ce travail fournit les bases d'une approche rigoureuse et méthodique pour optimiser la production d'acide hyaluronique, ouvrant la voie à des recherches expérimentales approfondies et à un fort potentiel d'innovation et de transfert industriel dans le domaine de la biotechnologie.

# **Références Bibliographiques**

## Références bibliographiques

Aissaoui, I. (2024). *Acide hyaluronique injectable : entre bienfaits et méfaits* (Doctoral dissertation).

Allalata, Q. (2023, June 1). L'impact de l'utilisation des plans d'expérience sur l'optimisation des résultats. <http://dspace.univ-guelma.dz/jspui/handle/123456789/14715>

Antony, J. (2023). *Design of experiments for engineers and scientists* (3rd ed.). Elsevier.

Armstrong, D. C., Cooney, M. J., & Johns, M. R. (1997). Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47(3), 309–312. <https://doi.org/10.1007/s002530050932>

Badri, A., Raman, K., & Jayaraman, G. (2019). Uncovering Novel Pathways for Enhancing Hyaluronan Synthesis in Recombinant *Lactococcus lactis*: Genome-Scale Metabolic Modeling and Experimental Validation. *Processes*, 7(6), 343. <https://doi.org/10.3390/pr7060343>

Belfegas Houda, D. A. (2020). *Protection de l'acier contre les effets de salinité Cl* (Doctoral dissertation, Faculté des Sciences et Technologies).

Belkadi, T., & Makked, L. (2016). *Traitement des margines d'olives par co-précipitation en utilisant les plans d'expériences* (Doctoral dissertation, UMMTO).

Boeriu, C. G., Springer, J., Kooy, F. K., & van den Broek, L. A. M. (2013). Production methods for hyaluronan. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2013, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2013/624967>

Box, G. E. P., & Wilson, K. B. (1992). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. In Springer series in statistics (pp. 270–310). [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4380-9\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4380-9_23)

Chong, B. F., Blank, L. M., McLaughlin, R., & Nielsen, L. K. (2004). Microbial hyaluronic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(4), 341–351. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1774-4>

Chong, B. F., Blank, L. M., McLaughlin, R., & Nielsen, L. K. (2021). Microbial hyaluronic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(18), 7765–7776. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11466-3>

DAAS, M. S. Plans d'expériences. *Univ. Frères Mentouri-Constantine, 1*, 1-26.

DALI Ahlam, A. A. (2022). Modélisation numérique et optimisation par la méthode des surfaces de réponses des murs en terre armée.

Derringer, G., & Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of quality technology*, 12(4), 214-219.

Elibol, M., & Ozer, D. (2002). Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry*, 38(3), 367–372.

[https://doi.org/10.1016/s0032-9592\(02\)00076-6](https://doi.org/10.1016/s0032-9592(02)00076-6)

Fallacara, A., Baldini, E., Manfredini, S., & Vertuani, S. (2018). Hyaluronic acid in the third millennium. *Polymers*, 10(7), 701. <https://doi.org/10.3390/polym10070701>

Ferreira, R. G., Azzoni, A. R., Santana, M. H. A., & Petrides, D. (2021). Techno-Economic analysis of a hyaluronic acid production process utilizing streptococcal fermentation. *Processes*, 9(2), 241. <https://doi.org/10.3390/pr9020241>

Gall, Y. (2010). Acide hyaluronique : structure, métabolisme et implication dans la cicatrisation. *Annales De Dermatologie Et De Vénérologie*, 137, S30–S39. [https://doi.org/10.1016/s0151-9638\(10\)70007-7](https://doi.org/10.1016/s0151-9638(10)70007-7)

Gauchi, J. P. (2016). Introduction à la méthode des plans d'expériences.

Huang, J. C., Guo, Q., Li, X. H., & Shi, T. Q. (2024). A comprehensive review on the application of neural network model in microbial fermentation. *Bioresource Technology*, 131801.

Idris, Y. (2015). Les plans d'expériences initiation à la construction et à l'analyse des plans factoriels complets à deux niveaux et du plan composite centré. *Notes de Cours, Département de Génie des Procédés, Faculté de Techno-logie, Université A. MIRA-Bejaia*.

Jiang, D., Liang, J., & Noble, P. W. (2021). Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 531–556. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005><sup>2</sup>

Koscher, E. (2023). Intérêts de l'acide hyaluronique au cabinet dentaire. <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-04517014v1>

Lai, Z., Rahim, R. A., Ariff, A. B., & Mohamad, R. (2016). COMPARISON OF HYALURONIC ACID BIOSYNTHESIS BY THE RECOMBINANT *Escherichia coli* STRAINS IN DIFFERENT MODE OF BIOREACTOR OPERATION. *Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences*, 6(3), 905–910.

Liu, L., Liu, Y., Li, J., Du, G., & Chen, J. (2011). Microbial production of hyaluronic acid: Current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories*, 10, 99. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-99>

Liu, X. W., Wang, H. H., Chen, J. Y., Li, X. T., & Chen, G. Q. (2009). Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by recombinant *Escherichia coli* harboring propionyl-CoA synthase gene (prpE) or propionate permease gene (prpP). *Biochemical engineering journal*, 43(1), 72-77. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.09.001>

Montgomery, D. C. (2017). *Design and analysis of experiments*. John Wiley & Sons.

Paiva, W. K. V. (2019). Produção, caracterização e avaliação da atividade antioxidante in vitro do ácido hialurônico produzido por *Streptococcus zooepidemicus* CCT 7546. [https://www.oasisbr.ibict.br/vufind/Record/UFRN\\_46b3d006510fc0922618d7313f10da98](https://www.oasisbr.ibict.br/vufind/Record/UFRN_46b3d006510fc0922618d7313f10da98)

Pan, N. C., Pereira, H. C. B., De Lourdes Corradi Da Silva, M., Vasconcelos, A. F. D., & Celligoi, M. A. P. C. (2016). Improvement production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* in sugarcane molasses. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182(1), 276–293. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2326-y>

PANTEL, M. C. A., Ivan, M., FOURNIER, M. F., & RONDAGS, M. E. (2006). Méthodologie pour l'optimisation dynamique multicritère d'un procédé discontinu alimenté : application à la production bactérienne d'arômes laitiers (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Lorraine).

Patil, K. P., Kamble, S. P., & Jadhav, J. P. (2023). Advances in microbial production of hyaluronic acid: Challenges and prospects. *Biotechnology Advances*, 63, 108049. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108049>

Poinsot, M. (2011). L'acide hyaluronique : Production microbiologique et applications. *Sciences pharmaceutiques*.

Puvendran, K., Anupama, K., & Jayaraman, G. (2018). Real-time monitoring of hyaluronic acid fermentation by in situ transfectance spectroscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 2659-2669.

R. BCHITOU « Chimiométrie » Cours de Master Chimie, université Mohammed V-Agdal, RABAT. Disponibles sur : <http://www.fsr.ac.ma/DOC/cours/chimie/bchitou/Cours%20chimiomtrie%20COMPLET%20SA.pdf> consulté le 30/03/2023.

Rousselle, P., Montmasson, M., & Garnier, C. (2019). Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization. *Matrix Biology*, 75, 12-26. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.002>

Schulte, S. (2018). *Metabolic engineering of microbial hosts for the biosynthesis of high molecular weight hyaluronan* (Doctoral dissertation, Dissertation, RWTH Aachen University, 2018). <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.07.008>

Serra, M., Casas, A., Toubarro, D., Barros, A. N., & Teixeira, J. A. (2023c). Microbial Hyaluronic Acid Production: A review. *Molecules*, 28(5), 2084. <https://doi.org/10.3390/molecules28052084>

Sianaki, O. A. (2020). TOPSIS: Technique for order preference by similarity to ideal solution. Retrieved from Maths Works File Exchange: <https://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/57143-topsis-technique-for-order-preference-by-similarity-to-ideal-solution>.

Tavianatou, A. G., Caon, I., Franchi, M., Piperigkou, Z., Galesso, D., & Karamanos, N. K. (2019). Hyaluronan: molecular size-dependent signaling and biological functions in inflammation and cancer. *FEBS Journal*, 286(15), 2883–2908. <https://doi.org/10.1111/febs.14777>

Ubaid, A., Ali, A., Lakshmi, S., Kamthan, M., & Abid, M. Emerging trends and innovations in bioprocessing techniques.

Ugbe, T. A., Akpan, P., Ofonodo, R., & Bassey, E. (2023). On Evaluation of Three Basic Properties of Central Composite Design. *Asian Journal Of Probability And Statistics*, 23(1), 1-15. <https://doi.org/10.9734/ajpas/2023/v23i1493>

Vázquez, J., Rodríguez-Amado, I., Montemayor, M., Fraguas, J., González, M., & Murado, M. (2013). Chondroitin sulfate, hyaluronic acid and Chitin/Chitosan production using Marine waste sources: Characteristics, applications and Eco-Friendly Processes: A review. *Marine Drugs*, 11(3), 747–774. <https://doi.org/10.3390/md11030747>

Westbrook, A. W., Ren, X., Moo-Young, M., & Chou, C. P. (2017c). Engineering of cell membrane to enhance heterologous production of hyaluronic acid in *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(1), 216–231. <https://doi.org/10.1002/bit.26459>

Woo, J. E., Seong, H. J., Lee, S. Y., & Jang, Y. (2019). Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for the Production of Hyaluronic Acid From Glucose and Galactose. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00351>

Wu, Y., Zhao, S., Wang, J., Chen, Y., Li, H., Li, J. P., ... & Zhang, T. (2024). Methods for determining the structure and physicochemical properties of hyaluronic acid and its derivatives: a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137603. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.137603>

Yu, H., Stephanopoulos, G., & Metallo, C. M. (2021). Engineered biosynthesis of hyaluronic acid in non-pathogenic microbial hosts. *Metabolic Engineering*, *63*, 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.11.001>