République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de L'enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université de Médéa



Faculté de Technologie

Filière : Génie des Procédés

Spécialité : Génie de l'environnement

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Thème

L'évaluation des activités enzymatiques des microorganismes en vue d'une application industrielle

Dirigé par :

Dr. BENKIAR Amina

Présenté par :

CHATAOUI Asmaa

DAHMANI Meriem

Année universitaire : 2020/2021

Remerciements

nous tiens à remercier tout d'abord Dieu qui
M’a guidé vers le bon chemin et qui m’a donné
Le courage et la force pour d'achever ce
modeste travail.
Nous tenons à remercier notre promotrice
Dr. BENKIAR Amina
En lui témoignant notre reconnaissance
Pour sa patience, ses conseils, son encadrement,
Son partage de connaissance et de la formation
qu’elle nous a donnée.
Je remercie aussi l’ensemble des enseignants
du département de Génie procédés qui ont
contribué à notre formation



Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Mes parents Ahmed et Zakia qui m'ont encouragé à aller de l'avant et qui m'ont donné tout leur amour pourterminer mes études. Aux quels je dois ce que je suis. Que dieu les protège.

Mon cher mari Bachir chaouch et mes chères frères, Yacine, Amine, Fayçal et mes belles sœurs Meriem et Ikram pour leur dévouement, leur compréhension et leur grande tendresse, qui en plus de m'avoir encouragé tout le long de mes études, m'ont consacré beaucoup de temps et disponibilité, et qui par leur soutien, leurs conseils et leur amour, m'ont permis d'arriver jusqu'à ici car ils ont toujours cru en moi.

A mes amies Assia, Souad, Imen et Asma Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs et des amies sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

Et en dernier toute ma famille DAHMANI et BEKHAT surtout ma tante Lamia que je l'aime beaucoup et ma deuxième famille CHAOUCH

Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et encouragements. Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez quotidiennement et votre bonté exceptionnelle. Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.

MERIEM



Dédicace

Je dédie ce modeste travail aux deux êtres qui me sont très chers Dans cette vie, à savoir mon père et ma mère. Je te dis merci et mille fois merci maman pour ton éducation ta patience, ton courage et ton sacrifice pour moi. Je te dis merci papa du fond de mon cœur pour ton éducation, ton sacrifice, ton assistance et pour ce que tu as fait et qui m'a permis d'avoir cette réussite et ce bonheur.

A mes sœurs (Amina et Abire).

A mon frère Abd elftah.

A toute ma famille.

A tous mes amis (Nedjma et Marwa)et

à tous mes collègues

Et à tous ceux qui m'ont soutenu durant tout mon parcours

Asma

Résumé

Cette étude à pour principal objectif l'évaluation des propriétés enzymatiques de la micro-algue *« chlorella sorokiniana »* nouvellement isolée à partir des effluents industriels. Cette souche a été cultivée en milieu Tris-Acétate-Phosphate (TAP) en condition Mixotrophe (source de lumière et de carbone) et a montré une croissance significative avec une production importante de la chlorophylle (a+b). En plus, leurs pouvoirs enzymatiques (protéolytique et kératinolytique) ont été misent en évidence dans le surnageant normal et méthanoïque de la culture. Les dosages des différentes activités enzymatiques dans les différentes conditions ont montré que cette micro-algue possède des enzymes intra et extracellulaire doté de plusieurs activités enzymatiques à savoir l'activité protéolytique au pH neutre et basique et l'activité kératinolytique.

Mots clés : Micro-algue, Enzyme, Protéase, Kératinase.

ملخص

الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تقييم الخواص الأنزيمية للطحالب الدقيقة المعزولة حديثا « *chlorella sorokiniana*» من المخلفات الصناعية السائلة. تم نمو هذه السلالة في وسط تريس-أسيتات-فوسفات (TAP) تحت ظروف التغذية المختلطة (مصدر الضوء والكربون) وأظهرت نموًا بارزا مع إنتاج كبير للكلوروفيل (أ + ب). بالإضافة إلى ذلك ، تم إثبات قواهم الأنزيمية (المحللة للبروتين والكيراتين) في الطاف الطبيعي والميثانولي لوسط النمو. أظهرت فحوصات الأنشطة الأنزيمية المختلفة في ظل الظروف المختلفة أن هذا الطحلب الدقيق يحتوي على إنزيمات داخل وخارج الخلية تتمتع بالعديد من الأنشطة الأنزيمية ، وهي النشاط التحلل للبروتين عند درجة الحموضة المحايدة والأساسية ونشاط الكيراتين.

الكلمات المفتاحية: الطحالب الدقيقة ، الإنزيم ، البروتياز ، الكيراتيناز.

Abstract

The main objective of this study is to evaluate the enzymatic properties of freshly isolated microalgae «*chlorella sorokiniana* » from industrial effluents. This strain was grown in Tris-acetate-phosphate (TAP) medium under mixed feeding conditions (light and carbon source) and showed prominent growth with significant production of chlorophyll (a + b). In addition, their enzymatic (proteolytic and keratinizing) powers were demonstrated in the natural and methanolic supernatant of the growth medium. Assays of different enzymatic activities under different conditions showed that this microalgae contains intracellular and extracellular enzymes that have many enzymatic activities, namely proteolytic activity at neutral and basic pH and keratin activity.

Keywords: Micro-algae, Enzyme, Protease, Keratinase.

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale

Revue bibliographique

Chapitre 1 : Les enzymes

1.1. Définition **01**

1.2. Classification des enzymes **01**

1.3. Phénomène mis en jeu dans un cycle catalytique enzymatique **02**

1.4. Les protéases **03**

1.4.1. Classification des protéases **03**

1.4.1.1 Exopeptidases **04**

1.4.1.2. End peptidases **05**

1.5. Définition de la Kératine **06**

1.5.1. Les kératinases **06**

1.5.2. Sources microbiennes des kératinases **07**

1.6. Les facteurs influençant la production de protéases **07**

1.7. Les protéases et l'industrie **08**

1.7.1. Industrie alimentaire **09**

1.7.2. Industrie pharmaceutique et médicale **11**

1.7.3. Détergents **11**

1.7.4. Tanneries **11**

1.7.5. Autres applications **12**

Chapitre 2 : les micro-algues

2.1 Présentation générale des micro-algues **13**

2.2. Différents types des algues **14**

2.3. Reproduction **14**

2.4. Composition des micro-algues **15**

2.5. La photosynthèse **15**

2.5.1. Organites et molécule de la photosynthèse **17**

2.5.2. Mécanisme de la photosynthèse **18**

2.6. Application des micro-algues **18**

2.6.1. Applications alimentaires **19**
2.6.2. Applications pharmaceutiques **19**
2.6.3. Application cosmétique **19**
2.6.4. Agrofournitures et traitement de l'eau **20**
2.7. Milieu de culture **20**
2.8. Conditions opératoires **21**
2.8.1. La réponse à la lumière **21**
2.8.2. Température **21**
2.8.3. Salinité **22**
2.8.4. Potentiel d'hydrogène (pH) **22**
2.8.5. Taux d'oxygène **22**
2.9. Contenu en nutriment **24**
2.10. Evolution de la croissance **25**
Partie expérimentale
3.1. Introduction **26**
3.2. Matériels et méthodes : **26**
3.2.1. Verreries et petits matériels **26**
3.2.2. Produits chimiques et réactifs **27**
3.2.3 Solution Tampons **28**
3.2.4 Milieu de culture **28**
3.3. Les méthodes utilisées **30**
3. 3.1. Cinétique de croissance et production de chlorophylle **30**
3. 3.2. Dosage de l'activité protéolytique **30**
3.3.3. Dosage de l'activité kératinolytique **32**
3.4. Conclusion **32**
Résultats et discussion
4.1. Introduction **34**
4.2. Cinétique de croissance des micro-algues **34**
4.3. Production de chlorophylle **35**
4.4. Pouvoir des micro-algues à produire des enzymes **36**
4.4.1. Les enzymes protéolytiques **36**
4.4.1.1. Test qualitatif **37**
4.4.1.2. Test quantitatif **37**

4.4.2. Les enzymes kératinolytique **40**

4.4.2.1. Test qualitatif **40**

4.4.2.2. Test quantitatif **41**

4.5. Conclusion **42**

Conclusion générale

Conclusion générale **44**

Référence bibliographique **45**

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU	TITRE	PAGE
Tableau 1.1	Différentes classes des enzymes	1
Tableau 1.2	Classification des protéases	4
Tableau 1.3	Exemples de protéases commerciales	8
Tableau 2.1	Principales espèces phytoplanctoniques représentatives des coursd'eau européens	14
Tableau 3.1	Matériels utilisés	29

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
Figure 1.1	Phénomène mis en jeu dans un cycle catalytique enzymatique	3
Figure 2.1	Schéma d'une cellule de *Chlorella*	15
Figure 2.2	Schéma d'un chloroplaste	17
Figure 2.3	Schéma général de processus de la photosynthèse	18
Figure 2.4	Schéma du cycle de Calvin	19
Figure 2.5	Diversité du champ d'application de microalgues	22
Figure 2.6	Représentation schématique du taux de croissance des algues en culture.	25
Figure 4.1	Profils de croissance des micro-algues	36
Figure 4.2	Profils de production de la chlorophylle par les micro-algues	38
Figure 4.3	Mise évidence de l'activité protéolytique des micro-algues : A) extrait normal, B) extrait méthanoïque	40
Figure 4.4	Résultats du dosage protéolytique dans l'extrait normal	40
Figure 4.5	Résultats du dosage protéolytique dans l'extrait méthanoïque	40
Figure 4.6	Résultats du dosage protéolytique dans l'extrait normal	41
Figure 4.7	Résultats du dosage protéolytique dans l'extrait méthanoïque	42
Figure 4.8	Mise évidence de l'activité kératinolytique des micro-algues	43
Figure 4.9	Résultats du dosage kératénolytique dans l'extrait normal	43
Figure 4.10	Résultats du dosage kératénolytique dans l'extrait méthanoïque	44

LISTE DES ABREVIATIONS

CID: Le carbone inorganique dissous

CO_2: Dioxyde de carbone

DHA: Acide hexanoique

E: Enzyme

EPA: Acide Ecosapentanoique

GNL: Gélose nutritive a base de lait

H : heure**.**

HCO_3: Bicarbonate

PH: Potentiel hydrogène

PQ: Plastocyanine

Na Cl : Chlorure de sodium.

NADPH: Nicotinamide adénine di nucléotide phosphate

NAOH : Hydroxyde de sodium.

mL: Millilitre.

Min : Minutes

S : Substrat

TCA: Acide trichloracétique

Introduction générale

Au cours des deux dernières décennies, le développement de la microbiologie a abouti à l'obtention de matériels biologiques très divers, modifiés génétiquement ou non et susceptibles d'être utilisés dans des procédés de production de vitamines, d'hormones, de vaccins et d'enzymes. Les enzymes d'origine microbienne, présentent des propriétés et des spécificités diverses. Ces propriétés reflètent de plus en plus leurs utilisations dans divers domaines d'applications, tels que l'industrie alimentaire humaine et animale, les détergents pour lessives, l'industrie des tanneries et l'industrie pharmaceutique [1]. Parmi ces enzymes on trouve les enzymes protéolytiques ou protéases qui sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines. Par la diversité de leurs applications, elles représentent l'un des plus grands groupes d'enzymes industrielles. De plus, les protéases sont ubiquistes ; elles se retrouvent aussi bien chez les plantes que chez les animaux et les microorganismes. Cependant, grâce à leur diversité biochimique extensive, les microorganismes représentent une source exceptionnelle de protéases. En effet, quarante pour cent des enzymes industrielles sont produites par les microorganismes. Celles-ci possèdent plusieurs avantages comme leur qualité GRAS (Generally Regarded As Safe) et leur aptitude à produire une large gamme d'enzymes extracellulaires [2]. Parmi ces microorganismes, on trouve les micro-algues qui ne sont pas étudiés jusqu'à présent.

Les micro-algues sont consommées depuis des milliers d'années dans le monde. Par exemple, des traces de la consommation de diverses espèces de micro-algue au Mexique du temps des Aztèques ont été retrouvées. L'Europe et les pays industrialisés utilisent des micro-algues en tant que compléments alimentaires pour lutter contre la malnutrition ainsi que pour l'aquaculture [3]. Elles sont cultivées en milieu extérieur, dans des raqueras, ou en milieu fermé, dans des photo-bioréacteurs [4]. Unicellulaires ou pluricellulaires indifférenciées, ce sont des micro-organismes généralement photosynthétiques eucaryotes ou procaryotes.

Le but de ce travail est l'évaluation du pouvoir enzymatique des micro-algues et les exploiter dans le domaine industriel. Dans cette optique, le manuscrit est donc structuré en deux grandes parties. La première partie propose une mise au point bibliographique mettant l'accent sur deux principaux volets qui sont les enzymes notamment les protéases, leurs origines et leurs domaines d'application et les micro-algues.

Dans la deuxième partie qui sera consacré à l'aspect pratique de ce travail, nous avons décrit en détail la cinétique de croissance des micro-algues, la production de chlorophylle, leurs pouvoir à produire des protéases et les méthodes de dosage de ces activité enzymatique. Les résultats obtenus sont ensuite discuté. Et enfin une conclusion générale qui résume l'essentiel du travail et les perspectives envisagé.

Chapitre 1 :

Généralités sur les enzymes

Généralités sur les enzymes

1.1. Définition

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protéique. Les catalyseurs augmentent la vitesse d'une réaction lente ou imperceptible sans subir aucune transformation en ce qui concerne leurs structures initiales. Le développement récent du concept des catalyseurs au dix-neuvième centenaire a évolué pas à pas avec la découverte de puissants catalyseurs de source biologique. Ceux-ci ont été appelés ENZYMES et ensuite identifiés comme protéines [5]. Les enzymes sont des protéines fabriquées par l'organisme [6]. Elles sont constituées des milliers d'acides aminés liés en une chaine linéaire. Ces acides aminés diffèrent dans leur nature chimique, sont liés entre eux par des liens covalents appelés liens peptidiques. L'enzyme permet l'activation ou l'accélération de réactions chimiques. Il en existerait environ 15.000 protéines chez l'homme [5]. Ces enzymes jouent un rôle dans toutes les fonctions, comme la digestion avec des enzymes intervenant dès le stade buccal comme les amylases [6]. Il existe plusieurs types d'enzyme tel que ; lipase, protéase… etc.

1.2. Classification des enzymes

Les enzymes sont classées en fonction des réactions qu'elles catalysent. on distingue six familles (Tableau 1.1)

Tableau 1.1 : Différentes classes d'enzyme [7].

Classe	**Réactions catalysées**
EC 1 Oxydo-réductases	Oxydo-réduction (transfert d'oxygène)
EC 2 Transférases	Transfert de groupes fonctionnels
EC 3 Hydrolases Coupure	une molécule avec fixation d'eau (hydrolyse)
EC 4 Lyases Coupure	autre que l'hydrolyse
EC 5 Isomérases	Remaniement interne d'une molécule
EC 6 Ligases Synthèses	de nouvelles molécules par addition d'éléments

1.3. Phénomène mis en jeu dans un cycle catalytique enzymatique

Quelque soit le type de réaction catalysé, un cycle catalytique enzymatique se déroule généralement en quatre étapes [8] :

a) diffusion des réactifs dans le milieu ;

b) reconnaissance enzyme substrat : elle est réalisée grâce à la complémentarité structurale entre le substrat et le site actif. La formation du complexe enzyme-substrat (E-S) peut s'expliquer soit par le modèle de simple complémentarité stérique, soit par celui de l'ajustement induit. La fixation E-S est réalisée par établissement de liaisons hydrogènes, interactions hydrophobes, et liaisons de Vander Wals. Cette approche du substrat vers l'enzyme, peut induire une modification de la géométrie du site actif pour une meilleure orientation du groupe réactionnel ;

c) mécanisme catalytique l'enzyme :et son substrat sont associés par diverses forces d'interaction ils constituent alors un ou plusieurs intermédiaires réactionnels instable qui permettent d'abaisser la barrière d'énergie de la réaction et d'aller vers la formation des produits .C'est la reconnaissance enzyme substrat qui permet le rapprochement de certains groupes fonctionnels et facilite ainsi la rupture et la formation de certaines liaisons du substrat ;

d) Expulsion des produits :une fois l'étape catalytique proprement dite effectuée, le produit formé reste transitoirement fixé à l'enzyme par des interactions de faible énergie. Il est en suite libéré pour permettre à l'enzyme de retrouver sa conformation native plus stable [9]. La figure 1.1 suivante résume l'ensemble de ces étapes :

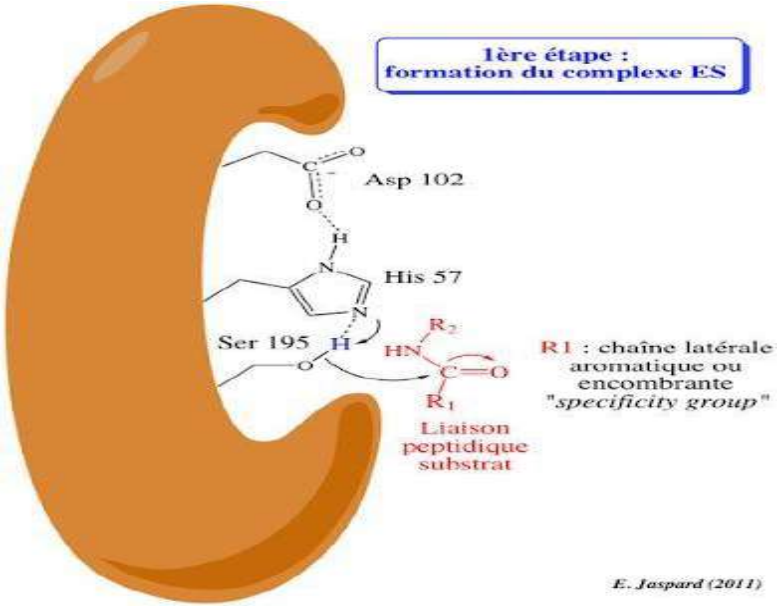


Figure 1.1 : Phénomène mis enjeu dans un cycle catalytique enzymatique [10].

1.4. Les protéases

Les enzymes protéolytiques (protéases ou protéinases) font partie de la classe des hydrolases [11]. En effet, ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique et sont produites extra cellulairement comme intra cellulairement. Ces enzymes sont généralement synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, ce qui permet de protéger la cellule contre tout effet désastreux. L'activation du zymogène en enzyme active nécessite une modification covalente irréversible. La formation des enzymes protéolytiques est parfois réprimée par l'adjonction au milieu d'un hydrolysat de protéines ou d'un mélange d'acides aminés Elles ont beaucoup de fonctions physiologiques, variant de la digestion générale des protéines à des processus régulatrices plus spécifiques [12].

1.4.1. Classification des protéases

Les protéases sont divisées en deux groupes selon leur site d'action, soit les protéases intracellulaires et extracellulaires. Les protéases intracellulaires sont importantes pour une variété de processus cellulaires et métaboliques comme la sporulation et la différentiation, la maturation d'hormones et d'enzymes, et la maintenance du pool de protéines cellulaires. Ce type de protéase est moins intéressant à utiliser en industrie car ces enzymes nécessitent une étape de lyse cellulaire pour en faire l'extraction. Les protéases extracellulaires, excrétées à l'extérieur de la cellule. Ces enzymes sont plus intéressantes à utiliser en industrie car elles ne

nécessitent pas d'étape de lyse cellulaire pour en faire l'extraction. Une centrifugation suffit pour les séparer des cellules. Les protéases se différencient également selon leur mode d'action: les endopeptidases et les exopeptidases. Les deux types de protéases sont divisés en plusieurs classes et sous-classes [12]. Tableau 1.2 présente les classes et sous-classes de protéases.

Tableau 1.2 : Classification des protéases [13]

Type de protéase	**Classes et sous-classes**
Exopeptidases	•Aminopeptidases Peptidyle peptidases • Dipeptidyle peptidases • Tripeptidyle peptidases Carboxypeptidases • Métallo carboxypeptidases • Sérine carboxypeptidases • Cystéine carboxypeptidases
End peptidases	Protéases sérines Protéases cystéines ou protéases thiols Protéases aspartiques ou protéase acide Métallo protéases

1.4.1.1 Exopeptidases

Les exopeptidases sont des protéases qui hydrolysent les liens peptidiques près des extrémités N ou C- terminales des protéines. Il existe deux classes d'exopeptidases: les aminopeptidases et les carboxypeptidases. Ces enzymes sont très peu utilisées en industrie [12].

a) Aminopeptidases

Les aminopeptidases sont des exopeptidases qui agissent près de l'extrémité N-terminale des protéines. Elles libèrent ainsi un seul acide aminé, un dipeptide ou un tri peptide, d'où les sous-classes. Beaucoup d'aminopeptidases sont spécifiques aux protéines ayant un résidu méthionine en position N-terminale, qui est alors libéré sous l'action de ses protéases.

b) Carboxypeptidases

Les carboxypeptidases sont des exopeptidases qui agissent près de l'extrémité C-terminale des protéines. Elle libère ainsi un seul acide aminé ou un dipeptide. Les carboxypeptidases sont divisées en trois sous classes, soit les sérines carboxypeptidases, le métallo carboxypeptidases et les cystéines carboxypeptidases, selon la nature des acides aminés présents au site actif de l'enzyme et selon leur mécanisme catalytique [13].

1.4.1.2. Endopeptidases

La plupart des enzymes utilisées en industrie sont des endopeptidases. Elles sont caractérisées par leur action hydrolytique à un site spécifique de la chaîne polypeptidique loin des extrémités Nterminale et C- terminale. La présence d'un groupement amino ou carboxyl libre peut avoir un effet répresseur sur l'activité de ces protéases. Les endopeptidases sont divisées en 4 classes selon leur mécanisme catalytique : les protéases cystéines, les métallo-protéases, les protéases aspartiques et les protéases sérines [13].

A. Protéases cystéines

Les protéases cystéines, ou thiols, sont très peu utilisées en industrie. Ces protéases sont présentes autant chez les procaryotes que chez les eucaryotes. La plupart des protéases de cette classe sont activées seulement en présence d'agents réducteurs comme la cystéine ou l'acide cyanhydrique. La papaïne, d'origine végétale, est la seule protéase de cette famille employée de façon significative en industrie.

B. Métallo-protéases

Les métallo-protéases forment un groupe de protéases très variées. Ces enzymes contiennent un ion métallique divalent, le plus souvent le Zn2+, nécessaire à leur activité. Les métallo- protéases sont habituellement des protéases dites neutres, ayant un pH optimum se situant près de 7, certaines métallo-protéases sont des protéases alcalines, avec un pH optimum autour de 10. Les métallo-protéases sont formées par plusieurs espèces du genre *Bacillus,* comme B. *subtilis, B. cereus, B. megaterium* et *B. stearo* Thermophilus [12]. Elles sont également produites par des moisissures comme *Aspergillus oryzae*.

C. Protéases aspartiques

Les protéases aspartiques, également connues sous le nom de protéases acides, sont des protéases dont l'activité catalytique dépend d'un résidu acide aspartique présent au site actif del'enzyme. La plupart des protéases aspartiques ont une activité maximale à de faibles pH, généralement entre 3 et 4. Leur masse moléculaire se situe généralement entre 30 et 45 kDa. Ces enzymes présentent un intérêt industriel dans les secteurs ou l'hydrolyse des protéines à faible pH est désirée.

D. Protéases à sérines

Les protéases sérines sont une sous-classe d'endopeptidases d'une grande importance au niveau industriel. La très grande majorité des protéases alcalines, très employées en industrie, sont des protéases de type sérine. Ces protéases sont caractérisées par la présence d'un résidu sérine au niveau de leur site actif, ainsi que de résidus aspartate et histidine formant le complexe actif avec le résidu sérine. Elles sont présentes chez les virus, les bactéries et les eucaryotes. Ces protéases ont généralement un pH optimal de 10, mais il peut varier entre 7 et11.

1.5. Définition de la Kératine

La kératine est une protéine fibreuse, constituant principal des phanères, c'est-à-dire des poils et des ongles. Dans certaines circonstances la kératine peut se développer au niveau de la peau, formant une callosité ; on dit alors que l'épiderme est kératinisé, voire hyperkératinisé si le processus est important [14].

1.5.1. Kératinases

Les kératinases sont généralement des protéases a serines ou des métalloprotéases qui hydrolysent les kératines [15]. La kératinase agit comme catalyseur potentiel dans la dégradation des déchets kératiniques sans affecter les protéines structurelles [16].

1.5.2. Sources microbiennes des kératinases

Les kératinases sont produites par les bactéries, les Actinomycètes et les moisissures. Parmi toutes les sources de kératinases, la source bactérienne est dominante, il s'agit d'espèces appartenant au genre *Bacillus*, particulièrement : *Bacillus. Licheniformis* et *Bacillus subtilis* sont les producteurs les plus efficaces des kératinases [17].

Cependant, les kératinases ont été produites aussi par d'autres souches bactériennes tel que *Pseudomonas, Chryseobacterium, Lysobacter, Nesterenkonia, Kocuria, Microbacterium, Stenotrophomonas, Serratia, et Meiothermus* [18]. Les Actinomycètes du genre [20] et *Actinomadura keratinilytica* [19]. Des champignons : Trichophyton [21] et *Microsporum* [22].

1.6. Les facteurs influençant la production de protéases

- **Effet de la salinité (NaCl)**

Comme indiqué plus haut, les protéines des halophiles et haloalcalophiles ont besoin de sel (NaCl / KCl) pour leur activité et leur stabilité. Toutefois, l'exigence de sel varie fortement. La plupart des protéines halophiles est actifs et stables jusqu'à 4 M de sel, l'optimum étant à 1-2 M [23] et inactivées et dénaturée à des concentrations inférieures à 1 M de Na Cl ou de la perte de l'activité en l'absence de sel.

- **Effet du pH**

Le pH est un facteur important qui influence la croissance des microorganismes. Le pH également a une forte influence sur la production de protéases. Hameed et al. (1999) ont démontré que la production de protéases par *B. subtilis* est maximale lorsque le pH est contrôlé durant la culture microbienne [23].

- **Effet de la température**

Enzymes thermostables sont d'un intérêt particulier pour les applications industrielles en raison de leur stabilité sous des températures élevées et la large gamme de pH. Les protéases thermophiles catalysent la réaction et maintiennent la stabilité à haute température. En outre, des températures plus élevées peuvent accélérer les vitesses de réaction, augmenter la solubilité des gaz non - réactifs et produits et réduire l'incidence de la contamination microbienne par des germes mésophiles [24].

- **Effet des solvants organique**

Ces dernières années, une classe de solvants microbes tolérants ont attiré l'attention. Ces organismes sont attrayants pour les applications dans la biorestauration solvant et biotransformation dans les milieux non aqueux et constituent une source riche de solvants enzymes stables [25].

- **Effet d'ions métalliques**

Les ions métalliques protègent l'enzyme contre la dénaturation et jouent un rôle vital dans le maintien de la confirmation actif de l'enzyme à des températures plus élevées et des concentrations en sel. Le Ca^{2+} est connu pour activer la protéase et augmenter la thermo stabilité. D'autre part les forts effets inhibiteurs des ions Hg^{2+} et de la Cu^{2+} sur les protéases alcalines de certains *Bacillus sp*. Sont également connus [26]

1.7. Les protéases et l'industrie :

Les protéases occupent une grande part du marché des enzymes industrielles. Le Tableau3 présente quelques exemples de protéases produites commercialement. Les principaux secteursindustriels employant des protéases sont :

Tableau 1.3: Exemples de protéases commerciales [27].

Nom Commercial	Firmes Productrices	Souches Microbiennes	Références

Kojizyme™	Novozymes, Denmark	*A. oryzae*	Sumantha et *al*. (2006)
Flavourzyme™	Novozymes, Denmark	*A. oryzae*	Kumar et *al*. (2008b)
Alcalase ®	Novozymes, Denmark	*B. licheniformis*	Rao et *al*. (1998)
Savinase®	Novozymes, Denmark	*B. amyloliquefaciens*	Kumar et *al*. (2008b)
Esperase®	Novozymes, Denmark	*B. licheniformis*	Rao et *al*. (1998)
Chymosinerecombinante	Novozymes, Denmark	*A. niger, A. awamori*	Kumar et *al*. (2008b)
Purafect®	Genencor International, USA	*B. lentus*	Sumantha et *al*. (2006)
Maxatase	Genencor International, USA	*B. licheniformis*	10
BLAPS	Gist-Brocades, Hollande	*B. lentus*	
Bioprase	Henkel, Allemand	*B. subtilis*	
Dispase	NagaseBiochemicals, Japon	*B. polymyxa*	
Aspergillo-pepsin I	InvitrogenCorp, USA ;	*A. saitoi*	
	BD Biosciences, USA ; etc.		
	KikkomanCorp, Japon		

1.7.1. Industrie alimentaire

Mis à part le cas de la protéase alcaline dans les détergents, les industries alimentaires constituent aujourd'hui encore le principal domaine d'application des technologies enzymatiques, qui à partir d'un nombre limité de types de réactions catalysées donnent lieu à une grande diversité d'application [27]. Les principales industries alimentaires utilisant les protéases sont :

- **Fromageries**

L'application majeure des protéases dans l'industrie alimentaire est dans la fabrication de fromages. La présure a été l'enzyme utilisée à cette fin depuis longtemps. Cependant, les fluctuations du prix de caillette et leur pénurie épisodique fait qu'elle est de moins en moins utilisée et tend à être remplacée par des protéases microbiennes [28]. Les protéases utilisées à cette fin sont produites par des microorganismes GRAS tels que *Mucor miehei, Bacillus subtilis* et *Endothiaparasitica*. Les protéases fongiques acides, alcalines et neutres produites par *A. oryzae* ont également été utilisées en industrie laitière.

- **Boulangeries**

Les endo et les exo protéinases d'*A oryzae* sont utilisées pour modifier le gluten de blé par une protéolyse limitée selon les caractéristiques désirées de la pâte ; un tel traitement enzymatique permet de réduire le temps de pétrissage. Des protéases bactériennes sont également souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte.

- **Préparation de produits à base de soja**

Les protéases neutres ou alcalines d'origine fongiques sont utilisées depuis très longtemps pour préparer la sauce de soja ainsi que d'autres produits à base de soja. Le traitement de ces protéines par la protéase alcaline "alcalase" à pH 8 permet la mise au point d'hydrolysats solubles utilisés comme additifs protéiniques dans les jus, les boissons fruitées et la formulation des aliments diététiques. Kojizyme™ est un complexe d'exopeptidases et d'endopeptidases dérivées d'*A. oryzae* utilisé dans la fermentation du sauce du soja.

- **Synthèse de l'aspartam**

Biens que les protéases soient des enzymes hydrolytiques, elles peuvent parfois catalyser la réaction inverse. Sous certaines conditions cinétiquement contrôlées, une préparation de thermolysine provenant de *Bacillus thermoprotyolyticus* est utilisée pour la synthèse de l'aspartam (un édulcorant à basse calorie) à partir de l'acide L-aspartique et de la Lphénylalanine méthyle ester. Il est produit industriellement par Toya Soda (Japon) [29].

1.7.2. Industrie pharmaceutique et médicale :

La grande diversité et spécificité des protéases est un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans le développement des agents thérapeutiques efficaces. Par exemple, des protéases d'*A oryzae* [30] sont utilisées comme aide à la digestion ; des collagénases provenant de *Clostridium sp*. Ou des subtilisines sont utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement des bruleurs, plaies et des ulcères dermiques ; la « Brinase » (une protéase acide plasmin-like) permet l'hydrolyse de la fibrine et le fibrinogène chez les patients souffrant d'une hémodialyse; une élastotérase provenant de *B. subtilis* peut être utilisée pour le traitement de furoncles, d'abcès et de plaies profondes [31].....etc.

1.7.3. Détergents

A l'heure actuelle, les protéases sont ajoutées comme des ingrédients clé dans la formulation des détergents pour usage domestiques (détergents à lessive, détergents à vaisselles), les produits de nettoyage pour usage industriels et les produits de nettoyage pour les lentilles cornéennes et les appareils dentaires. Cependant, le marché le plus important au niveau de détergents est de loin celui des détergents à lessive (. Une protéase détergente idéal doit avoir une large spécificité de substrat et stable dans l'environnement hostile de la machine à laver (température élevée et pH alcalin) [32]. Bien que la pepsine soit utilisée depuis 191[37], la plupart des protéases ajoutées dans les détergents sont produites par des souches de Bacilles [33].

Une marque de NovozymeDen mark est utilisée pour enlever les dépôts à base de protéines ainsi que les films protéiniques présentent dans les lentilles cornéennes.

1.7.4. Tanneries

Les protéases sont utilisées en tannerie depuis le début du siècle dernier pour leurs capacités à libérer les poils et la laine [28]. Les trois traitements de la peau à tanner (le reverdissage, le délainage et le confit âge) sont susceptibles de solutions enzymatiques de protéases produites par *B.* licheniformis, A. oryzae, B. amyloliquefasciens. Jusqu'à présent, l'usage des protéases aété limité car leur emploi est souvent plus coûteux que l'utilisation de produits chimiques. Par contre, l'emploi de produits chimiques comporte plusieurs inconvénients [35].

1.7.5. Autres applications :

Les protéases sont considérées aussi comme moyen efficace pour le traitement des rejets riches en protéines. La protéase neutre de *B. subtilis* peut être également utilisée pour le décreusage de la soie naturelle. Les protéases sont employées aussi avec des mélanges des enzymes hydrolytiques pour dégrader les polymères constitutifs de la matière végétale servant pour l'alimentation animale. Une autre utilisation des protéases neutres est la récupération d'argents à partir les films photographiques par hydrolyse de la gélatine [35].

Chapitre 2 :

Les micro-algues

2. Les micro-algues

2.1 Présentation générale des micro-algues

Les micro-algues contribuent à environ 40 à 50 % de l'oxygène dans l'atmosphère. Les algues sont la source originale de carbone fossile dans le pétrole brut et le gaz naturel. Les algues, à des fins pratiques, sont les seuls producteurs primaires dans les océans qui couvrent 71 % de la surface de la Terre. Les algues microscopiques et les algues soutiennent directement ou indirectement la plupart des formes de vie dans les mers [36]**.**

Ils sont des organismes photosynthétiques, et font partie des premiers organismes vivants apparus sur notre planète[37]**.** Ce sont un groupe important d'organismes photosynthétiques microscopiques procaryotes ou eucaryotes, dont beaucoup sont présents de manière unicellulaire et se trouvent dans divers environnements.

Les micro-algues n'ont pas de racine et se retrouvent dans des environnements divers [37] pouvant croître rapidement et vivre dans des conditions difficiles. Par exemples, des microorganismes procaryotes sont les cyanobactéries (*cyanophycées*) et les micro-algues eucaryotes sont par exemple des algues vertes (*Chlorophyta*) et les diatomées (*Bacillariophyta*) [38]**.** Il est estimé que plus de 50 000 espèces existent, mais seulement un nombre limité (environ 30 000) a été étudié et analysés.

Le terme phytoplancton s'avère plus approprié lorsqu' il est question à la fois d'algues et de cyanobactéries qui contient au sein de son cytoplasme de nombreux organites nécessaires à son fonctionnement et à son métabolisme chloroplastes, amyloplastes, oléoplastes, mitochondries et son noyau entouré de son enveloppe. Elle confère aux cellules une certaine résistance à la matière organique potentiellement toxique, ce qui motive leur utilisation pour le traitement des eaux**.**

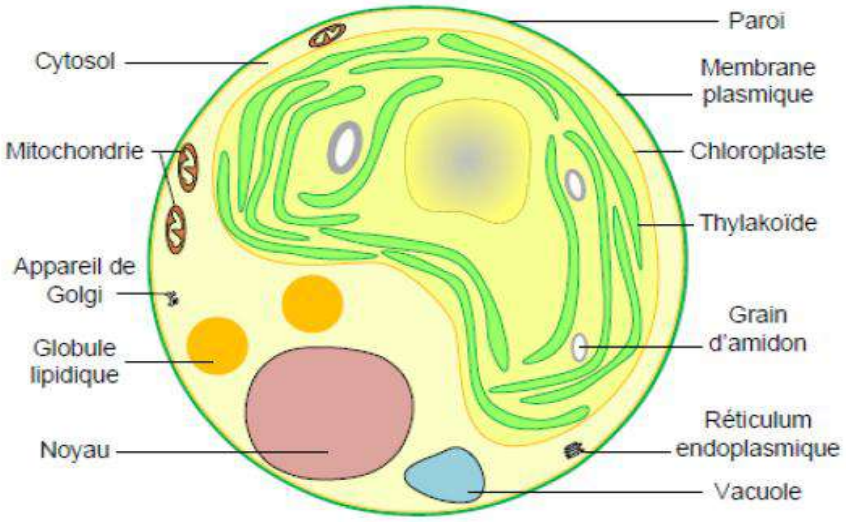


Figure 2.1. Schéma d'une cellule de micro-algue « *Chlorella* » [39].

La composition chimique de diverses algues montre leur richesse en protéines. Toutefois, le profil des acides aminés indique une déficience en méthionine et en acides aminés soufrés. En revanche, les micro-algues sont généralement riches en vitamines et en substances économiquement intéressantes. Des modifications de la composition chimique apparaissent néanmoins en fonction du milieu, du mode de culture, ou du moyen de conservation.

2.2. Différents types des algues

Dans le tableau, ci-dessous, sont regroupées les principales espèces phytoplanctoniques représentatives des cours d'eau européens

Tableau 2.1: Principales espèces phytoplanctoniques représentatives des cours d'eau européens [40]

Groupe spectrale	Groupe taxinomique	Présence	Principaux genres
Algues brunes	Diatomées (bacillariophycées)	Dominance au printemps	Stephanodiscus, skeletonema, cyclotella,(Thalassiosira)
Algues vertes	Chlorophytes	Dominance en été	Scenedesmus, Monoraphedium, Pediastrum
Algues Blues-vertes	Cyanophytes ou cyanobacteria	Abondantes en été	Oscillatoria, Microcystis
Chrysophycées	Criptophytes (cyanobactéries + riches en phycoérythrine typiquement)	Présence modérée	Rhadomas, Cryptomonas, Planktothrix, Rubescens, (cyanobactéria)

2.3. Reproduction

Les modes de reproduction chez les micro-algues peuvent être végétatives par la division d'une cellule seule ou d'une fragmentation d'une colonie, asexuée par la production de spore mobile, ou sexuelle par l'union de gamètes.

Le mode végétatif et asexué permet la stabilité d'un génotype adapté dans une espèce d'une génération au suivant. Les deux modes fournissent les moyens rapides et économiques d'augmenter le nombre d'individus en limitant la variabilité génétique.

Le mode sexuel implique plasmogamie (l'union de cellules), caryogamie (union de noyaux), association de chromosome et méioses, aboutissant à recombinaison génétique. La reproduction sexuée tient compte de la variation, mais est plus coûteuse, à cause de la perte des gamètes qui échouent à s'accoupler [41].

2.4. Composition des micro-algues

Les micro-algues ont une grande valeur biologique due à leurs richesses en [42]:

- **Fibres** : de 33 à 61% ;
- **Calcium :** les micro-algues sont une source abondante de ce minéral qui peut être jusqu'à 34% de la matière sèche ;
- **Vitamines :** surtout la vitamine B12 à des teneurs assez importantes contrairement aux plantes terrestres ;
- **Iode :** la teneur en iode des micro-algues est exceptionnelle et peut atteindre jusqu'à 14296 mg/kg matière sèche ;
- **Protéines :** Les phycobiliprotéines sont les principaux pigments des algues rouges (phycoérythrine) et bleus (phycocyanine), possèdent des propriétés antioxydantes utilisées dans les traitements de certains cancers et maladies inflammatoires liées au stress oxydatif ;
- **Polyphénols :** appelés phlorotannins chez les micro-algues, ils sont présents surtout dans les phéophycées et montrent une activité antioxydante dans les tests in vitro ;
- **Caroténoïdes :** des puissants antioxydants, les algues brunes en sont riches en plus des fucoxanthine ,β-cartène et violaxanthine. De nombreuses études ont démontré l'activité antioxydante des caroténoides et effets preventifs contre les pathologies.

2.5. La photosynthèse

Les organismes aquatiques, représentant qu'un pourcent de la biomasse totale, réalisent presque la moitié de l'activité photosynthétique sur terre. Parmi ces microorganismes, on cite les micro-algues qui constituent le phytoplancton et sont à l'origine de la majorité de la production primaire aquatique [43].

La photosynthèse est réalisée par des réactions qui transforment l'énergie solaire, le dioxyde de carbone et l'eau en biomasse et oxygène. Les pigments récoltent la lumière et les réactions chimiques sont effectuées par des enzymes. L'efficacité photosynthétique est définie comme le rapport entre la biomasse produite et l'intensité lumineuse.

2.5.1. Organites et molécules de la photosynthèse

Les cellules photosynthétiques possèdent des chloroplastes, qui sont les organites dans lesquels se déroule la réaction de la photosynthèse [44]. Un chloroplaste a la forme d'un disque aplati et mesure entre 2 et 10 µm de longueur et environ 1 µm d'épaisseur. Il possède son propre matériel génétique sous forme d'ADN circulaires, qui portent des gènes codant pour les protéines chloroplastiques.

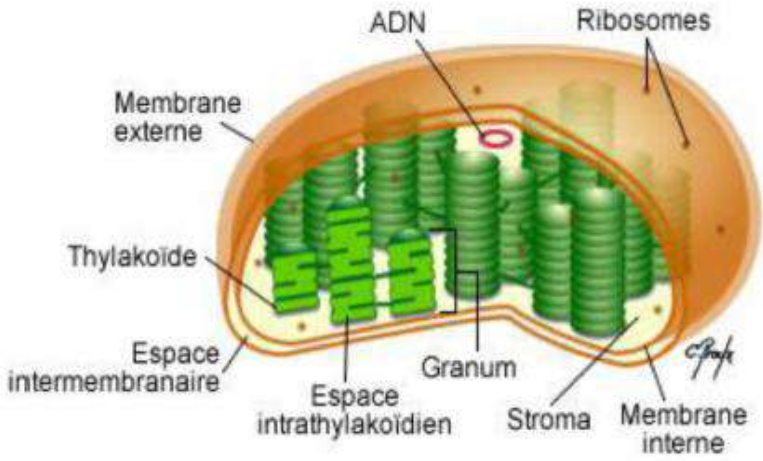


Figure 2.2. Schéma d'un chloroplaste [45]

L'enveloppe du chloroplaste comporte deux membranes, une interne et une externe. La membrane externe est une double couche formée par des phospholipides, qui est perméable aux molécules polaires. La membrane interne entoure le stroma (partie interne du chloroplaste). Elle comporte des replis, appelés « thylacoïdes », qui se prolongent dans le stroma. Les thylacoïdes contiennent des pigments essentiels de la photosynthèse,

notamment la chlorophylle [45]. La chlorophylle est un pigment apte de capter l'énergie des photons lumineux. Elle est composée d'un noyau tétrapyrollique sur lequel est accrochée une chaine carbonée [44].

2.5.2. Mécanisme de la photosynthèse

La photosynthèse se déroule en deux grandes étapes : créent de l'énergie par la production d'un agent réducteur, appelé NADPH2 et d'un composé à haute énergie, appelée ATP [46].

Phase thermochimique, également connue comme le cycle de Calvin-Benson. Phase de photolyse (conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique), cette étape se déroule dans les membranes thylacoïdes des chloroplastes qui contiennent les pigments photosynthétiques, des protéines et des enzymes. Les trois pigments majeurs sont les chlorophylles (verts), les caroténoïdes (oranges) et les phycobilines présents dans les antennes des photosystèmes I et II. Ces pigments récoltent la lumière alors que les protéines et les enzymes permettent d'effectuer les réactions chimiques. Ces réactions chimiques créent de l'énergie par la production d'un agent réducteur, appelé NADPH2 et d'un composé à haute énergie, appelée ATP [46].

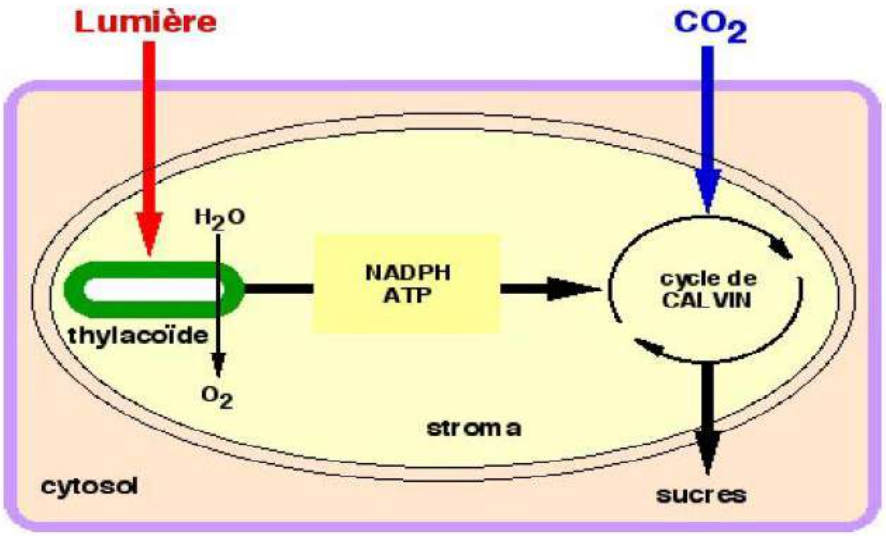


Figure 2.3. Schéma général de processus de la photosynthèse

Le cycle de Calvin peut être décomposé en trois étapes essentielles :

a) L'incorporation de CO_2 dans le RuBP (RibuloseBiphosphate): cette réaction est catalysée par la Rubis CO (Ribulose bis Phsphate Carboxylase Oxygénase). Comme son nom l'indique, cette enzyme a deux fonctions carboxylase et oxygénase ;

b) La réduction de l'APG en triosesphosphate : elle se réalise en deux étapes catalysées par la phosphoglycérokinase (PGK), puis par le glycéraldéhyde phosphodéshydrogénase (GAPDH). Au total on passe d'un acide à un aldéhyde à l'aide du NADPH (réduction) et d'une réaction intermédiaire faisant intervenir l'ATP ;

c) La régénération du RUBP : elle se réalise grâce à un ensemble de réactions faisant intervenir des sucres à différents nombres d'atomes de carbone : sucres en C6 (fructose), C4 (érythrose) et C7 (sédoheptulose). A partir de 5 triose-phosphates (C3P) ils se forment donc 3 pentose phosphates (C5P).

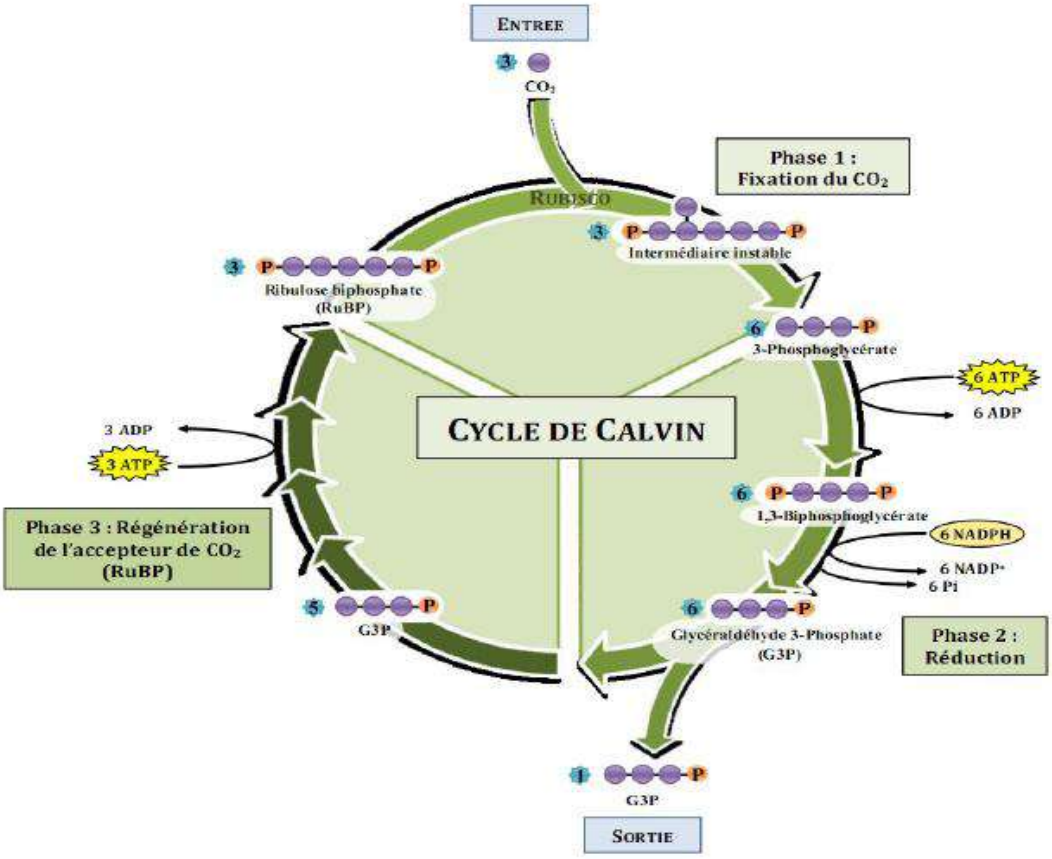


Figure 2.4. Schéma du cycle de Calvin

L'efficacité photosynthétique des algues est estimée à 9 %, beaucoup plus élevée que celles des plantes terrestres (entre 1 et 2 %) [47].

Pour réaliser la photosynthèse et se reproduire, les algues ont besoin de nutriments, de lumière et de conditions particulières.

2.6. Application des micro-algues

Les applications des micro-algues sont multiples, de l'alimentation humaine,

l'alimentation animale, les cosmétiques, la pharmaceutique…etc. Chaque espèce des micro-algues a des propriétés qui lui sont propres et toutes les micro-algues produites n'ont pas une application unique. Il est possible de regrouper les espèces en fonction de leurs principales utilisations [48].

2.6.1. Application alimentaires

Certaines espèces des micro-algues peuvent être consommées comme des légumes. Plusieurs processus de conservation des micro-algues peuvent être utilisés : elles peuvent être séchées, congelées, mises en bocaux, salées ou servies fraîches. La consommation des micro-algues est traditionnelle dans de nombreux pays asiatiques.

Les principales espèces consommées sont : *Undariapinnatifida, Laminariajaponica*et *Porphyra sp.* Les Japonais consomment actuellement 1,4 kg des microalgues (poids sec) par an et par habitant**,** les micro-algues dans l'alimentation sont bénéfiques outre leurs propriétés épaississantes, gélifiantes ou stabilisantes, bien connues et largement utilisées par des industries agro-alimentaires, elles ont aussi des propriétés nutritionnelles intéressantes en alimentation humaine.

L'eau de mer offre une composition remarquablement constante. Elle contient en solution tous les éléments nécessaires au maintien de la vie, éléments que les micro-algues absorbent et concentrent dans leurs tissus [49].

2.6.2. Application pharmaceutiques

Les extraits des micro-algues sont également utilisés par le secteur pharmaceutique. Les principes actifs extraits des micro-algues sont utilisés comme anti-inflammatoire oesophagien, pour lutter contre l'embonpoint, pour leur effet laxatif ou encore pour les pansements. Les micro-algues peuvent être aussi utilisées dans l'amélioration du confort des diabétiques.

En effet certain polysaccharides issus des micro-algues des côtes françaises peuvent moduler l'absorption intestinale du glucose et la réponse insulinique à l'alimentation. Par ailleurs, des oligosaccharides extraits des micro-algues peuvent améliorer l'équilibre de la flore intestinale du colon, en favorisant la croissance des bactéries**.**

Les micro-algues alimentaires sont source de polysaccharides divers, très différents de ceux provenant des végétaux terrestres. Ces polysaccharides représentent entre 30% et 70 %

du poids sec des micro-algues [50].

2.6.3. Application cosmétique

Les micro-algues utilises par la filière cosmétique sont souvent les mêmes que celles utilisées pour les applications alimentaires. Cependant, les travaux de recherche mettent en évidence de nouvelles applications pour de nouvelles espèces.

La filière cosmétique utilise les micro-algues sous forme d'extraits de plantes, broyées (pour les gommages par exemple) ou en tant qu'agents de coloration. Etant donné que le marketing joue un rôle important dans l'industrie des cosmétiques. Les micro-algues sont souvent utilisées afin de véhiculer une image de produits naturels apportant les bienfaits de la mer [51].

2.6.4. Agrofournitures

En agriculture, les micro-algues sont principalement utilisées comme engrais ou comme ingrédient dans la fabrication d'aliment pour le bétail. Concernant les engrais, les algues sont transformées en poudre, extraits liquides ou microbilles et sont épandues sur les terres. En effet, les micro-algues favorisent la croissance des plantes, la résistance aux maladies et produisent des substances protectrices contre les agressions par les gastéropodes. Pour l'alimentation animale, les fucales sont utilisées comme additifs alimentaires pour leurs qualités digestives. Elles sont transformées en farines mélangées à la nourriture [52].

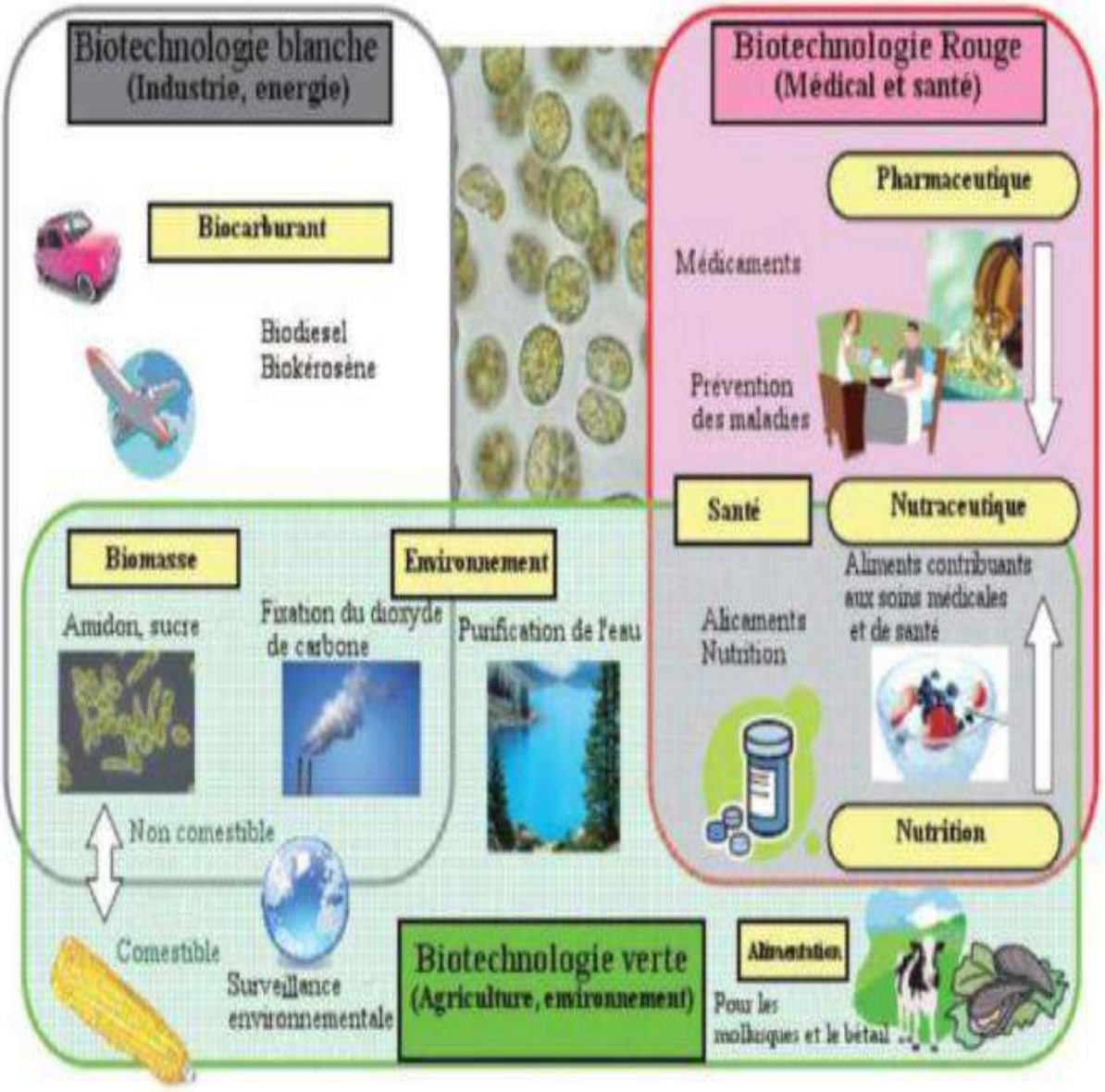


Figure 2.5. Diversité du champ d'application de micro-algues[48].

2.7. Milieu de croissance et de culture des micro-algues

Il est bien connu que les eaux douces présentent une richesse d'environnements et de flore algale. La répartition des espèces d'algues dans les eaux douces dépend non seulement de l'action sélective chimie-physique de l'environnement, mais aussi de la capacité de l'organisme à coloniser un environnement particulier. Par conséquent, divers milieux de culture ont été développés et utilisés pour l'isolement et la culture d'algues d'eau douce. Certains d'entre eux sont des modifications de recettes antérieures pour répondre à un objectif particulier, certains sont issus de l'analyse de l'eau dans l'habitat naturel, certains sont formulés après une étude détaillée des besoins nutritifs de l'organisme, et certains sont établis après prise en compte des paramètres écologiques [36]**.**

Les micro-algues vivent dans les milieux fortement aqueux. Elles vont assimiler les éléments minéraux nutritifs comme le potassium, le sodium, le calcium et le magnésium, des oligo-éléments (molybdène, zinc, cuivre) et le CO_2 dissous dans l'eau pour produire leurs constituants cellulaires. Les solutions mères des milieux sont généralement composées de trois types de composants ; macronutriments, des traces de métaux, et des vitamines.

2.8. Les conditions opératoires

La croissance des algues et l'activité photosynthétique dans différentes conditions environnementales ont été largement étudiées au cours des dernières décennies [53]**.** De plus, les nombreux paramètres environnementaux (lumière et température), opérationnels (pH, CO_2 et nutriments) qui influent sur le traitement des eaux usées ont été étudiés [54]**.** Parmi les paramètres les plus importants qui affectant la production d'algues :

2.8.1. La réponse à la lumière

La lumière est essentielle pour la croissance des algues, la photosynthèse augmente avec une intensité lumineuse croissante jusqu'à ce que le taux maximal de croissance des algues soit atteint au point de saturation de la lumière. L'augmentation de l'intensité de la lumière au-delà de ce point peut conduire à une photo-oxydation (également appelée photo-inhibition). Les réactions photosynthétiques sont globalement dépendantes de l'énergie lumineuse captée[53]**.**

Pour Grima et al [55]l'optimum de croissance est atteint entre 820 et 1620 µmol/m².s mais au-delà de cette valeur, l'irradiance devient photoinhibitrice [56].

Des cellules *Chlorell apyrenoidosa* cultivées dans un cycle de lumière/obscurité répété ont été étudiées. Pendant la nuit, des diminutions ont été observées dans la concentration de biomasse et les teneurs en glucides des cellules alors que leur teneur en protéines augmentait. Ces changements impliquent qu'en l'absence d'énergie lumineuse [57]**.**

2.8.2. La température

La température de l'environnement d'un organisme est un paramètre important puisque l'état physiologique en dépend. Aussi, chaque microorganisme a une température de culture optimale [39]**.** Les températures optimales de la croissance et de l'activité des réactions chimiques des microorganismes varient selon l'espèce. L'intervalle de température favorable à la bonne activité microbienne se situe entre 20 et 37°C selon GIBBS et al [58]**.**

Scenedes musalmeriensis présente une vitesse de croissance maximale à 35°C, au-dessus de laquelle sa croissance chute [59].

Le contenu cellulaire varié aussi avec la température. Chez *Scenedes musalmeriensis* la quantité de lutéine augmente en même temps que la température. La température optimale mesurée dans des conditions de taux maximal de croissance des algues (conditions nutritives et légères suffisantes) varie entre les espèces d'algues, mais est souvent comprise entre 28 et 35 °C pour de nombreuses algues. La température peut également modifier les équilibres ioniques de l'eau du bassin, le pH et la solubilité des gaz (oxygène et CO_2), bien que différentes espèces d'algues soient influencées à des degrés différents par cet effet. Bien que la perte de biomasse puisse être réduite en agissant la température et en évitant le mélange de la culture pendant la nuit [60]. L'effet de la température de nuit sur la perte de biomasse est étudiée par certains travailleurs [61].

2.8.3. Salinité

La salinité diminue le nombre de microorganismes. Elle ralentit les processus de l'humification et de la minéralisation des matières organiques. En effet, de tous les processus biologiques, la nitrification est la plus touchée, ainsi que le dégagement de CO_2. Les fortes salinités constituent donc une barrière naturelle pour la biodégradation.

2.8.4. Potentiel d'hydrogène (pH)

L'activité microbienne est largement influencée par le pH. Il doit être situé entre 5 et 9 avec un optimum aux alentours de 7. Si le pH est acide, il peut favoriser la solubilisation des métaux lourds qui sont très toxiques pour les microorganismes.

2.8.5. Taux d'oxygène

Le processus biologique aérobie est souhaitable pour la bioremediation de sol pollué par le diesel. Ainsi, la respiration aérobie semble être le mécanisme primaire pour la biodégradation des hydrocarbures. Plusieurs auteurs montrent que la biodégradation anaérobie est plus lente que la biodégradation aérobie.

2.8.6. Contenu en nutriments

Les nutriments sont indispensables à l'activité et au développement des microorganismes. Ce sont des corps simples qui peuvent être assimilés, sans transformation

digestive par les organismes et favoriser la croissance des populations de microorganismes. Les plus importants sont l'azote et le phosphore (N, P).

2.9. Evolution de la croissance

L'évolution de la croissance se fait selon cinq phases représentées par la Figure 2.6.

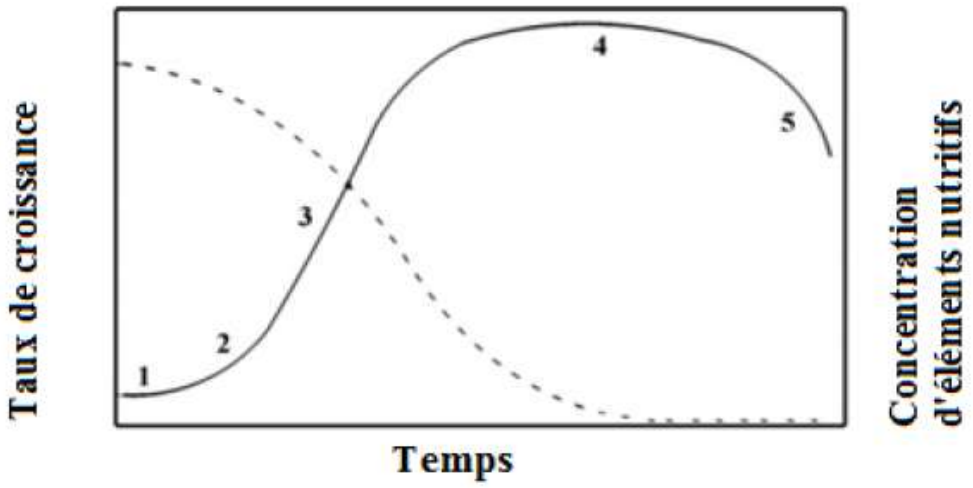


Figure 2.6. Représentation schématique du taux de croissance des algues en culture. discontinue (ligne continue) et la concentration des éléments nutritifs (ligne pointillée**)** [38]**.**

Les phases se succèdent à mesure que les nutriments du milieu sont consommés :

(1) phase de latence ;

(2) la phase d'accélération ;

(3) phase de croissance exponentielle ;

(4) phase de croissance stationnaire ;

(5) phase de décroissance (déclin ou de mort).

Chapitre 3 :
Matériels et méthodes

3.1. Introduction

Avec quelques milliers de tonnes par an, la filière des micro-algues est focalisée sur la biomasse sèche et sur des produits à haute valeur obtenus par une simple extraction. Actuellement, l'attention se porte sur les micro-algues photosynthétiques dans une stratégie de valorisation de déchets : le CO_2 de diverses sources industrielles, ainsi que des effluents riches en nitrates, phosphates,… etc peuvent être convertis en produits valorisables par raffinage de la biomasse en huiles, protéines, carbohydrates, engrais, biopolymères, biogaz, biocarburants, oxygène, etc.... Ceci nous a encouragées à réaliser cette étude dans le but d'évaluer le pouvoir enzymatiques de micro-algue (*Chlorella Sorokiniana*). Pour cela, notre travail s'articule autour des points suivants :

- L'étude de la croissance de la micro-algue (*Chlorella Sorokiniana)*;
- L'évaluation de leurs pouvoirs producteurs :
  - De chlorophylle,
  - D'enzymes ;

La partie expérimentale de cette étude a été réalisées au niveau des laboratoires du Hall technologiques.

3.2. Matériels et méthodes :

3.2.1. Verreries et petits matériels :

a) ***Verreries*** **:** Bécher ; Erlenmeyer, Tube à essai, Seringue, Entonnoirs, pipette graduée ; Fiole jaugée ; Pipette Pasteur, Verre à montre, Boîte Pétri, Micropipette, Bec benzène, Tube Eppendorf... etc.

b) Matériels :

Le matériel utilisé dans cette partie est illustré dans le tableau ci-contre :

Tableau 3.1 : Matériels utilisés

Matériels	Marque
Balance	KERN
Agitateur	HRIDOLPH
pH-mètre	OHAUS
Autoclave	NUVE
Etuve	MEMMERT
Centrifugeuse	HETTICH ZENTRIFUGEN
Vortex	HEIDOLPH
Bain marie	MEMMERT
Spectrophotomètre	SP-3000NANO OPTIMA
Incubateur	GFL

c) Matériels biologiques :

La souche de micro-algue *"chlorella sorokiniana "* a été isolée à partir d'un échantillon prélevé d'un rejet industriel. Par ailleurs, elle a été identifiée en utilisant des approches de la taxonomie classique et complémentée par la technique de biologie moléculaire. Cette souche a été retenue pour sa capacité de produire des enzymes d'intérêt industriel.

3.2.2. Produits chimiques et réactifs :

Les produits chimiques et les réactifs utilisés sont :

- Chlorure de calcium ($CaCl_2$) ;
- Méthanol (CH_3OH) ;
- Glycine.
- Hydroxyde de potassium (NaOH) ;
- Caséine ;
- Acide trichloracétique (TCA) ;
- Tyrosine ;
- Sulfate de Magnésium ($MgSO_4$) ;
- Sulfate d'ammonium ;

- Acétate de sodium ;
- Sulfate ferreux ($FeSO_4$) ;
- Sulfate de zinc ($ZnSO_4$) ;
- Sulfate de cuivre ($CuSO_4$) ;
- Monohydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4);
- Potassium dihydrogénophosphate (KH_2PO_4) ;
- Chlorure d'ammonium (NH_4Cl) ;
- Acide borique (H_3BO_3) ;
- Chlorure de manganèse($MnCl_2$) ;
- Ethylène diamine tétra acétique (EDTA) ;
- Phosphate(PO_4^{3-}) ;
- Kératine azure.

3.2.3 Solution Tampons

Dans notre travail les solutions tampons utilisés dans l'évaluation des différentes activités enzymatiques sont les suivantes :

- Tampon Glycine NaOH 100 mM à pH 9,0-10,6 ;
- Tampon KCl-NaOH (100mM) aditionner 5 Mm $CaCl_2$ à pH = 12.5 ;
- Tampon phosphat PO_4^{3-}à pH = 7.

3.2.4 Milieu de culture

a) Milieu de croissance des micro-algues :

C'est un milieu liquide utilisé pour la croissance et la production de chlorophylle. Il est composé de :

- Tris 100 mL (22.4 r/L) ;
- Solution A 50 mL (7 g / L NH_4Cl, 4 g / L $MgSO_4$,7 H_2O);
- Solution d'oligo-éléments 1 mL;
- Solution tampon 1 mL (pour 100 mL: 7,35 g K_2HPO_4 / 8,3 g KH_2PO_4) ;
- Eau distillée 848 mL.

Le pH de ce milieu est ajusté à 7 par une solution d'acide acétique suivie d'une

stérilisation à120 °C pendant 20 mn.

b) Gélose nutritive à base de lait (GNL)

La gélose nutritive à base de lait est solide. Elle est utilisée pour mettre en évidence le pouvoir protéolytique des souches en hydrolysant la caséine du lait introduite dans le milieu. Cette gélose est utilisée pour l'isolement et le criblage des microorganismes producteurs de protéases. L'activité protéolytique se manifeste par la diffusion d'un halo transparent dans le milieu qui indique la sécrétion des protéases par les microorganismes et l'hydrolyse des protéines du lait (caséines). Elle est constituée de :

- Eau distillée 750mL ;
- Lait écrémé 250mL ;
- Péptone 5g ;
- Agar 20g.

On ajuste le pH du milieu à (7.2-7.4) par une solution de NaOH et on fait une stérilisation à 120°C pendant 20 minutes, après on lui rajoute du lait écrémer pasteuriser à 114°C pendant 15 minutes.

c) Gélose nutritive à base de farine de plume (GNFP)

Le milieu GNFP est utilisé pour la mise en évidence des microorganismes producteurs des kératinases. La technique de diffusion dans l'agar est mise en œuvre pour la détection de l'activité kératinolytique. En effet c'est un test semi-qualitatif qui repose sur le fait que les kératinases, secrétées par les souches kératinolytiques, diffusent dans le milieu gélosé environnant et hydrolysent ainsi les kératines. L'activité enzymatique se traduit par l'apparition d'halo transparent autour des colonies produisant des kératinases. Ce milieu contient de :

- Eau distillée 1000 mL ;
- Farine de plume 5g ;
- Péptone de soja 2g ;

- Extrait de levure 3g;
- Agar 20g.

Ensuite on ajuste le pH du milieu à 7.4 avec une solution de NaOH puis on le stérilise (à 120 °Cpendant 20 min).

3.3. Les méthodes utilisées

3. 3.1. Cinétique de croissance et production de chlorophylle :

La cinétique de croissance des micro-algues et leurs pouvoirs à produire de la chlorophylle (a + b) ont été suivis par spectrophotométrie quotidiennement en mesurant les densités optiques à 680 nm, 665,2nm et à 652,4 nm.[66]

Mode opératoire

Un échantillon de 2 ml de culture a été utilisé pour déterminer le taux de croissance des micro-algues et ceci par la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 680 nm.

Un deuxième échantillon de 2 ml de culture a été prélevé aussi pour la détermination de la concentration en chlorophylle (a + b). L'échantillon a été placé dans un tube Eppendorf puis centrifugé à 13 000 tr / min pendant 10 min. Après élimination du surnageant, 2 mL du méthanol a été ajouté en présence de billes de verre. Par la suite, on lui fait subir un traitement au vortex pendant cinq à dix minutes à 4 ° C. A la fin, le mélange a été incubé à 60 °C pendant 5 min. La solution obtenue a été centrifugé à nouveau à 13000 tr / min pendant 5 à 10 min ; le surnageant a été récupéré et analysé pour déterminer la teneur en chlorophylle, et ceci par des mesures spectrophotométries à 665,2 nm et 652,4 nm [67].

La concentration de chlorophylle (a + b) a été calculée par l'équation suivante [68]

$$[Chlorophyll\,(mg/l)]_{A+B} = 0.28A_{665,2} + 27.64A_{652,4} \qquad \textbf{3.1}$$

3. 3.2. Dosage de l'activité protéolytique :

La plus connue est l'hydrolyse enzymatique de la caséine permettant la libération

d'acides aminés aromatiques détectés sous UV à 280 nm. L'activité est évaluée comme étant la quantité d'équivalent en Tyrosine libérée par unité de temps. L'activité protéolytique a été mesurée dans le surnageant de la culture obtenue après centrifugation pendant 15 minutes à 5000 rpm et aussi le surnageant méthanoïque (obtenue lors du dosage de la chlorophylle), en déterminant la concentration des peptides solubles dans l'acide trichloro- acétique (TCA) à la concentration finale de 6,6%. L'activité protéolytique est estimée selon laméthode de Kembhavi [69].

Méthode de Kembhavi

Elle est évaluée selon le protocole suivant :

- Mélanger 0,5 ml d'une solution de caséine (1% p/v) dans un tampon désiré en présence de 2 mM $CaCl_2$ avec 0,5 ml de la solution enzymatique préalablement diluée ;
- Incuber, la réaction enzymatique, à une température appropriée pendant 15 min ;
- Arrêter la réaction par addition de 0,5 ml de TCA à 20% (p/v) (le TCA précipite la caséine non hydrolysée) ;
- Incuber à température ambiante pendant 15 min ;
- Centrifuger le milieu réactionnel à 15000 rpm pendant 15 min ;
- Mesurer l'absorbance à 280 nm (correspond au maximum d'absorbance des Aa).

Une unité d'activité protéolytique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1 µg de tyrosine/ml/min dans ces conditions expérimentales. Une courbe d'étalonnage (Annexe 3), de 0 à 100 µg/ml, de tyrosine est réalisée dans les mêmes conditions à partir de laquelle nous avons déduit que 1 µg/ml de tyrosine correspond à une DO $_{280\ nm}$ de 0,0055. L'activité protéasique (U/ml) est déduite à partir de l'équation ci-dessous :

$$\textit{Activité protéolytique}\left(\mu / ml\right) = \frac{DO \times D \times d}{t \times 0.0055} \qquad \textbf{3.2}$$

Avec :

DO : Densité optique ;

D : Correspond à la dilution de l'enzyme ;

d : Dilution de l'enzyme dans le volume final du milieu réactionnel ;

t : Temps de la réaction en minute.

L'activité protéolytique a été mesurés dans de tampon a pH différent à savoir le tampon Glycine NaOH (pH= 10) et tampon phoshate (pH = 7).

3.3.3. Dosage de l'activité kératinolytique

L'activité kératinolytique a été mesurée dans le surnageant de culture obtenue aprèscentrifugation de 20 min à 10000 rpm et aussi le surnageant méthanoïque, en utilisant la kératine-azure comme substrat**.**

L'activité kératinolytique est estimée selon le protocole de Jaouadi [1] qui consiste à :

- Mélanger 1ml du surnageant, 1 ml du tampon KCl-NaOH (100 mM) additionné de 5 Mm $CaCl_2$ à pH 12.5 et 10 mg de kératine-azure finement découpée en raison de 10 g/l ;
- Incuber 20 min à 85°C sous une agitation de 250 rpm ;
- Arrêter la réaction par un bain de glace pendant 5 min ;
- Centrifuger le milieu réactionnel à 10000 rpm pendant 20 min ;
- Mesurer l'absorbance à 440 nm.

Une unité d'activité kératinolytique est définie comme étant l'augmentation de la DO_{440} de0,1.

3.4. Conclusion

L'intérêt de notre travail est d'étudier la cinétique de croissance de micro-algue « *chlorella sorokiniana* » et mètre en évidence les différentes phases de croissance et

multiplication des microorganismes et leurs capacité à produire de la chlorophylle. Et l'évaluation du pouvoir enzymatique de ce microorganisme.

Chapitre 4 :
Résultats et discussion

4.1. Introduction

Le défi consiste, actuellement, à découvrir des enzymes qui répondent convenablement aux contraintes techniques et économiques des procédés de biocatalyse industrielle moderne.

Les micro-organismes vivants en milieux extrêmes et en particulier les micro-algues présentent un répertoire d'enzymes originales ayant des propriétés singulières leur permettant non seulement de survivre dans ces conditions, mais aussi de se développer souvent de manière optimale. L'intérêt porté à ces micro-organismes a abouti à la découverte d'une diversité inouïe de producteurs d'enzymes, pouvant présenter des caractéristiques innovantes et nouvelles, complètement inattendues, dans des milieux supposés hostiles à la vie. Pour cela, nous présentons dans cette partie les résultats obtenus ainsi que les interprétations et les conclusions que nous avons tiré.

4.2. Cinétique de croissance des micro-algues

La culture de la souche *Chlorella sorokiniana* qui a été incubée à une température ambiante dans des Erlenmeyers de 250 mL avec un volume utile de 30 mL et sous une agitation optimisée de 100 rpm a fin de déterminer sa cinétique de croissance. Des mesures de la densité optique ont été effectuées tous les 24 h et les résultats obtenus sont représentés sur la figure ci contre (**Figure 4.1**).

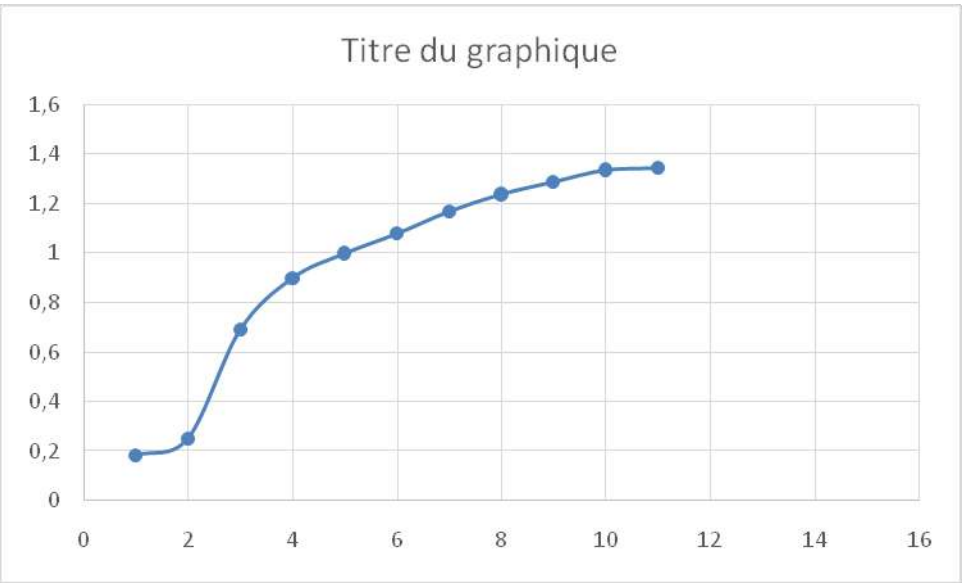


Figure 4.1 : Profils de croissance des micro-algues.

Le suivi de la densité optique en fonction du temps (figure 4.1), qui correspond à la croissance et la multiplication des cellules, montre que le développement des micro-algues commence après une phase de latence de deux jours. Durant cette phase, les cellules sont actives et précédent à la synthèse de nouveaux constituants cellulaires de façon à s'adapter au nouveau milieu. La durée de cette période est influencée par : la quantité et l'âge de l'inoculum, la composition du nouveau milieu par rapport à celle du milieu d'origine ainsi par l'intensité de la lumière à laquelle est exposée.

Suite à cette période d'adaptation les micro-algues commençant à croitre et à se multiplier, ils entrent alors en phase de croissance exponentielle. A ce moment, la vitesse de développement atteint sa valeur maximale après 10 jours, pendant cette période la population est homogène et chaque cellule possède les mêmes propriétés chimiques et physiologiques. La phase stationnaire (au delà 10 jours) commence au moment où les nutriments du milieu s'épuisent et la population devient alors stable, de plus les déchets métaboliques produits par les cellules commencent à s'accumuler dans le milieu.

4.3. Production de chlorophylle

Le surnageant de culture de *Chlorella sorokiniana* dans le milieu de croissance constitue l'extrait brut. Ce surnageant renferme une quantité importante en chlorophylle. Cette dernière a été estimée après avoir solubilisé le culot dans du méthanol, le traité au vortex à 4°C pendant 5 à 10 min, l'incubé à 60 °C pendant 5 min et lui faire subir une deuxième centrifugation à 13000 tr/min pendant 10 min.

Des lectures de la densité optiques à 665.2 et 652.4 nm permettent la détermination de la concentration en chlorophylle (a et b). Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 4.2.

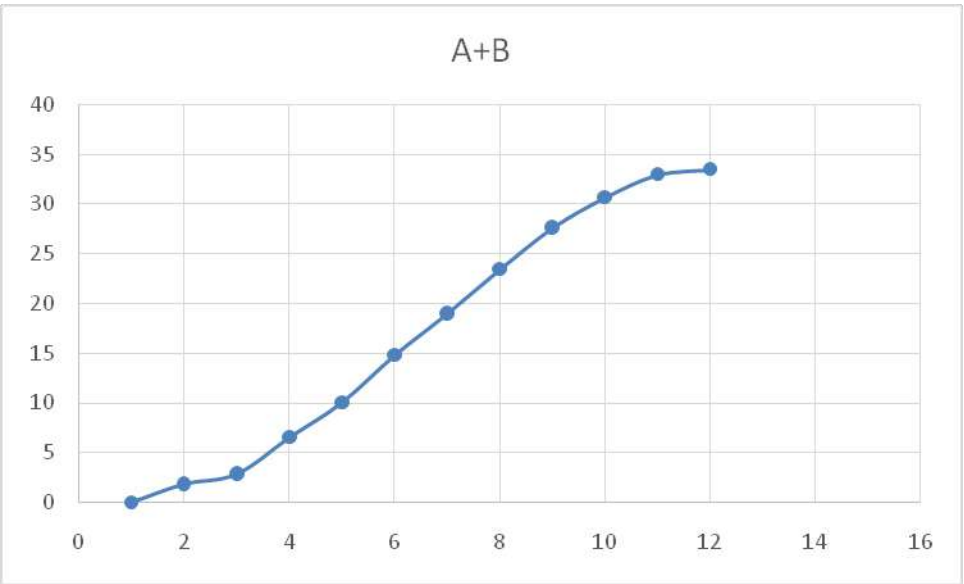


Figure 4.2 : Profils de production de la chlorophylle par les micro-algues

L'analyse de la figure 4.2 montre que les micro-algues produisent de la chlorophylle (a et b) en fonction du temps. Elle commence dès le deuxième jour et atteint sa production maximale au douzième jour. Ceci peut être exprimé par la croissance des micro-algues et le profil de leurs cinétiques. Car les cellules au début sont en phase d'adaptation au nouveau milieu puis commence à croitre et a se multiplier afin d'atteindre la phase stationnaire. Pendant cette phase, la concentration en chlorophylle est presque constante puis commence à diminuer. Cette diminution représente la phase de déclin où les cellules utilisent ses produits comme nutriment.

4.4. Pouvoir des micro-algues à produire des enzymes

4.4.1. Les enzymes protéolytiques

4.4.1.1. Test qualitatif

Les deux extraits de culture de *Chlorella sorokiniana* obtenues après centrifugation ont été étalés sur milieu GNL (milieu utilisé pour déceler les activités protéolytiques extracellulaires et intercellulaire) sont incubés à la température ambiante (**Figure 4.3**). Le premier est récupéré directement après la centrifugation de la culture (extrait normal)et le deuxième est récupéré lors du dosage de la chlorophylle après solubilisation par le méthanol (extrait méthanoique).



Figure 4.3 : Mis en évidence de l'activité protéolytique des micro-algues : A) extrait normal, B) extrait méthanoïque

La figure ci-dessus montre que les deux extraits enzymatiques renferment des enzymes protéolytiques. A savoir l'extrait brut contient des enzymes extracellulaires puisque elles se trouvent dans le surnageant par contre l'extrait éthanoïque contient des enzymes intracellulaires puisqu'elles sont récupéré après avoir solubilisé le culot dans du méthanol.

4.4.1.2. Test quantitatif

Le test réalisé sur milieu solide GNL est un test qualitatif. Ainsi, afin d'évaluer le niveau de production de protéases par les micro-algues, des cultures ont été réalisées sur milieu liquide. Les activités protéolytiques ont été mesurées dans des tampons différents (tampon phosphate et tampon glycine NaOH) à pH (différent (7 et 10) suivant la méthode de Kembhavi dans l'extrait normale et l'extrait méthanoïque. Les résultats obtenus sont regroupés dans les figures 4.4 et 4.5 respectivement.

a) Tampon phosphate à pH 7 :

L'estimation de l'activité enzymatique dans l'extrait normal est représentée sur la figure 4.4.

D'après l'analyse de la figure 4.4, on remarque que l'extrait normal ne contient pas d'enzymes protéolytiques au début et c'est à partir du troisième jour que les micro-algues commencent à produire des protéases. La production atteint sa valeur maximale 24.18 U/mL pendant le quatrième jour. Ensuite elle diminue pour se stabilisé.

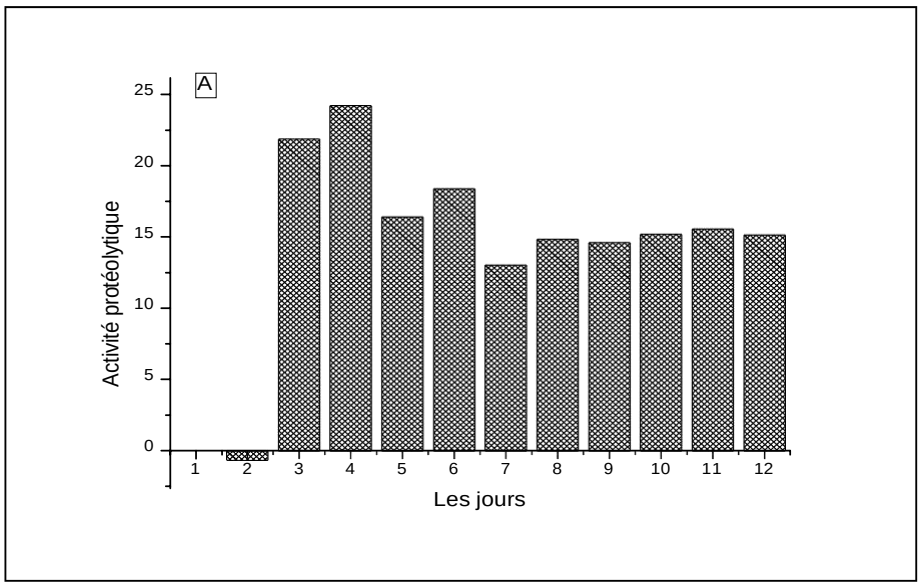


Figure 4.4 : Résultats du dosage protéolytique dans l'extrait normal.

Par contre pour l'extrait méthanoïque (figure 4.5) on remarque qu'aucune activité n'est observée durant les quatre premiers jours. La sécrétion de protéase apparue pendant le cinquième jour pour atteindre sa valeur maximale (7.02 U/mL) le sixième jour. Puis commence à diminue et a s'annuler dès le dixième jour.

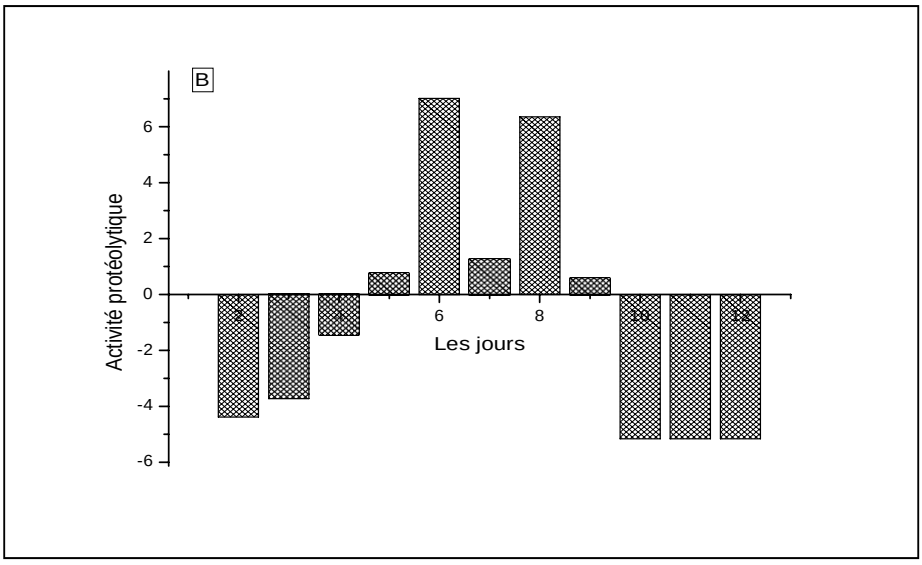


Figure 4.5 : Résultats du dosage protéolytique dans l'extrait méthanoïque .

La mesure des activités enzymatiques dans les deux extraits (normal et méthanoïque) nous permet de constaté que les micro-algues secrètent des protéases extra et intra cellulaires. En plus, les protéases extracellulaires ont une activité protéolytique plus importante que les protéases intracellulaires et ceci possède un pH neutre.

b) Tampon glycine NaOH à pH= 10

Le suivi des sécrétions protéolytiques dans l'extrait normal en fonction du temps (figure 4.6) montre clairement que la micro-algue *Chlorella sorokiniana* produit une protéase alcaline et atteint la valeur maximale en termes d'activité protéolytique (85.8 U/mL) au bout de cinq jours.

En plus, on remarque une diminution de l'activité protéolytique puis une ré-augmentation pendant le huitième jour. Au delà du huitième jour l'activité protéolytique se stabilise. Ce phénomène peut être expliqué comme suit : la micro-algue sécrète des protéases alcalines, dont l'une atteint son activité maximale au cinquième jour et l'autre au huitième jour. Pour confirmer ceci il faut faire appel à d'autres moyens de caractérisations.

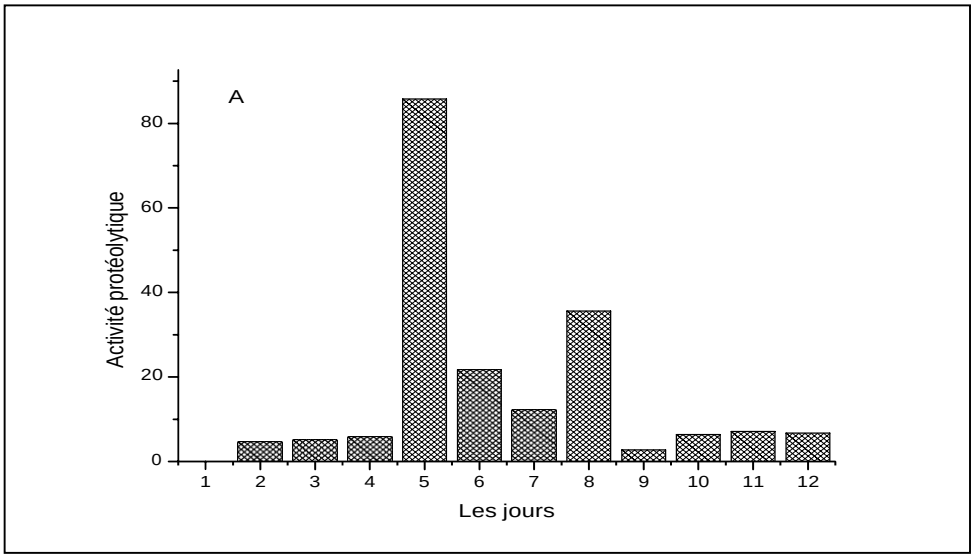


Figure 4.6 : Résultats du dosage protéolytique dans l'extrait normal.

De même pour l'extrait méthanoïque, on remarque deux niveaux de production maximale, le premier à cinq jours (65 U/mL) et le deuxième au dixième jour (75.24 U/mL) (figure 4.7). Après, aucune activité protéolytique n'est observée. Les résultats obtenus indiquent que notre micro-algue produit des protéases intracellulaires même à des pH alcalin.

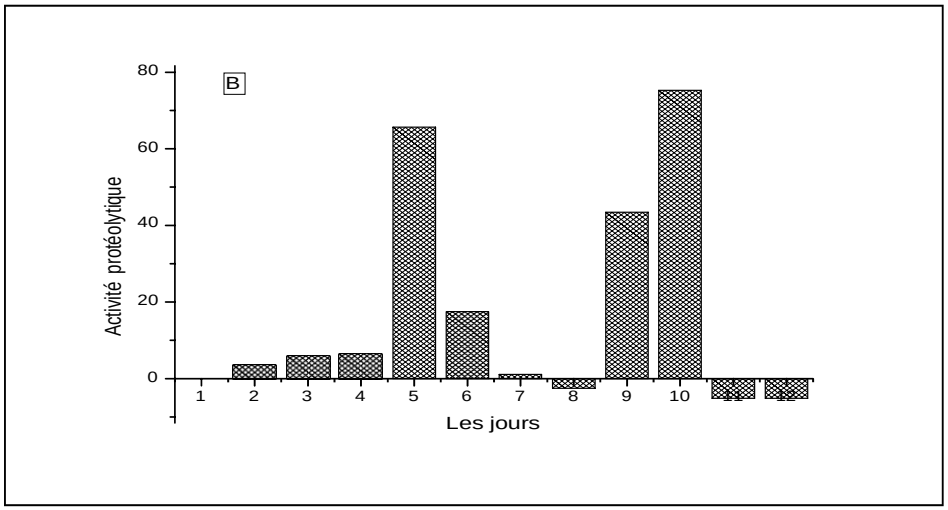


Figure 4.7 : Résultats du dosage protéolytique dans l'extrait méthanoïque

L'analyse des résultats obtenus des dosages des activités protéolytiques des deux extraits enzymatiques dans les tampons nous permet de constaté que la micro-algue *chlorella sorokiniana* produit des protéases intra et extracellulaire. Ces dernières sont actives au pH neutre et alcalin. En plus, les protéases extracellulaires (extrait normal) permettent des taux de protéolyse meilleurs au pH alcalin par rapport au pH neutre et aux protéases intracellulaires (extrait méthanoïque).

4.4.2. Les enzymes kératinolytique

Les résidus à base de kératine (plumes de volailles, cheveux, poils,…) sont très abondants dans la nature. Leur traitement se limite jusqu'à présent à l'incinération, un procédé très polluant. Cependant, l'intérêt croissant pour l'environnement ainsi que la richesse de ces substances en protéines et en essentiels nous amènent à chercher une autre alternative plus valorisante pour le traitement de ce type de déchet. En l'occurrence, la voie de la dégradation enzymatique, faisant intervenir une activité protéase (kératinase), semble être très prometteuse et en accord avec les exigences écologiques.

4.4.2.1. Test qualitatif

Tout d'abord, on doit montrer que la souche *Chlorella sorokiniana* est capable de croitre sur un milieu adéquat à base de kératine. Un milieu sélectif à base de farine de plume (GNFP) a été utilisé pour la mise en évidence du pouvoir kératinolytique des micro-algues. Les résultats de ce test sont illustrés sur la figure 4.8.

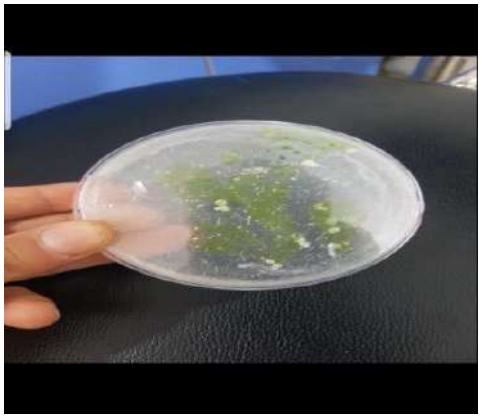


Figure 4.8: Mise en évidence de l'activité kératinolytique des micro-algues

La souche de *Chlorella sorokiniana* est apte de croitre et de secrété des kératinases sur milieu de culture solide à base de kératines (figure 4.8). Cette caractéristique a été visualisée par l'apparition d'une zone transparente sur le milieu solide GNFP. Ceci confirme que les micro-algues produit une enzyme menée d'une activité kératinolytique extracellulaire nécessaire pour la dégradation des substrats à base de kératine.

4.4.2.2. Test quantitatif

Le dosage de l'activité kératinolytique de la micro-algues *Chlorella sorokiniana* est estimé suite à une incubation des extraits enzymatiques normal et méthanoïque en présence de la kératine azure. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 4.9 et 4.10 respectivement.

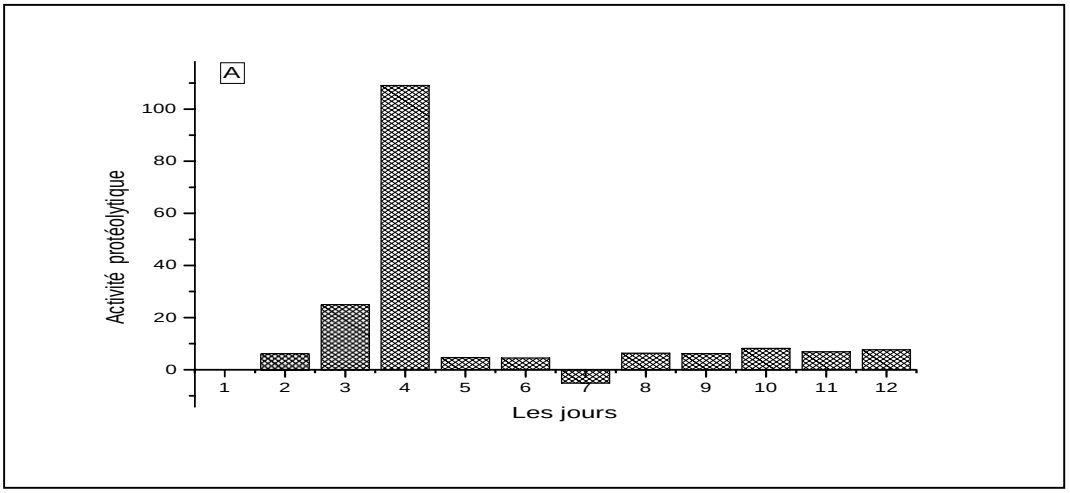


Figure 4.9 : Résultats du dosage kératénolytique dans l'extrait normal.

La figure 4.9 montre que les micro-algues *Chlorella sorokiniana* sécrètent des enzymes extracellulaires ayant un pouvoir kératinolytique. On observe un taux de sécrétion important pendant la phase exponentielle et plus précisément au quatrième jour (109.08 U/mL). Ensuite, la sécrétion des kératinases diminue pour atteindre un niveau constant.

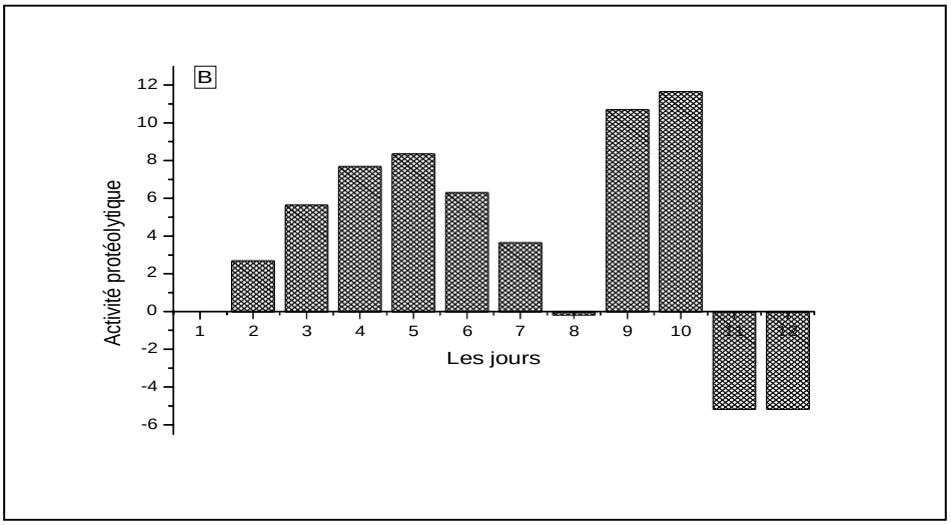


Figure 4.10 : Résultats du dosage kératénolytique dans l'extrait méthanoïque.

L'examen de la figure 4.10 révèle que *Chlorella sorokiniana* renferme des kératinase à l'intérieur de ses cellules. En plus, on remarque que l'activité kératinolytique augmente en fonction du temps pour atteindre le premier niveau (8.34 U/mL) au cinquième jour puis diminue pour atteindre un deuxième niveau (11.64 U/mL) au dixième jour. Ensuite aucune activité n'est observée.

Le dosage de l'activité kératinolytique coïncide avec celui de l'activité protéolytique. Les protéases extracellulaires de notre micro-algue sont plus actives dans les milieux alcalins. En plus, en plus c'est fort possible que les deux extraits renferment plus d'une enzyme qui demande une étude plus détaillée.

4.5. Conclusion

Le contexte de notre travail proposé est de mettre en évidence le pouvoir des micro-algues à produire des enzymes dotés de différentes activités. Ces derniers ont été évalués par des tests qualitatifs et quantitatifs à savoir l'activité protéolytique et kératinolytique. Les résultats obtenus nous indiquent que cette micro-algues produit des protéases et des kératinases intra et extracellulaires. En plus, ces enzymes sont actives même à des pH alcalin qui lui

confère plusieurs applications industrielles notamment dans la dépollution et le traitement des déchets très riches en kératines talles que les plumes des volailles .

.

CONCLUSION GENERALE

Le champ d'application des micro-algues a longtemps été contenu dans les domaines de l'aquaculture, de l'alimentions pour animaux d'élevage, voir de complément pour l'alimentation humaine. Les récents progrès accomplis en recherche fondamentale et appliquée ont fait entrer les micro-algues dans l'ère de la génomique. Au-delà des compétences acquises dans les systèmes de culture et la création de photo bioréacteurs aux géométries originales, la transformation génétique est une réalité pour plusieurs dizaines de micro-algues issues de groupes phylogénétiques différents.

Une mise évidence de la production des enzymes hydrolytique extracellulaire et intercellulaire par la souche de micro-algue « *Chlorella sorokiniana* ». Cette micro-algue isolée d'effluent industriel, après purification et identification [70] croit et se multiplie dans un bouillon liquide.

En plus, cette étude à révélé le pouvoir de « *chlorella sorokiniana* » à produire des enzymes extra et intracellulaires caractérisé par une activité protéolytique active au pH neutre et alcalin d'une manière générale et une activité kératinolytique d'une manière particulière. Ces activités lui permettre leurs introduction dans plusieurs secteurs industriels notamment le traitement des rejets très riche en protéines.

Références bibliographiques

[1] Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. & Veau P. (1999). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle.Masson. Paris. P. 12-426.

[2] García-Gómez M. J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O., Prado-Barragán L. A. (2009). Advantages of a proteolytic extract by Aspergillus oryzae from fish flour over a commercial proteolytic preparation. Food Chem. 112. 604–608.

[3] Gessesse, Amare, and Gashaw Mamo. "High-level xylanase production by an alkaliphilic Bacillus sp. by using solid-state fermentation." Enzyme and microbial technology 25.1-2 (1999): 68-72.

[4] Burhan, R. Y. P., et al. "Fossil bacterial ecosystem at methane seeps: origin of organic matter from Be'eri sulfur deposit, Israel." Geochimica et Cosmochimica Acta 66.23 (2002): 4085-4101.

[5] Jacinta A. Lodge, Timm Maier, Wolfgang Liebl, Volker Hoffmann et Norbert Sträter, « Crystal Structure of Thermotoga maritima α-Glucosidase AglA Defines a New Clan of NAD^+-dependent Glycosidases », Journal of Biological Chemistry, vol. 278, n° 21, 23 mai 2003, p. 1915119158.

[6] Ida Schomburg, Antje Chang, Sandra Placzek, Carola Söhngen, Michael Rother, Maren Lang, Cornelia Munaretto, Susanne Ulas, Michael Stelzer, Andreas Grote, Maurice Scheer et Dietmar Schomburg, « BRENDA in 2013: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA », Nucleic Acids Research, vol. 41, n° D1, , janvier 2013 23203881,DOI 10.1093/nar/gks1049.

[7] Radzicka et R. Wolfenden, « A proficient enzyme », Science, vol. 267, n° 5194,janvier 6) 93-90 p. ,1995PMID 7809611,DOI 10.1126/science.7809611 .

[8] Brian P. Callahan et Brian G. Miller, « OMP decarboxylase—An enigma persists », Bioorganic Chemistry, vol. 35, n° 6,-465 p. décembre 2007,) 469PMID 17889251, DOI 10.1016/j.bioorg.2007.07.004, lire en ligne .

[9] Christian B. Anfinsen, « Principles that govern the folding of protein

chains », Science, vol. 181, n° 4096,-223 p. juillet 1973,
) 230PMID 4124164, DOI 10.1126/science.181.4096.223, lire en ligne .

[10]. Debra Dunaway-Mariano, « Enzyme Function Discovery », Structure, vol. 16, n° 11, 12 November 2008, p. 1599-1600 (PMID 19000810,DOI 10.1016/j.str.2008.10.001, lire en ligne .

[11].Michael Ibba et Dieter Söll, « Aminoacyl-tRNA synthesis », Annual Reviews Biochemistry, vol. 69,-617 p. juillet 2000,
) 650PMID 10966471,DOI 10.1146/annurev.biochem.69.1.617, lire en ligne .

[12].Marina V. Rodnina et Wolfgang Wintermeyer, « Fidelity of aminoacyl-tRNA selection on the ribosome: kinetic and structural mechanisms », Annual Reviews Biochemistry, vol. 70,-415 p. juillet 2001,
) 435PMID 11395413,DOI 10.1146/annurev.biochem.70.1.415, lire en ligne .

[13].Olga Khersonsky et Dan S. Tawfik, « Enzyme Promiscuity: A Mechanistic and Evolutionary Perspective », Annual Reviews Biochemistry, vol. 79,-471 p. juillet 2010,
) 505PMID 20235827,DOI 10.1146/annurev-biochem-030409-143718, lire en ligne.

[14]. Rouse, J. G., et Van Dyke, M. E. A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications. Materials, (2010); 3 (2), 999-1014.

[15]. -Pandey, A., Negi, S., Ricardo, C. Soccol. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. (2017); 447–469.

[16].Macedo, A. J., da Silva, W. O., Gava, R., Driemeier, D., Henriques, J. A., Termignoni, C. Novel keratinase from Bacillus subtilis S14 exhibiting remarkable dehairing.

[17]. Thys, R., Lucas, F., Riffel, A., Heeb, P., et Brandelli, A. Characterization of a protease of a feather-degrading Microbacterium species. Letters in Applied Microbiology, (2004); 39 (2), 181–186.

[18]. Gupta, R., et Ramnani, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. Applied microbiology and biotechnology, (2006); 70 (1), 21–33.

[19] Habbeche A. (2014). Purification et caractérisation d'une kératinase thermostable

KERAK-29 chez une nouvelle souche d'Actinomycète. Thèse de doctorat de biochimie appliquée. Université Badji Mokhtar, Faculté des sciences, Annaba : 120 p.

[20] Ignatova, Z., Gousterova, A., Spassov, G., Nedkov, P. Isolation and partial characterisation of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strainThermoactinomyces. Can. Journal of Microbiology. (1999); 45, 217–222.

[21].Asahi, M., Lindquist, R., Fukuyama, K., Apodaca, G., Epstein, WL., McKerrow, JH. Purification and characterization of major extracellular proteinases from Trichophyton rubrum. Biochemical Journal, (1985); 232:139-44.

[22]. Kunert, J. Biochemical mechanism of keratin degradation by the actinomycete Streptomyces fradiae and the fungus Microsporum gypseum: a comparison. Journal of Basic Microbiology, (1989); 29 (9), 597–604.

[23].Daniel E. Koshland, « Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis », Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 44, n° 2,) 104-98 p. février 1958, PMID 16590179, PMCID 335371, lire en ligne .

[24].Andrea Vasella, , Gideon J Davies et Matthias Böhm, « Glycosidase mechanisms », Current Opinion in Chemical Biology, vol. 6, n° 5,) 629-619 p. ,2002 octobre DOI 10.1016/S1367-5931(02)00380-0, lire en ligne .

[25].Arieh Warshel, Pankaz K. Sharma, Mitsunori Kato, Yun Xiang, Hanbin Liu et Mats H. M. Olsson, « Electrostatic Basis for Enzyme Catalysis », Chemical Reviews, vol. 106, n° 8,août 20066, p. 3210-3235)□PMID 16895325,DOI 10.1021/cr0503106, lire en ligne .

[26].Stephen J. Benkovic et Sharon Hammes-Schiffer, « A Perspective on Enzyme Catalysis », Science, vol. 301, n° 5637,-1196 p. août 2003,) 1202PMID 12947189, DOI 10.1126/science.1085515, lire.

[27].J. Villà, M. Štrajbl, T. M. Glennon, Y. Y. Sham, Z. T. Chu et A. Warshel, « How important are entropic contributions to enzyme catalysis? », Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 97, n° 22,-11899 p. octobre 2000, 24) 11904PMID 11050223,PMCID 17266, DOI 10.1073/pnas.97.22.11899, lire en ligne .

[28].Arvind Ramanathan, Andrej Savol, Virginia Burger, Chakra S. Chennubhotla et Pratul K. Agarwal, « Protein Conformational Populations and Functionally Relevant Substates », Accounts of Chemical Research, vol. 47, n° 1, janvier 21 2014, p. 149-156 (PMID 23988159, DOI 10.1021/ar400084s,lire en ligne .

[29].Chung-Jung Tsai, Antonio del Sol et Ruth Nussinov, « Protein allostery, signal transmission and dynamics: a classification scheme of allosteric mechanisms », Molecular BioSystems, vol. 5, n° 3,mars
207 p. ,2009216 (PMID 19225609, PMCID 2898650, DOI 10.1039/B819720B, lire en ligne .

[30]. Raoul Kopelman, « Fractal Réaction Kinetics », Science, vol. 241, n° 4873,septembre 23) 1626-1620 p. ,1988PMID 17820893,DOI 10.1126/science.241.4873.1620, lire en ligne.

[31].George E. Briggs et John B. S. Haldane, « A Note on the Kinetics of Enzyme Action », BiochemicalJournal, vol. 19, n° 2,-338 p. ,1925
) 339PMID 16743508, PMCID 1259181).

[32]. A. Meighen, « Molecular biology of bacterial bioluminescence », Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 55, n° 1,-123 p. ,1991 mars
) 142PMID 2030669, PMCID 372803, lire en ligne .

[33]. de Clerq, « Highlights in the Development of New Antiviral Agents », Mini Reviews in Medicinal Chemistry, vol. 2, n° 2,) 175-163 p. avril 2002, PMID 12370077.

[34]. Roderick I. Mackie et Bryan A. White, « Recent Advances in Rumen Microbial Ecology and Metabolism: Potential Impact on Nutrient Output », Journal of Dairy Science, vol. 73, n° 10,) 2995-2971 p. octobre 1990, PMID 2178174, DOI 10.3168/jds.S0022-0302(90)78986-2, lire en ligne .

[35].Peter M. Bennett et Ian Chopra, « Molecular basis of beta-lactamase induction in bacteria », Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 37, n° 2,-153 p. février 1993,) 158PMID8452343, PMCID 187630,DOI 10.1128/AAC.37.2.153, lire en ligne .

[36] R.A. Andersen, Algal culturing techniques, Elsevier, 2005.

[37] P. Chen, M. Min, Y. Chen, L. Wang, Y. Li, Q. Chen, C. Wang, Y. Wan, X. Wang, Y. Cheng, Review of biological and engineering aspects of algae to fuels approach, International

Journal of Agricultural and Biological Engineering. 2 (2010) 1–30.

[38] T.M. Mata, A.A. Martins, N.S. Caetano, Microalgae for biodiesel production and other applications: a review, Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14 (2010) 217–232.

[39] A. Souliès, Contribution à l'étude hydrodynamique et à la modélisation des photobioréacteurs à haute productivité volumique, PhDThesis, Nantes, 2014.

[40] S. Baillot, UTILISATION DES GROUPES MORPHO-FONCTIONNELS DU PHYTOPLANCTON POUR LE DIAGNOSTIC ECOLOGIQUE DES PLANS D'EAU DU BASSIN LOIRE BRETAGNE, (2013).

[41] P. Gualtieri, Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology, Taylor & Francis, 2006.

[42] A. El Kouri, V. Bultel-Poncé, O. Assobhei, S. Etahiri, Etude de la variation saisonnière de l'activité antimicrobienne et anti-inflammatoire chez quelques espèces d'algues marines de la côte Atlantique Marocaine, Review of Biol. and Biotechnol. 3 (2004) 29–36.

[43] P.G. Falkowski, A. Sukenik, R. Herzig, NITROGEN LIMITATION IN ISOCHRYSIS GALBANA (HAPTOPHYCEAE). II. RELATIVE ABUNDANCE OF CHLOROPLAST PROTEINS 1, Journal of Phycology. 25 (1989) 471–478.

[44] S.W. Wright, S.W. Jeffrey, Pigment markers for phytoplankton production, in: Marine Organic Matter: Biomarkers, Isotopes and DNA, Springer, 2006: pp. 71–104.

[45] Hichem. Tahraoui, "optimisation de l'élimination des Micropollutants organique", thèse de doctorat Avril 2021, Université de Médéa.

[46] Y. NEMcovA, T. Kalina, Cell wall development, microfibril and pyrenoid structure in type strains of Chlorella vulgaris, C. kessleri, C. sorokiniana compared with C. luteoviridis (Trebouxiophyceae, Chlorophyta).(With 14 figures in the text), Archiv Fur Hydrobiologie-Supplementband Only. 136 (2000) 95–106.

[47] A. Richmond, Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology, John Wiley & Sons, 2008.

[48] L. Brennan, P. Owende, Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14 (2010) 557–577.

[49] R. Filali, Estimation et commande robustes de culture de microalgues pour la valorisation biologique de CO2., Supélec, 2012.

[50] G. Becerra-Celis, Proposition de stratégies de commande pour la culture de microalgue dans un photobioréacteur continu, 2009.

[51] N. GANA, Détermination de certains paramètres biochimiques urinaires chez le rat wistar recevant un régime cafeteria supplémenté en algues vertes, 2014.

[52] Q. Le Bras, L. Ritter, D. Fasquel, M. Lesueur, S. Lucas, S. Gouin, Etude de la consommation des algues alimentaires en France. Programme IDEALG Phase 1. Etude nationale., (2014).

[53] L. Barsanti, P. Gualtieri, Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology, CRC press, 2014.

[54] J.B.K. Park, R.J. Craggs, A.N. Shilton, Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production, Bioresource Technology. 102 (2011) 35–42.

[55] J.C. Weissman, R.P. Goebel, Production of liquid fuels and chemicals by microalgae. Final subcontract report, Microbial Products, Inc., Fairfield, CA (USA), 1985.

[56] E.M. Grima, F.G. Camacho, J.S. Pérez, F.A. Fernández, J.F. Sevilla, Evaluation of photosynthetic efficiency in microalgal cultures using averaged irradiance, Enzyme and Microbial Technology. 21 (1997) 375–381.

[57] E. Olivo, Conception et étude d'un photobioréacteur pour la production en continu de microalgues en écloseries aquacoles, Université de Nantes, 2007.

[58] N. Adir, H. Zer, S. Shochat, I. Ohad, Photoinhibition–a historical perspective, Photosynthesis Research. 76 (2003) 343.

[59] A. BOUDERHEM, E.H.-K.A. OULD, UTILISATION DES SOUCHES BACTERIENNES TELLURIQUS AUTOCHTONES DANS LA BIODETECTION ET LA BIOREMEDIATION DES SOLS POLLUES PAR LES HYDROCARBURES., n.d.

[60] B. Clément-Larosière, Etude de la croissance de Chlorellavulgaris en photobioréacteur batch et continu, en présence de concentrations élevées de CO2, Châtenay-Malabry, Ecole centrale de Paris, 2012.

[61] J.C. Ogbonna, H. Tanaka, Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/dark cyclic culture of Chlorella pyrenoidosa, Journal of Fermentation and Bioengineering. 82 (1996) 558–564.

[62] C. Escapa, R.N. Coimbra, S. Paniagua, A.I. García, M. Otero, Comparative assessment of diclofenac removal from water by different microalgae strains, Algal Research. 18 (2016) 127–134.

[63] M.-K. Ji, A.N. Kabra, J. Choi, J.-H. Hwang, J.R. Kim, R.A. Abou-Shanab, Y.-K. Oh,
B.-H. Jeon, Biodegradation of bisphenol A by the freshwater microalgae Chlamydomonas mexicana and Chlorella vulgaris, Ecological Engineering. 73 (2014) 260–269.

[64] D. Campbell, V. Hurry, A.K. Clarke, P. Gustafsson, G. Öquist, Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62 (1998) 667–683.

[65] Kembhavi, A.A., et al., "The two cysteine endopeptidases of legume seeds: purification and characterization by use of specific fluorometric assays". Arch. Biochem. Biophys., 1993. 303(2): p. 208-213.