REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En Sciences de la nature et de la vie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

Guessaymi Ahlem **Zerarka Wafaa**

Aoufi Chaimaa

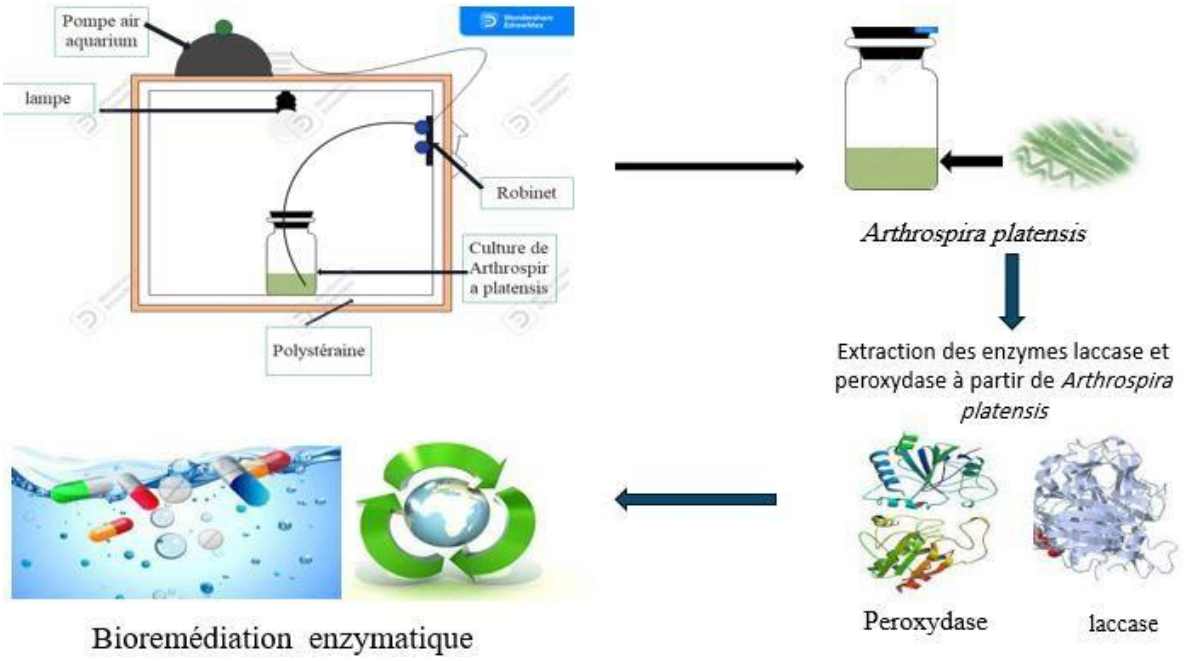
Thème

Valorisation et optimisation de biocatalyseurs enzymatiques de sources microbiens pour le traitement d'eaux polluées par des contaminants organiques en trace

Soutenu le 24/06/2023, devant le jury composé de :

***Président* :**	***Mme.* Kirdi Rachida**	***MCB***	***Université de Médéa***
***Examinatrice* :**	***Mme* .Cherifi Hakima**	***Pr***	***Université de Médéa***
Examinatrice :	***Mme.* Yous Radia**	***MCA***	***Université de Médéa***
***Encadreur* :**	***M.* Azizi Ahmed**	***MCA***	***Université de Laghouat***
***Co-encadreur* :**	***M.* Ainas Mahfoud**	***MCB***	***Université de Médéa***
***Invité* :**	***M.* Latreche sofiane**	***Doctorant***	***Université de Laghouat***

Année Universitaire : 2022/2023.



Bioremédiation enzymatique des polluants émergents par des enzymes extraits à partir de *Arthrospira platensis*

Valorisation et optimisation de biocatalyseurs enzymatiques de sources microbiens pour le traitement d'eaux polluées par des contaminants organiques en trace

RESUME.Ce travail vise à évaluer la bioremédiation des polluants émergents pharmaceutiques par les enzymes peroxydase et laccase extrait et purifiée à partir de la biomasse algale *Arthrospira platensis*.

La neutralisation de ces contaminants, une technique très prometteuse et efficace qui est simple et peu coûteuse se reflète dans le traitement biologique de ces effluents. Cette méthode d'élimination qui est la biodégradation consiste à utiliser les enzymes laccase et peroxydase d'*Arthrospira platensis* qui ont la capacité de dégrader le polluant et donc de le métaboliser en substances non toxiques grâce à des réactions biochimiques,en utilisant l'enzyme peroxydase et laccase traitée avec de l'acétone.

Les résultats de l'activité enzymatique étaient $AE_{Laccase\ Brut}$=0.0413UI/ml ; $AE_{laccase\ partiellement\ purifier}$=0.0308UI/ml $AE_{Peroxydase\ Brute}$ =0.0067UI/ml et $AE_{Peroxydase\ partiellement\ purifier}$ =0.0055 UI/ml avec un rendement de bioremédiation des polluants émergents (diclofénac, sulfaméthaxazole, ampicilline, Ibuprofène, Amoxicilline, pénicilline) a été satisfaisant montre la capacité de l'élimination de ces dernier. Dans ce contexte on distingue pourcentage de dégradation maximale avec $laccase_{Brut}$ pour sulfaméthaxazole (84.11%) ; $Laccase_{(partiellement\ purifier)}$ pour le Diclofénac (56.40%) et $peroxydase_{(Brut)}$ pour Amoxicilline (70.29%) ; $Laccase_{(partiellement)}$ pour Amoxicilline (76.54%).

Mots clés *:* Polluants émergents pharmaceutiques ; Bioremédiation enzymatique ; *Arthrospira platensis* ; Laccase ; Peroxydase.

Valorization and optimization of enzymatic biocatalysts from microbial sources for the treatment of water polluted by trace organic contaminants

ABSTRACT.This work aims to evaluate the bioremediation of emerging pharmaceutical pollutants by peroxidase and laccase enzymes extracted and purified from algal biomass *Arthrospira platensis*.

To neutralize these contaminants, a very promising and effective technique that is simple and inexpensive is reflected in the biological treatment of these effluents. This disposal method which is biodegradation consists in using the laccase and peroxidase enzymes of *Arthrospira platensis* which have the capacity to degrade the pollutant and therefore to metabolize it into non-toxic substances thanks to reactions biochemicals.

Using peroxidase and laccase enzyme treated with acetone. The enzyme activity results were AE $_{\text{Laccase (EEB)}}$ = 0.0413IU /mL; AE $_{\text{laccase (EEPP)}}$ =0.0308IU/ml; AE $_{\text{Peroxidase (EEB)}}$ = 0.0067IU/ml and AE $_{\text{Peroxidase (EEPP)}=}$ 0.0055 IU/ml ml with a bioremediation yield of emerging pollutants (diclofénac, sulfamethoxazole, ampicillin, Ibuprofen, amoxicillin, penicillin) was satisfying shows the capacity for the elimination of the latter. In this context, we distinguish percentage of maximum degradation with laccase (**EEB**) for sulfamethoxazole (84.11%); Laccase (**EEPP**) for Diclofénac (56.40%) and peroxidase (**EEB**) for amoxicillin (70.29%); Laccase (**EEPP**) for amoxicillin (76.54%).

Keywords*:* Emerging pollutants; Enzymatic bioremediation; *Arthrospira platensis*; Laccase; Peroxidase.

تثمين وتحسين المحفزات الحيوية الأنزيمية من المصادر الدقيقة لمعالجة المياه الملوثة بالملوثات العضوية الصيدالانية

ملخص .يهدف هذا العمل إلى تقييم المعالجة الحيوية للملوثات الصيدلانية عن طريق إنزيمات البيروكسيداز واللاكاز المستخرجة والمنقّاة من الكتلة الحيوية الطحلبية أرثروسبيرا بلاتنسيس.

لتحييد هذه الملوثات ، وهي تقنية واعدة للغاية وفعالة وبسيطة وغير مكلفة تنعكس في المعالجة البيولوجية لهذه النفايات . طريقة التخلص هذه هي التحلل البيولوجي يتكون من استخدام إنزيمات اللاكاز والبيروكسيداز *المستخرج من أرثروسبيرا بلاتنسيس* والتي لها القدرة على تحلل الملوثات وبالتالي تحويلها إلى مواد غير سامة بفضل التفاعلات كيماويات حيوية.

في هذه الدراسة تم استخدام إنزيم البيروكسيداز واللاكاز المعالج بالأسيتون. كانت نتائج نشاط الإنزيم اللاكاز الحر(0.0413 وحدة دولية / مل) ؛ اللاكاز(0.0308 وحدة دولية / مل) ؛ البيروكسيداز الحر(0.0067 وحدة دولية / مل)و البيروكسيداز(0.0055 وحدة دولية / مل) وكان ناتج المعالجة الحيوية للملوثات (ديلفوفيناك ، سلفاميثاكسازول ، أمبيسلين ، إيبوبروفين ، أموكسيسيلين ، بنسلين) مرضية, يُظهر القدرة على التخلص من هالأخير . في هذا السياق ، نميز النسبة المئوية للتحلل الأقصى باستخدام اللاكازالحرمع السلفاميثاكسازول (84.11٪) واللاكاز مع الديكلوفيناك (56.40٪) البيروكسيداز الحر مع الأموكسيسيلين (70.29٪) ؛ البيروكسيداز مع الأموكسيسيلين (76.54٪).

الكلمات المفتاحية: الملوثات العضوية الصيدلانية , المعالجة الحيوية الأنزيمية, *أرثروسبيرا بلاتنسيس, اللاكاز, البيروكسيداز.*

Remerciements

Avant tout, nous remercions "Allah" tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la force pour accomplir ce modeste travail Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous adressons nos plus vifs remerciements à notre promoteur ***Ahmed AZIZI (MCA).****, pour nous avoir proposé ce thème, pour ses conseils judicieux et son suivi assidu durant la période de la réalisation de ce travail malgré ses charges Professionnelles Trouver ici monsieur l'expression de nos sincères reconnaissances.*

Nous tenons également à remercier ***Mahfoud AINAS (MCB).,*** *d'avoir accepté de nous Co-encadrer, ainsi que pour l'aide et la collaboration compétente qu'il nous a apportées, pour son encouragement, sa contribution, ses Conseils et l'intérêt porté pour notre sujet.*

Nous Sommes particulièrement honorés et reconnaissants à ***M^me^ Kirdi Rachida (MCB),*** *d'avoir accepté de juger notre travail en tant que président ; Ainsi que à* ***M^me^ Cherifi Hakima (Pr) et M^me^ Yous Radia (MCA),*** *de bien vouloir évaluer et examiner ce mémoire. Veuillez trouver ici le témoignage de nos sincères gratitudes.*

Nos reconnaissances sincères pour l'aide, l'accueil et la sympathie du personnel technique du laboratoire pédagogique de biologie (LPB).

À tous les enseignants qui n'ont jamais hésité de nous orienter, aider et conseiller, notamment à ***LATRECHE Sofiane****.*

Nos très spéciaux remerciements reviennent à nos familles et à nos amies pour leurs encouragements et leur compréhension.

Finalement, nos remerciements s'adressent à tous ceux ou celles qui ont contribué du près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

À vous tous, un grand Merci.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

En avant, à Allah qui tout Puissant, qui m'a donné la force, la santé et le courage pour réaliser ce travail.

Je dédie ce travail à mes chers parents qui ont toujours été présents pour me soutenir, veiller à mon éducation et m'encourager à bien travailler dans tous ce que j'entreprends et plus particulièrement dans mes études.

A mon très cher frère « Mohamed »merci infiniment pour ton soutien pour ta confiance merci d'être toujours à mes côté ta valeur est inestimable.

A tous les membres de ma famille Guessaymi et Bouchabaa pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire.

A tous mes amis, mes camarades de la Microbiologie Appliquée promotion 2023. A tous ce qui ont collaboré à ce travail de près ou de loin. Que Dieu vous gardes et vous protèges.

Et À mon trinomes Wafaa et Chaima

Et à tous ceux qui sont dans mon cœur.

Ahlem

Dédicaces

Avec l'aide d'Allah "اللـــــــــــــــــــــــــــــــــــه".

J'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

À mes très chers parents,

À mes très chers frères **Mohamed** et **Abdel Raouf** et ma petit sœur **Douaa**.

À ma Belle-famille ZERARKA et à la famille YEZLI

À tous mes amis

À mes trinômes Ahlem et Chaimaa et a toute sa famille

À tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail

Wafaa

Dédicaces

Avant tout je remercie mon dieu qui m'a donné tout courage et la volonté de Terminer ce travail modeste.

Je voudrais voyager avec à respect et magnifique mes parents

M'ont protégés et soutenus depuis mon premier cri de vie et m'aider pour Réaliser mon rêve, que dieu les protège et leur prête santé et longue vie.

À mon cher père : qui m'a encouragé toutes longues de mes études.

À mon cher Mama : Qui m'a toujours protégé par ses prières et m'a embrassé dans ma faiblesse.

À mes chères princesses, mes sœurs : Nour, Hadjer, Zola et Takoua.

À mes chers amis : Malika, Souhila, Imane, Raihane, Zahra, Manal, Zala ،Souad, chafika,

À mon cher Youcef : Merci d'être toujours à mes côtés.

Une spéciale dédicace à toute ma belle-famille A toute la famille

« AOUFI » et«KHATTAR»

Et tous qui m'ont aidé à compléter ce travail.

En fin je remercie mon trinôme Ahlame et Wafaa

CHAIMAA

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIÈRES	*I*
ABRÉVIATIONS & NOMENCLAUTRES	*Iv*
LISTE DES FIGURES	*Xi*
LISTE DES TABLEAUX	*xiii*
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
RÉFÉRENCES DE L'INTRODUCTION	3
1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUES	4
1.1. Polluants émergents	4
1.1.1. Concept des polluants émergents	4
1.1.2. Types des polluants émergents	5
1.1.3. Voies d'entrée et rémanence dans l'environnement	6
1.1.3.1. Les sources ponctuelles	6
1.1.3.2. Les sources diffuses	6
1.1.4. Impact des PEs sur les êtres vivants et l'environnement	7
1.1.4.1. Effets potentiels sur la faune et la flore	7
1.1.4.2. Effets potentiels sur l'homme	7
1.1.5. Les produits pharmaceutiques dans l'environnement	7
1.1.5.1. Pollution par les composés pharmaceutiques	9
1.1.5.2. Eaux usées d'industrie pharmaceutiques	9
1.1.6. Procédés d'élimination des polluants émergents dans les eaux usées	9
1.1.6.1. Adsorption	11
1.1.6.2. Filtration membranaire	12
1.1.6.3. Coagulation et floculation	12
1.1.6.4. Procédés d'oxydation avancés	12
1.1.6.5. Bioréacteur à membrane	13
1.1.6.6. Boues activées conventionnelles	13
1.2. Potentialité de Bioremédiation	14
1.2.1. Bioremédiation	14
1.2.2. Méthodes de Bioremédiation	15
1.2.3. Types de bioremédiation	15
1.2.3.1. Phytoremédiation	16
1.2.3.2. Mycoremédiation	16
1.2.3.3. Bioremédiation par les Microorganisme	16
1.2.3.4. Phyocremédiation	16
1.2.4. Bioremédiation des contaminants émergents	17

1.2.5. Potentialité de *Arthrospira platensis* dans la bioremédiation des PEs	18
1.2.5.1. Spiruline	18
1.2.5.2. *Arthrospira Platensis*	18
1.2.5.3. Morphologie	19
1.2.5.4. Taxonomie	20
1.2.5.5. Cycle Biologique	21
1.2.5.6. Composition chimique	22
1.2.6. Les facteurs influencent la croissance de *Arthrospira platensis*	22
1.2.6.1. Température	22
1.2.6.2. La qualité de l'eau	22
1.2.6.3. Ondes Lumineuses	23
1.2.6.4. Ph	23
1.2.6.5. Nutriment	23
1.2.7. Utilisation de spiruline	24
1.2.7.1. Utilisation thérapeutique	24
1.2.7.2. Utilisation nutritionnel	24
1.2.7.3. Utilisation biotechnologie	25
1.2.8. Utilisation de la spiruline comme objet modèle dans la bioremédiation	25
1.3. Traitement enzymatique des polluants émergents	26
1.3.1. Biorémediation enzymatique	26
1.3.2. L'avantage de l'utilisation de la biorémédiation enzymatique	26
1.3.3. Facteurs affectant la dégradation enzymatique	27
1.3.3.1. Température	27
1.3.3.2. pH	28
1.3.3.3. Concentration enzymatique	28
1.3.3.4. Biodisponibilité des polluants	28
1.3.3.5. L'Agitation	28
1.3.4. Utilisation des enzymes de spiruline dans la bioremediation	29
1.3.4.1. Super Oxyde Dismutase (SOD)	29
1.3.4.2. Lipase	29
1.3.4.3. Laccase	30
1.3.4.4. L'Asparaginase	30
1.3.4.5. Peroxydase	31
1.3.4.6. Protéases	31
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	32
2. PRODUITS, MATERIELS & METHODES	36
2.1. Matériel	36
2.1.1. Produits	37
2.1.2. L'appareillage	37
2.2. Méthodes	37

2.2.1..Organisme et conditions de culture	37
2.2.1.1. Dispositif expérimentale de culture de la biomasse algale	37
2.2.1.2. Préparation du milieu de culture	38
2.2.2.Vérification de la culture d'*Arthrospira platensis*	39
2.2.2.1. Suivi morphologique par microscopique optique	39
2.2.2.2. Suivi analytique par spectroscopie UV-Vis	40
2.2.3. Schéma de production de laccase et peroxydase par spiruline	40
2.2.3.1.Induction de l'activité de peroxydase	40
2.2.3.2. Induction de l'activité laccase	40
2.2.3.Extraction et Purification partielle	41
2.2.3.1. Extraction de la peroxydase	41
2.2.4.2. Extraction de laccase	42
2.2.4. Dosage de l'activité enzymatique	42
2.2.4.1. Dosage pour peroxydase	42
2.2.4.2. Dosage pour laccase	44
2.2.5. Dosage de protéines totales par la méthode de Bradford	45
2.2.5.1. Préparation du réactifs de Bradford	45
2.2.5.2. Dosage des protéines	45
2.2.5.3.Préparation de la courbe d'étalonnage	45
2.2.6. Détermination de biomasse	45
2.2.7. Dégradation *in vitro* des PEs par les enzymes de la spiruline	46
2.2.7.1. Laccase	46
2.2.7.2. Peroxydase	47
RÉFÉRENCES DE MATERIELS ET METHODES	48
3. RESULTATS & DISCUSSION	49
3.1. Vérification de la culture d'*Arthrospira platensis*	49
3.1.1. Suivi morphologique par microscopique optique	49
3.1.2. Suivi analytique par spectroscopie UV-Vis	50
3.2. Schéma de production de laccase et peroxydase par *Arthrospira platensis*	50
3.2.1. Peroxydase	50
3.2.2. Laccase	51

3.3. Mesure de l'activité de peroxydase et de laccase	51
3.3.1. Peroxydase	51
3.3.2. Laccase	54
3.4. Dosage des protéines	57
3.5. Détermination de Biomasse	57
3.5.1. Biomasse sans gaïacol	57
3.5.2. Biomasse avec gaïacol	58
3.6. Dégradation des polluants émergents par Laccase	59
3.6.1. Dégradation des polluants émergents par EEB	59
3.6.2. Dégradation des polluants émergents par EEPP	59
3.7. Dégradation des Polluants émergents par peroxydase	61
3.7.1. Dégradation des Polluants émergents par EEB	61
3.7.2. Dégradation des PEs par EEPP	61
RÉFÉRENCES DE RESULTA ET DISCUSION	62
CONCLUSION GENERALE	63
ANNEXES	

LISTE DES ABREVIATIONS & NOMENCLATURES

Abréviation	***Signification***
A	Absorbance
AE	Activité Enzymatique
DO	Densité Optique
E	Enzyme
EEB	Extrait Enzymatique Brut
EEPP	Extrait Enzymatique Partiellement Purifié
P	Produit
PEs	Polluants émergents
Pod	Peroxydase
R	Rendement
UV	Rayonnement Ultraviolet
ABTS	L'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
Ps	Poid sec

Nomenclature et Symboles

Lecture	***Désignation***	***Unité***
[ ]	Concentration molaire ou massique	*(mol L^{-1})* ou *(mg L^{-1})*
[ ]$_0$	Concentration initiale molaire ou massique	*(mol L^{-1})* ou *(mg L^{-1})*
AE	Activité Enzymatique	*(U L^{-1})*
A_f	Absorbance finale de solution aqueuse	*(-)*
A_i	Absorbance initiale de solution aqueuse	*(-)*
E	Enzyme	*(-)*
P	Produit	*(-)*
PH	Potentiel d'Hydrogène	*(-)*
R	Rendement de dégradation	*(%)*
Rpm	Rotation par minute	*(tr mn^{-1})*
S	Substrat	*(-)*
T	Température	*(°C)*

Lettres Grecques

Lecture	**Désignation**	**Unité**
$\mathcal{E}$	Coefficient d'extinction molaire	*(Lmol^{-1})*
λ	Longueur d'onde	*(nm)*

Indices

Lecture	**Désignation**
0	Initiale
F	Final
I	Initial
M	Michaelis
Max	Maximal
Opt	Optimal
T	Totale

LISTE DES FIGURES

Numéros	Titres des figures	Pages
1.1	Représentation conceptuelle de l'origine des polluants émergents (EP) et leur cheminement vers l'environnement	4
1.2	Diverses méthodes de traitement pour éliminer les contaminants émergents et leur utilisation finale	11
1.3	Schéma général des stratégies de bioremédiation impliquant différents taxons microbiens	14
1.4	Classification de la bioremédiation basée sur le transport et l'élimination des déchet	15
1.5	Phytoremédiation des eaux usée	17
1.6	*Arthrospira platensis* vue au microscope optique	19
1.7	Les différents aspects de la spiruline. (A) spiralée, (B) ondulée, (C) droite	20
1.8	Cycle biologique d'*Arthrospira platensis*	21
1.9	Composition chimique de la spiruline	22
1.10	Bioremediation enzymatique	26
1.11	Illustration schématique des sources potentielles de contaminants de l'eau et de leur bioremédiation par les laccases	27
2.1	*Arthrospira platensis* fournie en culture	36
2.2	Culture de la spiruline dans les conditions expérimentales	38
2.3	Montage expérimentale de production de laccase par spiruline	40
2.4	Préparation de l'extrait enzymatique de la peroxydase de Arthrospira Platensis	41
2.5	Préparation de l'extrait enzymatique de la laccase de *Arthrospira Platensis*	42
3.1	Observation microscopique d'*Arthrospira platensis* (×10)	49
3.2	Observation microscopique d'*Arthrospira platensis* (×100)	49
3.3	Développement de l'absorbance en absence de gaïacol et glucose en fonction temps	50
3.4	Développement de l'Absorbance de la biomasse en présence de gaïacol et glucose en fonction de temps	51
3.5	Activité enzymatique EEB de peroxydase	52
3.6	L'activité enzymatique EEPP de peroxydase	52
3.7	Développement de la couleur de l'activité enzymatique de peroxydase	53
3.8.	Activité enzymatique pour EEB de laccase	54
3.9.	Activité enzymatique pour EEPPde laccase	55
3.10.	Développement de la couleur de l'activité enzymatique de la laccase	55
3.11.	Développement de la couler de l'activité enzymatique de l'EEB de laccase	56
3.12.	Courbe d'étalonnage de l'albumine, avec une pente égale=0,001 Lmg^{-1}	57

3.13.	Développement de poids sec en absence de gaïacol	58
3.14.	Développement de poids sec en présence de gaïacol	58
3.15.	Résultats de rendement de dégradation des 6 PEs par EEB de peroxydase	59
3.16.	Résultats de rendement de dégradation des 6 PEs par EEPP de peroxydase	60
3.17.	Rendement de dégradation des PEs par L'EEB de laccase	61
3.18.	Rendement de dégradation des PEs par L'EEPP da laccase	62

LISTE DES TABLEAUX

Numéros	Titre des tableaux	Pages
1.1	Classe de polluants émergents	5
1.2	Composés pharmaceutiques abondants dans l'environnement	8
1.3	Avantages et inconvénients des différentes technologies dans l'élimination de micropolluants pharmaceutiques dans les eaux usées	10
1.4	Taxonomie d'*Arthrospira Platensis*	20
2.1	Composition chimique du milieu Zarrouk	38
2.2	Composition chimique de la solution A5	39
2.3	Composition chimique de la solution B6	39
3.1	Développement d'Absorbance de *Arthrospira platensis* à618	50
3.2	Caractéristiques des solutions enzymatiques de l'EEB et de l'EEPP de la peroxydase	53
3.3	Caractéristiques des solutions enzymatiques de l'EEB et de l'EEPP de la laccase	56

INTRODUCTION

GENERALE

Les polluants émergents (PE) posent un nouveau défi majeur aux scientifiques qui ont une vision négative de l'ensemble de l'environnement, y compris l'eau, le sol et l'air (Kumar Vineet et *al.*, 2022). Ce problème a un impact accru sur la santé humaine et sur l'environnement d'une manière générale. Un nombre important de polluants ont été détectés dans l'environnement à des concentrations de traces, parmi ces substances les médicaments sont les plus rencontrés. Différentes sources d'émission de ces polluants sont identifiées (yassine El Maataoui, 2020).

Diverses méthodes physicochimiques, telles que l'adsorption, l'oxydation chimique, la précipitation, la coagulation, la filtration, l'électrolyse, la photodégradation pour l'assainissement des eaux usées, mais les principaux inconvénients de ces méthodes sont le coût élevé, la faible efficacité, la polyvalence limitée et la gestion des déchets générés. Les méthodes biologiques sont généralement considérées comme respectueux de l'environnement car ils peuvent conduire à une minéralisation complète des polluants organiques à faible coût (Pandey et *al.*, 2007).

L'utilisation de microorganismes pour l'élimination des polluants émergents issus des effluents industriels offre des avantages considérables ; le processus est relativement peu coûteux, les coûts de fonctionnement sont faibles et les produits finaux de la minéralisation complète ne sont pas toxiques (Forgacs et *al*., 2004). Divers microorganismes tels que les champignons, les levures, les bactéries, les algues et leurs enzymes ont été utilisés pour dégrader différents polluants émergents dans certaines conditions environnementales (Forgacs et *al*., 2004 ; Olukanni et *al*., 2006). Les cyanobactéries (algues bleu-vert) sont omniprésentes dans la nature et ont une capacité énorme dans le traitement des effluents industriels et des eaux usées (Acuner et Dilek, 2004). *Spirulina platensis* est un objet modèle pour les recherches visant à détecter les mécanismes impliqués dans le processus de bioremédiation et l'élaboration de procédures efficaces pour l'élimination des polluants de divers milieux aquatiques (Ana Luisa parra Guardado, 2019).

Les approches enzymatiques pour la dégradation est un domaine de biorestauration relativement nouveau et prometteur recherche qui a suscité beaucoup d'intérêt en raison de sa spécificité de substrat détendue, de son efficacité et de sa facilité de manipulation **(**Husain.M, Husain. Q, 2007) ; Saratale R.G., Saratale G.D, 2011). En général, ces enzymes sont capables de catalyser des réactions spécifiques, la plupart du temps dans des conditions de

fonctionnement modérées ce qui entraîne une consommation d'énergie moindre et un processus plus respectueux de l'environnement (Ana Luisa ParraGuardado et *al.*, 2019).

Parmi les milliers d'enzymes identifiés et souvent connues dans les moindres détails, les laccases (EC 1.10.3.2) et peroxydase (EC 1.11.1.7) semblent être les enzymes les plus prometteuses. La faible spécificité de substrat rend la laccase intéressante à des fins biotechnologiques dans diverses industries et la bioremédiation des polluants industriels (Mayer, 1987) Bien que les cyanobactéries produisent une petite quantité de laccase dans des conditions normales qui peuvent être améliorées par l'ingénierie métabolique afin de fournir de la laccase dans les quantités requises et à faible coût, il est important que les rendements soient augmentés et que les coûts de production soient réduits (Palanisami et Uma, 2010). Les peroxydases sont des oxydoréductases qui catalysent la réduction des peroxydes, tels que le peroxyde d'hydrogène (H2O2) et l'oxydation d'une variété de composés organiques et inorganiques (Hamid et *al*., 2009).

Les peroxydases ont un potentiel de bioremédiation des eaux usées contaminées par des phénols, des crésols et d'autres effluents industriels, pour la décoloration des colorants textiles, l'élimination des produits chimiques perturbateurs endocriniens, la dégradation des pesticides, les biphényles polychlorés, les alcanes et alcènes chlorés du sol, les herbicides phénoxyalcanoïques, la triazine herbicides, dioxines chlorées et insecticides chlorés,Les progrès rapides dans l'utilisation de la peroxydase pour la dégradation des polluants ont jeté plus de lumière sur les stratégies de bioremédiation durable pour les composés polluants et la protection de l'environnement en utilisant différentes enzymes (Neelam et *al*., 2013).

Dans ce travail, on va étudier le procédé de dégradation enzymatique par la laccase de spiruline comme une autre alternative pour traiter ces polluants émergents Notre étude sera divisée en trois parties :

- **La premier partir** présente une étude bibliographique ciblée tout d'abord sur les polluants émergents et les polluants pharmaceutiques et les méthode d'élimination,ensuite nous avons rassemblé les données essentielles sur le phénomène de bioremediation et basé sur bioremediation des polluants émergents , Dans la dernière partie, nous présentons une synthèse bibliographique sur la bioremediation enzymatique .
- **La partir deux** décrit tout le matériel utilisé et présente en détail les méthodes entreprises pour l'aboutissement à l'objectif souligné.
- **La troisième partir** les résultats obtenus et leurs discussions.
- Enfin ce travail est achevé par une conclusion générale et perspective.

Références de l'introduction

1. **Acuner, E., Dilek, FB**.,(2004). Traitement du tectilon jaune 2G par Chlorella vulgaris Processus Biochem. 39, 623–631.
2. **Ana Luisa ParraGuardado**.,(2019),enzymatic degradation of recalcitrant pharmaceutical micropollutants. Thèse, université Montpellier.
3. **Forgacs, E., Cserháti, T., Oros, G.**, (2004). Élimination des colorants synthétiques des eaux usées : une revue. Environ. Interne. 30, 953–971.
4. **Hamid H, Rehman KU**.,(2009). Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry*., 115(4):1177–1186.
5. **Kumar, Vineet, Agrawal, Sakshi, Bhat, Sartaj Ahmad, Américo-Pinheiro, Juliana Heloisa Pinê, Shahi, Sushil Kumar, Kumar, Sunil**.,(2022). Environmental impact, health hazards, and plant-microbes synergism in remediation of emerging contaminants.Cleaner Chem. Eng. 2, 100030.
6. **Maroof Husain ,Qayyum Husain**.,(2007).Applications of Redox Mediators in the Treatment of Organic Pollutants by Using Oxidoreductive Enzymes: A Review.
7. **Mayer, AM**.,(1987). Polyphénol oxydases dans les plantes progrès récents. Phytochem 26, 11–20.
8. **Neelam Bansal et Shamsher S. Kanwar**.,(2013). Peroxidase(s) in Environment Protection.
9. **Olukanni, OD, Osuntoki, AA, Gbenle, GO**.,(2006). Biodégradation des effluents textiles potentiels de bactéries adaptées et non adaptées aux effluents textiles. Afr. J. Biotechnol. 5, 19801984
10. **Palanisami, S., Uma, L.,(**2010). Activités laccase et polyphénol oxydase des cyanobactéries marines :une étude avec la décoloration Poly R 478. Monde J. Microbiol Biotechnol. 26, 63–69
11. **Pandey , A. , Singh , P. , Iyenger , L.,(**2007) colorants. Int. Biodétérioration. Biodégrad. 59, 73–84.
12. **Saratale R.G. , Saratale G.D.,Chang J.S., S.P. Govindwar S.P.,(**2011), Bacterial decolorization anddegradation of azo dyes: a review, J. Taiwan Inst. Chem. Eng. 42.138–157.
13. **yassine El Maataoui**,(2020).Valorisation des matériaux naturels Marocains (argiles et phosphate)et fibre polymère synthétique dans l'adsorption des micropolluants émergents antibiotique et pesticides.

1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUES

1.1. Polluants émergents

La pollution de l'environnement est l'une des plus importants problèmes dans le monde dus au rejet incontrôlé d'effluents non traités et polluants dans l'environnement, croissance démographique, industrialisation, l'exploration, l'urbanisation et l'exploitation minière sont des acteurs clés de l'environnement pollution (prince O.Ukaogo et *al*,. 2020). Le nombre de polluant augmentant de façon exponentielle, il est nécessaire de disposer de techniques performantes pour les analyser et préciser leurs risques potentiels sur la santé et l'environnement. Ces polluants peuvent exister à l'état de trace dans l'eau et dans des mélanges complexes ce qui complique l'analyse (Anne Feraudet, 2009).

1.1.1. Concept de polluant émergent

Les polluants émergents (PE) sont des substances chimiques et des composés qui ont été récemment identifiés comme étant dangereux pour l'environnement et les écosystèmes, y compris la santé des humains. En plus, beaucoup de ces polluants émergents n'ont pas été réglementés par la législation nationale ou internationale, posant ainsi un plus grand risque pour nos moyens de subsistance. Ces polluants, comprennent une variété de composés tels que les antibiotiques, médicaments, les stéroïdes, les perturbateurs endocriniens, les hormones, les additifs chimiques, ainsi que les microbilles et les microplastiques. Il existe nombreuses sources de PEs, allant des industries à l'agriculture et aux ménages. Hôpitaux et l'industrie pharmaceutique (S. Krishnakumar et *al*., 2022).

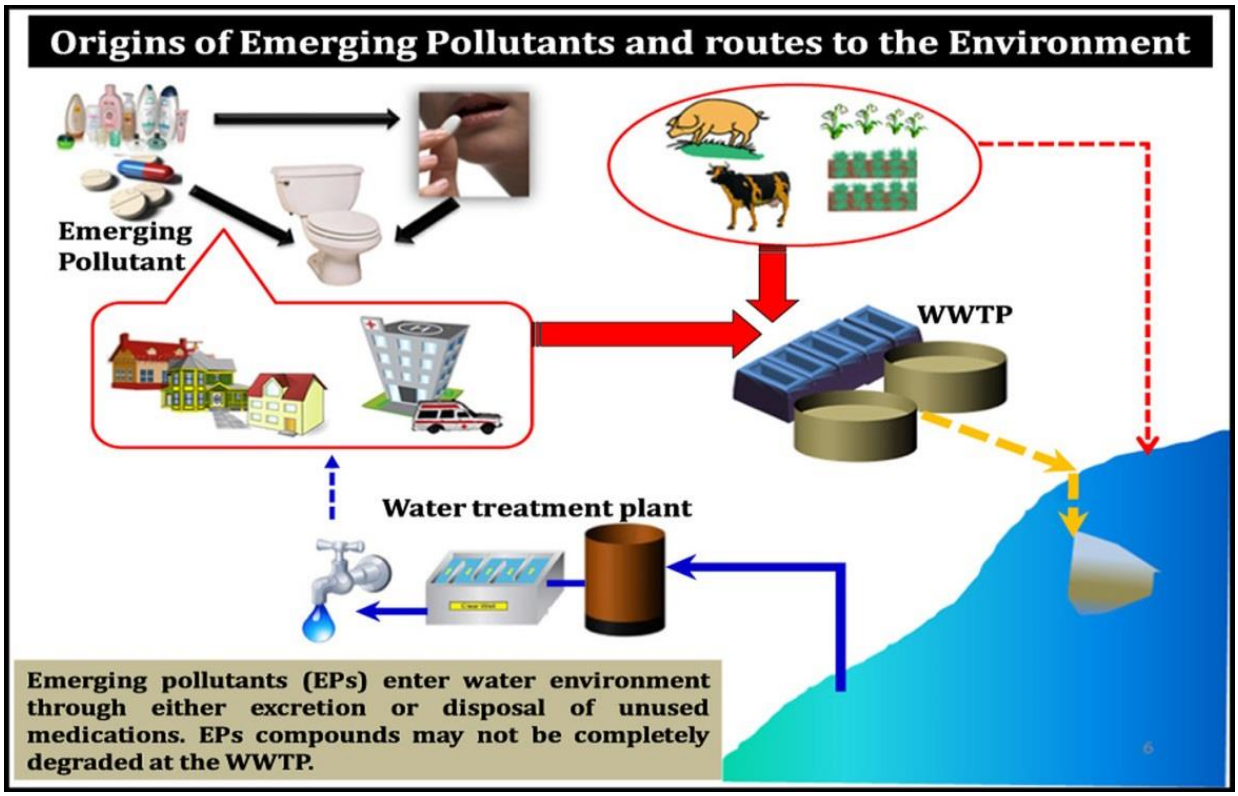


Fig 1.1. Représentation conceptuelle de l'origine des polluants émergents (EP) et leur cheminement vers l'environnement (Anindita Gogoia et *al.*, 2018).

1.1.2. Types des polluants émergents

Les polluants émergents sont de nature chimique ou biologique. Ces substances peuvent être d'origine industrielle, agricole, domestique ou naturelle, elles peuvent aussi être le résultat de traitements de dépollution. Parmi les polluants chimiques, on trouve par exemple les substances pharmaceutiques et cosmétiques, les pesticides et les plastifiants. Certains polluants biologiques comme par exemple le prion, l'ADN des bactéries résistantes aux antibiotiques, les virus, les toxines font partie de cette catégorie (Anne Feraudet,2009).

Tableau 1.1. Classe de polluants émergents (Barcelo, 2003).

Produits	Exemples de composé
Produits pharmaceutiques	
Antibiotique	Triméthoprime, érythromycine, lincomycine, sulfaméthoxazole
Analgésiques, anti-inflammatoire	Codéine, ibuprofène, acétaminophène, aspirine, diclofénac, fénoprofène
Médicaments psychotiques	Diazépam
Régulateurs de lipide	Bézafibrate, acide clorifibrique, acide fénofibrique
β-bloquants	Métoprolol, propanol, timolol
Stéroides et hormones	Estradiol, Oestrone, Oestriol, Diéthylstibestrol
Produits à usage ménager	
Parfums	Polycyclique, macrocyclique
Produits solaires	Benzophénone, méthylbenzylidène
Insecticides	N, N-diéthyltoluamide
Antiseptiques	Triclosan, chlorophène
Les tensioactifs et leurs métabolites	Ethoxylates d'alkylphénol, 4-nonylphénol, 4-octylphénol,Carboxylates d'alkylphénol
Produits à retard de flamme	Ethers diphényliquespolybromés, tétrabromobisphénol A
Additifs industriels	Agents chélatant (EDTA), sulfate aromatique
Additifs d'essence	Dialkyl d'éther, méthyl-ter-butyl éther (MTBE)

1.1.3. Voies d'entrée et rémanence dans l'environnement

Les polluants entrent dans l'environnement par deux grandes voies qui sont les sources ponctuelles et les sources diffuses :

1.1.3.1. Les sources ponctuelles

Sont des points d'entrée fixes des contaminants ; elles sont plus faciles à maîtriser. Les sources ponctuelles peuvent être : des effluents des stations d'épuration, des eaux usées industrielles, des eaux usées domestiques et des lixiviats des décharges (Vanessa Maroga Mboula, 2012).

1.1.3.2. Les sources diffuses

Quant à elles ne constituent pas des points fixes d'entrée, elles sont ainsi moins faciles à contrôler. Les voies d'entrées dites sources diffuses sont par exemple, les eaux de ruissellement, le lessivage des sols et les eaux souterraines. Les effluents des stations d'épuration ont été identifiés comme une des voies majeures d'entrée des polluants émergents. En effet, les traitements conventionnels des stations d'épuration ne permettent pas une élimination complète des polluants émergents. Ces derniers se retrouvent donc dans les effluents et sont rejetés dans l'environnement (Vanessa Maroga Mboula, 2012).

(Andreozzi et *al*.,2003) ont fait des analyses sur les effluents de stations d'épuration de différents pays en Europe (France, Grèce, Italie, Suisse). Plusieurs composés ont été détectés avec des concentrations de l'ordre du µg/L. On retrouve les régulateurs des lipides, les antiphlogistiques, les antibiotiques, les antiépileptiques.

Dans une autre étude ont collecté des données sur les concentrations en polluants émergents dans les eaux usées, dans les eaux affluant dans les STEPs et les concentrations dans les effluents de ces STEPs. Les composés visés étaient les phtalates, les produits pharmaceutiques et le bisphénol A. Les taux d'abattement pour les polluants trouvés en entrée et en sortie des STEPs sont présentés (Vanessa Maroga Mboula, 2012).

D'après les résultats présentés, la caféine est le composé le plus présent en entrée de la STEP (56,63 µg/L) et son taux d'abattement est environ de 97%. L'ofloxacin est le composé le moins présent en entrée, la concentration de ce composé varie de 0,007 à 2,275 µg/L. Le di-(2-éthylhexyle) phthalate est le phthalate le plus utilisé et ainsi le plus détecté, il a un taux d'abattement de 90%. Les analgésiques et les anti-inflammatoires ont les taux d'abattement les plus faibles, entre 30% et 40%. Les taux d'abattement des antibiotiques et du bisphénol A

sont respectivement de 50% et 71%. L'utilisation continuelle de ces composés fait qu'ils sont fréquemment rencontrés en entrée, en sortie des STEPs, dans les eaux de surface et sont ainsi qualifiés de « pseudo-persistants » (Vanessa Maroga Mboula, 2012).

1.1.4. Impact des PE sur les êtres vivants et l'environnement

1.1.4.1. Effets potentiels sur la faune et la flore

La présence des contaminants dans l'environnement entraine des interrogations notamment sur les effets qu'ils peuvent avoir sur l'écosystème. Ainsi, de nombreuses études sont effectuées afin d'identifier les effets probables sur la flore et la faune. Dans la littérature, les études de toxicité les plus rencontrées sont les évaluations d'effet de toxicité aigüe. Cette dernière est étudiée in vivo, chez l'animal après exposition à des doses relativement élevées ou in vitro, avec des tests sur des cultures cellulaires. Thèse de doctorat (Vanessa Maroga Mboula, 2012).

1.1.4.2. Effets potentiels sur l'homme

Les effets des contaminants sur les Hommes sont difficiles à étudier car l'expérimentation sur l'Homme est limitée. L'impact des polluants sur les Hommes est, en général, mis en évidence par des études épidémiologiques ou estimer en fonction des tests sur les animaux et les cellules. Par exemple, l'exposition aux substances à action endocrine qui induit une baisse de la reproduction chez les animaux est également soupçonnée de provoquer une baisse de la reproduction chez les humains . Les perturbateurs endocriniens comme le bisphénol A et la 17β-oestradiol sont soupçonnés de participer au développement du cancer du sein, du cancer des testicules et de la prostate (Vanessa Maroga Mboula, 2012) .

1.1.5. Les produits pharmaceutiques dans l'environnement

Parmi les micropolluants émergents, les produits pharmaceutiques sont des molécules possédant des propriétés curatives, préventives ou administrées en vue d'établir un diagnostic. Elles sont classées selon : l'effet pour lequel elles sont conçues (antibiotiques, analgésiques…), leur structure chimique (parmi les antibiotiques : quinolones, céphalosporine…), leur mode d'action (anti-métabolites ou agents alkylants) (BOCALY Melissa ,2010). Leurs propriétés physicochimiques leur confèrent des capacités de franchissement des membranes biologiques. Elles sont généralement considérées comme des polluants émergents comptent tenu du récent intérêt dont elles font l'objet, et sont souvent classées dans une catégorie que l'on qualifie de « micropolluants » car les concentrations retrouvées dans les milieux aquatiques sont de l'ordre

du nanogramme ou du microgramme par litre. Les stations d'épuration, bien qu'elles se soient significativement améliorées sur le plan technique ces dernières années, n'ont pas été conçues pour éliminer la totalité des molécules pharmaceutiques. Par exemple, même si le paracétamol y est dégradé à plus de **90 %,** on en retrouve des traces dans les eaux usées remises en circulation, puis dans les eaux de surface.Certains composés,comme le diclofénac ou la carbamazépine ne se dégradent quasiment pas. Ces résidus de produits pharmaceutiques,rejetés dans les eaux de surface,peuvent donc présenter un risque environnemental non négligeable (BOCALY Melissa ,2010).

Tableau1.2. Composés pharmaceutiques abondants dans l'environnement (H. Benchaabane, S. Chadouli ,2019)

Groupe	Produits pharmaceutiques	Concentration (µg/L)
Antibiotique	Oflaxacin, Chlortetracycline, Oxytetracycline, Streptomycin, Flumequine, Ciprofloxacin, Trometoprim, Lincomycin, Azithromycin, Clarithromycin, exythromycin, N4-AcetySulfamerthoxazole, Sulfamerthoxazole,Roxithromycin, Sulfamethazin	1.7
Antidépressifs	Mianserin	0.004
Tranquillisants	Diazépam	
Antiépileptiques	Carbamazépine	1.21
Anti-inflammatoires / Analgésiques	Acide asétylsalicylique(Aspirine), Diclofénac, Ibuprofène, Acétaminophène, Métamizol, Codéine, Indométacine,Naproxen, Phenazone, Fenoprofen, Paracétamol	10
Agent de contraste	Diatrizoate, Iohexol, Ioméprol, Iopamidol, Iopronide, AcideIothalamine, Acide Ioxithalamine	//
Beta Bloquants	Métoprolol, Propanolol, Nadolol, Aténolol, Sotalol,Bétaxolol	1.07
Anticancéreux	Cyclophosphamide, Ifosfamide	1.46
Diurétiques	Furosémide	0.067
Régulateurs lipidiques	Bézafibrate, acide Clofibrique, Fénofibrate, Gemfibrozil	2,53

1.1.5.1. Pollution par les composés pharmaceutiques

Les produits pharmaceutiques utilisés ou même expirés sont évacués dans l'environnement. Ils apparaissent beaucoup plus, dans l'environnement, sous forme des résidus dont leurs provenances sont les hôpitaux, les usages domestiques et les usines (Charlotte EDARD, 2011).

Les sources des polluants pharmaceutiques peuvent se distinguer selon trois origines différentes :

Les pollutions humaines, industrielles et agricoles. Les hôpitaux et les exploitations agricoles sont les principales sources de contamination de l'environnement. Bien qu'il existe d'autres voies d'accès de ces polluants dans la biosphère (rejets industriels et domestiques, etc.), l'homme reste toujours l'unique responsable de leur présence dans l'environnement, en tant que fabricant et distributeur (Charlotte EDARD, 2011).

1.1.5.2. Eaux usées d'industrie pharmaceutiques

De nombreuses études démontrent que la plupart des eaux de surfaces étudiées sont polluées par les produits pharmaceutiques. De même, la présence de ces produits s'est avérée dans les eaux de surface, les eaux souterraines et résiduaires, les boues des stations d'épuration utilisées en épandage agricole et même dans l'eau potable (Manal Soufan,2011) Les principales sources de pollution des eaux par les produits pharmaceutiques, peuvent être distinguées en deux types: les sources diffuses issues principalement des excrétions humaines et animales, et représentant la plus grande partie des médicaments rejetés dans l'environnement, et les sources ponctuelles qui sont à l'origine d'émissions beaucoup plus concentrées mais limitées sur le plan géographique (Manal Soufan,2011).

1.1.6. Procédés d'élimination des polluants émergents dans les eaux usées

La plupart des eaux conventionnelles et des stations d'épuration n'ont pas été conçues pour le traitement des eaux usées contenant des produits pharmaceutiques et d'autres contaminants émergents. Typiquement, les stations d'épuration comprennent un système primaire de traitement physico-chimique et un système secondaire constitué d'un réacteur biologique formé de boues activées. Bien que certains micropolluants puissent être éliminés de l'eau lors d'un traitement conventionnel, il reste encore une proportion variable dans l'effluent pour être rejetée dans l'environnement. Il est donc impératif de trouver des options de traitement efficaces non

seulement d'un point de vue pratique, mais aussi d'un aspect économique (Ana Luisa parra Guardado,2019).

Au cours des dernières décennies, diverses technologies physiques, chimiques et biologiques ont été évaluées pour l'élimination ou la dégradation des composés pharmaceutiques dans l'eau. Dans cette section, un aperçu des technologies de traitement les plus pertinentes disponibles pour chaque catégorie est présentées**.** Les avantages et inconvénients des différents procédés sont résumés dans le tableau **I.3**

Tableau 1.3. Avantages et inconvénients des différentes technologies dans l'élimination de micropolluants pharmaceutiques dans les eaux usées (Ahmed et *al*., 2017).

Processus de Traitement	**Avantages**	**Désavantages**
Adsorption	Élimination d'une grande variété de micropolluants	Régénération difficile des matériaux adsorbants Coûts élevés liés à la consommation et à l'élimination des adsorbants usagés
Filtration membranaire	Élimination d'un certain nombre de micropolluants, y compris certains produits pharmaceutiques	Coûts d'exploitation élevés Encrassement des membranes Problème d'élimination des boues concentrées Faible élimination des composés hydrophobes
Coagulation-floculation	Élimination élevée de la turbidité et de la couleur Augmentation de la vitesse de sédimentation	Élimination inefficace des composés pharmaceutiques Grande génération de boues Introduction de lamelles coagulantes en phase aqueuse
Procédés d'oxydation avancés (AOP)	Haute efficacité d'élimination Oxydation sélective favorisant les propriétés de désinfection Taux de dégradation court Permet la dégradation et la minéralisation des polluants	Consommation d'énergie élevée Formation de sous-produits toxiques Interférence des piégeurs de radicaux libres
Boue activée	Faibles coûts d'investissement et d'exploitation	Faible efficacité d'élimination Production de grandes quantités de boues
Bioréacteur à Membrane	Élimination efficace des composés hydrophobes Effluent de haute qualité Petite empreinte de pied	Consommation d'énergie élevée Encrassement des membranes Élimination inefficace des composés hydrophiles et persistants Un post-traitement peut être nécessaire

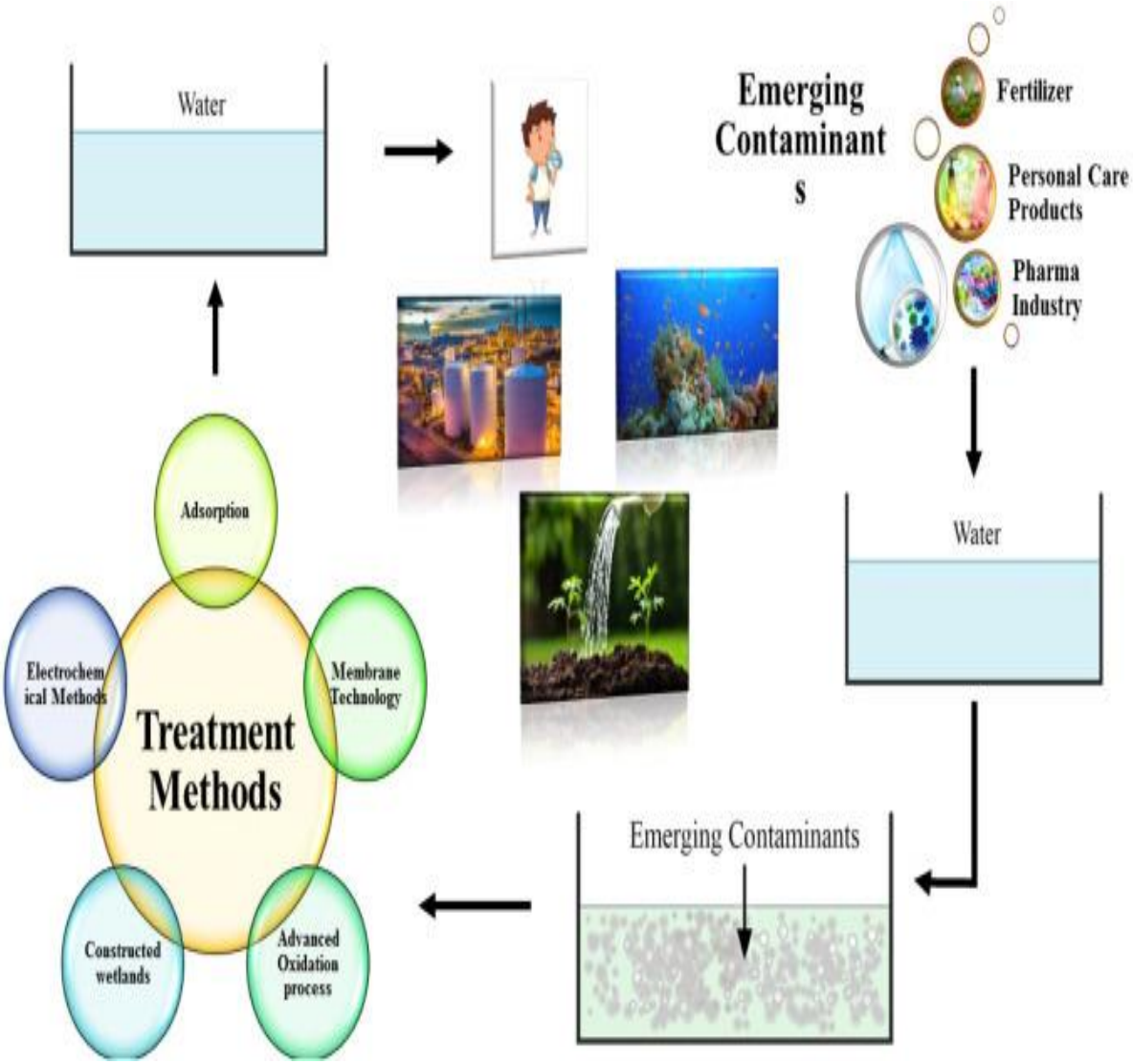


Fig 1.2. Diverses méthodes de traitement pour éliminer les contaminants émergents et leur utilisation finale (B. Senthil Rathi, et *al.*, 2021).

1.1.6.1. Adsorption

L'adsorption est l'un des processus physiques les plus répandus pour l'élimination des contaminants dans l'eau et l'un des principaux processus de traitement des produits pharmaceutiques . C'est un processus simple qui permet de transférer des molécules en phase liquide sur une surface solide permettant ainsi l'élimination des polluants au lieu de produire des sous-produits plus dangereux . Globalement, l'efficacité du procédé d'adsorption dépend à la fois de la nature du polluant et du type de matériau adsorbant. Ainsi, afin d'améliorer l'élimination des micropolluants pharmaceutiques, différents adsorbants ont été étudiés et développés (Ana Luisa parra Guardado,2019).

1.1.6.2. Filtration membranaire

L'utilisation des procédés de séparation membranaire pour le traitement de l'eau a augmenté au cours des dernières décennies. Parmi les différents types de membranes disponibles sur le marché, il a été prouvé que les membranes d'ultrafiltration (UF, taille des pores 10 nm), de nanofiltration (NF, taille des pores 1 nm) et d'osmose inverse (RO, taille des pores <1 nm) éliminent efficacement les petits polluants de taille tels que les composés pharmaceutiques. L'élimination des micropolluants pharmaceutiques dans la séparation membranaire peut se produire par divers mécanismes (adsorption, rejet à l'état d'équilibre, effets électrostatiques) qui dépendent des propriétés physicochimiques du composé, de la solution d'alimentation et des caractéristiques de la membrane (Ana Luisa parra Guardado,2019).

1.1.6.3. Coagulation et floculation

La coagulation et la floculation représentent une partie importante des usines conventionnelles de traitement de l'eau et des eaux usées et sont généralement appliquées avant la sédimentation et la filtration dans un processus mieux connu sous le nom de clarification. La coagulation implique l'ajout de produits chimiques, habituellement des sels d'aluminium et de fer, qui réagissent avec les particules en suspension et colloïdales pour former des microparticules en réduisant leurs charges répulsives . Ensuite, au cours de la floculation, ces microparticules entrent en collision et forment des agrégats ou flocs plus gros qui sont facilement éliminés par sédimentation (Ana Luisa parra Guardado,2019).

1.1.6.4. Procédés d'oxydation avancés

Les procédés d'oxydation avancés (POA) représentent une alternative très efficace pour le traitement des micropolluants pharmaceutiques récalcitrants qui ne sont pas éliminés par les technologies conventionnelles de traitement de l'eau et des eaux usées. Les POA sont des méthodes oxydatives basées sur la génération de radicaux (OH•, O2•-., HO2•), principalement des radicaux hydroxyles (OH•) (Kanakaraju et al., 2018). Ces radicaux sont des espèces extrêmement réactives qui peuvent attaquer avec succès un large éventail de molécules organiques et inorganiques conduisant à l'oxydation ou même à la minéralisation des polluants (Ana Luisa parra Guardado,2019).

Les radicaux hydroxyles peuvent être générés à partir d'agents oxydants tels que l'ozone (O3) ou le peroxyde d'hydrogène (H2O2), souvent combinés à des catalyseurs métalliques ou semi-conducteurs ou au rayonnement UV. Les POA couramment utilisés pour le traitement

pharmaceutique de l'eau et des eaux usées pourraient être classés en trois catégories : les procédés photochimiques, les procédés non photochimiques et les procédés hybrides ou combinés. Des exemples de l'application de certains de ces procédés pour le traitement des produits pharmaceutiques cibles sont présentés ci-après (Ana Luisa parra Guardado,2019).

1.1.6.5. Bioréacteur à membrane

Les technologies de bioréacteur à membrane (MBR) associent le traitement des boues activées à un processus de séparation membranaire afin de retenir les boues dans le système, favorisant ainsi la dégradation microbienne de la matière organique et, dans certains cas, des micropolluants (produits pharmaceutiques). Typiquement, dans un MBR, le module de membrane (fibres creuses ou membranes plates) est immergé à l'intérieur du réservoir du réacteur conforme à une seule unité. Les MBR sont considérés comme des systèmes plus efficaces pour l'élimination des micropolluants car ils présentent certains avantages par rapport aux CAS, tels que de faibles besoins en espace, une SRT accrue dans des volumes de réaction plus petits et la présence presque inexistante de solides en suspension dans le perméat. Néanmoins, afin d'obtenir une telle performance, une aération continue dans la partie inférieure de la membrane est généralement nécessaire afin d'assurer la saturation en oxygène ainsi que de créer des turbulences pour réduire au maximum le colmatage et l'encrassement de la membrane qui sont les plus grands inconvénients de cette technologie . En outre, le fonctionnement du MBR peut également être affecté par l'âge et la concentration des boues, la composition des eaux usées, la conductivité, la température de fonctionnement et le pH (Ana Luisa parra Guardado,2019).

1.1.6.6. Boues activées conventionnelles

Les boues activées conventionnelles (CAS) sont probablement le traitement biologique le plus couramment utilisé dans les stations d'épuration urbaines. Il est destiné à l'élimination de la matière organique à base de processus biologiques . La CAS utilise de l'oxygène dissous pour favoriser la croissance de microorganismes qui peuvent dégrader les polluants dans des conditions opérationnelles précises.Cependant, ce traitement n'est généralement pas assez efficace pour l'élimination des micropolluants persistants en raison de leur nature récalcitrante et de leur faible quantité (Ana Luisa parra Guardado,2019).

1.2. *Spiruline* et potentialité de bioremédiation

1.2.1. Bioremediation

La bioremédiation est tout processus biologique qui utilise des micro-organismes (bactéries, microbes) des champignons, des plantes, des algues ou les enzymes qui en dérivent pour retourner d'un environnement altéré par les contaminants à leur état naturel, sain biologiquement. Elle conduit à une dépollution.La dégradation des contaminants par les microorganismes dépend de trois facteurs : type d'organisme, type de contaminant, conditions géologiques et chimiques du site contaminé (Singhal .M et *al.*, 2022).

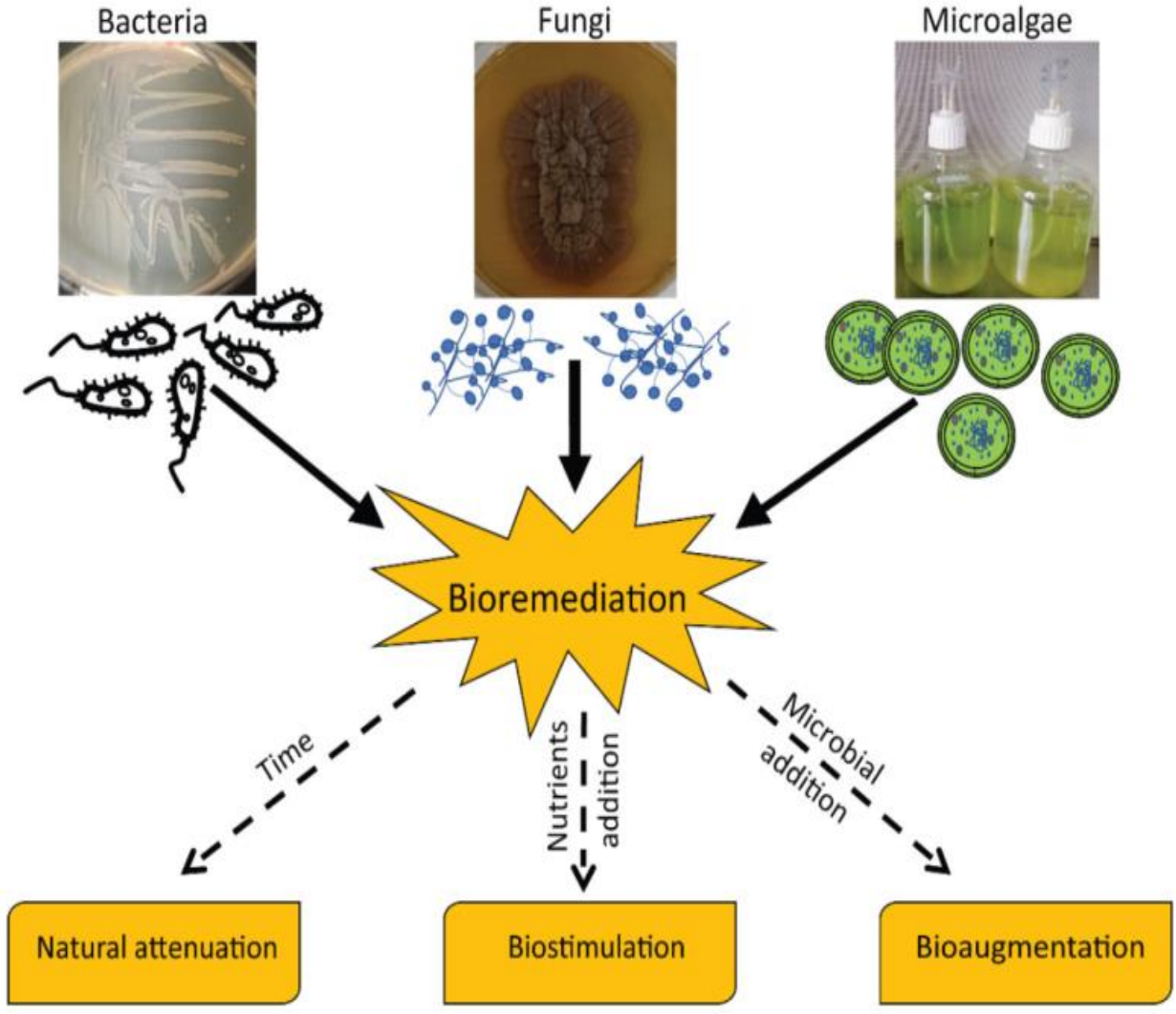


Fig 1.3. Schéma général des stratégies de bioremédiation impliquant différents taxons microbiens (Filippo Dell' Anno et *al.*, 2021)

1.2.2. Méthodes de bioremédiation

Sur la base du transport et de l'élimination des déchets, la bioremédiation est classée en deux catégories in situ et ex situ (singhal.M et *al*., 2022).

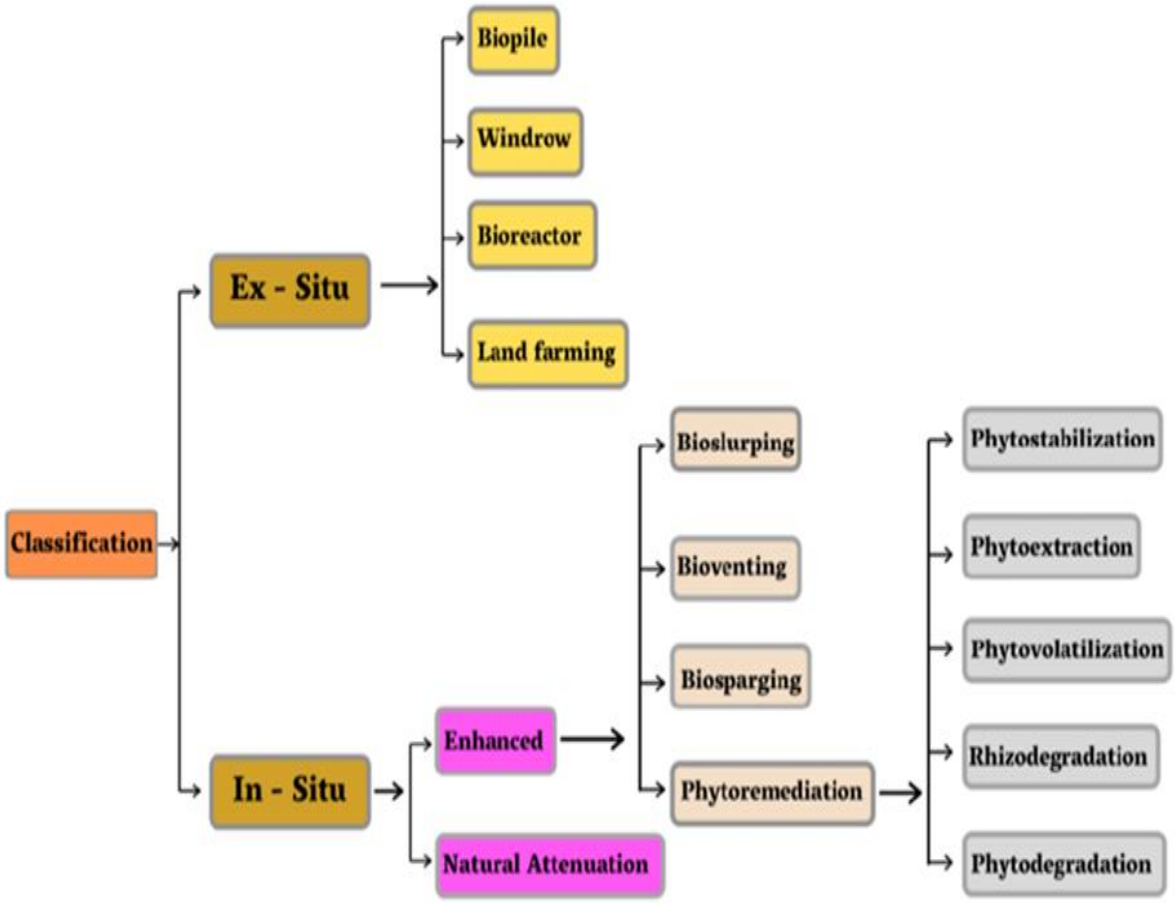


Fig 1.4. Classification de la biorémédiation basée sur le transport et l'élimination des déchet (singhal.M et *al*., 2022)

1.2.3. Types de bioremédiation

Actuellement, il existe des méthodes physico-chimiques pour l'élimination et la dégradation des polluants,. la dégradation de divers produits chimiques récalcitrants et nocifs dans le sol et l'eau. Cependant, ces méthodes sont coûteuses, produisent des sous-produits toxiques et sont inefficaces pour les produits à faible concentration mais hautement toxiques. Des stratégies ont été développées et peuvent surmonter ces limitations et fournir un remède vis-à-vis de ces polluants. Parmi ces stratégies, en voici les principales (Akhtar et Amin-ul Mannan, 2020).

1.2.3.1. Phytoremédiation

La phytoremédiation est également appelée agro-remédiation, botano-remédiation ou remédiation verte. La phytoremédiation est une biotechnique qui utilise les processus naturels par lesquels les plantes et leur flore microbienne de la rhizosphère dégradent et séquestrent les polluant organiques et inorganiques, tant en milieux poreux, que liquide ou gazeux (Ashraf et *al.*, 2019).

1.2.3.2. Mycoremédiation

Ces dernières années, le potentiel des champignons pour la bioremédiation a été de plus en plus reconnu. Plusieurs raisons pour lesquelles les champignons sont des organismes idéaux pour la mycoremédiation et pourquoi les champignons peuvent être supérieurs aux bactéries ou aux plantes dans de nombreuses conditions (Treu et Falandysz, 2017).

1.2.3.3. Bioremédiation par les microorganismes

Il s'agit de la technologie innovante la plus efficace qui utilise des microorganismes (microchampignons, bactéries et microalgues) vivants pour dégrader les polluants environnementaux ou pour prévenir la pollution. Il s'agit d'une approche multidisciplinaire, mais dont l'élément de base est la microbiologie (Chawla et *al.*, 2013).

1.2.3.4. phycoremédiation

L'application des microalgues dans le traitement des eaux usées est un domaine d'intérêt pour la recherche depuis de nombreuses années. La phycoremédiation est l'utilisation de macro- ou microalgues pour la réduction ou la biotransformation de polluants, y compris les nutriments et les produits chimiques nocifs provenant des eaux usées (Kumar et *al.*, 2018) .

Les micro-organismes employés dans la phycoremédiation ne produisent pas de sous-produits nocifs et augmentent la teneur en oxygènedissous. Les réacteurs à base de biofilms utilisés dans processus de traitement des eaux usées sont catégorisés en réacteurs rotatifs d'algues rotatif, le réacteur à biofilm horizontal et le réacteur à biofilm à lit (MBBR**)** (wang et *al.*, 2016).

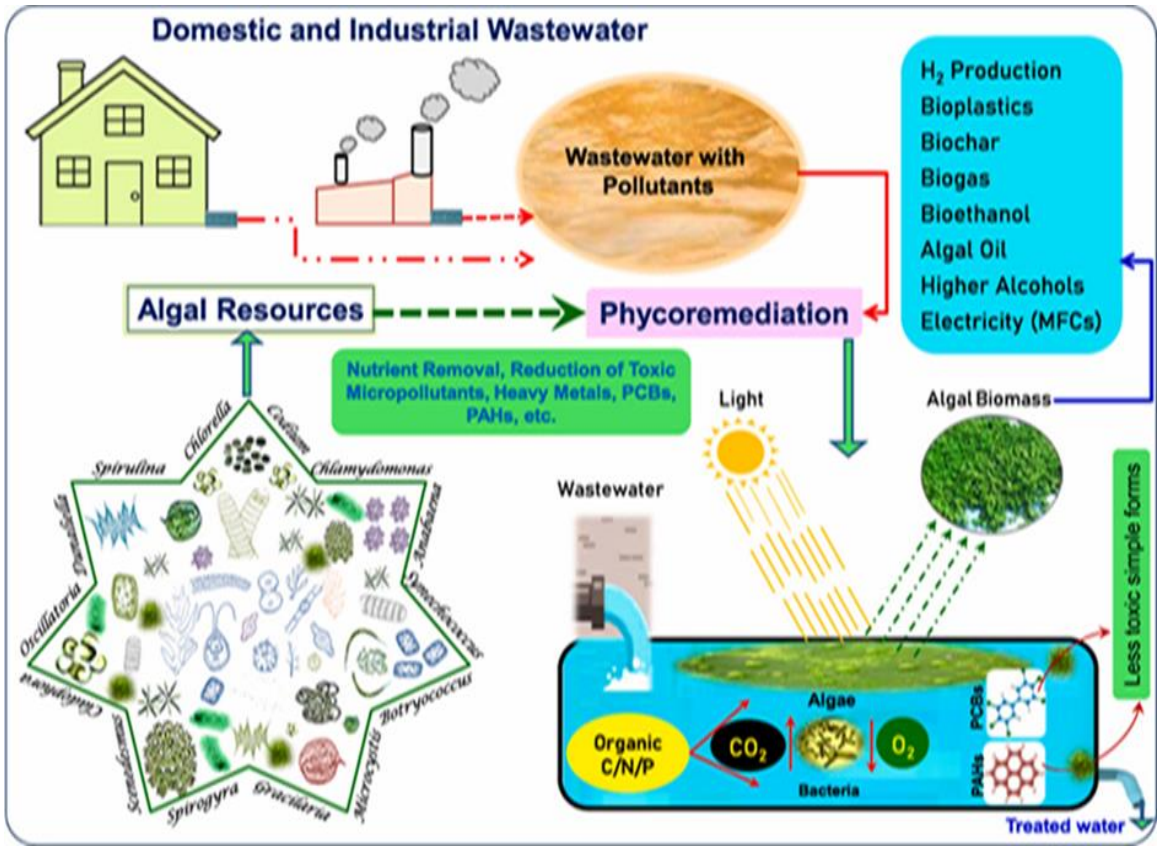


Fig 1.5. phycoremediation des eaux usée (Stephen Dayana Priyadharshini et *al.*, 2021)

1.2.4. Bioremédiation des contaminants émergents

Les activités industrielles, urbaines et agricoles entraînent la libération de nombreux contaminants tels que les métaux, métalloïdes, solvants, mais aussi des contaminants émergents tels que les pesticides, les plastifiants, les produits pharmaceutiques (PHR: antibiotiques, anti-inflammatoires non stéroïdiens, agents antiépileptiques, œstrogènes…) et les produits de soins personnels (PSP: ingrédients antiseptiques/préservateurs/désinfectants) rejetés par les hôpitaux et les établissements de santé, les unités agricoles, les centres de soins de santé, etc (Liu et *al.*, 2018).

L'utilisation des microalgues pour la bioremédiation est la capacité de récupérer les ressources pour une réutilisation bénéfique grâce au bioraffinage de la biomasse microalgale/bactérienne pour une gamme de produits à haute et à faible valeur, tels que les pesticides,les plastiques et les fibres algues, ou aliments riches en protéines.Alors que le potentiel des microalgues à détoxifier les polluants organiques et inorganiques a été bien documenté au cours des 30 dernières années ce n'est que récemment que l'attention a été portée sur l'utilisation des microalgues pour la bioremédiation des EC actuels (Ibuot et *al.*,2017).

1.2.5. Potentialité d'utilisation d'*Arthrospira platensis* dans la bioremediation des polluants émergents

1.2.5.1. SPIRULINE

La spiruline est un organisme primitif qui a évolué il y a environ 3,5 milliards d'années et qui a appris à utiliser le dioxyde de carbone dissous dans l'eau salée comme source de nutrition pour la reproduction.est une cyanophyte (algue bleue) qui se développe rapidement en plein soleil, à des températures élevées et dans des environnements alcalins. La spiruline pousse rapidement en plein soleil, à des températures élevées et dans des environnements extrêmement alcalins. (M. Ahsan B. Habib et *al.*, 2008).

On connaît actuellement 200 genres et environ 1 500 espèces de cyanobactéries ; en raison de leur difficulté à être détectées, il est probable qu'il y en ait encore beaucoup d'autres à découvrir. La spiruline est la plus connue ; elle appartient à l'ordre des Nostocales, à la famille des Oscillatoriaceae et au genre *Arthrospira*. Il convient de noter qu'il existe parfois une grave confusion entre les termes "*Spiruline*", "*Spirulina*" et "*Arthrospira*". Ces malentendus proviennent à la fois d'erreurs de détermination scientifique dans les années 1950 et de la désignation commerciale de certaines cyanobactéries comestibles. Dans la pratique, le terme "*Spiruline*" désigne le nom commercial d'une espèce de cyanobactérie alimentaire qui appartient néanmoins au genre *Arthrospira*. Le terme "*Spiruline*" est le nom commercial de la spiruline, mais il désigne également un genre de cyanobactéries qui n'est pas apparenté à *Arthrospira* et qui n'est pas comestible (pour Spirulina major, Spirulina subtilissima, Spirulina princeps, Spirulina gigantea, ou Spirulina subsalsa) (Cruchot. H,2008).

1.2.5.2. Arthrospira platensis

Arthrospira platensis est une cyanobactérie planctonique filamenteuse composée de cellules individuelles (environ 8 mm de diamètre) qui se développe dans les lacs alcalins subtropicaux dont la température optimale est d'environ 35 °C. Dans les cultures productives, l'*Arthrospira* est cultivée dans des étangs mixtes peu profonds ou dans des bassins semi-fermés, Peu profonds ou dans des photobioréacteurs tubulaires semi-fermés. Le milieu de croissance contient des sels inorganiques avec une concentration élevée de bicarbonate, maintenant la valeur du pH entre 9 et 10. Cette cyanobactérie est le procaryote photosynthétique le plus cultivé (Masojídek et Torzillo, 2014).

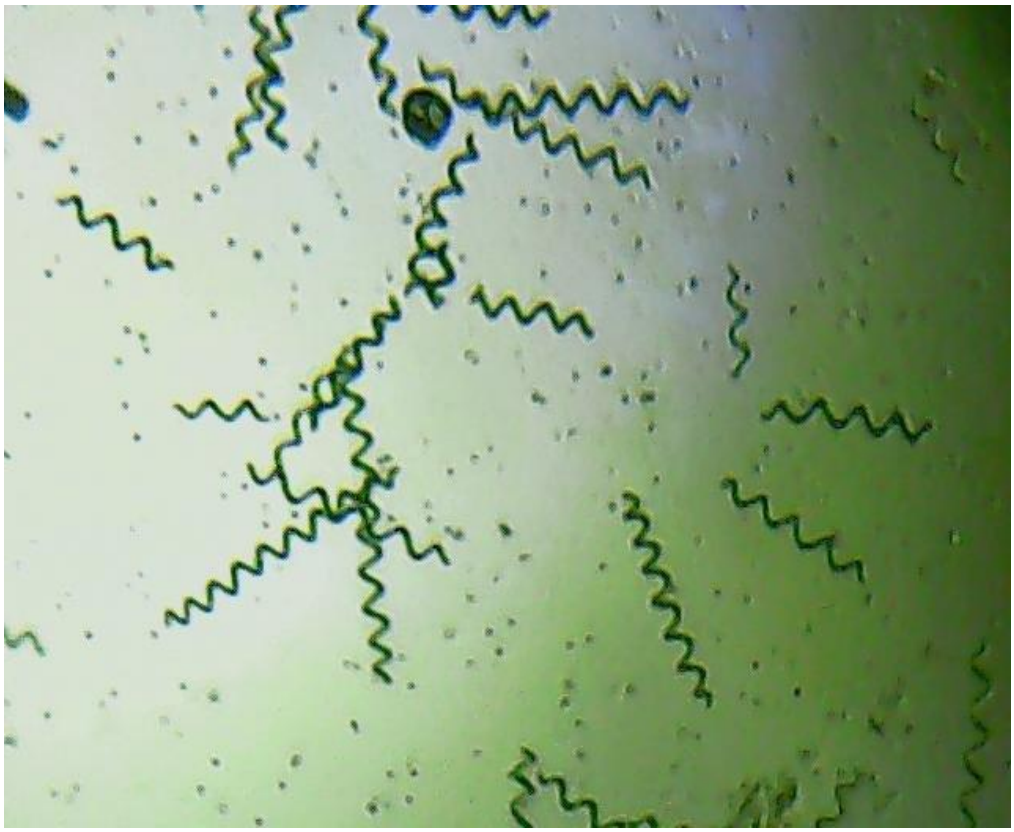


Fig 1 .6. *Arthrospira platensis* vue au microscope optique (Ghennai. A, 2017)

Chaque sous-espèce se différencie par le diamètre de son hélice, *A. platensis* ayant un diamètre plus grand et des trichomes généralement plus longs que les autres variations du genre ce qui lui confère plusieurs avantages pour la santé et lui permet de survivre dans différents climats.Sa biomasse est largement utilisée comme aliment de santé, comme complément alimentaire et comme source de produits chimiques fins. La biomasse contient des protéines (60%), des glucides (15%), des lipides, des phycobiliprotéines, des caroténoïdes, des vitamines et des minéraux (Masojídek et Torzillo, 2014).

1.2.5.3. Morphologie

La spiruline est une cyanobactérie à Gram négatif qui peut être unicellulaire ou multicellulaire. Elle est photoautotrophe. La spiruline a une longueur moyenne de 250 µm. Elle est constituée de cellules translucides empilées bout à bout appelées filaments ou trichomes. Ceux-ci ont un diamètre de 10 à 12µm, sont mobiles, non ramifiés et enroulé en 6 ou 7 tours. L'enroulement du trichome sur lui-même se fait dans le sens d'un ressort miniature, d'où le terme "spiruline" du latin "spira" qui signifie enroulement. Plusieurs facteurs environnementaux peuvent influencer la direction d'un hélicoptère. Cette forme typique de l'hélicodale lui permet de traverser l'eau à une vitesse de 5 mètres par seconde en imitant le mouvement d'une vis. Le terme "mobilité" fait

référence au mouvement (Charpy et *al.*, 2008). Cependant, il existe des spirulines ondulées et des spirulines droites, qui ont une relation directe avec les conditions environnementales rencontrées dans leurs milieux.

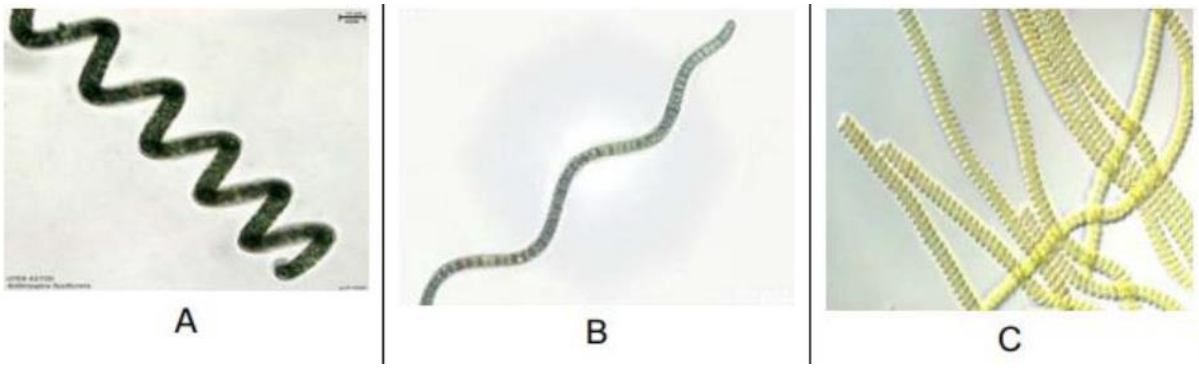


Fig 1.7. Les différents aspects de la spiruline. (A) spiralée, (B) ondulée, (C) droite (Charpy et *al.*, 2008)

1.2.5.4. Taxonomie

Ce genre a une forme hélicoïdale très spécifique, qui présente une variation au sein de chaque espèce, et chaque souche de l'espèce. En outre, il a été signalé que des cas où une structure presque droite, soit naturellement, soit à cause de produits chimiques, de radiations ou d'autres facteurs. La cellule devient incapable de reprendre sa forme hélicoïdale (Guasto et Waliszewski, 2018)

Tableau 1.4. Taxonomie d'Arthrospira Platensis (AlFadhly et *al., 2022)*

Domaine	***Bactéries***
Règne	*Eubacterla*
Embranchement	*Cyanobactéries*
Classe	*Cyanophycées*
Sous-classe	*Oscillatoriophycideae*
Ordre	*Oscillatorlales*
Famille	*Osellatorlaceae*
Genre	*Arthrospira*
Espèce	*A. platensis*

1.2.5.5. Cycle biologique :

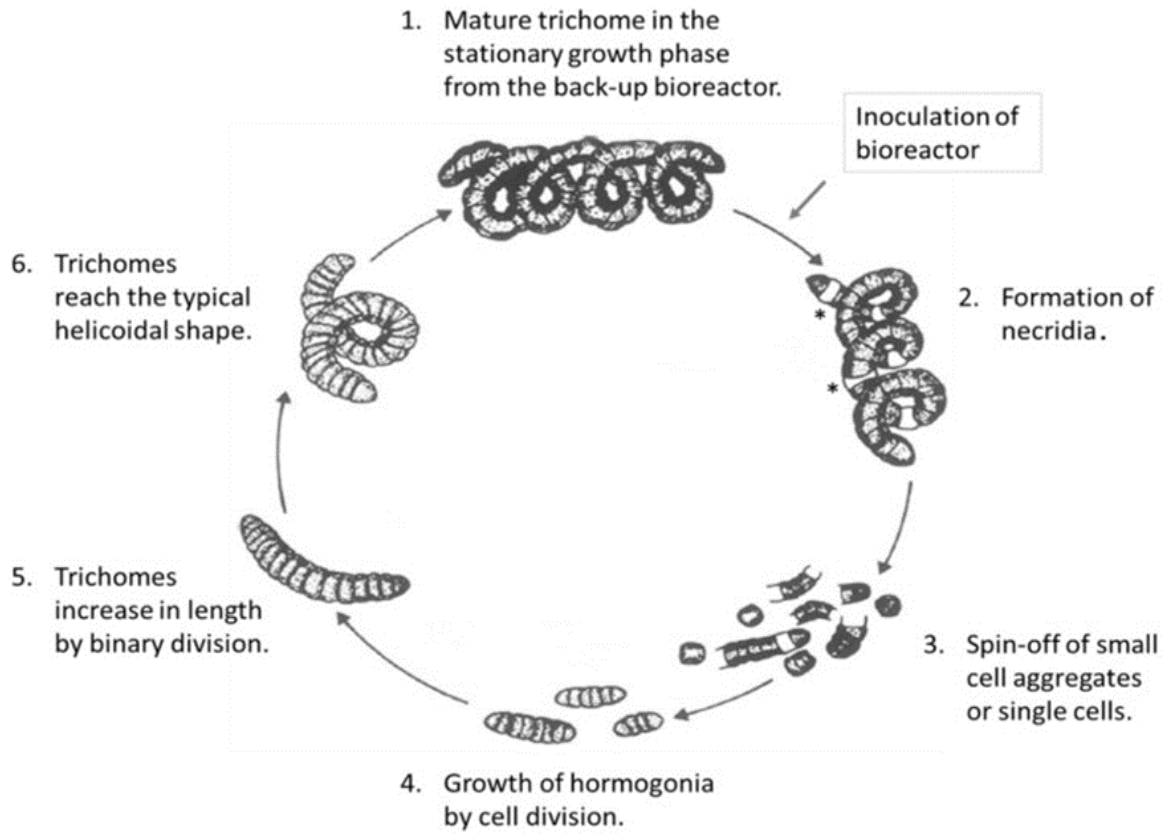


Fig 1.8. Cycle biologique d'Arthrospira platensis (Jung, C. H. G et *al.*, 2021)

La spiruline se reproduit de manière asexuée par simple division, bourgeonnement ou fragmentation aléatoire. Le processus est le suivant :

- Les filaments matures forment des cellules appelées ganglions, qui ont un aspect biconcave, ressemblant à un disque détaché (Fig. 9)
- des fragments des trichomes de cette couche, formant ainsi deux nouveaux filaments appelés hormogonies (Fig. 9)
- Celles-ci vont croître jusqu'à maturité par simple division cellulaire (une cellule donnera naissance à deux, etc.) et prendre la forme connue pour être typique de la spiruline.

1.2.5.6. Composition chimique de la spiruline

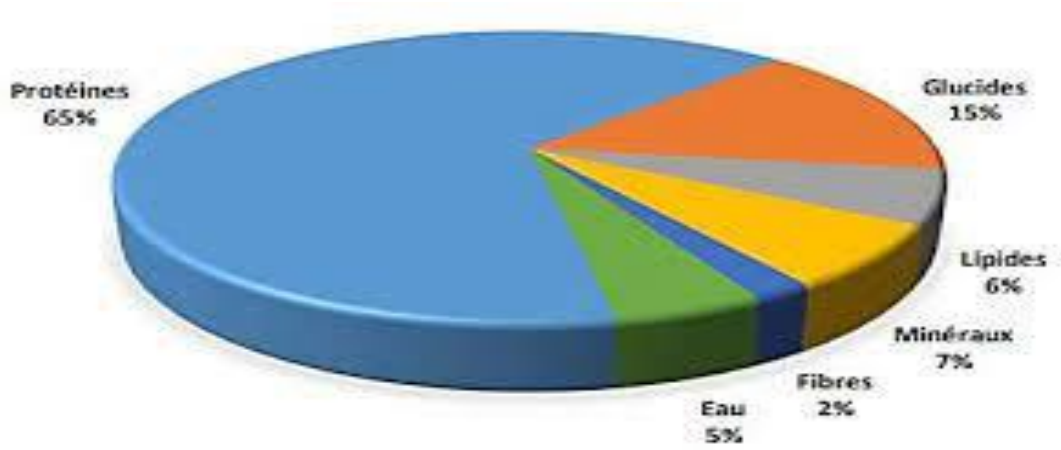


Fig1.9. Composition chimique de la spiruline (Lecointre, 2017).

La spiruline, arbore une teneur record en protéines de 70%. Les protéines algales sont d'une grande qualité nutritionnelle. Son exceptionnelle teneur en protéines de haute valeur biologique très digestibles, ainsi que sa composition idéale en vitamines, minéraux et oligo-éléments font d'elle un complément alimentaire intéressant dans le cadre d'une alimentation déficitaire ou déséquilibrée . Le produit final commercialisé de la spiruline se présente sous forme de poudre, de flocons, de gélules ou de comprimés d'une intense couleur bleu vert) Les doses journalières conseillées varient de 250 à 5 000 mg (Cruchot, 2008).

1.2.6. Les facteurs influencent la croissance *d'Arthrospira platensis*

1.2.6.1. La Température

La spiruline est une algue mésophile. Elle peut supporter des températures aussi élevées que 40°C et aussi basses que 20°C , la température idéale pour la croissance était de 35°C. En outre, on a découvert que le rendement de biomasse le plus élevé se produisait à 35°C (AYMAN ESMAT BENYAMIN, 1993).

1.2.6.2. La qualité de l'eau

La qualité de l'eau se désigne par la salinité, le pH, la température, le total des solides dissous (TDS), la dureté, les métaux lourds, les microbes et la conductivité électrique (EC). La qualité de l'eau peut modifier la solubilité des nutriments apportés au milieu ainsi que l'accumulation sélective de certains métaux lourds par les algues tout au long de la phase de croissance. Il convient de souligner qu'une biomasse algale élevée entraîne des problèmes tels que

l'épuisement de l'oxygène, des niveaux élevés d'ammoniac, la libération de toxines dans la colonne d'eau et la création de produits chimiques odorants. (Hosna hajati et *al*.,2019).

1.2.6.3. Ondes lumineuses

La lumière bleu produisait la plus forte teneur en protéines, suivie des lumières jaunes, blanches, rouges et vertes. En outre, la lumière fluorescente blanche avec un composant rouge-orange fournit une énergie plus élevée pour une meilleure synthèse des protéines et des pigments. Pour la sélection d'une source de lumière artificielle afin de produire des micro-algues, le producteur devrait noter certains paramètres tels que la longueur d'onde lumineuse, l'intensité et la fréquence de la lumière, l'efficacité électrique, l'accroissement de la chaleur, de la longévité et du coût. Une longueur d'onde d'environ 400-700 nm convient à la croissance des microalgues, et les longueurs d'onde comprises entre 600 et 700 nm sont les plus efficaces pour la photosynthèse (Hosna hajati et *al*.,2019).

1.2.6.4. PH

Le pH de l'eau avait un effet direct sur les propriétés physiologiques des algues**,** un pH de 9.Le poids sec de *Spirulina platensis* était de 0,91 g/500 ml, et que les teneurs en protéines et en chlorophylle étaient de 64,3 % et de 13,2 mg/gm, respectivement.

La concentration en ions hydrogène (niveau de pH) est considérée comme l'un des paramètres les plus importants du système de culture des algues. Pour permettre un environnement sélectif pour *Spirulina platensis*, le pH doit être maintenu à un niveau spécifique, 9,2-10,5 (AYMAN ESMAT BENYAMIN, 1993).

1.2.6.5. Nutriments

Pour éliminer le bruit des données dû à un déficit d'un nutriment spécifique nécessaire au développement, tous les nutriments doivent être fournis en excès afin d'examiner l'effet de l'énergie lumineuse, qui est le principal constituant du processus de photosynthèse. Avec un rapport azote/phosphore de 5,5 :1, Spirulina platensis a atteint son niveau de production le plus élevé. Des nutriments seront apportés au milieu en quantités excessives tout en maintenant le rapport N:P à 5,5 :1 afin de découvrir comment la lumière affecte la croissance. Grâce à ce processus, la restriction de la croissance due à la carence en nutriments sera supprimée et l'impact de la photosynthèse sera observé (Ayman Esmat Benyamin,1993).

1.2.7. Utilisation de spiruline

La spiruline nous offre plusieurs filières d'applications. Cette algue bleu microscopique se développe dans les régions tropicales et subtropicales possédant de multiples utilités : agro-alimentaire, pharmaceutique, écologique et biotechnologique (Razafindrajaona et *al* ,2008).

1.2.7.1. Utilisation thérapeutique

L'utilisation de la biomasse de spiruline comme composant de produits nutraceutiques est très répandue. Dans le même temps, anti-inflammatoire, anticancéreux, antihyperglycémique, antihypertenseur et d'autres propriétés médicalement utiles différents composants de la biomasse de spiruline ont été démontrés (Soheili et Khosravi-Darani, 2011). De ce point de vue, la *spiruline platensis* est une excellente matière première pour la production de divers médicaments. La biomasse spiruline, obtenue dans des conditions contrôlées dans des bioréacteurs fermés, est très précieuse pour l'industrie pharmaceutique, mais assez coûteuse. L'utilisation de cette biomasse comme simple sorbant pour les métaux lourds n'est pas rentable (Ana Luisa parra Guardado, 2019).

1.2.7.2.Utilisation nutritionnel

Grace à son excellent profil nutritionnel, la spiruline peut générer plusieurs performances : En enrayant la malnutrition, elle est utilisée par des humanitaires et des médecins sous forme de poudre afin de la mélanger à des céréales ou à de l'eau, pour sauver des enfants atteints de malnutrition sévère. Elle se révèle plus efficace que les médicaments pour pallier toutes les carences.

Considérer comme une excellente source de vitamines B9 et B12 ainsi que de fer, la spiruline est bien adaptée aux femmes enceintes car elle leur permet d'accéder à tous les nutriments essentiels. Grâce à la phycocyanine qui augmente l'oxygénation des muscles et limite les crampesutérine.

Par sa composition, la spiruline convient très bien aux enfants et adolescents ainsi qu'au bébé en âge de consommer des protéines. Son apport en éléments essentiels de qualité. Comme pour l'homme, la spiruline renforce aussi les défenses naturelles de l'animal. Elle joue un grand rôle dans le maintien de son système immunitaire, lui permet de lutter contre certaines maladies et agit contre son vieillissement et sa fatigue (Casal, 2019).

1.2.7.3. Utilisation biotechnologie

Les cyanobactéries ont suscité beaucoup d'attention ces dernières années en raison de leurs applications potentielles en biotechnologie. Des études récentes ont montré que les sites pollués par le pétrole sont riches en consortiums de cyanobactéries capables de dégrader les composants du pétrole. En plus de ces applications, les cyanobactéries sont également utilisées dans l'aquaculture, le traitement des eaux usées, l'alimentation, les engrais, la production de métabolites secondaires, notamment les exopolysaccharides, les vitamines, les toxines, les enzymes et les produits pharmaceutiques (Abed et al 2008).

1.2.8. Utilisation de la spiruline comme objet modèle dans la bioremédiation

la spiruline possède des mécanismes qui assurent la survie de cette cyanobactérie dans des conditions qui diffèrent essentiellement des optimales. Les environnements pollués, en particulier aquatiques, peuvent être associés à des conditions extrêmes. Par conséquent, les organismes extrêmophiles, en particulier ceux qui possèdent des mécanismes d'élimination des métaux lourds et des polluants organiques persistants, sont des objets de perspective dans la biorestauration (Soheili et Khosravi-Darani, 2011).

Compte tenu de ce qui précède, Spirulina platensis est un objet modèle pour les recherches visant à détecter les mécanismes impliqués dans le processus de bioremédiation et l'élaboration de procédures efficaces pour l'élimination des polluants de divers milieux aquatiques. Cyanobacterium *Spirulina platensis* est également un objet technologiquement pratique, étant facile à manipuler dans des conditions de laboratoire et industrielles. Le cycle vital de la cyanobactérie, en fonction de la composition du milieu nutritif et des conditions de croissance, peut varier dans des limites très larges, de 6 à 21 jours. De plus, ce paramètre peut être fixé en appliquant les procédures de culture spécifiques de sorte que la durée et la composition biochimique de la biomasse obtenue correspondent à certaines exigences prédéterminées (Soheili et Khosravi-Darani, 2011).

Les cellules spirulines en phase de croissance exponentielle et en début de phase de déclin sont caractérisées par la présence d'un grand nombre de bulles de gaz, ce qui assure la floculation de la biomasse microalgale et, par conséquent, nous pouvons la collecter facilement et sans grand coût. La structure spécifique des cellules spirulines à paroi cellulaire de type gram négatif facilite l'extraction des composants cellulaires tant pour des analyses rigoureuses, que pour leur utilisation dans divers domaines (Soheili et Khosravi-Darani, 2011).

1.3. Bioremédiation enzymatique des polluants émergents

1.3.1. Bioremediation enzymatique

l'utilisation de micro-organismes et de plantes dans la biorémédiation est un processus extrêmement lent et nécessite donc l'application d'enzymes microbiennes qui ont été isolées à partir de cellules entières pour accélérer le processus de biorémédiation (prathap somu et *al.*,2022

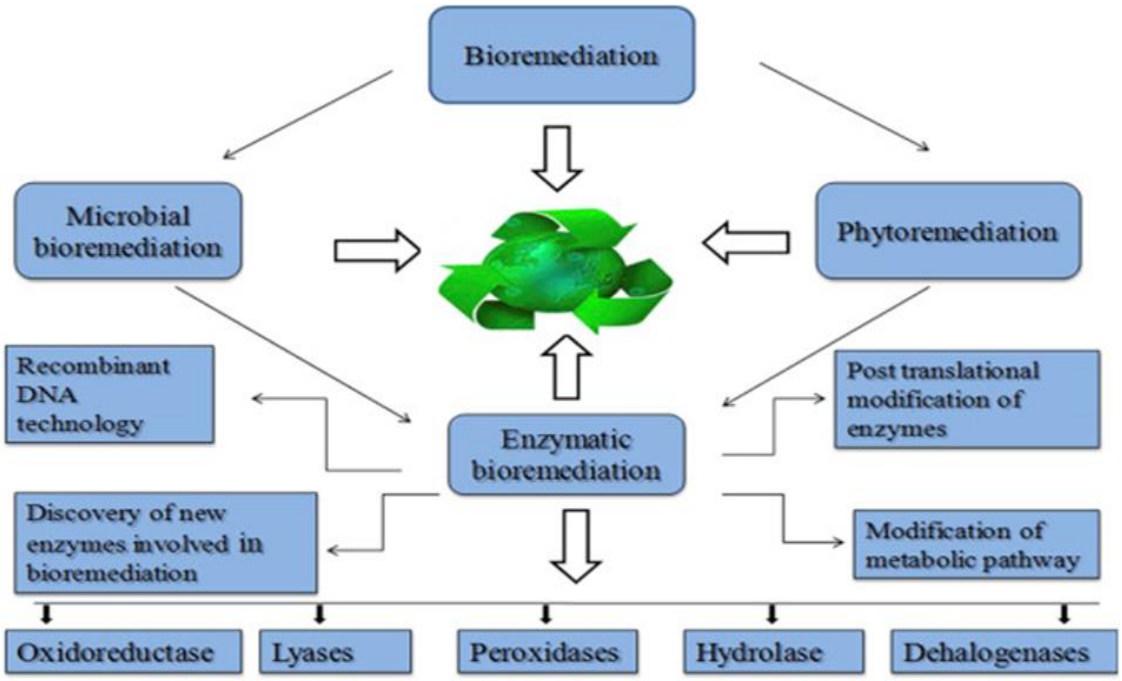


Fig 1.10. Un aperçu des méthodologies combinatoires pour la bioremédiation (Babita Sharma et *al.*, 2018)

Les enzymes aident à la biorémédiation de nombreux polluants simultanément car elles ont un large éventail de spécificités. Contrairement aux microbes, les enzymes peuvent fonctionner dans n'importe quelles conditions et restent constantes face aux changements rapides et défavorable. Comme les enzymes sont des substances biodégradables, elles ne constituent pas une menace pour l'environnement. L'activité catalytique de l'enzyme a lieu sur ses sites actifs lorsque le substrat s'y fixe (prathap somu et *al.*,2022)

1.3.2. L'avantage de l'utilisation de la biorémédiation enzymatique

Elle inhibe la formation de sous-produits toxiques et est donc considérée comme sûre pour l'environnement . Par rapport aux micro-organismes, les enzymes sont beaucoup plus petites en

taille et sont plus spécifiques Les enzymes les plus largement utilisées dans la biorémédiation sont la peroxydase du raifort et la laccase car elles oxydent une large gamme de produits chimiques. Le traitement des eaux usées est donc une méthode importante pour réduire la pollution de l'eau; Les polluants toxiques tels que les colorants, le phénol et les composés pharmaceutiques peuvent être éliminés à l'aide d'enzymes comme la laccase, la peroxydase et l'azoréductase (prathap somu et *al*.,2022).

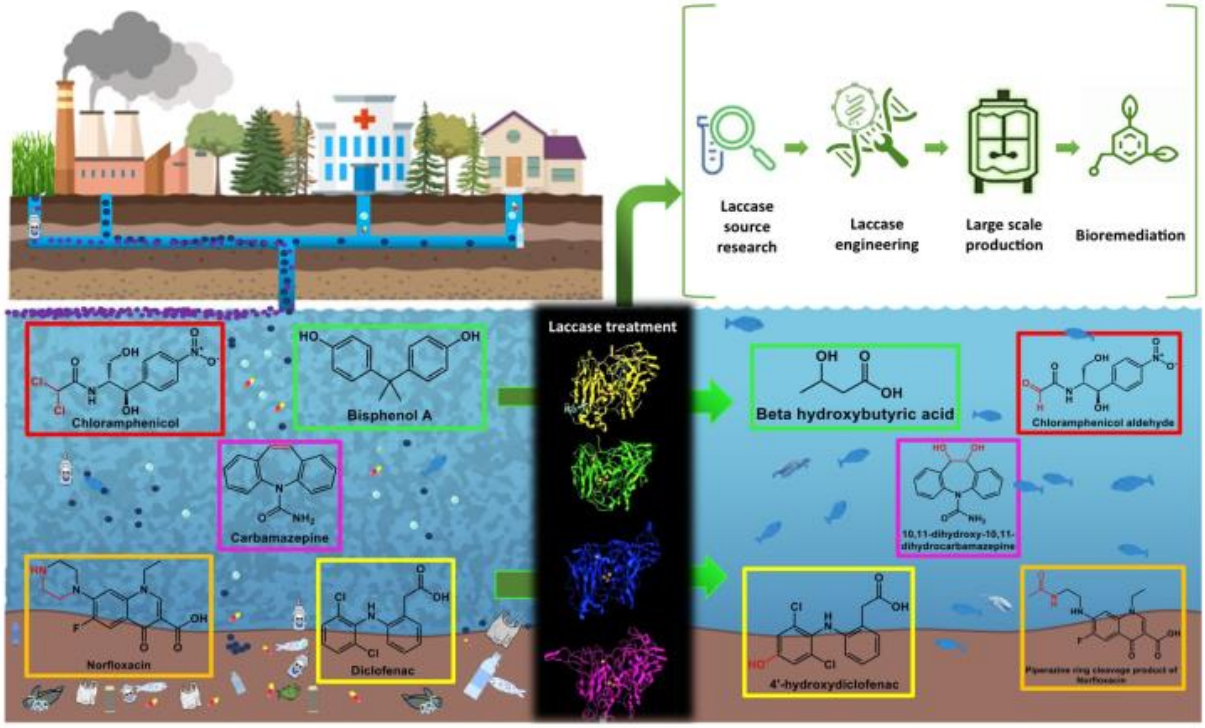


Fig 1.11 .llustration schématique des sources potentielles de contaminants de l'eau et de leur bioremédiation par les laccases (Leticia Arregui et *al*., 2019)

1.3.3. Facteurs affectant la dégradation enzymatique

1.3.3.1. La température

La température est un facteur crucial dans l'action des enzymes microbiennes extracellulaires et intracellulaires. Les enzymes microbiennes possèdent plusieurs enzymes optimales pour la décomposition des contaminants environnementaux. Étant donné que les enzymes sont des protéines, elles sont sensibles à la température élevées, qui peuvent les dénaturer ou modifier leurs caractéristiques.Les enzymes Lac sont inactives ou clivées au-delà de cette fourchette température à 40 ◦C, une détérioration maximale a été de 100 %. Dans la biodégradation des

colorants anthraquinoniques, une plage optimale similaire a été examinée à l'aide de l'enzyme Laccase. Cependant, la même enzyme Lac s'est révélée optimale à 50 ◦C chez plusieurs espèces. Les lipases et les peroxydases fonctionnent mieux à des températures comprises entre 15 et 30 ◦C (Lopes et *al.*, 2020).

1.3.3.2. pH

Le pH optimal pour diverses enzymes générées par différents microbes varie. Une valeur de pH en dehors de la plage optimale entraîne une diminution de l'activité enzymatique. La majorité des enzymes fonctionnent à un pH neutre. Cependant, certaines enzymes, comme les protéases alcalines, fonctionnent à un pH supérieur à 8,0, ont utilisé des enzymes lignocellulolytiques fongiques telles que les protéases alcalines,le pH optimal pour la biodégradation des enzymes brutes a été déterminé, enzymes brutes se situe entre 7 et 8 (Soza-Martinez et *al.*, 2020).

1.3.3.3. Concentration enzymatique

La concentration enzymatique appliquée dans le processus de biodégradation est un facteur critique d'efficacité au cours du processus de biorestauration. L'efficacité de la dégradation augmente généralement jusqu'à un certain point avec l'augmentation des concentrations enzymatiques (Al-Dhabi et *al.*, (2021)

1.3.3.4. Biodisponibilité des polluants

La biodisponibilité des polluants fait référence à la quantité de contaminants qui peuventêtre rapidement absorbée par les micro-organismes et dégradée. La biorestauration à médiation enzymatique peut être affectée par la présence de polluants dans le milieu aqueux (Saravanan et al., 2021).

1.3.3.5.L'agitation

L'agitation est également essentielle à la dépollution car elle est principalement de la chaleur, du substrat et de l'oxygène. L'augmentation de la vitesse d'agitation améliore l'efficacité de la biodégradation en raison de l'augmentation de la disponibilité de l'oxygène dans les processus aérobies. La possibilité de biodégradation de la tétracycline a été améliorée à 200 rpm/min (Al-Dhabi et *al.*, 2021)

1.3.4. Utilisation des enzymes de spiruline dans la bioremediation

La spiruline est une cyanobactérie qui est riche en nutriments, en protéines et en enzymes. Voici quelques types d'enzymes que l'on peut trouver dans la spiruline :

1.3.4.1. Super Oxyde Dismutase (SOD)

Les superoxydes dismutases (SOD ; EC 1.15.1.1) sont des métalloenzymes qui peuvent contenir du fer, du manganèse ou du cuivre/zinc et qui agissent contre les superoxydes cytotoxiques des radicaux libres comme antioxydants, qui défendent les cellules contre le stress oxydatif (De Raposo et *al.*, 2013).

Actuellement, cinq isoformes de SOD ont été détaillées, dans lesquelles les cofacteurs métalliques tels que Cu/ ZnSOD, MnSOD, FeSOD, NiSOD et Fe/ZnSOD, qui sont considérées comme des isoformes en raison de divers résultats d'analyses différentielles diverses. La SOD est l'une des plus importantes des enzymes impliquées dans la conversion des radicaux superoxydes O2 - en O2 et H2O2, protégeant ainsi les cellules et les tissus des dommages oxydatifs.Chez les microalgues, les SOD jouent un rôle important dans la protection des cellules contre le stress oxydatif causé par diverses méthodes, y compris les stress chimiques et biologiques, les métaux lourds et les radiations . *Synechococcus nidulans, Pseudanabaena sp.* et A. *platensis* ont montré des activités spécifiques de superoxyde dismutases de 50,4, 18,4 et 30,0Umg 1, respectivement (Gunes et *al.*, 2015).

1.3.4.2. Lipase

Les lipases (triacylglycérol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) sont responsables de l'hydrolyse des triacylglycérols à longues chaînes . Ces enzymes peuvent être utilisées dans diverses industries, telles que l'alimentation, les détergents, les produits pharmaceutiques et la bioremédiation, entre autres . L'activité des lipases est détectée, par exemple, dans le lait, les graines oléagineuses (soja, arachide), les céréales (avoine, blé), les fruits et les légumes, ainsi que dans le tube digestif des mammifères. Les lipases microbiennes ont attiré l'attention de l'industrie en raison de leur stabilité, de leur sélectivité et de leur large spécificité de substrat . De nombreux micro-organismes ont été identifiés comme producteurs potentiels de lipases extracellulaires, notamment des bactéries, des levures et des champignons (Abada, 2008).

(Demir et T€ukel 2010) ont étudié pour la première fois la purification et la caractérisation de la lipase *d'A. platensis*. Dans la solution enzymatique brute, l'activité totale était de 0, 23U.mL^{-1} avec une activité spécifique de 0,12Umg protéine.

1.3.4.3. La laccase

Les laccases (EC 1.10.3.2) appartiennent à une famille d'oxydases bleues à cuivre multiple et sont des glycoprotéines extracellulaires monomériques,On les trouve dans les lichens, les micro-organismes, les plantes et les insectes . Cette glycoprotéine a la capacité de capturer l'O2 de l'air et de l'utiliser comme accepteur d'électrons pour oxyder une variété de composés et produire de l'eau, ainsi que pour oxyder des polymères complexes dans des composés phénoliques tels que la lignine. Cette capacité à être des "catalyseurs verts" les rend aptes à être utilisés dans une variété d'industries, de la bioremédiation dans l'industrie alimentaire (brassage) à l'industrie de la pâte à papier . L'activité des laccases (130UL 1) a été confirmée chez l'algue Tetracystis aeria, avec un pH optimal de 7,0 et 9,0 . La laccase a été détectée chez A. platensis et a décoloré 96% du colorant anthraquinonique bleu réactif en 4h. Cette enzyme a été purifiée par chromatographie d'échange et d'exclusion d'anions. La protéine présente une taille approximative de 66kDa, avec un pH et une température optimale pour l'activité enzymatique de 3,0°C et 30°C, respectivement. Elle a également montré une grande stabilité à un pH alcalin (8) et à des températures élevées (50°C) (Afreen et *al.*, 2017).

1.3.4.4. L'asparaginase

L'asparaginase (EC 3.5.1.1, L-asparagine amidohydrolase) est une enzyme ayant des applications dans les industries alimentaires et pharmaceutiques , qui hydrolyse la L-asparagine en acide L-aspartique et en ammoniac. En général, la L-asparaginase microbienne est intracellulaire. Les L-asparaginases peuvent être obtenues à partir de plantes, de mammifères et de sources microbiennes (bactéries, champignons, algues) .Rapportent la première description d'une L-asparaginase microalgale ; les extraits acellulaires contenaient une activité asparaginase de 1,5IUmL 1. Selon (Ebrahiminezhad et *al.* 2014), les microalgues sont économiquement viables pour la production de médicaments à grande échelle. Dans leur étude, C. vulgaris a montré une activité intracellulaire de L-asparaginase de 10IUg 1 poids cellulaire sec. Ils ont donc conclu que C. vulgaris est probablement une source nouvelle, sûre et économique pour la production de L-asparaginase. Dans un milieu contenant du NaNO3, du NaCl et du FeSO47H2O, A. platensis a montré la production la plus élevée de L-asparaginase, soit 0,275U.

L'activité spécifique la plus élevée de la L-asparaginase (0,166Umg 1) a été trouvée dans des extraits subcellulaires, cytoplasmiques. Selon les auteurs, sa production pourrait être induite par l'utilisation de conditions de stress combinées (Prihanto et Wakayama, 2014).

1.3.4.5. Peroxydases

Les peroxydases utilisent du peroxyde d'hydrogène pour catalyser l'oxydation d'une variété de composés organiques et inorganiques. Les peroxydases végétales, les peroxydases animales et les catalases sont les trois catégories de peroxydases . La peroxydase se trouve dans la nature et est utilisée pour la dégradation des polluants et des pesticides, la décoloration des colorants, comme biocapteurs, dans l'industrie de la pâte à papier et dans le traitement des eaux usées . Un exemple de son application peut être vu dans les eaux de process des industries textiles, qui ont normalement une forte coloration due à la présence de colorants rhodamine, qui résistent au processus de blanchiment traditionnel et peuvent être dégradés par la peroxydase . La capacité unique des champignons de la pourriture blanche à dégrader la lignine est largement associée à des réactions oxydatives non spécifiques médiées par les radicaux libres exerçant leurs peroxydases extracellulaires (Lundell et *al.*, 2010).

1.3.4.6. protéases

Les protéases font référence aux enzymes qui hydrolysent les protéines, elles sont classées comme endo ou exopeptidases, selon leur site d'action préféré : alors que les exopeptidases clivent aux extrémités Nterminale (aminopeptidases) ou Cterminale (carboxypeptidases) d'un substrat, les endopeptidases effectuent des coupures à l'intérieur des substrats. En raison de leurs propriétés catalytiques, les protéases sont utilisées dans divers processus industriels, tels que l'alimentation, les produits chimiques et les produits pharmaceutiques (Aguilar et Sato, 2018).

Références bibliographiques

1. **Abada, E.A.E**.,(2008**)**. Production and characterization of a mesophilic lipase isolated from Bacillus stearothermophilus AB-1. Pak. J. Biol. Sci. 8, 1100–1106.
2. **Afreen, S., Shamsi, T.N., Baig, M.A., Ahmad, N., Fatima, S., Qureshi, M.I., Hassan, M.I., Fatma, T**.,(2017). A novel multicopper oxidase (laccase) from cyanobacteria: purification, characterization with potential in the decolorization of anthraquinonic dye. PLoS One 12, 1–20.
3. **Aguilar, JGdS, Sato, HH.**,(2018). Protéases microbiennes : production et application dans l'obtention d'hydrolysats de protéines. Rés alimentaire. Int. 103, 253–262.
4. **Ahmed, MB, Zhou, JL, Ngo, HH, Guo, W., Thomaidis, NS, Xu, J.(** 2017). Progrès dans les technologies de traitement biologique et chimique pour l'élimination des contaminants émergents des eaux usées : un examen critique. J. Hazard. Mater. 323, 274–298.
5. **Akhtar, N., Amin-ul Mannan, M.,**(2020). Mycoremediation: Expunging environmental pollutants..
6. **Al-Dhabi, N.A., Esmail, G.A., Valan Arasu, M.,(** 2021). Effective degradation of tetracycline by manganese peroxidase producing Bacillus velezensis strain Al-Dhabi 140 from Saudi Arabia using fibrous-bed reactor. Chemosphere 268, 128726.
7. **AlFadhly, N. K. Z., Alhelfi, N., Altemimi, A. B., Verma, D. K., & Cacciola, F.,** (2022). Tendencies Affecting the Growth and Cultivation of Genus Spirulina: An Investigative Review on Current Trends. In Plants (Vol. 11, Issue 22). MDPI.
8. **Ana Luisa ParraGuardado**.,(2019),enzymatic degradation of recalcitrant pharmaceutical micropollutants. Thèse, université Montpellier.
9. **Andreozzi R., Raffaele M., Nicklas P**., (2003). Pharmaceuticals in STP effluents and theirsolar photodegradation in aquatic environment. Chemosphere, 50, 1319-1330.
10. **Anindita Gogoi et al.**,(2018). Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: A review.
11. **Anne Feraudet.**,(2009).Détection des polluants émergents dans l'eau : état des lieux.
12. **Ashraf, S., Ali, Q., Zahir, Z. A., Ashraf, S., Asghar, H. N.** (2019). Phytoremediation: Environmentally sustainable way for reclamation of heavy metal polluted soils.Ecotoxicology and Environmental Safety, 174, 714-727.
13. **Ayman esmat benyamin.**,(1993),light energy effect on *spirulina platensi*s growth rate augst / Texas Tech University,p74
14. **Babita Sharma, Arun Kumar Dangi , Pratyoosh Shukla.**,(2018).Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review.
15. **Barceló D**., (2003). Emerging pollutants in water analysis. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 22, 14-16.
16. **Bocaly Melissa** ,(2010). Impacts des substances pharmaceutiques sur l'eau et les milieux aquatiques.
17. **CASAL A.,(**2019)l'Aliment Idéal et le plus Complet de Demain, Site web www.spirulinefrance.fr.
18. **Charlotte Edard,(2011).contamination** du milieu hydrique par les residus de medécaments humains et vetrenales: application à l'étude DE la présence de fluoriquinolones a usage humaine et veterinaire dans l'eau. .
19. **Charpy, L., Langlade, M. J., & Alliod, R**.,(2008). « La Spiruline peut-elle être un atout pour la santé et le développement en Afrique ? »

20. **Chawla, N., Suneja, S., Kukreja, K., Kumar R**.,(2013). Bioremediation: An emerging technology for remediation of pesticides. *Research Journal of Chemistry and Environment*, 17 (4), 88-96.
21. **Cruchot H.,** (2008). La spiruline bilan et perspectives. Diplôme d'état de Docteur en Pharmacie. Université de Franche-comté, 323 p.
22. **De Raposo, M.F.J., de Morais, R.M.S.C., de Morais, A.M.M.B**., (2013). Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. Life Sci. 93, 479–486.
23. **Demir, B.S., T€ukel, S.S., (**2010). Purification and characterization of lipase from Spirulina platensis. J. Mol. Catal. B Enzym. 64, 123–128.
24. **Ebrahiminezhad, A., Rasoul¬Amini, S., Ghoshoon, MB, Ghasemi, Y**.,(2014). Chlorella vulgaris, une nouvelle source de microalgues pour la production de L¬asparaginase. Biocatal. Agric. Biotechnol. 3, 214–217.
25. **Filippo Dell' Année 1, Eugenio Rastelli, Clémentine Samson, Christophe Brunet ,Adrianna Ianora et Antonio Dell' Année .**,(2021), Bactéries, Champignons et Microalgues pour la Bioremédiation des Sédiments marins contaminés par les hydrocarbures pétroliers à l'ère des omiques.
26. **Ghennai .A.,**.(2017) Approche immuno-inflammatoire de l'insulinorésistance au cours de la diabésité chez Psammomysobesus : impact de la phytonutrition par la spiruline thèse de docteur. UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI BOUMEDIENE.
27. **Guasto, A., & Waliszewski, W**.,(2018). ARTHROSPIRA PLATENSIS Monograph
28. **Gunes, S., Tamburaci, S., Imamoglu, E., Dalay, M.C.,(** 2015). Determination of superoxide dismutase activities in different cyanobacteria for scavenging of reactive oxygen species. J. Biol. Act. Prod. Nat. 5, 25–32.
29. **H. Benchaabane, S. Chadouli**.,(2019). Etude paramétrique et cinétique de la dégradation et de la minéralisation de l'amoxicilline par oxydation anodique. Application sur un rejet pharmaceutique M. Singhal et al Microalgae Based Sustainable Bioremediation of Water Contaminated by Pesticides , Published: 19.04.2021) réel (SAIDAL Medéa), Mémoire de Master, Université de Khemis Miliana .
30. **Hosana hajati and MOJTABA zaghari .**,(2019), Spirulina Platensis in Poultry Nutrition, ,p206
31. **Ibuot, A., Dean, A. P., McIntosh, O. A., Pittman, J. K**. (2017). Metal bioremediation by CrMTP4 over-expressing *Chlamydomonas reinhardtii* in comparison to natural wastewater-tolerant microalgae strains. *Algal Research*, 24, 89-96 ,In: Environmental Pollution of Paddy Soils. Springer, pp. 229–243.
32. **Jung, C. H. G., Braune, S., Waldeck, P., Küpper, J. H., Petrick, I., & Jung, F.** (2021). Morphology and growth of arthrospira platensis during cultivation in a flattype bioreactor. Life, 11(6).
33. **Kumar, S., Kaushik, G., Dar, M. A., Nimesh, S., Lopez-Chuken, U. J., VillarrealChiu, J. F**. (2018). Microbial degradation of organophosphate pesticides: A Review.*Pedosphere*, 28, 190–208
34. **Lecointre, R..,** (2017). Optimisation de la production de spiruline dans une ferme à Madagascar afin de lutter contre la malnutrition infantile, MEMOIRE INGENIEUR agroalimentaire de l'école nationale vétérinaire, agroalimentaire, et l'alimentation, Oniris,nante atlantiques, p 5,14.

35. **Leticia Arregui et al**., 2019. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation.
36. **Liu, W., Chen, Q., He, N., Sun, K., Sun, D., Wu, X., Duan, S**. (2018). Removal and biodegradation of 17β-estradiol and diethylstilbestrol by the freshwater microalgae Raphidocelis subcapitata. International Journal of Environmental Research and Public Health, 15 (3), 452
37. **Lopes, S.L., Vieira, N., R da Luz, J.M., S Silva, M. de C., Cardoso, W.S., M Kasuya, M.C.,**(2020). Production of fungal enzymes in Macaúba coconut and enzymatic degradation of textile dye. Biocatal. Agric. Biotechnol. 26, 101651.
38. **Lundell, TK, M€akel€a, MR, Hilden, K.,(** 2010). Enzymes modificatrices de la lignine dans les basidiomycètes filamenteux revue écologique, fonctionnelle et phylogénétique. J. Basic Microbiol. 50, 5–20.
39. **M. Ahsan B. Habib, Mashuda Parvin, Tim C, Huntington, Mohammad R. Hasan**. (2008). A REVIEW ON CULTURE, PRODUCTION AND USE OF SPIRULINA AS FOOD FOR HUMANS AND FEEDS FOR DOMESTIC ANIMALS AND FISH. (n.d.).
40. **Manal Soufan**, Thèse de l'Université de POITIERS, (2011).
41. **Masojídek, J., & Torzillo.G.** (2014). Mass Cultivation of Freshwater Microalgae. In Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. Elsevier.
42. **Muskan Singhal , Swapnali Jadhav , Swaroop S. Sonone , Mahipal Singh Sankhla , Rajeev Kumar ,(**2022). Microalgae Based Sustainable Bioremediation of Water Contaminated by Pesticides.
43. **Prathap Somu et al** ,(2022).Immobolization of enzymes for bioremediation :A future remedial and mitigating strategy.
44. **Prihanto,AA ,Wakayama,M .,(**2014) .Combinaison de stress environnemental et de localisation de l'asparaginase dans *Arthrospira platensis* pour l'amélioration de la production .3 Biotech 4,647_653.
45. **Prince O. Ukaogo et al.(** 2020). 21 - Environmental pollution: causes, effects, and the remedies.
46. **Razafindrajaona ,J,M.,P, Rakotozandriny., Rakotozandrindrainy R.,Tsivingaina, A., Ramapiherika, K,D.,Randria ,J, N**.(2008). Colloque international sur la spiruline pp 142.
47. **S. Krishnakumar ·D. Satheesh Herbert Singh· Prince S. Godson · Salom Gnana Thanga**,(2022). Emerging pollutants: impact on environment, management,and challenges.
48. **Saravanan, A., Kumar, P.S., Vo, D.-V.N., Jeevanantham, S., Karishma, S., Yaashikaa, P.R.**,(2021). A review on catalytic-enzyme degradation of toxic environmental pollutants: microbial enzymes. J. Hazard Mater. 419, 126451.
49. **Senthil Rathi, P Senthil Kumar , Pau-Loke Show.** ,(2021).A review on effective removal of emerging contaminants from aquatic systems: Current trends and scope for further research.
50. **Soheili, M., Khosravi-Darani, K**., (2011). The potential health benefits of algae and micro algae in medicine: a review on *Spirulina platensis*. Curr. Nutr. Food Sci. 7 (4), 279–285.
51. **Soza-Martinez, J.D., Balagurusamy, N., Montanez, J., Peralta, R.A., Moreira, R.F.P.M.,Bracht, A., Peralta, R.M., Morales-Oyervides, L.,(** 2020). Synthetic dyes

biodegradation by fungal ligninolytic enzymes: process optimization, metabolites evaluation and toxicity assessment. J. Hazard Mater. 400, 123254.

52. **Stephen Dayana Priyadharshini , Palanisamy Suresh Babu , Sivasubramanian Manikandan , Ramasamy Subbaiya , Muthusamy Govarthanan e, Natchimuthu Karmegam**,(2021). Phycoremediation of wastewater for pollutant removal: A green approach to environmental protection and long-term remediation.
53. **Treu, R., Falandysz, J**. (2017). Mycoremediation of hydrocarbons with basidiomycetes-a review. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 52 (3), 148-155.
54. **Vanessa Maroga Mboula**,(2012). Devenir de polluants émergents lors d'un traitement photochimique ou photocatylitique sous irradiation solaire.
55. **Wang Y, Ho SH, Cheng CL, Guo WQ, Nagarajan D, Ren NQ, Lee DJ, Chang** JS (2016) Perspectives on the feasibility of using microalgae for industrial wastewater treatment. Biosour Technol 222(2016):485–497.

2. MATERIELS & METHODES

2. Produits, Matériels et Méthodes

La présente enquête était d'évaluer la dégradation enzymatique par la laccase et peroxydase de la *spiruline* comme alternative pour traiter des polluants émergents issus d'une industrie pharmaceutique : Diclofénac, Ampicilline, Amoxicilline, Pénicilline, Ibuprofène, Sulfaméthoxazole.

Ainsi, pour répondre aux objectifs de cette étude, nous avons adopté la démarche expérimentale qui comprend les étapes suivantes

- Production de laccase et peroxydase par la spiruline
- Extraction, semi purification et dosage de l'activité de laccase et peroxydase.
- Essais de dégradation enzymatique des PEs par ces deux enzymes.

L'intégralité de ce travail a été réalisée au sein du laboratoire pédagogique de biologie (LPB), de Dégradation des polluants émergents par EEPP e la faculté des sciences, à l'université Yahia Farés de Médéa, durant la période « Février-Mai 2023 ».

2.1. Matériels

Cette étude a été conduite sur l'algue bleue verte "***Arthrospira platensis***" appartenant à la classe des cyanobactéries d'origine algérienne de wilaya de Tamanrasset (variété propre à la région). La souche a été aimablement fournie en culture dans des flacons de 500 mL par le laboratoire de faculté des sciences de l'Université de Yahia Farès (Médéa) ; Sous des conditions de culture bien précis.



Fig 2.1. *Arthrospira platensis* fournie en culture

2.1.1. Produits

Les produits chimiques et réactifs utilisés au cours de cette étude sont les suivants : Diclofénac (99.46%), Ampicilline (87.47%), Sulfaméthoxazole (99.84%) ampicilline (87.47%), Ibuprofène Standard (99, 34%), penecilline.G. sodique (97.54%), Amoxicilline, $NaHCO_3$, K_2HPO_4, $NaNO_3$, K_2SO_4, NaCl, $MgSO_4(7H_2O)$, $CACL_2$, $FeSO_4(7H_2O)$, EDTA, H_3BO_4, $MnCl_2.4\ H_2O$, $ZnSO_4.7\ H_2O$, $CuSO_4.7\ H_2O$, MoO_3, $C_7H_8O_2$, H_2O_2, C_3H_6O, HCl, NAOH.

2.1.2. L'appareillage

L'appareillage utilisé est le suivant

Autoclave (OTO12) ; Bec Bunsen ; Etuve (Memmert) ; Microscope optique (Optika microscopes) ; Réfrigérateur (Liebherr) ; Spectrophotomètre (2005J.Pselecta.sa) ; Agitateur (Agimatic-N) ; Balance de Kern ; Micropipette 100-1000µl (EASY AOT) ; pH mètre (pH-2005-pH Meter) ; Conductimètre Thermomètre numérique (Fance) ; Luxmètre de type 13 08SI. ; Pompe air aquarium ; Lampe ; Centrifugeuse (OHAUS).

2.2. Méthodes

2.2.1..Organisme et conditions de culture

2.2.1.1. Dispositif expérimentale de culture de la biomasse algale

Le dispositif expérimental a été structuré de manière à ce que la souche soit cultivée dans un milieu de culture favorable par la présence des éléments minéraux nécessaires à la croissance dans des flacons (photo-bioréacteurs cylindriques) de 500 mL, maintenus dans des conditions de :

- **Eclairement :** Un éclairage en jour pour les cultures (photopériode 12:12 à l'aide d'un programmateur) est assuré à l'aide d'une lumière blanche par lampe fluorescente (2500 Lux)
- **Température :** La température est maintenue à une valeur optimale de 32 °C à l'aide de thermostats réglables
- **Débit d'air :** L'agitation des cultures est assurée par barbotage d'air à l'aide de pompes à air avec un débit de 3 L/min pour assurer une bonne aération et permettre aux cellules l'accès aux nutriments et à la lumière

Les échantillons ont été prélevés chaque jour pour mesurer la densité optique (DO), détermination de la productivité et le taux de croissance spécifique.



Fig 2.2. Culture de la *spiruline* dans les conditions expérimentales

2.2.1.2. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture de référence étant le milieu standard Zarrouk (décrit par Zarrouk en 1966.) Il est composé d'eau et éléments nutritifs essentiels pour la croissance **d'*Arthrospira platensis*** Les composants de milieu sont pesés et mélangés avec l'eau distillée puis le mélange est agité pendant 20min et par la suite le milieu de culture est ajusté à pH = 9 par addition de NaOH (4N). Il est conservé à l'abri de la lumière à pH égal à 9.5, après stérilisation à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Sa composition est donnée dans le tableau **2.1.**

Tableau 2.1. Composition chimique du milieu Zarrouk (Zarrouk, 1966).

Produit chimique	Quantité en(g/l) d'eau
$NaHCO_3$	16.8
K_2HPO_4	0.5
$NaNO_3$	2.5
K_2SO_4	1.0
NaCl	1.0
$MgSO_4(7H_2O)$	0.2
$CaCl_2$	0.04
$FeSO_4$ $(7H_2O)$	0.01
EDTA	0.08

A chaque 1 litre des composants du milieu de base ci-dessus, on a ajouté 1 ml de chacune des solutions d'oligoéléments A5 et B6.

Tableau 2.2. Composition chimique de la solution A5 (Zarrouk, 1966)

Oligo-éléments	Concentration (mg /l)
NH_4VO_3	22.9
$K_2Cr_2(SO_4)_4$ $(24H_2O)$	96.0
$NiSO_4(7H_2O)$	47.8
$Na_2WO_4(2H_2O)$	17.9
$Ti_2(SO_4)_3$	40.0
$Co(NO_3)_2(6H_2O)$	44.0

Tableau 2.3. Composition chimique de la solution B6 (Zarrouk, 1966).

Oligo-élément	Concentration (g/l)
H_3BO_3	2.86
$MnCl_2$ $(4H_2O)$	1.81
$ZnSO_4(7H_2O)$	0.22
$CuSO_4$ $(5H_2O)$	0.08
MoO_3	0.015

2.2.2. Vérification de la culture d'*Arthrospira platensis*

2.2.2.1. Suivi morphologique par microscopique optique

L'observation microscopique de spiruline permet de vérifier l'état de culture et l'étape de croissance, ainsi pour mettre en évidence la mobilité et faire une approche sur la morphologie.

Cet examen se réalise en déposant sur une lame porte-objet une goutte de culture de la souche *Arthrospira platensis* à examiner, cette goutte est recouverte d'une lame couvre-objet. La préparation est examinée à l'objectif à immersion (100x), après dépôt d'une goutte d'huile immersion, Observation :

- Grossissement 10X,40X,100X.
- Diapharagme quasiment fermé pour augmenter le constraste.
- Une intensité lumineuse ajustée.

2.2.2.2. Suivi analytique par spectroscopie UV-Vis

L'évolution de la biomasse algale a été mesurée par absorption a une longueur d'onde de lecture λ = 618 nm ont pour but de se concentrer sur l'adaptabilité et la croissance de la biomasse.

2.2.3. Schéma de production de laccase et peroxydase par spiruline

2.2.3.1. Induction de l'activité de peroxydase

La Production de peroxydase à partir de biomasse algale *Arthrospira platensis* a été réalisée dans des flacons de 250 mL. Dans des conditions de culture ordinale (sans gaïacol) (pH = 9,5 ; T = 25 °C ; lumière = 2000 Lux ; volume de culture = 100 mL débit d'air : 3 L/min).

2.2.3.2. Induction de l'activité laccase

Une expérience de production de laccase par la biomasse algale *Arthrospira platensis* a été réalisée dans des flacons de 250 mL sous des conditions de cultures bien précises (pH = 9.5 ; T = 25 °C ; lumière = 2000 Lux ; Volume de culture = 100 mL ; débit d'air : 3 L/min).

L'activité de la laccase dans les cultures en croissance active a été induite par l'ajout de 100 µM de gaïacol (dissous dans 50% d'éthanol) au jour 0 et les cellules cyanobactériennes ont ensuite été laissées à croitre pendant 10 jours supplémentaires. La culture sans gaïacol a été considérée comme témoin



Fig. 2.3. Montage expérimentale de production de laccase par spiruline**.**

2.2.3. Extraction et Purification partielle

2.2.3.1. Extraction de la peroxydase

- Une culture a été cultivée dans des conditions optimale : température 30°C, pH 9,0
- La culture a été centrifugé à 15000 tr/min pendant 20min.
- Le surnageant de culture homogénéisée dans 2 ml de tampon phosphate (0,5 M, pH 7,5) dans des conditions glacées.
- Ensuite,les échantillons d'homogénat ont été centrifugés à 15 000 tr/min à 4 °C pendant 15 minutes
- Puis les culots ont été jetés et le surnageant a été utilisé pour le dosage enzymatique (*Gahagan et al.,1968*).
- Le surnageant de culture obtenu par centrifugation à été soumis à une précipitation à l'acétone froide (Le filtrat de culture a été mélangé avec de l'acétone froide à un rapport volumique de 1:4 (filtrat : acétone) et incubé à -20°C pendant 1 heure 30 minutes).
- La protéine a été précipitée et recueillie par centrifugation à 10 000 g pendant 30 min. Le surnageant a ensuite été jeté et le culot résiduel séché à l'air pour éliminer tout résidu d'acétone, Le culot qui servait maintenant de source d'enzyme pour une étude ultérieure (Afreena et *al.*, 2017).

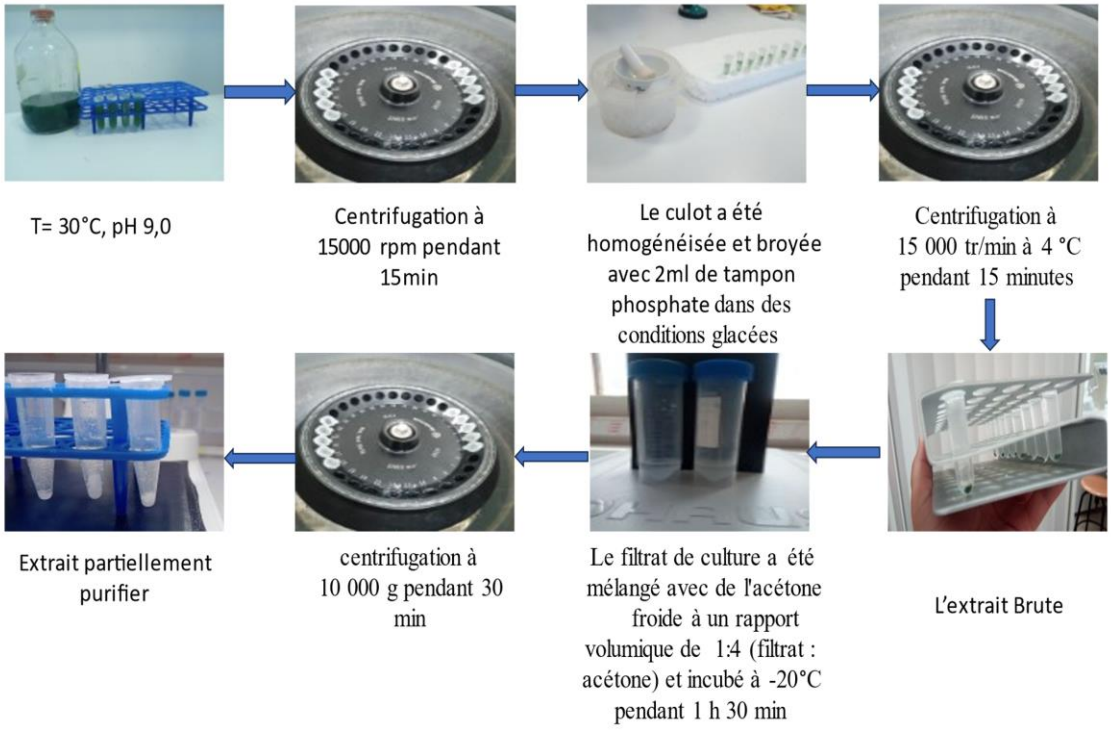


Fig2.4 : Préparation de l'extrait enzymatique de la peroxydase de Arthrospira Platensis

2.2.4.2. Extraction de laccase

Une culture a été cultivée dans des conditions optimisées : température 30°C, pH 9,0 et induite avec 2,5Mm glycoses + gaïcol ; pour une production maximale d'enzymes **(Afreena et *al.*, 2017)**. Au 4ème jour, le surnageant de culture obtenu par centrifugation à 8000 g pendant 20 min et a été soumis à une précipitation à l'acétone froide (Le filtrat de culture a été mélangé avec de l'acétone froide à un rapport volumique de 1 :4 (filtrat : acétone) et incubé à -20°C pendant 1 heure 30 minutes).

La protéine a été précipitée et recueillie par centrifugation à 10 000 g pendant 30 min. Le surnageant a ensuite été jeté et le culot résiduel séché à l'air pour éliminer tout résidu d'acétone, Le culot qui servait maintenant de source d'enzyme pour une étude ultérieure **(Afreen et *al.*, 2017).**

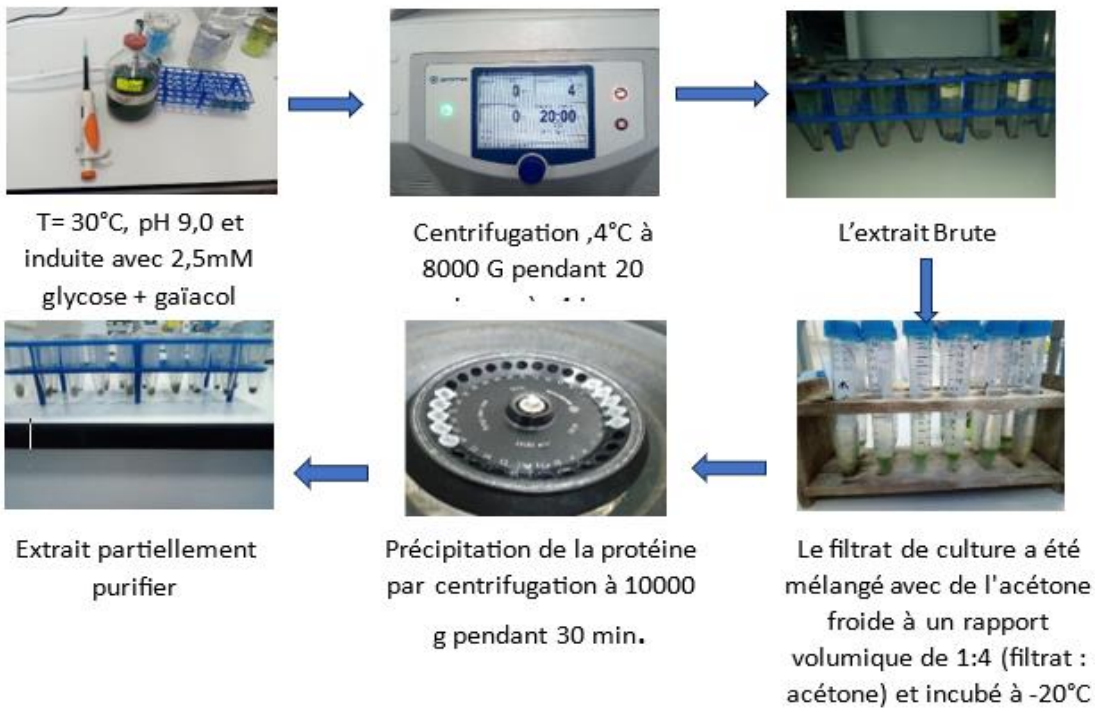


Fig 2.5 . Préparation de l'extrait enzymatique de la laccase de *Arthrospira Platensis*

2.2.4. Dosage de l'activité enzymatique

2.2.4.1. Dosage de l'activité peroxydase

L'activité peroxydase a été déterminée en suivant la méthode de *Gahagan et al.,1968*. Les cellules cyanobactériennes de différents traitements ont été homogénéisées dans 2 ml de tampon phosphate 100 mM (pH 7,0) à 5 °C. L'homogénat a été centrifugé à 10 000 g pendant

30 min. Le surnageant clair a été pris comme enzyme brute. Le mélange réactionnel a été maintenu jusqu'à 3 ml contenant :

- 1 ml de 25 mM H_2O_2.
- 1 ml de 20 mM gaïacol.
- 1 ml d'extrait enzymatique.

Au temps t0, le chronomètre est déclenché immédiatement après l'injection de 0,2 mL

De l'extrait dans le tube qui contient le mélange réactionnel. Verser le contenu du tube dans la cuve est prendre la valeur de la densité optique après la stabilisation. La même opération est répétée pour les diverses concentrations étudiées après un rinçage soigneux de la cuve. Le coefficient d'extinction molaire ξ trouvé. On mesure l'activité enzymatique de la peroxydase suivant la consommation de peroxyde d'hydrogène à 430 nm,tel que : La vitesse initiale est mesurée par le rapport de l'absorbance sur le temps Δa (430 nm)/Δt (min).

L'activité peroxydase a été calculée comme suit :

$$\textbf{Activité enzymatique } (\mathbf{U.mL^{-1}}) = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{Vr}{Ve} \times \frac{1000}{\varepsilon} \times \textit{Facteur de dilution} \qquad \textbf{Eq 2.1)}$$

Où :

- Ve : volume de l'extrait enzymatique
- Vr : volume réactionnel
- t : temps (min)
- A : Absorbances à 470 nm
- Ɛ : Le coefficient d'extinction 7425.

Les activités enzymatiques ont été exprimées en unités internationales (U), définies comme la quantité d'enzyme qui transforme 1 µmol du substrat en 1 min (Atalla et *al*., 2010).

- **Réaction catalysée**
- **Réaction générale** $\mathbf{H_2O_2 + AH_2 \xrightarrow{(peroxydase)} 2H_2O + A}$ **(Eq 2.2)**

Il s'agit d'une oxydoréduction dans laquelle, H_2O_2 sera réduit et l'autre subtrat(organique) AH_2 oxydé.

- **Réaction étudiée**

$$\mathbf{2H_2O_2 + 4gaicol\ (2méthoxy\ phénol) \xrightarrow{(peroxydase)} Tétragaicol + 8H_2O} \qquad \textbf{(Eq 2.3)}$$

(Incolore) **(Brun rouge)**

Un cycle catalytique oxyde 2 molécules de gaicol et consomme une molécule de peroxyde mais il conduit à des formes radicalaires qui se polymérisent.deux cycles sont nécessaires pour former par condensation une molécule de tétragaicol,produit coloré.

2.2.4.2. Dosage de l'activité laccase

Les échantillons ont été prélevés par centrifugation à 8000 g pendant 20 min à 4 ° C après 10 jours de culture. Le culot a été retiré et le surnageant a été utilisé pour le dosage enzymatique (déterminer la teneur en enzyme laccase).

L'activité laccase (EC 1.10.3.2) a été mesurée à 30 °C en utilisant 2 mM d'ABTS (L'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)) dans du tampon glycine HCl 0,1 M (pH 2,5). La couleur verte développée en raison de l'oxydation de l'ABTS a confirmé la présence de laccase. L'augmentation de l'absorbance du mélange d'essai a été contrôlée à 420 nm dans un spectrophotomètre Shimadzu UV3600.

Le mélange réactionnel (1000 µL) consistait en 100 µL d'ABTS, 800 µL de tampon glycine HCl 0,1 M (pH 2.5) et 100 µL de solution d'enzyme brute (surnageant). Le blanc contient tout le constituant à l'exception de l'enzyme active. Le mélange réactionnel a été incubé à 30°C pendant 2 min.

Le coefficient d'extinction (ε) de l'ABTS était de 36 000 M^{-1} cm^{-1}. L'activité laccase a été calculée comme suit :

$$\textbf{Activité enzymatique } (\mathbf{U.mL^{-1}}) = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{Vr}{Ve} \times \frac{1000}{\varepsilon} \times \textit{Facteur de dilution} \qquad \textbf{(Eq 2.4)}$$

Où :

- Ve : volume de l'extrait enzymatique
- Vr : volume réactionnel
- t : temps (min)
- A : Absorbances à 420 nm
- Ɛ : Le coefficient d'extinction de l'ABTS était de 36 000 M^{-1} cm^{-1}

Les activités enzymatiques ont été exprimées en unités internationales (U), définies comme la quantité d'enzyme qui transforme 1 µmol du substrat en 1 min (Atalla et *al.*, 2010).

La concentration en protéines a été dosée par la méthode de Bradford (1976), avec de l'albumine de séru bovin comme standard.

- **Réaction catalysée**

Ce test implique la production directe du bleu vert ABTs

Il a une absorption maximale à 420 nm, l'ajout des antioxydants au radical cation pré formé réduit son ABTs en fonction de l'activité antioxydante et de leur concentration

ABTs + Reagent $\xrightarrow{\text{(Laccase)}}$ **$ABTS^{\cdot+}$ (bleu vert)** **(Eq 2.5)**

2.2.5. Dosage de protéines totales par la méthode de Bradford

2.2.5.1. Préparation du réactif de Bradford

Le bleu brillant Coomassie G-250 (10 mg) a été dissous dans 5 ml (95 %) d'éthanol et 10 ml d'acide O-phosphorique (85 % p/v) ont été ajoutés et le volume total a été porté à 100 ml avec de l'eau distillée. La solution a été filtrée_sur Whatman n°.1 papier filtre et stocké dans une bouteille sombre à température ambiante.

2.2.5.2. Dosage des protéines

Au dosage des protéines, 0,1 ml de surnageant et 1 ml de colorant de Bradford ont été ajoutés, les échantillons ont été incubés à 37 °C pendant 5 minutes dans l'obscurité. L'absorbance a été enregistrée à 595 nm. La concentration en protéines a été calculée à l'aide d'une courbe standard en utilisant de la BSA.

2.2.5.3. Préparation de la courbe d'étalonnage

Prendre 5 tubes à essaies, y introduire : 0,1mL de l'albumine à différentes concentrations de 0 à 100 mg L^{-1} avec un pas de 25 mg L^{-1}, ajouter 0.25 mL de NaOH (1 M) et 5 mL du réactif de Bradford. Agiter puis laisser les tubes 10 minute pour développer la coloration. Chaque concentration correspond à une absorbance qui se traduit sur la courbe d'étalonnage *absorbance=f ([Albumine])*

2.2.6. Détermination de biomasse

La biomasse *d'Arthrospira platensis* est évaluée en mesurant la densité optique de la culture chaque jour à ʎ=680 nm par un spectrophotomètre (Mark A.Tedesco.Mark et *al.*,1989).

Les DO obtenues ont été converties en concentrations de cellule sèche (poids sec) en utilisant l'équation de la courbe d'étalonnage (ainas,2018)

$$\mathbf{DO = 0.1482 \times C(PS) - 0.085} \qquad \mathbf{(Eq\ 2.6)}$$

2.2.7. Dégradation *in vitro* des PEs par les enzymes de la spiruline

2.2.7.1. Par la laccase

La dégradation de 10 µg/L de diclofénac, Ampicilline, Sulfaméthoxazole, Amoxicilline, Ibuprofène et Penicilline par la laccase de *Arthrospira platensis* a été étudiée pour les PEs individuellement. Pour évaluer l'efficacité de la dégradation, des solutions mères contenant 10 µg/L de c'est polluant ont été préparées séparément dans du méthanol pur (ou eau ultra pure), puis stockées dans des des tubes à essaies recouverts de papier d'aluminium (Pour éliminer la possible dégradation de l'antibiotique à la lumière) à 18 °C avant utilisation.

Ces solutions de PEs agitées (10 µg/L ; 50 ml) tamponnées avec un tampon phosphate salin, pH 4.5, ont été incubées avec 0.2 ml de laccase de la Spiruline sur agitateur rotatif pendant quatre (04) h à 80 tr/min et 30 °C. Les expériences ont été réalisées en double dans l'obscurité et l'enzyme sans PEs a été considérée comme témoin dans l'expérience. En prenant 0,5 mL et en ajoutant 0,5 mL de méthanol pour désactiver la laccase afin d'arrêter la dégradation ultérieure.

La dégradation des médicaments a été analysée par spectrophotométrie à (λ_{max}) nm à l'aide d'un spectrophotomètre, et le pourcentage de dégradation de l'effluent a été vérifié selon la formule (Afreen et *al.*,2017)

$$\boldsymbol{D = 100\ (A_{ini} - A_{obs})/\ A_{ini}} \qquad \textbf{(Eq 2.7)}$$

Où :

- D : la dégradation (en %),
- A_{ini} : Absorbance initiale
- A_{obs} : Absorbance observée

2.2.7.2. Par la Peroxydase

La méthode sert à réaliser la bioremédiation enzymatique des polluants émergents (Diclofénac, Ampicilline, Sulfaméthoxazole, Amoxicilline, Ibuprofène et Penicilline) dans des tubes a essaies . Pour évaluer l'efficacité de la dégradation , des solutions mères contenant 10 µg/L de c'est polluant ont été préparées séparément dans du méthanol pur (ou eau ultra pure), puis stockées dans des tubes a essaies recouverts de papier d'aluminium (Pour éliminer la possible dégradation de l'antibiotique à la lumière) à 18 °C avant utilisation.

Ces solutions de PEs agitées (10 µg/L; 50 ml) tamponnées avec un tampon phosphate , pH 7, ont été incubées avec 0.2 ml de peroxydase de la Spiruline (5,3 mg de protéine/mL, 600

U/mL) sur agitateur rotatif pendant quatre (04) h à 80 tr/min et 30 °C. Les expériences ont été réalisées en double dans l'obscurité et l'enzyme sans PEs a été considérée comme témoin dans l'expérience.

La dégradation des médicaments a été analysée par spectrophotométrie à (λ_{max}) nm à l'aide d'un spectrophotomètre, et le pourcentage de dégradation de l'effluent a été vérifié selon la formule (Afreen et *al.*,2017) :

$$\boldsymbol{D = 100\ (A_{ini} - A_{obs})/\ A_{ini}} \qquad \textbf{(Eq 2.8)}$$

Références de matériels et méthodes

1. **Ainas**,.(2018).Valorisation d'une biomasse algale par un photobioréacteur pour la production d'hydrogene.
2. **Atalla, M. Mabrouk ; Zeinab, H. Kheiralla; Eman, R. Hamed ; Amani, A. Youssry and Abeer, A. Abd El Aty**.,(2010). Screening of some marine-derived fungal isolates for lignin degrading enzymes (LDEs) production.
3. **Embrasse Afreena,Farėha Banob ,Nadim Ahmad, Tasneem Fatma**.,(2017).Criblage et optimisation de la laccase de cyanobactéries avec son potentiel de décoloration du colorant anthraquinonique Remazol Brilliant Blue R.
4. **Gahagan H.E, Holm R.E**.,(1968) Effect of Ethylene on Peroxidase Activity
5. **Tedesco MA, Duerr EO.,** (1989) Light, temperature and nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of Spirulina platensis UTEX 1928. J. Applied Phycol.
6. **Zarrouk C.,** (1966), Contribution à d'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la connaissance et la photosynthèse de Spirulina maxima. Thèse de doctorat, Paris.

3. RESULTATS & DISCUSSION

3. RESULTATS & DISCUSSION

3.1. Vérification de la culture d'*Arthrospira platensis*

Dans cette partie ont basse sur la vérification de croissance de culture d'*Arthrospira platensis* dans des conditions optimales pour voir un bon développement de notre souche.

3.1.1. Suivi morphologique par microscopique optique

Observation de souche d'*Arthrospira platensis* au microscope optique à grossement ×10 et ×100 pour suivi leur développement et leur morphologie tout le long de la période de culture et d'expérimentation.

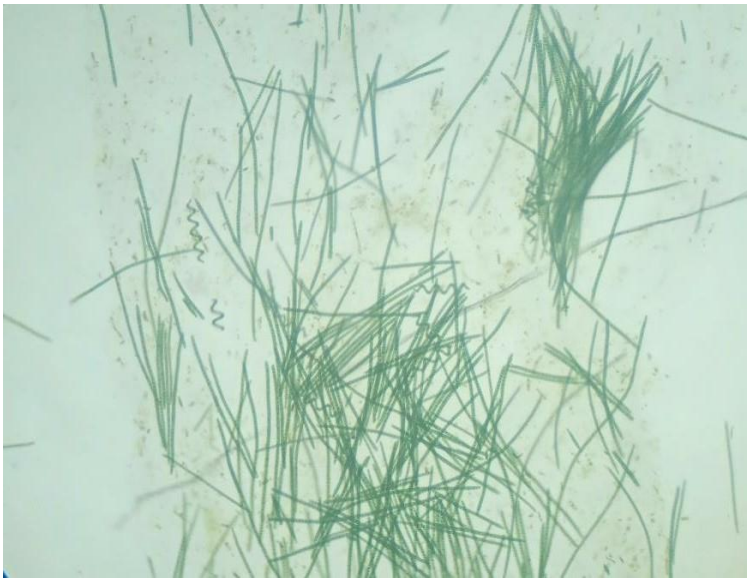


Fig.3.1. Observation microscopique d'*Arthrospira platensis* (×10)



Fig.3.2. Observation microscopique d'*Arthrospira platensis* (×100)

L'observation microscopique de spiruline à l'état frais montre qu'elle est présentée sous une forme droite et filamenteuse avec une couleur vert. Ce qui confirme que notre culture de spiruline a été en bon état de culture. (Muhling., 2000)

3.1.2. Suivi analytique par spectroscopie UV-Vis

À partir le suivi d'analyse par spectroscopie UV-Vis de notre souche on voire le développement d'absorbance *d'Arthrospira platensis* à λ_{max} = 618nm. (Tableau .3.1)

Tableau.3.1. Développement d'Absorbance *d'Arthrospira platensis* à 618nm

Jours	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
λ_{max} = 618nm	1.4	1.2	1.6	1.71	1.79	1.82	2.00	3.00	3.00	3.00

3.2. Schéma de production de laccase et peroxydase par *Arthrospira platensis*

3.2.1. Peroxydase

La figure montre les résultats du développement d'absobance de biomasse en absence de gaïacol et glucose en termes de temps. Ont détectées des fluctuations d'absorbance. On observe à J_0, J_2 et J_3 il ya une absorption moyenne (1.09, 1.18 et 1.41), qui diminuer à J_5=0.94, J_6=1.116, puis à J_6, J_7, J_8 et J_9 a été augmenté à nouveau (1.51, 1.34, 1.26 et 1.61), à pour atteindre un maximum à J_{10} = 2.36 qui indique une fluctuation dans la production de laccase au cours de temps. (Fig. .3.3)

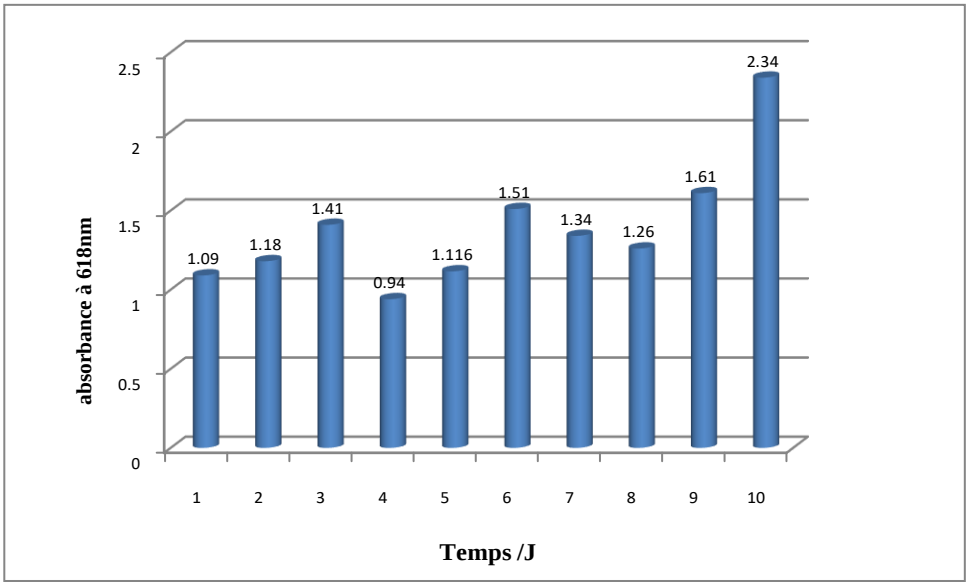


Fig. 3.3. Développement de l'absorbance en absence de gaïacol et glucose en fonction de temps

3.2.2. Laccase

La figure représente les résultats de développement de l'Absorbance de la biomasse en présence de gaïacol et glucose en fonction de temps, on observe que l'absorbance a été augmenté par rapport le temps. À ($J_{0=1.18}$ _$J_{4=1.23}$) on a une absorbance minimale qui indique une faible production de laccase par contre à ($J_{7=1.4}$_$J_{10=2.36}$) on a une absorbance maximale qui montre une production élevée de laccase en biomasse. (fig.3.4)

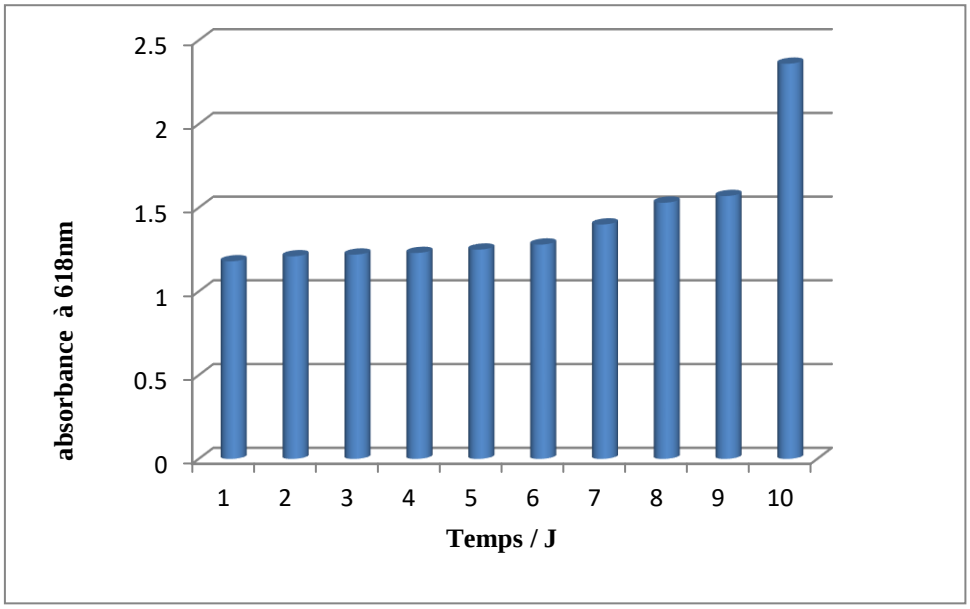


Fig.3.4. Développement de l'Absorbance de la biomasse en présence de gaïacol et glucose en fonction de temps

La figure (3.4) représente le développement de l'absorbance en présence de gaïacol et glucose on observe une augmentation de biomasse par rapport le temps jusqu'à une valeur optimal à DO=2.4.

Contrairement, voir des valeurs fluctuantes, une fois croissantes puis décroissantes de développement d'absorbance de biomasse en absence de gaïacol et glucose. Cette différentiation est due à la fois à l'effet du gaïacol et glucose que sont stimulent la biomasse à améliorer de production des enzymes (laccase), Voir (fig. 3.3).

3.2. Induction de l'activité de peroxydase et de laccase

3.2.1. Peroxydase

L'avancement de la réaction est déterminé par la mesure de l'augmentation de l'absorbance à 470 nm , qui indique l'evolution d'une couleur rouge rouille résultant de la décomposition du H2O2 qui transforement le gaiacol (substrat) au tétragaiacol**.** Voir (fig .3.4)

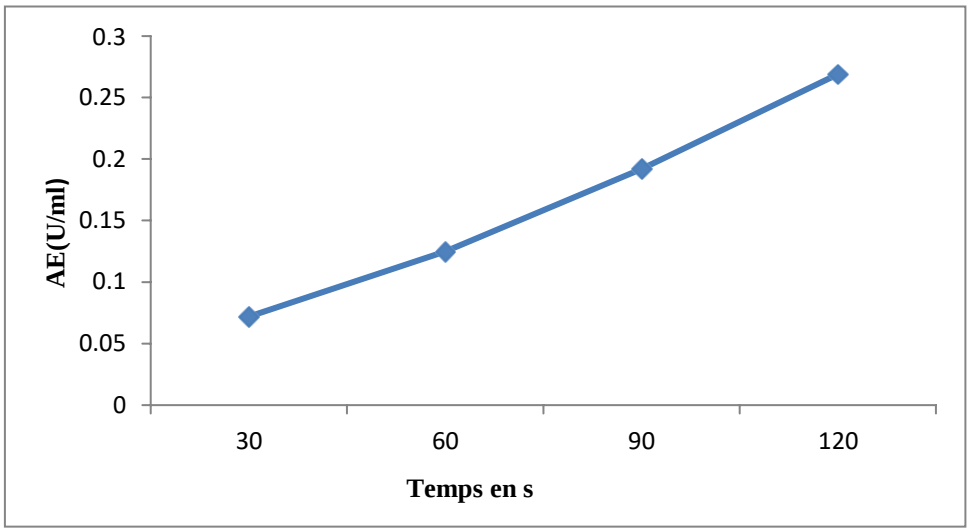


Fig.3.4. Activité enzymatique d'EEB

$$AE = 0.0025 \times 20 \times \frac{1000}{7425} \times 1$$

Donc :

$$AE = 0.0067 U/mL$$

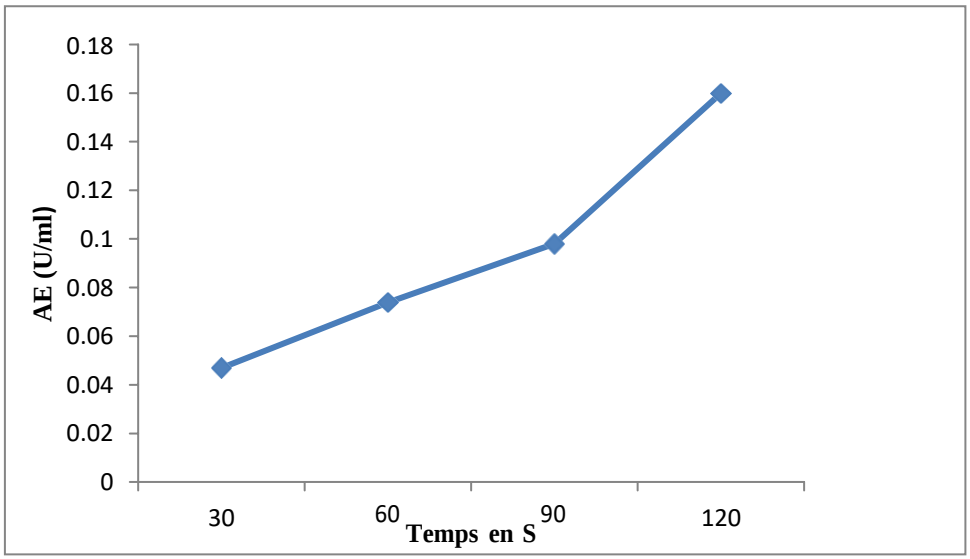


Fig.3.5. Activité enzymatique d'EEPP

$$AE = 0.0020 \times 20 \times \frac{1000}{7425} \times 1$$

Donc :

$$AE = 0.0055\ U/mL$$

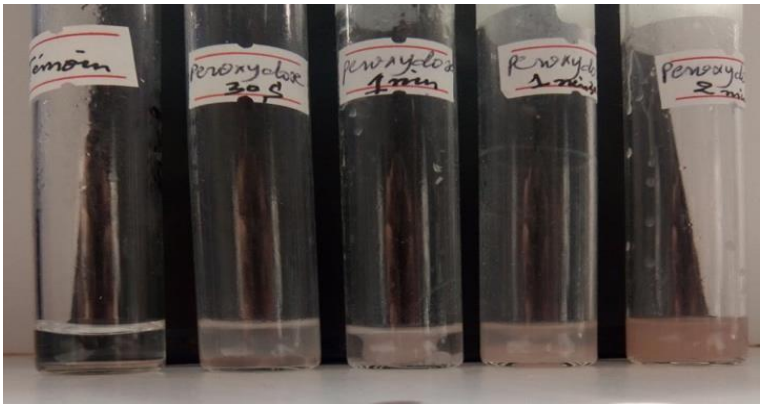


Fig. 3.6. Développement de la couleur de l'activité enzymatique

Table de purification

Le tableau de purification illustre le rôle et l'efficacité des processus de purification utilisant l'acétone, en utilisant des termes et des concepts précis. La pureté d'une préparation des protéines est exprimée en termes d'activité spécifique, qui correspond à l'activité enzymatique relative à la quantité totale des protéines dans la préparation. Cette mesure est généralement exprimée en unités enzymatiques par poids des protéines totales, où une activité spécifique élevée indique une plus grande pureté d'enzyme. (Tableau.3.2.)

Tableau.3.2. Caractéristiques des solutions enzymatiques de l'EEB et de l'EEPP de la Peroxydase.

Etape	Protéines Totales (mg/ml)	Activité Totale (UI/ml)	Activité Spécifique (UI/mg)	Facteur de Purification	Rendement (%)
EEB	36.36	0.0067	0.000184	/	100
EEPP	19.09	0.0055	0.000291	1.6	82.08

La purification d'une enzyme implique généralement un compromis entre l'obtention d'une enzyme pure (facteur de purification élevé) et le maintien d'une activité enzymatique maximale (activité spécifique élevée). Lors du processus de purification, il est inévitable de perdre une certaine quantité de matériau, ce qui peut entraîner une diminution de l'activité enzymatique.

Le facteur de purification mesure la fois où l'activité spécifique a été concentrée par rapport à l'étape précédente de purification.

Le rendement de purification quant à lui représente la proportion de l'activité enzymatique obtenue par rapport à la concentration en protéine initiale. Étant donné que des pertes de matériau se produisent lors du processus de purification, le rendement est généralement

inférieur à 100 %. Dans votre cas, le rendement diminue de 100 % à 82.08 % après la purification avec l'acétone, ce qui indique une perte d'activité enzymatique et une réduction de la quantité d'enzyme pure obtenue.

3.2.2. Laccase

L'activité de la laccase a été quantifiée en mesurant l'oxydation de l'acide 2,2'-azino-bis-(3-Éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) en son radical cationique (ABTS$^{\bullet+}$) à 420 nm (ε_{max} = 3,6 x 104 M-1 cm-1), qui se détermine par l'augmentation de l'absorbance à 420 nm , qui indique l'evolution d'une couleur vert .Les valeurs desvitesses initiales ainsi obtenus sont la pente ΔDO/min. (fig.3.7)

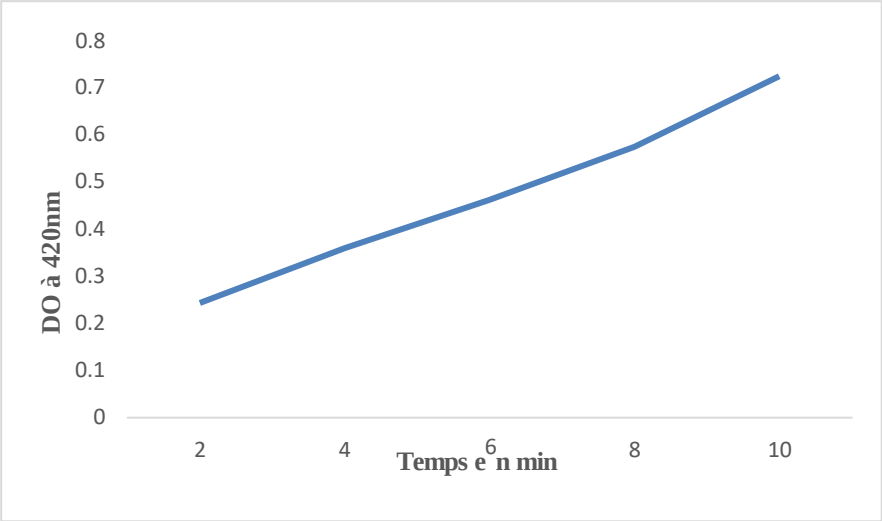


Fig. 3.7. Activité enzymatique pour EEB

Donc :

$$AE = 0.0745 \times 20 \times \frac{1000}{36000} \times 1$$

AE = 0.0413U / ml

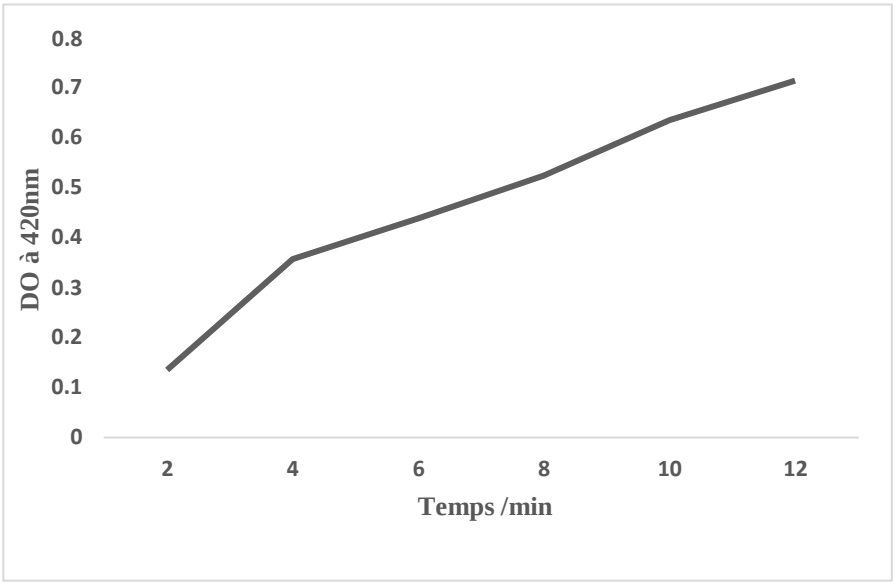


Fig. 3. 8. Activité enzymatique d'EEPP

$$AE = 0.0555 \times 20 \times \frac{1000}{36000} \times 1$$

Donc :

$$AE = 0.0308 U/ml$$



Fig.3.9. Développement de la couleur de l'activité enzymatique de l'EEPP



Fig. 3.10. Développement de la couler de l'activité enzymatique de l'EEB

Le but du tableau de purification est de démontrer le rôle et l'efficacité des processus de purification utilisant de l'acétone. Ce tableau utilise des termes et des concepts spécifiques. On évalue la pureté d'une préparation de protéines en se référant à son activité spécifique, qui représente l'activité enzymatique par rapport à la quantité totale de protéines dans la préparation. Cette mesure est généralement exprimée en unités enzymatiques par poids de protéines totales. Une activité spécifique élevée indique une plus grande pureté de l'enzyme. (tableau.3.3)

Tableau.3.3. Caractéristiques des solutions enzymatiques de l'EEB et de l'EEPP de la laccase.

Etape	Protéines Totales (mg/ml)	Activité Totale (UI/ml)	Activité Spécifique (UI/mg)	Facteur de Purification	Rendement (%)
EEB	**50**	**0.0413**	**0.000826**		**100**
EEPP	**23.6**	**0.0308**	**0.00130**	**1.57**	**74.57**

En effet, lorsqu'on purifie une enzyme, on doit trouver un compromis entre l'obtention d'une enzyme pure (avec un facteur de purification élevé) et la conservation d'une activité enzymatique maximale (avec une activité spécifique élevée). Au cours du processus de purification, il est inévitable de perdre une certaine quantité de matériau, ce qui peut entraîner une diminution de l'activité enzymatique.

Le facteur de purification mesure la concentration de l'activité spécifique par rapport à l'étape précédente de purification.

Le rendement de purification représente la proportion de l'activité enzymatique obtenue par rapport à la concentration initiale de protéines. Étant donné que des pertes de matériau se produisent pendant le processus de purification, le rendement est généralement inférieur à 100 %. Dans votre cas, le rendement est passé de 100 % à 74.57 % après la purification avec l'acétone, ce qui indique une perte d'activité enzymatique et une diminution de la quantité d'enzyme pure obtenue.

3.2. Dosage des protéines

Détermination le dosage des protéines à partir le courbe d'étalonnage de l'albumine avec une pente égale à 0,001 L.mg^{-1}. (fig.3.12)

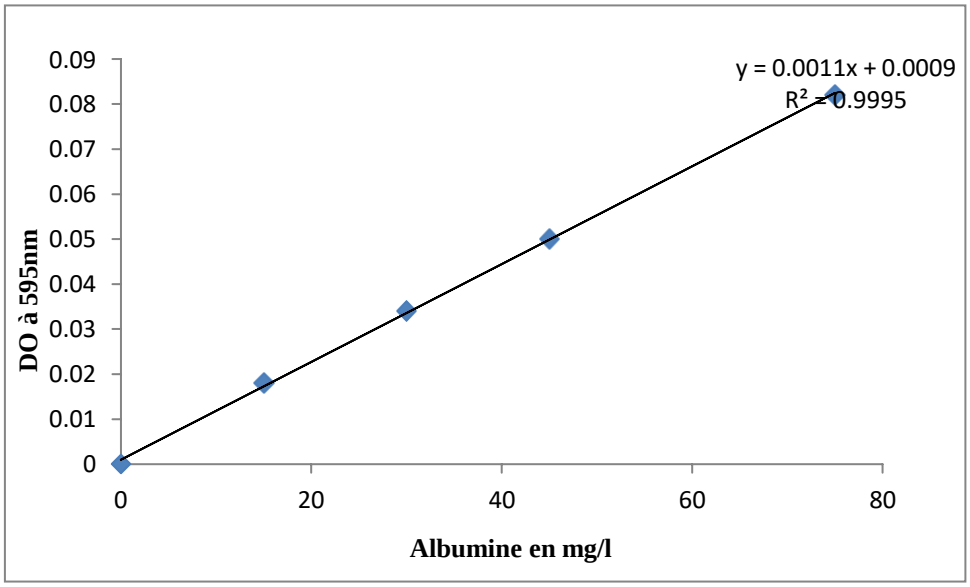


Fig. 3.12. Courbe d'étalonnage de l'albumine, avec une pente égale=0,001 L.mg^{-1}.

3.4. Détermination de Biomasse

3.4.1. Biomasse sans gaïacol

Les résultats décrits dans la figure représentent une fluctuation dans le développement de poids sec en absence de gaïacol dans les conditions optimale **;** nous remarquions un développement de Poids sec (7.2 ; 8 et 10) intensifie par rapport au l'absorbance (1.09, 1.18 et 1.41). Puis on observe à l'absorbance (1.41 et 0.94) une diminution de développement de poids sec (10,7). Qui augmente encore une fois à (1.11 ,1.26 ,1.34, 1.51 ,1.61 et 2.34) pour attendre une valeur maximale de poids sec 16 à DO=2.34.

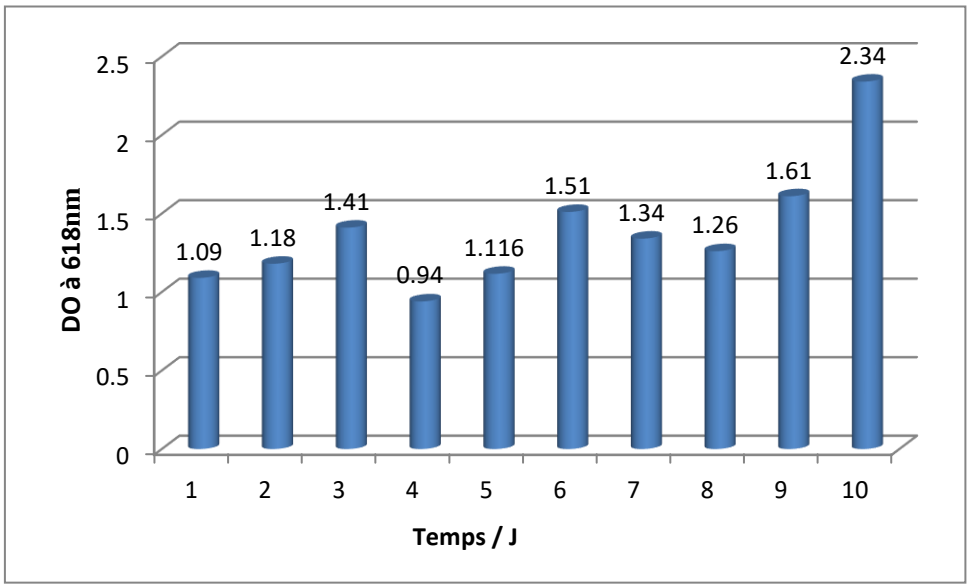


Fig. 3.13. Développement de poids sec en absence de gaïacol

3.4.2. Biomasse avec gaïacol

La figure montrer le développement de poids sec en présence de gaïacol et glucose, Où l'on note que plus l'absorption est importante, plus le poids sec est important, qui indique que le Poids sec de biomasse est donne une croissance augmenter continuellement en présence de gaïacol. Cela prouve que le gaïacol considéré comme un stimulant pour augmenter la biomasse (spiruline) et en plus de son poids sec.

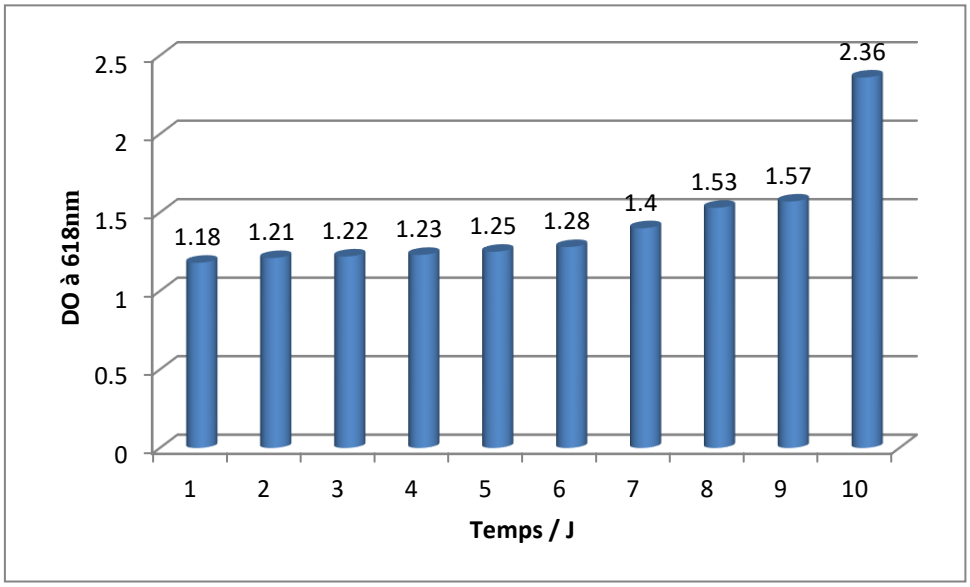


Fig.3.14. Développement de poids sec en présence de gaïacol

3.5. Dégradation des polluants émergents par Laccase

3.5.1. Dégradation des polluants émergents par EEB

La figure . 31 présente les résultats de la dégradation de 6 substanses pharmaceutiques par l'EEB après traitements de 4h à 30 °C , pH = 4 . Schématiquement, trois domaines d'efficacité d'élimination peuvent être considérés, soit élevé (70 % à 100 %), modéré (40 % à 69 %).

Avec Laccase brute, la sulfaméthoxazole (84 ,11%), la pénicilline (78,82%) et Ibuprofène (71%) ont exhibé des rendements d'élimination élevés. De plus, diclofénac (57,55%), Ampicilline (50,81%) et Amoxicilline (50%) ont été donné un rendement de dégradation moyenne.

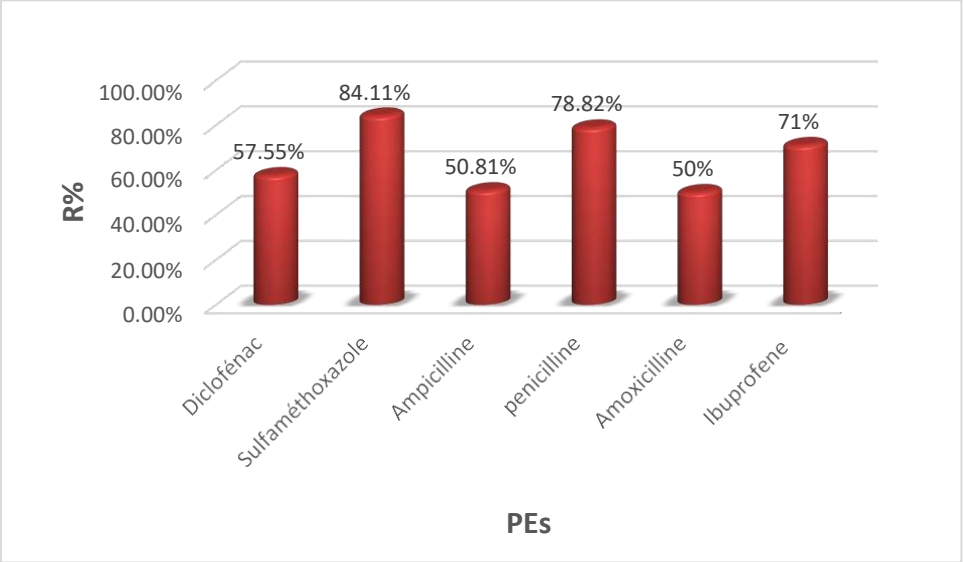


Fig.3.15. Résultats de rendement de dégradation des 6 PEs par EEB

3.5.2. Dégradation des polluants émergents par EEPP

La figure présente les résultats de la dégradation de 6 substanses pharmaceutiques par l'EEB après traitements de 4h à 30 °C , pH = 4 . Schématiquement, trois domaines d'efficacité d'élimination peuvent être considérés, soit modéré (40 % à 69 %), ou faible (39% à 1%).

Avec Laccase partiellement purifie, diclofénac (56,40%), Ibuprofène (50%) Ampicilline (44%) ont été donné un rendement de dégradation moyenne. De plus, la sulfaméthoxazole (13.15%) la pénicilline (23.91%) et Amoxicilline (31.30%) et ont exhibé des rendements d'élimination faible.

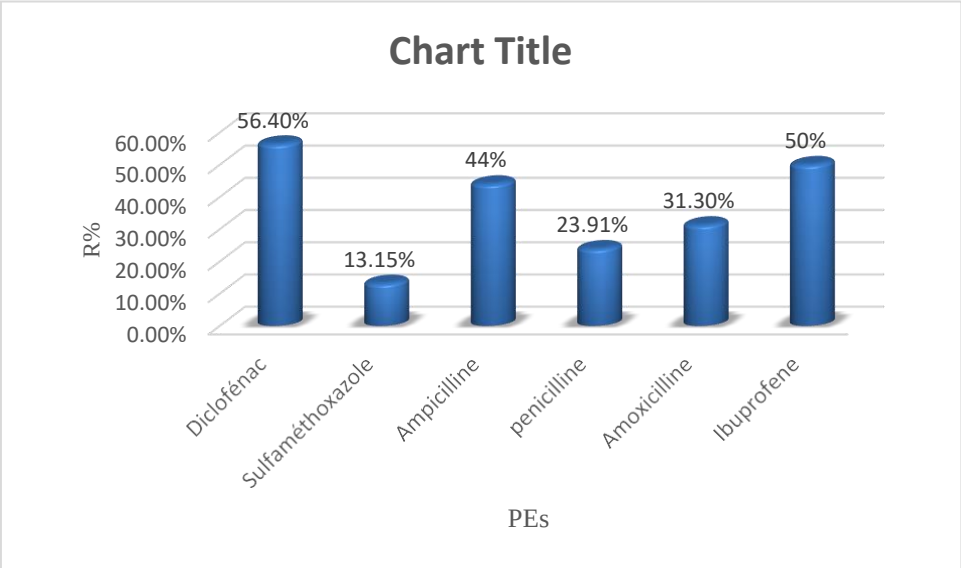


Fig.3. 16. Résultats de rendement de dégradation des 6 PEs par EEPP

Les figures (3.15 et 3.16) présente les résultats d'élimination des 06 composés d'intérêt par l'enzyme de laccase d'*Arthrospira platensis*, après un traitement de 4h, de pH= 4.

Nos résultats dégradation de pénicilline (78.82%), Ampicilline (50.81%), Amoxicilline (50%) sont en similaire avec (*Dennis Bechrd et al 2016)* travaille sur *Trametes versicolor* qui obtiennent aussi d'élimination des produits pharmaceutique, était modérée et principalement autour de 50% l'pénicilline seuls l'amoxicilline et Ampicilline après 24h ont été élimination jusqu'à 90%.

Donc les laccase seules ont été utilisé avec succès pour éliminer les produit pharmaceutiques (Prieto et *al*,. 2011 ; Kim et Nicell 2006 ; Liort et al 2013).

Pour l'élimination de sulfaméthaxazole (84.11%) par laccase cette résulta sont d'accord avec l'étude de (Truoscia li et *al*,. 2014)qui utilise laccase de *Phanerochaete chrysosporium* ,qui appliquée dans le processus de transformation dans des essais in vitro la dégradation de sulfaméthaxazole atteint le maximum 50% en 48h, mais nos résulta bien supérieur que cette dernier.

Donc le cas de dégradation du diclofénac (57.55%) par laccase de *Arthrospira platensis* cette résulta d'accord avec l'étude de (Sacher et *al*,.2010) qui travailler avec *Trametes versicolor* qui obtiennent élimination de diclofénac à l'ordre de(46.80%).mais nos résulta sont bien supérieurs à ces derniers

3.6. Dégradation des Polluants émergents par peroxydase

3.6.1. Dégradation des Polluants émergents par EEB

Le résultat obtenu représente le rendement de dégradation des 6 PEs par l'EEB après traitements de 4h à 30 °C, pH =7 ,on observe une variation de rendement de dégradation des PEs par L'EEB peuvent etre concidiré soit élevé (66 % à 75%), modéré (30% à 62%) et faible (1 % à 39 %).

Avec l'EEB La sulfaméthoxazole (66.88%), l'Ibuprofène (66.66%) et l'Amoxicilline (70.29%) ayant un rendement de dégradation élève. De plus Pénicilline (61.06%), Diclofénac (56.06%) et l'Ampicilline (31.64 %) ont été donnée un rendement d'élimination moyenne.

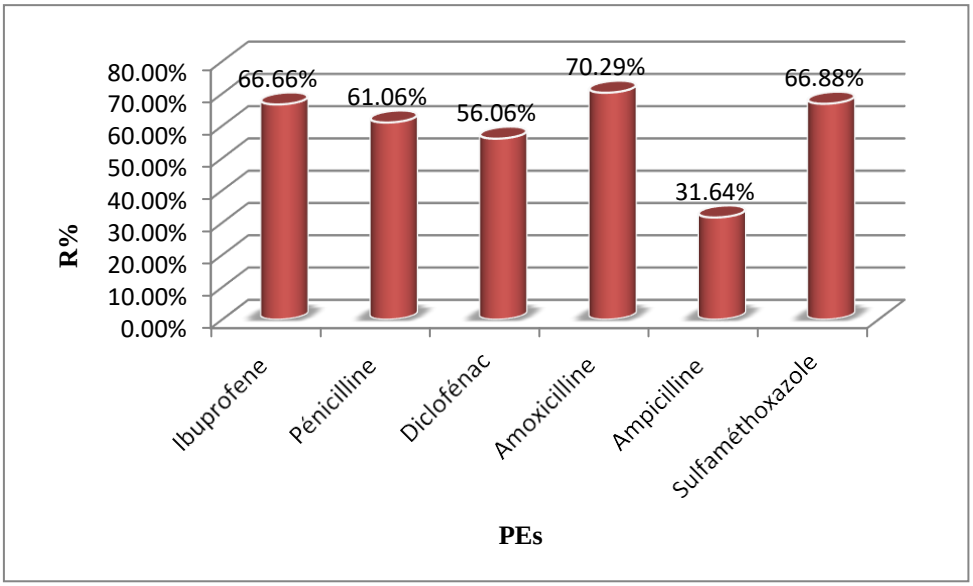


Fig.3.17. Rendement de dégradation des PEs par L'EEB

3.6.2. Dégradation des PEs par EEPP

Le résultat obtenu représente le rendement de dégradation des 6 PEs par l'EEB après traitements de 4h à 30 °C, pH =7 ,on observe une variation de rendement de dégradation des PEs par L'EEB peuvent etre concidiré soit élevé (61% à 76%), modéré (30% à 60%) et faible (1% à 39 %).

Avec l'EEB La sulfaméthoxazole (61.72%), l'Amoxicilline (76.54%) et ayant un rendement de dégradation moyenne. De plus l'Ampicilline (30%), la Diclofénac (49.31%), l'Ibuprofène (51.52%) et Pénicilline (51.58%), ont été donnée un rendement d'élimination faible.

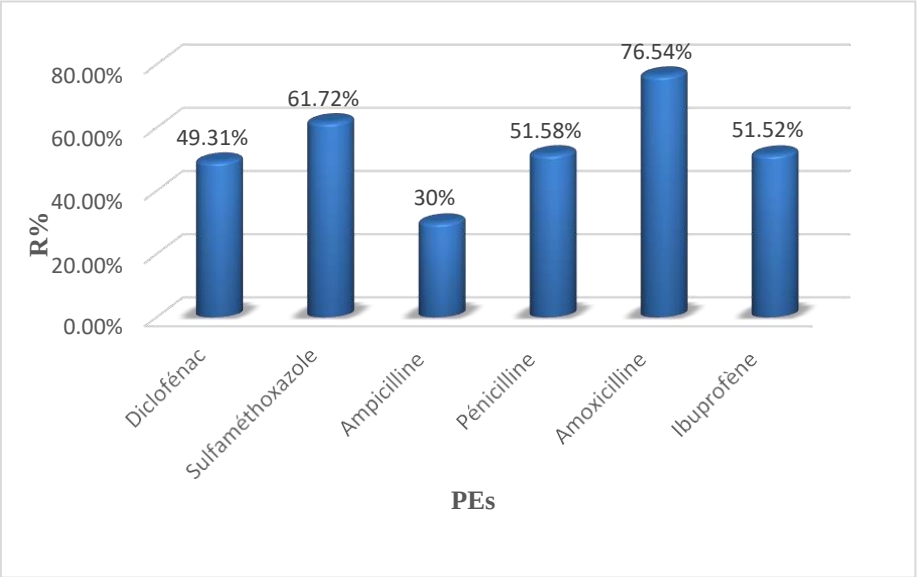


Fig.3.18. Rendement de dégradation des PEs par L'EEPP

Les résultats de cette étude démontrent l'élimination de diclofénac de pourcentage (56.06%) par peroxydase de *Arthrospira platensis*, ces résultats sont d'accord avec l'étude de (yongjum zhang., 2010) qui utilise la peroxydase de champignon de la pourriture blanche *Phanerochaete chrysosporium* a été étudiée sur sa dégradation in vitro de diclofénac à l'ordre de (10%). donc nos résultats sont supérieurs à ces derniers.

Le cas de dégradation de sulfaméthoxazole (78.13%) par peroxydase extrait de *l'Arthrospira platensis* cette résulta similaire avec (Gabriela bairan., 2022) qui travaille sur peroxydase de *Bjerkandero adusta* à un niveau supérieur (80%) donc cette résultat similaire

Références de résulta et discusion

1. **Dennis Becker, Saulo Varela, Sara RodriguezMozaz, Rob Schoevaart, Damià Barceló, Matthias de Cazes, MariePierre Belleville, José SanchezMarcano, Jean de Gunzburg, Olivier Couillerot, Johannes Völker, Jörg Oehlmann, Martin wagner,(**2016). Élimination des antibiotiques dans les eaux usées par traitement enzymatique avec un cas de lac fongique la dégradation des composés n'élimine pas toujours la toxicité
2. **Gabriela bairan,Cynthia romeroguido et Eduardo torres ,Edith chavezbravo Jossue ortizalvarez**,.(2022).Oxydation des micropolluants sulfamides par la peroxydase polyvalente de Bjerkandera adusta.
3. **Guoxia- li, Zhuzheng-wei, Lihong-li.,(**2014). Biodégradation du sulfaméthoxazole par Phanerochaete chrysosporium
4. **Kim, YJ et Nicell, JA.,** (2006). Impact des conditions de réaction sur la laccase conversion catalysée du bisphénol A. Bioresour. Technol. 97, 14311442.
5. **Lioret , L. , Eibes , G. , Moreira , MT , Feijoo , G. et Lema , JM., (**2013). composés œstrogéniques provenant d'effluents d'eaux usées secondaires filtrés dans un réacteur à membrane enzymatique continue. Identification de la biotransformation des produits. Environ. Sci. Technol. 47, 45364543
6. **Muhling.M**.(2000). Characterization of Arthrospira (Spirulina) strains., Durham theses,Durham University.
7. **Prieto, A., Moder, M., Rodil, R., Adrian, L. et MarcoUrrea, E**. (2011) Dégradation des antibiotiques norfloxacine et ciprofloxacine par une pourriture blanchechampignon et identification des produits de dégradation. Bioressource. Technol. 102 ,1098710995.
8. **Yongjun Zhang, SvenUwe Geissen**,(2010=. Dégradation in vitro de la carbamazépine et du diclofénac par la lignine peroxydase brute

CONCLUSION

De nombreux contaminants émergents sont présents dans l'environnement à des concentrations de l'ordre du ng/L au µg/L. La conversion des eaux usées en eau de haute qualité nécessitera leur élimination. Les systèmes actuels de traitement des eaux usées ne sont pas conçus pour dégrader les contaminants émergents. Les systèmes de traitement physico-chimique sont efficaces mais coûteux tandis que les approches biologiques sont bon marché.

Le développement et la mise en œuvre de la technologie enzymatique pour l'intendance environnementale. Ce travail révèle que les peroxydases et laccase sont l'un des groupes d'enzymes les plus prometteurs avec des utilisations potentielles dans divers secteurs biotechnologiques, en particulier, le traitement des contaminants environnementaux. Plus important encore, la biodégradation assistée par la peroxydase et laccase extraite est effectuée dans un moyen efficace et rentable dans des conditions environnementales douces sans l'utilisation d'instruments ou équipements avancés, pas de consommation d'énergie et sans l'utilisation de solvants toxiques pour le traitement des contaminants concernés.

Nous avons traité des polluants émergents par un procédé biologique est bioremédiation enzymatique qui met en œuvre la peroxydase et laccase extraite à partir d'une culture cyanobactérienne *Arthrospira platensis*, Les extraite était obtenue à partir d'une source peu coûteuse et très disponible, sa purification par l'acétone permet d'obtenir un extrait enzymatique partiellement purifié. La purification de la lacasse et peroxydase a été effectuée par la précipitation à l'acétone, une méthode simple et efficace.

On a conclu que la peroxydase et laccase de spiruline sont des enzymes moyennement stables. les résultats démontrent que le mécanisme la plus souhaité est bien la biodégradation tellement il y une disparition des polluants émergents après le traitement.

Le rendement de bioremédiation des polluants émergents, tels que le diclofénac, le sulfaméthaxazole, l'ampicilline, l'ibuprofène, l'amoxicilline et la pénicilline, a été jugé satisfaisant, démontrant ainsi leur capacité d'élimination. Les pourcentages de dégradation maximale obtenus sont les suivants : 84,11% pour le sulfaméthaxazole avec l'enzyme laccase brute, 56,40% pour le diclofénac avec l'enzyme laccase partiellement purifier, 70,29% pour l'amoxicilline avec l'enzyme peroxydase brute, et 76,54% pour l'amoxicilline avec l'enzyme laccase partiellement purifier.

Enfin, une application relevant du domaine environnemental a été réalisée. Il s'agit de l'élimination ou de la dépollution des eaux usées par un traitement biologique mettant en jeu la peroxydase et catalase libre et laccase de spiruline comme catalyseur.

Perspective

1. En termes de perspectives d'avenir, ce travail pourra être amélioré par : la bioremédiation enzymatique de PE par les autres enzymes qui existe dans biomasse *Arthrospira platensis*.
2. Evalué la bioremédiation enzymatique des autres polluants émergents pharmaceutiques.
3. Appliquer ce procédé sur un effluent réel
4. Recherche le mécanisme de dégradation des polluants émergents par les enzyme extrait à partir de *Arthrospira platensis*
5. Teste le procédé de bioremédiation enzymatique avec d'autre microalgue

ANNEXES

ANNEXES

1. Préparation des solutions des tampons

Les solutions tampons qu'ils sont utilisées dans biodégradation du PES par la peroxydase et laccase sont été préparées par dissolution des réactifs appropriés dans l'eau distillée sous agitation magnétique. Ces différentes solutions tampons utilisées sont :

- Solution tampon pH 3.0 ; 4.0 et 5.0 préparée par phosphate de sodium0,01M.
- Solution tampon pH 6.0 et 7.0 préparée par phosphate monopotassique 0,1M et 50mM
- Solution tampon pH 3.0 ; 4.0 préparée par Hcl glycine 0.1M

Tableau. 1 Tampon phosphate de sodium pH 4.0

Réactifs	Concentration en (mM)	Quantité g/l
NaCl	137	8
KCl	2.7	0.2
Na_2HPO_4	10	1.42
KH_2PO_4	1.76	0.24

Tableau. 2 Tampon Hcl glycine pH 3.0

Réactifs	Quantité g/l
Glycine	7.5
HCl	0.832
L'eau distillée	1000 ml

Tableau. 3 Tampon phosphate monopotassique 0.1M pH7.0

Réactifs	Quantité g/l
$Na_2HPO_4(7H_2O)$	1.78
$NaH_2PO_4(H_2O)$	0.46
L'eau distillée	100ml

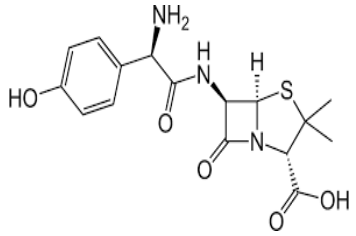
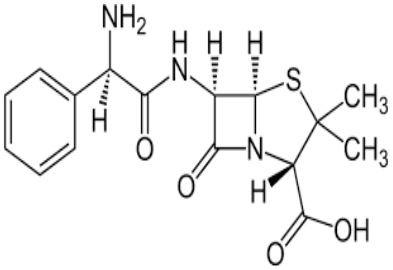
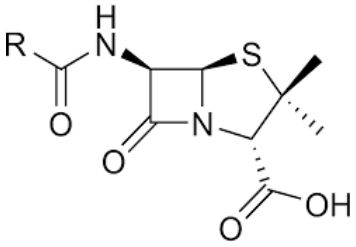
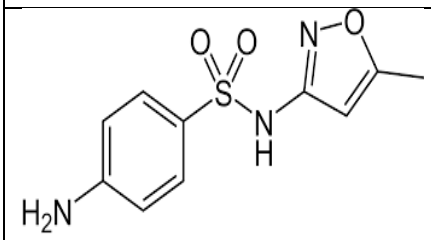
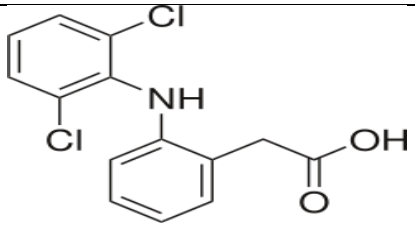
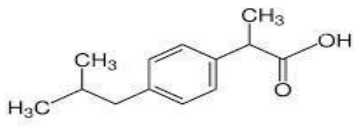
Tableau. 4 Tampon phosphate monopotassique 50mM pH7.0

Réactifs	Quantité g/l
$Na_2HPO_4(7H_2O)$	1.78
$NaH_2PO_4(H_2O)$	1.56
L'eau distillée	200ml

En ajustant le pH des solutions en utilisant les solutions de KOH 0.2 N et HCl 0.2 N,

2. Les Médicaments de choix

Tableau .5 les polluants émergents utiliser dans la bioremédiation

Amoxicilline	**Ampicilline**	**Pénicilline G**
		
Formule Brute = $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ MM= 365.40 g/mol P= 96%	Formule Brute = $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ MM= 349.406g/mol P=87.47%	Formule Brute=$C_{16}H_{18}N_2O_4S$ MM=334.4 g/mol P=97.54%
Sulfamethoxazole	**Diclofénac**	**Ibuprofène**
		
Formule Brute = $C_{10}H_{11}N_3O_3S$ MM=253.28 g/mol P= 99.84%	Formule Brute = $C_{14}H_{11}Cl_2O_2$ MM= 296.15 g/mol P= 99.46%	Formule Brute = $C_{13}H_{18}O_2$ MM= 206.28 g/mol P= 99.34%

3. Les Produits

Les produits utilisés durant cette étude sont les suivant :

Produit	**La formule Brute**	**Masse Molaire g/mole**	**La Marque**	**La Pureté %**
K_2HPO_4	Phosphate Dipotassique	174.18	Biochem Cheopharm	99%
$NaNO_3$	Nitrate De Sodium	84.99	Biochem Cheopharm	99%
K_2SO_4	Sulfate De Potassium	174.26	Riedel-De Haen	99.5%
NaCL	Chlorure De Sodium	58.44	Biochem Cheopharm	99.5%
$MgSO_4(7H_2O)$	Sulfate De Magnesium	246.47	Biochem Cheopharm	99.5%
$Cacl_2$	Chlorure De Calcium	110.99	Biochem Cheopharm	90%
$FeSO_4(7H_2O)$	Sulfate De Fer	278.01	Biochem Cheopharm	98.5%
$C_{10}H_{16}N_2O_8$	Edta	292.25	Riedel-De Haen	99.5%
H_3PO_4	Acide Phosphorique	97.994	Cheminova	100%
$MaCl_2(4H_2O)$	Chlorure De Manganese	197.9052	Bendosen	99.99
$CuSO_4(7H_2O)$	Sulfate De Cuivre	249.69	Vwr Bdh	99.8%

No3	Nitrate	62.0049	Fisher Chemicale	59.5%
HCL	Acide Chloridrique	36.458	Fluka	33%
NaOH	Hydroxyde De Sodium	40	Biochem Chemopharma	97%
CH_3CH_2OH	Ethanole	46	Specilab	96%
NH_2CH_2COOH	Glycine	75.07	Biochem Chemopharma	98.5%
$C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$	Bleu De Comassie	854.04	Biochem Chemopharma	98%
$C_{30}72H_{4828}N_{816}O_{928}S_{40}$	Bsa	68000	Biochem Chemopharma	98%
H_2O_2	Peroxyde D'hydrogene	34	Ficher Chemical	30%
H_3PO_4	Acideortho-Phosphorique	98	Cheminova	85%
Na_2HPO_4	L'hydroenop-Hosphate	141.96	Vwr Bdh Chemicals	100
K_2HPO_4	Potassium PhosphateDibasic	136.09	Biochem Chemopharma	99.5
$(CH_3)_2CO$	Acetone	58.08	Biochem Chemopharma	100%

Appareillage

Spectrophotomètre UV-visible



Spectrophotomètre à Balayage-



Centrifugeuse



Microscope Optique



Incubateur avec agitation



pH métre



Balence



Pompe aquaruim



Programateur



Autoclave

