République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche scientifique

Université YAHIA Farés MEDEA

Faculté : de technologie

Département : de génie des procédés et environnement

Spécialité :de génie des procédés pharmaceutique

Thème

Etude des activités enzymatique des micro algue en vue d'une application indstrielle

Présenter Par :

LAIDANI AYMENE

Dirigé Par :

Benkiar amina

Tahraoui Hichem

2020-2021

REMERCIMENT

Je voudrais tout d'abord adresser toute ma gratitude àMME BENKIAR AMINA et MR HICHAM TAHRAOUI , pour ses engagement, son aide et ses précieux conseils qu'ils ontsus me transmettre tout au long de ce projet. Je tiens à les remercier tout particulièrement pour son soutien durant toute cette année. Ma volonté de poursuivre dans ce domaine tient en particulier à son enseignement pour lequel, je souhaite lui témoigner toute ma reconnaissance.

Je souhaite témoigner de la richesse de cette année au travers d'un corps professoral passionné, déterminé et qui a toujours su manifester son soutien. Je remercie toutes ces personnes qui ont contribué au renforcement de mes connaissances et qui m'ont donné les outils indispensables à la poursuite de mes études.

J'adresse mes sincères remerciements à tous les professeurs, intervenants et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques m'ont permis de mener à bien mon travail.

Un grand merci à l'ensemble de ma famille et plus particulièrement à mes parents et ma sœur pour leur amour, leur confiance, leurs conseils ainsi que leur soutien inconditionnel qui m'a permis de réaliser les études pour lesquelles je me destine et par conséquent ce mémoire. Merci à ma marraine, Marie Claire pour m'avoir encouragée et épaulée durant toutes mes études.

DÉDICAS

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

- *A l'homme, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect : mon cher père SELIMAN LAIDANI*

A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non àmes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse: mon adorable mère HAMIDA.

A ma chère sœur RAHMA et qui n'a pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que Dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.

A mes adorables petits frèresqui savent toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.

A Mes chers amis (es) : Ibrahim ,mouloud ,oussama , benisssa ,Dahmen…..etc.

A Toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce travail.

A Toute ma promo du département des génie desprocédée pharmacetique

Merci pour leurs amours et leurs encouragements.

Résumer

De nombreuses études récentes portent sur les champignons endophytes qui constituent un important réservoir d'enzymes extracellulaires. Ils représentent aussi un modèle symbiotique très intéressent des microalgue, notamment *chlorella sorokiniana*. qui est une microalgue verte d'eau douce dont la production mondiale expriméeen biomasse sèche dépasse 2000 tonnes/an. Elle présente une composition biochimiquecomplexe (protéines, amylase , kératinase ,lipides, pigments, enzymes, .)A la lumière de ces connaissances, nous avons jugé utile de débuter un travail portant sur l'activité enzymatique, amylolytique et protéolytique,kératinolityque, de la souche *chlorella sorokiniana* étant donné l'importance majeur des amylases et protéases en industries (alimentaire, pharmaceutique, détergents,…).

L'étude a été conduite en utilisant une souche de micro algue *chlorella sorokiniana* Après un test de mise en évidence de l'activité amylolytique et protéolytique et kératinolityque sur milieux solides à base de substrats spécifiques (amidon et gélatine et farine de plume respectivement), Cette souche qui est productrice d'amylases et de protéases et de kératinase.. Concernant les activités enzymatiques, l'activité protéolytique a été selon la méthode de Kembhavi, alors que l'activité kératinolytique est estimée selon le protocole de Jaouadi et al**[1].**

ملخص

تركز العديد من الدراسات الحديثة على الكائنات الحية الدقيقة التي تعد مستودعًا مهمًا للإنزيمات خارج الخلية. كما أنها تمثل وهي طحالب دقيقة خضراء للمياه .Chlorella sorokiniana نموذجًا تكافليًا مثيرًا للاهتمام من الطحالب الدقيقة ، ولا سيما العذبة يتجاوز إنتاجها العالمي معبراً عنه بالكتلة الحيوية الجافة 2000 طن / سنة. له تركيبة كيميائية حيوية معقدة (بروتينات ، دهون ، أصباغ ، إنزيمات ، ...). في ضوء هذه المعرفة ، اعتبرنا أنه من المفيد بدء العمل على تحديد طبيعة الإنزيم الذي تفرزه الطحالب الدقيقة موضوع دراستنا. من بين الأنشطة الأنزيمية ، لوحظت القوة المحللة للبروتين ، والكيراتين ، والميلولات.

الكلمات المفتاحية: الطحالب الدقيقة ، الكلوريلا سوروكينيانا ، الإنزيم ، البروتياز ، الكيراتيناز ، ألفا أميليز

Abstract

Many recent studies focus on microorganisms that are an important reservoir of extracellular enzymes. They also represent a very interesting symbiotic model of microalgae, in particular Chlorella sorokiniana. which is a green freshwater microalgae whose global production expressed as dry biomass exceeds 2000 tonnes / year. It has a complex biochemical composition (proteins, lipids, pigments, enzymes, ...). In the light of this knowledge, we deemed it useful to start work on determining the nature of the enzyme secreted by the microalgae subject of our study. Among the enzymatic activities, the proteolytic, keratinolytic and amylolytic power are noted.

Keywords: Microalgae, Chlorella sorokiniana, Enzyme, Protease, Keratinase, α-amylase..

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction

Revue bibliographique

Chapitre I : Les enzymes

1-Généralités et origines des enzymes industrielles **1**

1.1.Définition des enzymes **1**

1.2. Classification des enzymes **1**

1.3. Origine des enzymes industrielles **2**

1.4. Les hydrolases **3**

1.4.1. Les protéases **3**

1.4.1.1. Classification des protéases **3**

1.4.1.2. Sources de protéases **4**

1.4.1.3. Applications des protéases **5**

1.4.2. Les amylases **8**

1.4.2.1. Applications industrielles de α –amylase **9**

1.4.3. Les kiratinase **12**

1.4.3.1. Définition de la Kératine **12**

1.4.3.2. Rôle de la kératine **12**

1.4.3.4. Kératinases **12**

1.4.3.5. Sources microbiennes des kératinases **12**

1.4.3.6. Applications industrielles des kératinases **13**

Chapitre II

2. Généralité sur les micro-algues **14**

2.1. Définition **14**

2.2 Composition biochimique des micro-algues **14**

2.3. Diversité et classification **15**

2.4. Mécanisme de la photosynthèse chez les micro-algues **15**

2.5. Croissance des micro-algues **18**

2.6. Effet de différents paramètres sur la croissance des micro-algues **19**

Influence de la lumière **19**

Influence de la température **20**

Influence du pH **20**

2.7. Domaines d'application des micro-algues **22**

2.7.1. Application en alimentation et santé **22**

2.7.2. Utilisation des micro-algues dans l'industrie cosmétique **24**

2.7.3. Utilisation des micro-algues en agriculture **25**

2.7.4. Utilisation des micro-algues comme source de biocarburant **25**

Partie expérimental

3.1. Introduction **27**

3.2. Matériels et méthode **27**

3.2.1. Verreries et matériels **27**

3.2.2. Matériels biologiques **27**

3.2.3. Produits chimiques et réactifs **27**

3.2.4. Tampons **28**

3.2.5. Milieux de culture **28**

3.3. Cinétique de croissance et production de chlorophylle **30**

3.4. Dosage de l'activité protéolytique **31**

3.5. Dosage de l'activité kératinolytique **32**

Résultats et discussion

4.1. Introduction **33**

4.2. Cinétique de croissance des micro-algues **33**

4.3. Production de chlorophylle **34**

4.4. Pouvoir protéolytiques des micro-algues **35**

4.4.1. Test qualitatif **35**

4.4.2. Test quantitatif **36**

4.5. Activité kératinolytique **37**

4.5.1. Test qualitatif **37**

4.5.2. Test quantitatif **38**

4.6. Activité α-amylase **38**

4.7. Conclusion **39**

Conclusion générale

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU	TITRE	PAGE
Tableau 1.1	Classification des enzymes	1
Tableau 2.1	Compositions biochimiques de micro-algues	14
Tableau 2.2	Diversité des micro-algues eucaryotes et procaryotes, marines et d'eau douce	15
Tableau 4.1	Résultats du dosage protéolytique	37
Tableau 4.2	Résultats du dosage kératénolytique	38

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
Figure 2.1	Interaction des deux photosystèmes de la photosynthèse	16
Figure 2. 2	Représentation schématique de la membrane du thylakoïde, lieu de déroulement de la photosynthèse.	16
Figure 2.3	Mécanisme de photosynthèse.	17
Figure 2.4	Les différentes étapes du cycle de Calvin	18
Figure 2. 5	Courbe de croissance d'une micro-algue en fonction du temps	19
Figure 2. 6	Variation du taux de croissance en fonction de la lumière	20
Figure 2.7	Variation du taux de croissance en fonction du pH	21
Figure 2.8	Réaction de transestérification	26
Figure 4.1	Profils de croissance des micro-algues	33
Figure 4.2	Profils de production de la chlorophylle par les micro-algues.	35
Figure 4.3	Mise évidence de l'activité protéolytique des micro-algues	36
Figure 4.4	Aspect du halo sur le milieu GNL après incubation	36
Figure 4.5	Mise évidence de l'activité kératinolytique des micro-algues	37
Figure 4.6	Mise évidence de l'activité amylolytique des micro-algues	38
Figure 4.7	Détection de l'activité amylolytique des micro-algues par l'iode	39

LISTE DES ABREVIATIONS

E.C : (Enzyme Commission)

Ph : Potentiel hydrogène

IUBMB : International Union of Biochemistry and Molecular Biology

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

PS : photosystèmes

LHC : (Light Harvesting Complex)

PQ : plastoquinones

PC : plastocyanine

rbcL : Rubisco Large sub unit

CID : le carbone inorganique dissous

HCO_3 : bicarbonate

PUFA : Polyinsaturated fatty acids

EPA : Acide Ecosapentanoique

DHA : Acide hexanoique

FAO :Food and Agriculture Organiszation

PUA : Polyunsaturated aldehydes

GNL :Gélose nutritive à base de lait

GNFP :Gélose nutritive à base de farine de plume

INTRODUCTION GENERALE

Depuis très longtemps, les enzymes ont toujours fait partie de notre vie quotidienne **[2]**. Elles sont présentes dans toutes les cellules et sont indispensables pour la survie de toutes les espèces vivantes. En effet, les enzymes sont capables de dégrader et de transformer différents composés se trouvant dans l'environnement du vivant. Un avantage pouvant être utilisé par certaines industries dans différents domaines. L'emploi des enzymes connaît un succès remarquable et ouvre des perspectives nouvelles. En effet certaines industries n'ont vu le jour que grâce à la mise sur le marché d'enzymes purifiés. **[3]** En1998, le marché mondial des enzymes a été estimé à environ 1.5 milliard de dollars et des augmentations allant de 2% à 25% de ce chiffre annuellement, dépendant du domaine ont été signalés **[4]**

La demande mondiale au niveau industriel pour les enzymes d'origine microbienne croit d'une année à l'autre et ce afin d'améliorer certains procédés de fabrications tels que l'industrie du textile (décoloration de jeans par exemple), la papeterie (procédé de blanchiment de la pâte à papier..), dépollution (attaque des substances phénoliques..), industrie alimentaire (boulangerie,…) **[5]**

Pour faire face à la demande croissante des industriels notamment dans le domaine des biocatalyses et en se basant sur le modèle de la synthèse organique « traditionnelle » pour aboutir à une chimie « verte » plus respectueuse de l'environnement, de nombreux efforts ont été fournis pour la recherche d'enzymes d'intérêt industriel. Une attention particulière pour les enzymes provenant de microorganismes extrêmophiles a fait l'objet de plusieurs études. **[6].**

En effet, les microorganismes extrêmophiles ont développés des stratégies très variées pour s'adapter aux contraintes physico-chimiques. Parmi ces microorganismse qu'en trouve les micro-algues qui donne plusieurs activité enzymatique.

Les micro-algues font l'objet d'applications dans différents domaines de la production bioénergétique, à la production de métabolites à grande valeur ajoutée ou comme outil de bioremédiation de milieux pollués.

Dans cette optique, notre objectif s'articule essentiellement sur les points suivants :

- La croissance des micro-algues *Chlorella sorokiniana* et la production de chlorophylle ;
- L'évaluation des performances des micro-algues dans la production d'enzymes.
-

1. Généralités et origines des enzymes industrielles

1.1. Définition des enzymes

Les enzymes sont des macromolécules protéiques de haute masse moléculaire (10 à 100 kDa). Elles catalysent les réactions chimiques en augmentant leurs vitesses d'au moins 106 fois, par rapport à la réaction en leur absence **[7]**. En effet, les enzymes sont présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires **[8].** En 2005, plus de 3000 activités enzymatiques différentes ont été isolées et identifiées **[9]**, la structure d'environ 1300 d'entre elles a été déterminée **[10]**.

1.2. Classification des enzymes

La commission des enzymes de l'union internationale de biochimie classe les enzymes en six grandes classes, selon leur activité catalytique **(Tableau 1.1) [11]**. Environ 75% des enzymes industrielles sont des hydrolases **[12]**.

Tableau 1.1 : Classification des enzymes **[12]**

E.C (classe)	Classification	Type de réaction catalysée
E.C.1	Oxydoréductases	Oxydoréduction
E.C.2	Transférases	Transfert de groupements fonctionnels
E.C.3	Hydrolases	Hydrolyse (coupe les liens chimiques par addition d'une molécule d'eau)
E.C.4	Lyases	Elimination de groupement et formation de doubles Liaisons
E.C.5	Isomérases	Isomérisation
E.C.6	Ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP

1.3. Origine des enzymes industrielles

Les enzymes industrielles peuvent avoir plusieurs origines dont les végétaux, les animaux et les microorganismes [13].

Les microorganismes constituent la principale source d'enzymes industrielles : 50% proviennent des champignons et des levures, 35% des bactéries, alors que 15% sont d'origine végétale ou animale [14]. L'extraction à partir des plantes et des animaux est cependant limitée par de nombreux paramètres difficiles à contrôler. Les principaux avantages des enzymes d'origine microbienne sont les suivants :

- Une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques ;
- Une possibilité d'utilisation de matières premières bon marché ;
- Des rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des souches microbiennes par génie génétique et l'optimisation des conditions de production [13]

Les enzymes produites par les thermophiles et les hyperthermophiles (bactéries, champignons) sont habituellement thermostables, c'est-à-dire qu'elles sont résistantes à l'inactivation irréversible à des températures élevées. On les appelle thermozymes ou thermoenzymes [15]. Les enzymes produites par les mésophiles sont, quant à elles, connues sous le nom de mésozymes. Ces dernières ne sont souvent pas appropriées pour certains procédés industriels qui requièrent des conditions réactionnelles parfois rudes et particulières (température, pH, présence de solvants). Les thermozymes possèdent des avantages biotechnologiques par rapport aux mésozymes. Elles sont plus résistantes que les mésozymes à la dénaturation thermique et chimique [16]. Elles sont plus faciles à purifier par traitement à la chaleur [15]. En raison de leur thermo stabilité, les réactions catalysées par des thermozymes sont moins susceptibles d'être contaminées par des microorganismes et ont souvent des taux réactionnels plus élevés que les mêmes réactions catalysées par des mésozymes. Ainsi que, le fait d'opérer des procédés à des températures élevées entraîne une diminution de la viscosité du milieu réactionnel en plus d'augmenter la solubilité des substrats [17].

Parmi les enzymes actives à des températures élevées d'intérêt industriel, les protéases, les lipases et d'autres hydrolases comme les cellulases, les chitinases et les amylases sans oublier la taq polymérase **[18]**. En effet, une des bactéries thermophiles les plus connues dont les enzymes ont trouvé une application industrielle, c'est Thermus aquaticus, bactérie thermophile aérobie, hétérotrophe, isolée en 1969 dans une source chaude du parc national de Yellowstone par le microbiologiste américain **Thomas Brock.**

1.4. Les hydrolases

Les hydrolases sont des enzymes de dégradation qui provoquent la coupure d'une molécule et fixent les radicaux H et OH de l'eau sur les valences libérées. Ces enzymes ne nécessitent pas généralement de coenzymes, elles sont activables par des cations. Elles interviennent sur les fonctions éthers, acétals, esters phosphoriques, liaisons O-O desperoxydes, C-N des amides **[18].**

1.4.1. Les protéases

Les protéases peuvent être définies comme étant des enzymes capables d'hydrolyser les protéines par coupure d'une ou de plusieurs liaisons peptidiques. Elles sont dénommées peptidase par l'union internationale de biochimie et biologie moléculaire (IUBMB), mais elles portent d'autres noms, comme protéinases ou enzymes protéolytiques

1.4.1.1. Classification des protéases

Les enzymes sont classées par la commission des enzymes (C.E.) de l'IUBMB en six classes (oxydoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases, ligases). Les protéases appartiennent à la sous-classe 4 des hydrolases.

Les protéases peuvent être classées elles-mêmes en protéases acides, neutres et alcalines, selon la gamme du pH dans laquelle leur activité est optimale **[19]** ou en exopeptidases et endopeptidases, selon leur mode d'action; les premières hydrolysent les liaisons peptidiques à partir des extrémités, les secondes agissent en divers points de la séquence **[20]**. Les protéases peuvent être classées également selon les acides aminés du site actif, ce qui permet de les regrouper en protéases à sérine , les protéases à cystéine, protéases à aspartate, métalloprotéases, etc. Cette dernière classification traduit les mécanismes catalytiques différents de chaque groupe.

1.4.1.2. Sources de protéases

la vaste distribution des protéases chez les plantes, les animaux, et les microorganismes démontre que ces enzymes sont nécessaires a la survie des organismes ; les protéases jouent des rôles physiologiques importants dans les différents processus biologiques **[21]** .

a)Protéases d'origine animale

Les protéases d'origine animale sont utilisées dans le domaine alimentaire comme la présure ou dans le domaine médical tel que la trypsine et la chymotrypsine. Ces dernières sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs **[21].**

- **Présure** est un coagulant du lait d'origine animale extrait de la caillette (le quatrième estomac) de veaux non sevrés. La préparation est constituée de 80% de chymosine et de 20% de pepsine. Elle est employée pour la coagulation du lait dans la fabrication des fromages **[22].**
- **Trypsine** est une protéase digestive à sérine, l'application de la trypsine dans l'industrie alimentaire est limitée à cause du goût très amer qu'elle entraîne **[21]**Cette enzyme est très utilisée pour des approches de recherche en protéomique, spécialement pour la caractérisation et le séquençage de protéines **[23].** En culture cellulaire la trypsine est utilisée pour détacher des cellules adhérant à d'autres cellules ou a une matrice. En effet, la trypsine clive les protéines membranaires d'adhésion, et les cellules se retrouvent alors en suspension **[24]**
- **Chymotrypsine** est une protéase digestive à sérine, elle est utilisée essentiellement dans les applications de diagnostic et d'analyse **.**

b) Protéases d'origine microbienne

Les protéases microbiennes peuvent être produites par les bactéries, les moisissures et les levures. Dès que le développement de la microbiologie a permis de mieux comprendre les systèmes qui président à la synthèse des enzymes chez les microorganismes, la production industrielle d'enzymes s'est orientée vers les processus fermentaires **[25].**les protéases d'origine microbiennes représentent 40% des enzymes du marché mondial **[26].**

c)Protéases d'origine végétale

Les protéases végétales sont regroupées selon leur action catalytique en protéases à sérine, à cystéine, à aspartate et en métalloprotéases **[27]** Les protéases ont été identifiées et étudiées chez plusieurs familles végétales, particulièrement chez les Asteraceae, les Caricaceae, les Moraceae, Asclepiadaceae, Apocynaceae et Euphorbiaceae **[28]**

Les protéases végétales sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques des plantes, elles interviennent dans le renouvellement des protéines, la dégradation des protéines mal repliées, la sénescence **[29]** et dans divers processus cellulaires, y compris les mécanismes de défense. En effet, ces protéases sont impliquées dans tous les aspects du cycle de vie allant du stockage des protéines pendant la germination des graines à l'initiation de programmes de sénescence et la mort cellulaire **[30].**

1.4.1.3. Applications des protéases

Les protéases occupent une grande part du marché des enzymes industrielles. Les principales industries utilisatrices de protéases sont l'industrie alimentaire avec ces différentes applications, l'industrie des détergents pour lessives, la tannerie et l'industrie pharmaceutique et médicale .

Industrie alimentaire

L'application des protéases à l'industrie alimentaire n'est pas récente. Ce secteur représente 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'applications **[31].**

Fabrication de fromages: représente la majeure application de protéases dans l'industrie alimentaire **[32]** Les enzymes coagulantes fongiques sont les plus utilisées pour cette fin, car elles donnent de bons résultats souvent comparables à ceux obtenus par la présure et la pepsine bovine et porcine. Tandis que, la présure végétale à été écartée à cause de sont activité protéolytique élevée **[31]**. Ces enzymes permettent de coaguler le lait rapidement à son pH naturel avec très peu de dégradation subséquente des protéines du lait. Par conséquence, il y a formation du caillé, l'étape clé dans les produits fromagères **[33].**
Les protéases utilisées à cette fin sont produites par des microorganismes GRAS tels que Mucor miehei, Bacillus subtilis et Endothia parasitica. Les protéase fongiques acides, alcalines et neutres produites par Aspergillus oryzae ont également été utilisées pour l'affinage des fromages **[34].**

Panification : Les endo et les exoprotéinases d'Aspergillus oryzae (papaïne ou bromélaine) sont utilisées pour modifier le gluten de blé par une protéolyse limitée selon les caractéristiques désirées de la pâte. Ces protéases attaquent le gluten de la farine et empêchent la rétention le dioxyde de carbone produit par les levures **[35].** Un tel traitement enzymatique permet de réduire le temps de pétrissage et d'augmenter ainsi le volume de la mie **[31].**Des protéases bactériennes sont également souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte **[32]**;

Attendrissement des viandes : Les protéases permettent une dégradation primaire des tissus connecteurs de collagène et d'élastine, et la majeure partie de l'action enzymatique s'effectue dans une gamme de température de 40 à 60°C.

La papaïne et largement utilisée à cette fin. Ainsi, il est possible de l'appliquer sur la viande immédiatement avant la préparation ou bien l'enzyme peut être injectée à l'animal juste avant l'abattage. Ceci est possible, car l'enzyme est alors inoculées sous sa forme oxydée inactive laquelle devient active par réduction dans le corps de l'animal. L'enzyme attendrisseur idéal doit attaquer les tissus connecteurs à de faibles température est être inactivée à 50°C. Elle doit aussi avoir une bonne activité aux pH usuels de la viande, soit entre 4 et 5. Comme la papaïne, certaines enzymes protéolytiques microbiennes, telle que la protéase alcaline d'Aspergillus oryzae, sont employées comme des additifs pour augmenter la digestibilité des aliments et l'attendrissage des viandes ;

brasserie : l'action protéolytique de la papaïne donne à la bière finie une bonne stabilité colloïdale à froid **[36].**et ceci en empêchant la formation d'un précipité de protéine et de tannin causé par l'entreposage à froid de la bièrre ;

Préparation de produits à base de soja : se fait par des protéases neutres ou alcalines d'origine fongiques qui sont utilisées depuis très longtemps. Le traitement de ces produits par la protéase alcaline permet la mise au point d'hydrolysats solubles utilisés comme additifs protéiniques dans les jus et boissons fruitées et dans la formulation des aliments diététiques **[32].**

a. 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, notamment :

- Comme aide à la digestion, cas des protéases d'Aspergillus oryzae **[32]**
- Traitement des bruleurs, plaies et des ulcères dermiques par combinaison des collagénases provenant de Clostridium sp. ou des subtilisines avec des antibiotiques [48] ;
- L'hydrolyse de la fibrine et la fibrinogène chez les patients souffrant d'une hémodialyse en utilisant la « Brinase » (une protéase acide plasmin-like) **[32]** ;
- Traitement de furoncles, d'abcès et de plaies profondes pouvant se faire par une élastotérase provenant de Bacillus subtilis **[37]** ;
- Vaccination antiparasitaire, étant donné que les protéases jouent un rôle critique dans la virulence des agents pathogène **[38].**

b. Détergence

Les détergents constituent l'application industrielle la plus importante des enzymes. Les protéases jouent un très grand rôle dans l'amélioration du pouvoir détergent d'une lessive. Elles sont capables de dissoudre les taches protéiques à basse température contrairement aux produits chimiques qui ne possèdent pas des propriétés équivalentes même à haute température. La protéase la plus fréquemment utilisée est la subtilisine de Bacillus qui est capable de cliver de nombreux liens peptidiques avec une préférence pour les résidus hydrophobes **[39].**

c. Tannerie et textile

Les protéases alcalines d'Aspergillus et de Bacillus sont utilisées en tannerie depuis le début du siècle dernier pour leurs capacités à libérer les poils et la laine de la peau à tanner et ceci dans ces trois traitement : reverdissage, le délainage et le confitage**[32].**

La protéase neutre de Bacillus subtilis peut être également utilisée pour le décreusage de la soie naturelle.

1.4.2. Les amylases

Les amylases (EC.3.2.1.x) sont des enzymes appartenant à la troisième classe, celle des hydrolases, de type endoglycanases. Elles agissent sur les liaisons (1,4) de l'amidon. En effet, les amylases catalysent la dégradation des polymères d'amidon pour produire des dextrines et différents gluco-oligosaccharides de longueurs variables **[40]**. Elles sont des métallo-enzymes à calcium. Ces ions sont nécessaires au maintien de la stabilité de la structure tertiaire de l'enzyme et à son activité **[41]**.

Les amylases sont classées en deux catégories, endoamylases et exoamylases. Les endoamylases catalysent l'hydrolyse à l'intérieur de la molécule d'amidon d'une manière aléatoire. Cette action provoque la formation d'oligosaccharides linéaires et ramifiés de diverses longueurs de chaîne. Les exoamylases hydrolysent l'extrémité non réductrice, pour donner successivement des produits finaux plus courts **[40]**.

Les amylases proviennent de différentes sources (plantes, animaux et microorganismes). Aux cours de la dernière décennie. Des recherches considérables ont été entreprises avec l'α-amylase extracellulaire étant produite par une grande variété de micro-organismes **[42]**.

En effet, l'α-amylase [α-(1,4)-D- glucanohydrolase (E.C.3.2.1.1)] **[43]** est une endoamylase qui hydrolyse au hasard les liaisons osidiques (1,4), de l'amylose, de l'amylopectine, de l'amidon et du glycogène et l'exclusion des liaisons terminales de ces chaînes. Elle provoque la libération du glucose, du maltose et surtout des dextrines **[44]**. Elle a été dérivée de plusieurs champignons et bactéries **[45]**. Les α-amylases de Bacillus amyloliquefaciens et d'Aspergillus oryzae sont des glycoprotéines et renferment 478 acides aminés répartis en 2 domaines globulaires appelés A (1-380 résidus) et B (381-478 résidus). Ces domaines sont associés par une chaîne polypeptidique constituée principalement de résidus hydrophobes **[46].** En effet, les α-amylases microbiennes sont parmi les enzymes les plus utilisés dans les procédés industriels : industrie alimentaire, pharmaceutique, textile, papeterie, et détergent, en raison de leur productivité et thermostabilité **[47]**.

L'avantage majeur de l'utilisation des microorganismes pour la production des amylases est la capacité de produire à grande échelle ainsi que, la facilité de manipulation pour obtenir des enzymes avec des caractéristiques souhaitées **[42]**

Les amylases sont parmi les enzymes les plus importantes en biotechnologie **[40]**. Elles représentent environ 25 à 33% du marché mondial des enzymes **[48].**En effet, les amylases possèdent une gamme étendue d'applicationstels que les industries de la saccharification d'amidon, le textile, les aliments, le boulangerie, le brassage et la distillation **[34]**. En raison de l'importance industrielle de cette enzyme, un intérêt est porté à l'isolement de nouvelles amylases appropriées à applications industrielles nouvelles **[49].**

1.4.2.1. Applications industrielles de α –amylase :

L'α -amylase gagne une attention accrue en raison de ses propriétés d'hydrolyser l'amidon. Ils existent d'autres activités qui peuvent être réalisées grâce à cette propriété. Ces enzymes ont remplacé les méthodes chimiques d'hydrolyse utilisées précédemment dans divers secteurs industriels pour rendre les processus plus facile **[50]**. Il existe de nombreuses applications potentielles largement utilisées de cette enzyme sur le plan industriel.

a)Hydrolyse de l'amidon :

L'amidon est utilisé dans la production de fructose et les sirops de glucose, Ce processus comporte trois étapes: gélatinisation, Liquéfaction et saccharification. La gélatinisation implique la dissolution des granules d'amidon dans l'eau pour former une suspension d'amidon visqueux. L'amylose et l'amylopectine sont dispersées dans l'eau lors de la dissolution. La Liquéfaction de l'amidon est une hydrolyse partielle en petites dextrines dont l'α- amylase entraîne une réduction de la viscosité de la suspension d'amidon. La Saccharification est la production de glucose et le sirop de fructose par hydrolyse supplémentaire **[51].**

L' α -amylase utilisée dans l'étape de liquéfaction peut être réalisée à partir de diverses sources microbiennes. Les amylases thermostables peuvent être utilisées pour l'hydrolyse à une température élevée. ; Bacillus stearothermophilus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus licheniformis et Pyrococcusfuriosus sont quelques-unes.

D'après Gupta et al ; 2003 **[52]**de nombreuses sources microbiennes utilisées pour produire l' α -amylase utilisé dans la conversion d'amidon. Dans un premier temps, l' α -amylase de Bacillus amyloliquefaciens a été utilisé, mais il a été remplacé par l' α -amylase de Bacillus stearothermophilus ou Bacillus licheniformis **[53].**

b) Boulangerie :

L'α-amylase est ajoutée à la pâte dans un processus de cuisson du pain. Cela provoque l'hydrolyse de l'amidon en petits dextrines qui peuvent encore être fermentés par des levures. Cela augmente la vitesse de fermentation. En outre l'hydrolyse de l'amidon diminue la viscosité de la pâte, ce qui améliore la texture et l'augmentation du volume du pain par l'augmentation de la pâte **[54].**Une fois que la cuisson est terminée, l'alpha amylase est également utilisé en tant qu'agent anti-rassissement pour améliorer la durée de conservation et éviter tout changement au cours du stockage des produits cuits au four. Tous les changements indésirables comme augmentation de la fermeté, la perte de netteté de la croûte, diminution de la teneur en humidité de la mie et la perte de saveur de pain.

c) L'industrie de détergent :

L'utilisation d'enzymes dans les détergents a augmenté avec les méthodes changeantes de la vaisselle et la lessive. Les consommateurs préfèrent utiliser de l'eau froide et des conditions douces. Plus tôt les produits chimiques utilisés dans les détergents ont causé des dommages en cas d'ingestion et les conditions de la vaisselle étaient très dures. Cependant les enzymes ont montré à l'industrie un chemin alternatif. Les enzymes sont sûrs et le travail sera dans des conditions douces **[55]**.

L'alpha-amylase est utilisée pour dégrader l'amidon en plus petits oligosaccharides solubles dans l'eau Par conséquent, l'élimination de l'amidon est également importante de maintenir la blancheur du linge.

d)Désencollage des textiles :

L'amidon est un agent d'encollage préféré car il est facilement disponible, moins coûteux. La couche de l'amidon est soumise à une hydrolyse dans le procédé de désencollage où l'α-amylase est utilisée pour cliver des particules d'amidon au hasard en composants solubles dans l'eau qui peuvent être éliminés par lavage. L'enzyme agit spécifiquement sur les molécules d'amidon seul, en laissant les fibres non affecté **[56].**

e)Industrie du papier :

Le papier est également traité avec des agents d'encollage pour le protéger contre les contraintes mécaniques au cours du traitement **[57]**. Le dimensionnement contribue également à une meilleure qualité du papier en termes de résistance, la douceur, et l'écriture.

L'amidon est couramment utilisé comme agent d'encollage. Le rôle de la α-amylase dans l'industrie du papier, est l'hydrolyse partielle de l'amidon pour le rendre moins visqueux dans

un procédé discontinu ou un procédé continu étant donné que la nature très visqueuse d'amidon naturel le rend impropre pour le revêtement sur le papier **[58]**.

f)L'industrie de biocarburant :

L'amidon est un produit de départ économique, il est utilisé pour la production d'éthanol en tant que biocarburant **[59]** Ceci est réalisé dans une série d'étapes. Tout d'abord, l'amidon est soumis à une gélatinisation pour former une suspension d'amidon visqueux. Ceci est suivi par le processus de saccharification, où l'amidon est hydrolysé par l'α-amylase pour obtenir les sucres fermentes cibles pour produire de l'éthanol.**[60]**

1.4.3. Les kiratinase

1.4.3.1. Définition de la Kératine

Le mot « Kératine » est apparu dans la littérature aux environs de l'année 1850. La kératine vient du mot « Kera » en grec qui signifie une corne **[61].** En effet les kératines représentent une famille des protéines fibreuses insolubles produites dans certaines cellules épithéliales des vertébrés supérieurs (reptiles, oiseaux, et mammifères) **[62]** connues sous le nom des scléroprotéines **[63]**En fonction de leurs teneurs en soufre, les kératines sont regroupées en kératines dures (ongles, plumes, poils et sabots) et en kératines molles (peau et cals) **[64]**

1.4.3.2. Rôle de la kératine

Le rôle de la kératine est d'assurer une protection de l'animal (ou de l'homme) contre son environnement naturel. C'est pourquoi elle montre une grande résistance aux attaques chimiques et enzymatiques. Cette résistance est due à sa forte teneur en cystéine **[65]**

1.4.3.4. Kératinases

Les kératinases sont généralement des protéases a serines ou des métalloprotéases qui hydrolysent les kératines **[66].** la kératinase agit comme catalyseur potentiel dans la dégradation des déchets kératiniques sans affecter les protéines structurelles **[67]**

1.4.3.5. 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 **[68].**

Cependant, les kératinases ont été produites aussi par d'autres souches bactériennes tel que Pseudomonas, Chryseobacterium, Lysobacter, Nesterenkonia, Kocuria, Microbacterium, Stenotrophomonas, Serratia, et Meiothermus **[69]** Les Actinomycètes du genre Thermoactinomyces**[70]**et Actinomadura keratinilytica **[71].** Des champignons : Trichophyton **[72].**Microsporum **[73]**

1.4.3.6. Applications industrielles des kératinases

L'application des kératinases dans l'environnement ainsi que dans le secteur de la biotechnologie a été bien étudiée **[66].**citant les applications suivantes :

a) Détergence

L'emploi d'enzymes dans les détergents est l'application la plus répandue de toutes les technologies enzymatiques **[74]** ; environ 89 % des enzymes de détergent sont des protéases alcalines **[75]**Les kératinases peuvent contribuer à l'élimination des surfaces kératiniques qui sont souvent rencontrées dans la blanchisserie, comme les cols des chemises (38). De plus, les kératinases sont utilisés dans le nettoyage des canalisations bouchées par des déchets kératiniques **[76].**

b) Récupération de l'argent

Les protéases alcalines jouent un rôle crucial dans le bioprocédé des films photographiques usés pour la récupération d'argent ; ces pellicules contiennent du polyester comme matière de base, enveloppée par une couche de gélatine et une couche d'argent (1,5 à 2 % par unité de masse). Cet argent est récupéré en brûlant ces pellicules, ce qui provoque une pollution environnementale indésirable, et pour remédier, des protéases alcalines sont mises en place pour la récupération en continu de l'argent à partir de ces films photographiques en décomposant la couche de gélatine qui est difficile à dégrader par d'autres protéases **[77].**

c) Traitement de cuir

Le tannage est un procédé chimique, consistant à transformer les peaux en les rendant plus durables et plus souples **[78].** Les méthodes conventionnelles dans le traitement de cuir utilisent du sulfure d'hydrogène et d'autres produits chimiques ce qui cause les pollutions environnementales. Ainsi, pour ces raisons environnementales, le traitement du cuir utilise une approche enzymatique ce qui il lui offre plusieurs avantages (diminue les coûts, améliore la qualité du produit final) **[79].**

d) Autres applications

Autres applications potentielles des kératinases, c'est la digestion anaérobie des déchets de volaille pour produire du gaz naturel comme combustible **[80]** Dans le domaine de la médecine et de la pharmacie, elles sont employées pour l'élimination de l'acné, pour la préparation des vaccins pour la dermatophytose et comme additifs dans les agents pour éclaircir la peau, car ils stimulent la dégradation de la kératine **[81].**

2. Généralité sur les micro-algues

2.1. Définition

Les micro-algues sont des organismes microscopiques unicellulaires photosynthétiques qui se développent dans les milieux fortement aqueux et sont capables de convertir l'énergie lumineuse et une source de carbone en un ensemble de produits organiques. On utilise le terme «micro» car la taille d'une micro-algue varie de quelques micromètres à une centaine de micromètres.

L'existence des micro-algues et plus précisément des cyanobactéries remontent à plus de trois milliards d'années. En utilisant l'énergie solaire, elles produisirent de l'oxygène qui s'accumule lentement dans l'atmosphère primitive, atmosphère hostile riche en gaz carbonique et en méthane. L'enrichissement en oxygène de l'atmosphère primitive conduisit à la création de la couche d'ozone, qui protège la terre des rayonnements solaires ultraviolets, et provoqua des modifications du climat et de la composition de la croûte terrestre. Ces changements ont ainsi permis une colonisation des continents par de nouvelles formes de vie animale et végétale **[82].**

2.2 Composition biochimique des micro-algues :

L'intérêt des micro-algues se manifeste par la diversité de leurs compositions biochimiques. Cette biomasse se différencie principalement des autres végétaux par sa richesse en lipides, protéines, polysaccharides, vitamines, pigments et antioxydants. Le Tableau 2 recense la composition chimique de différentes micro-algues **[82]**

Tableau 2.1 : Compositions biochimiques de micro-algues **[83]**

Micro-algues	protéines	Polysaccharides (%)	Lipides (%)
Chlorella vulgaris	51-58	12-17	14-22
Dunaliella salina	57	32	6
Porphyridiumoruenium	28-39	4-57	9-14
Sporulina plantensis	46-63	8-14	4-9
Synechococcus sp	63	15	11

2.3. Diversité et classification

Les micro-algues constituent un groupe extrêmement hétérogène rassemblé autour d'une cohérence physiologique : la photosynthèse oxygénique **.**Cette famille rassemblerait de plusieurs centaines de milliers à plusieurs millions d'espèces selon les estimations, parmi lesquelles 47000 espèces sont décrites **[84].**

La classification de cette diversité est complexe (Tableau 2.2) et la taxonomie est sujette à de fréquents bouleversements du fait notamment de l'utilisation des techniques de phylogénie moléculaire **[85].**

Tableau 2.2 : Diversité des micro-algues eucaryotes et procaryotes, marines et d'eau douce **(d'après,[86])**

Règne	**Embranchement \ classe**
Procaryotes	**Cyanophytes**
	Prochlorophytes
Eucaryotes	**Bacillariphytes**
	Charophytes
	Chlorophytes
	Chrysophytes
	Cryptophytes
	Dinophytes
	Euglenophytes
	Glaucophytes
	Haptophytes
	Phaeophytes
	Phodophytes

2.4. Mécanisme de la photosynthèse chez les micro-algues

Lors de la photosynthèse, l'énergie lumineuse est convertie en énergie chimique. La lumière est absorbée par des antennes collectrices, puis transmise aux centres réactionnels

des photosystèmes localisés dans la membrane des thylakoïdes, entraînant une libération d'électrons. Ces électrons libérés conduisent à la formation des molécules énergétiques : le NADPH et l'ATP. Ce processus correspond à « la phase lumineuse ». La phase lumineuse est suivie par une phase dite « obscure » durant laquelle il y a synthèse de glucides en utilisant l'énergie produite en phase lumineuse, ainsi que le CO_2 et H_2O absorbés. L'interaction des deux photosystèmes permet l'absorption du CO_2, la production de la matière organique et de $l'O_2$ (Fig 2.1).

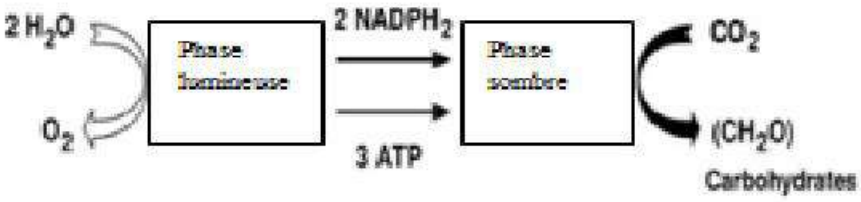


Figure 2.1: Interaction des deux photosystèmes de la photosynthèse **[87].**

La photosynthèse se déroule dans les chloroplastes au niveau des membranes des thylakoïdes (Figure 2.1). Différents enzymes, des protéines et des pigments dont chlorophylles, caroténoïdes, phycobilines et autres participent à ce processus. Les pigments photosynthétiques sont associés à des photosystèmes I (PSI) et II (PSII), d'accepteurs et de donneurs d'électrons qui présentent des complexes moléculaires P 700 et P 680 respectivement. En effet, ces pigments captent l'énergie lumineuse à l'aide d'antennes collectrices LHC (Light Harvesting Complex) qui est transférée par la suite aux photosystèmes.

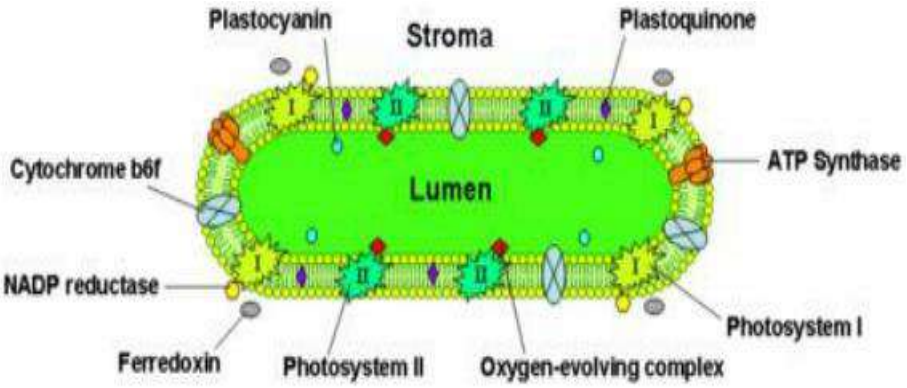


Figure 2. 2: Représentation schématique de la membrane du thylakoïde, lieu de déroulement de la photosynthèse.

2.4.1. Phase claire

Au sein du photosystème II, il y a excitation électronique de la chlorophylle qui va permettre l'extraction d'un électron (qui servira à la réduction du NADP+) à partir de la molécule d'eau (donneur primaire). Cet électron est transporté dans un premier temps jusqu'à des plastoquinones (PQ). Elles le cèdent par la suite à un complexe appelé cytochrome b6/f (cytb6/f) qui le transfère à une plastocyanine (PC).

La réduction de l'accepteur final intervient au niveau d'un deuxième centre réactionnel (PSI), elle permet de stocker du « pouvoir réducteur » dans la molécule de NADPH. L'oxydation de cette molécule ainsi que le gradient de protons généré par ces processus produira de l'énergie sous forme d'ATP (Figure 2.3).

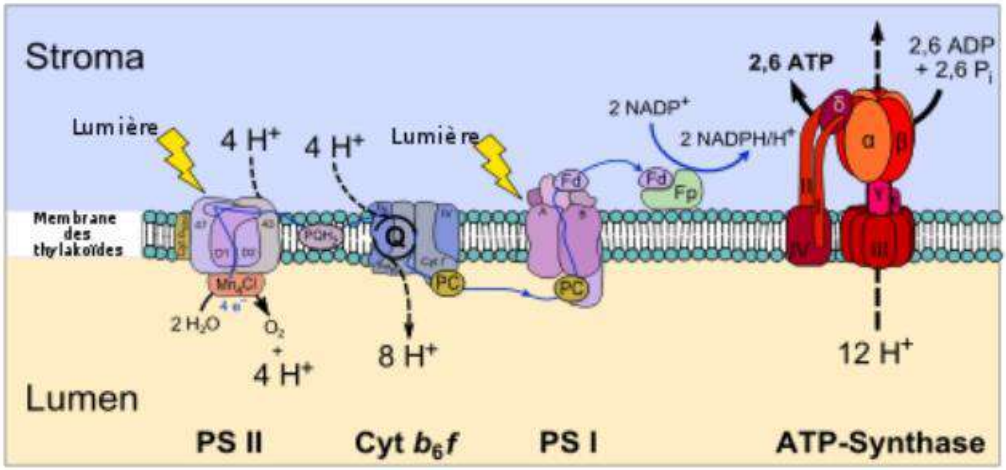


Figure 2.3 : Mécanisme de photosynthèse.

2.4.2. Phase sombre

Elle correspond à l'assimilation du CO_2 en utilisant les molécules énergétiques (ATP et NADPH) produites dans la phase claire. Ce cycle de réactions appelé cycle de Calvin-Benson se déroule à l'extérieure des thylakoïdes, au niveau du stroma.

Le cycle de Calvin (Fig. 13) est initié par l'enzyme Rubisco (D-ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase) qui condense le carbone du CO_2 à une molécule à 5 carbones (**ribulose-biphosphate**), générant molécule à 6 carbones instable qui sera scindée en deux triose phosphate : le 3 Phosphoglycérate. Une seconde phosphorylation par l'ATP produit le 1,3 biphospho glycérate, réduità son tour par le NADPH en 3-phosphoglycéraldehyde (sucre). Une série de réactions permet la régénération de l'accepteur de CO2 qui rentre dans un nouveau cycle. Le gène chloroplastique rbcL

est très utilisé comme marqueur moléculaire dans l'identification des différentes espèces de micro-algues.

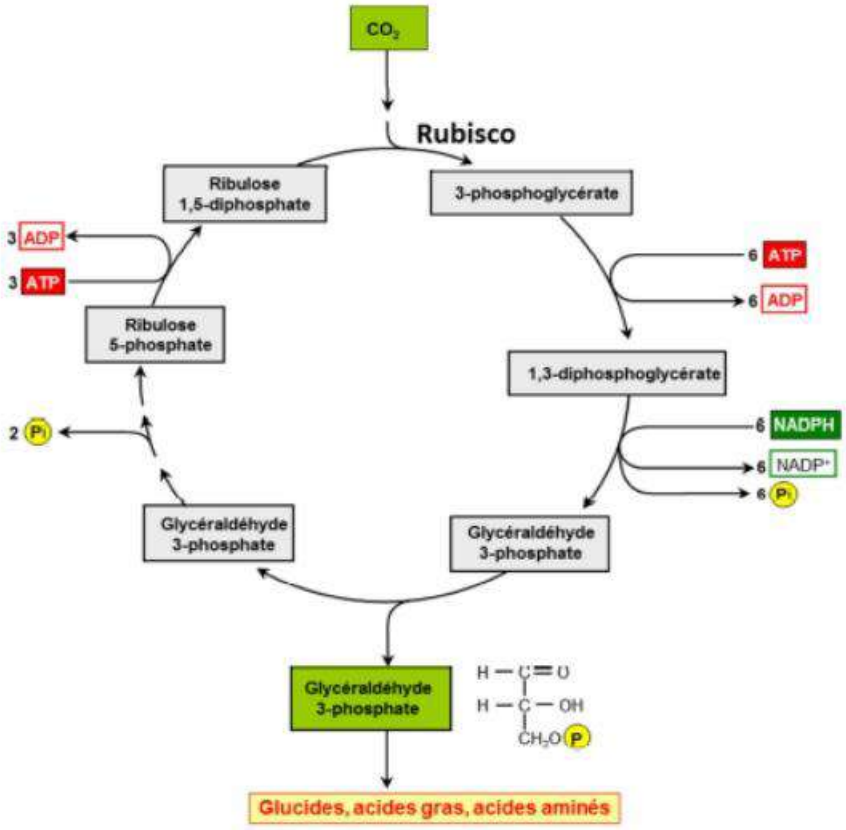


Figure 2.4: Les différentes étapes du cycle de Calvin **[88].**

2.5. Croissance des micro-algues

Est similaire à celle des bactéries la courbe de croissance des micro-algues se caractérise par la présence de quatre phases (Figure 2.5):

a) **Phase de latence:** phase d'adaptation aux conditions de culture. La croissance est lente ;

b) **Phase exponentielle:** les cellules se multiplient très vite. Cette phase est définie de par le caractère exponentiel de la croissance. La vitesse de croissance de la culture est optimale dans les conditions optimales du milieu ;

c) **phase stationnaire**: est une phase de réduction de nutriments. Le taux de morbidité est égal au taux de croissance. Les microorganismes ont tendance à accumuler des métabolites au lieu de croitre. Cette phase est idéale pour l'accumulation de la matière lipidique ainsi que des métabolites secondaires. En effet, lors de la valorisation des

métabolites de micro-algues. Cette phase est choisie pour la production en masse de ces métabolites **[89].**

d) **Phase de déclin**: dite aussi de sénescence, est due à un épuisement des nutriments provoquant la mort cellulaire.

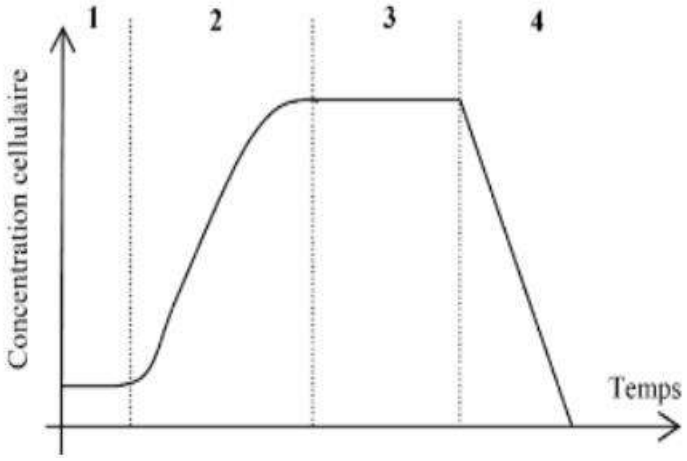


Figure 2. 5: Courbe de croissance d'une micro-algue en fonction du temps **[90].**

2.6. Effet de différents paramètres sur la croissance des micro-algues

De nombreux facteurs sont susceptibles d'influencer la croissance cellulaire des micro-algues notamment, la disponibilité en nutriments, l'intensité lumineuse, la température, ainsi que le pH du milieu **[91].**

a. Influence de la lumière

La lumière est sans doute l'un des facteurs les plus importants pour la croissance des micro-algues **[92].**Ces microorganismes utilisent la lumière pour la réalisation de la photosynthèse. La photosynthèse peut être affectée par la quantité d'énergie lumineuse reçue par la cellule. Une relation linéaire existe entre le taux de croissance et la lumière.

L'augmentation de l'éclairement jusqu'à un niveau de saturation est spécifique à chaque espèce. En effet Singh et Singh en 2015 ont constaté que le taux de croissance des micro-algues augmente proportionnellement avec l'intensité lumineuse jusqu'à un certain seuil d'irradiance, qualifié de « seuil de saturation ». Au-delà de ce seuil, une photo-inhibition est observée et qui est caractérisée par une phase plateau (Figure 2.6).

Les cellules restent viables mais ne se multiplient plus. Cette photo-inhibition serait associée à une désactivation partielle des composants clés de l'appareil photosynthétique **[93].**

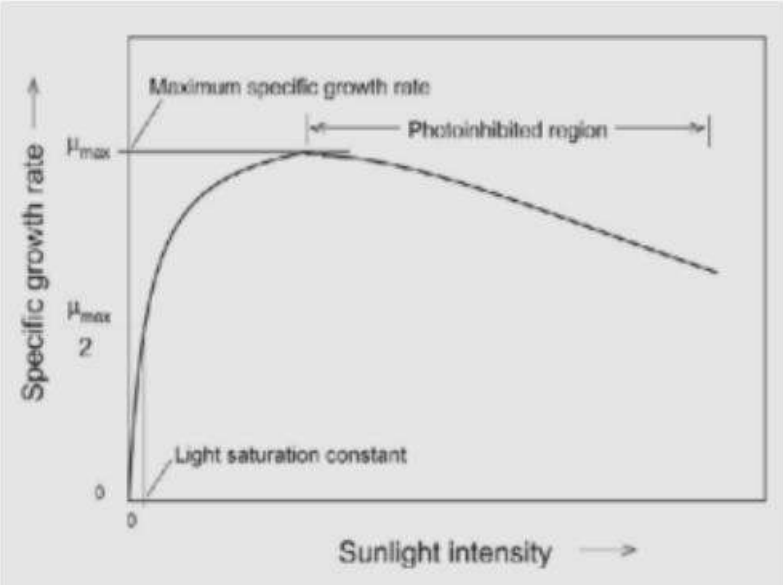


Figure 2. 6: Variation du taux de croissance en fonction de la lumière **[94].**

b . Influence de la température

La température est un paramètre qui intervient dans le développement et la croissance cellulaire des micro-algues. Les micro-algues n'ont pas toutes le même comportement vis à vis de la température. Elles sont généralement capables de se développer sur une large gamme de températures comprises entre 15 et 35 °C avec une température optimale entre 20 et 25 °C et une réponse très variable entre les espèces.

Le taux de croissance de micro-algues diminue fortement lorsqu'elles sont cultivées à des températures supérieures à la température optimale. Ceci s'explique généralement par le stress thermique qui peut affecter le fonctionnement des enzymes et ou modifier les protéines impliquées dans la photosynthèse **[95].** D'autre part la composition en acides gras des membranes cellulaires peut être affectée par les variations de température, ce qui influe sur la stabilité et la fluidité des membranes, en particulier celles des thylakoïdes **[96].**

c . Influence du pH

Le pH est un facteur essentiel qu'on ne peut négliger lors de la culture des micro-algues. Le pH optimal de la plupart des espèces est compris entre 7 et 9.

A la différence des plantes terrestres qui utilisent directement le CO_2 atmosphérique, les micro-algues n'ont pas la capacité d'assimiler le carbone sous forme gazeuse. Ces dernières puisent le carbone inorganique dissous (CID) dans le milieu sous forme de bicarbonate (HCO_3). Il en résulte une augmentation du pH du milieu de culture par une modification de l'équilibre carbonaté de l'eau. Il existe une relation étroite entre le pH et la quantité de carbone inorganique dissous:

CO_2 (gaz) + H_2O <=> CO_2 (dissous) + H_2O <=> H_2CO_3 <=> $\mathbf{HCO_3^-}$ + H^+ <=> **CO3- 2 +** $\mathbf{2}H^+$

Des études ont montré que l'augmentation du pH du milieu entraine une accumulation des triacylglycérols chez certaines espèces de micro-algues, avec une diminution de la croissance **[97].**Ces données suggèrent que ce stress inhibe non seulement le cycle cellulaire, mais déclenche également efficacement l'accumulation de lipides. La sensibilité des micro-algues au pH se traduit par une courbe en réponse au taux de croissance (Figure 2.7)

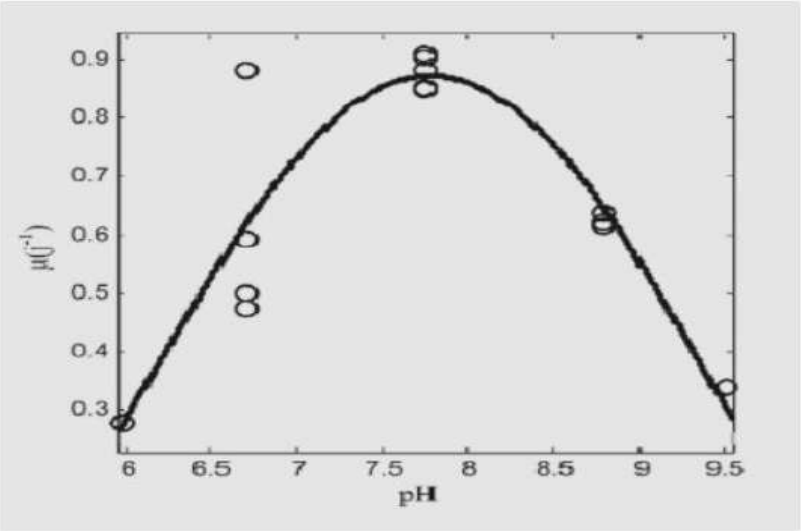


Figure 2.7: Variation du taux de croissance en fonction du pH chez Thalassiosira weisflogii (donnée laboratoire de Physiologie et Biotechnologie des Algues Ifremer).

2.7. Domaines d'application des micro-algues

De par leur très grande diversité, de part les différents milieux d'où elles sont isolées, de par leur richesse en métabolites et surtout de par la simplicité de leur production en masse dans des milieux simples, les micro-algues font l'objet d'applications dans différents domaines de la production bioénergétique à la production de métabolites à grande valeur ajoutée ou comme outil de bioremédiation de milieux pollués. Sur les milliers de micro-algues connues, seule une dizaine seraient exploitées industriellement (Arthrospira sp., Chlorella sp., Dunaliella sp., Nannochloropsis sp., Skeletonema sp., Porphyridium sp. ….) **[98].**

2.7.1. Application en alimentation et santé

Les micro-algues sont riches en protéines, carbohydrates, acides gras polyinsaturés et vitamines. La spiruline est une micro-algue bleue riche en protéines, sels minéraux, oligo- aliments et vitamines et est très utilisée dans l'alimentation humaine notamment comme complément protéique. Sa teneur en protéines varie entre 60 et 70% de son poids sec **[99].**

La spiruline a fait l'objet d'utilisation en alimentation chez les populations aztèques au 16 ème siècle. Ce peuple ayant déjà remarqué les propriétés de la spiruline, la collecte ait sous forme de boue verte qui se formait sur l'eau des lacs du Mexique pour en faire des galettes **[100].**

En Afrique, le botaniste Jean Léonard a observé en 1966 que le peuple Kanembous n'était pas touché par la mal nutrition qui sévissait chez les populations du Tchad. Cette tribu, vivant au bord du lac Tchad cultivait de la spiruline pour en faire des pâtes d'algue séchée au soleil qu'elle consommait **[101].**

En Chine en espace d'une année (de 2003 à 2004) la production de la spiruline a augmenté de 2 fois en passant respectivement de 19 080 tonnes à 41 570 tonnes, représentant une valeur marchande de plus de 16,6 millions de dollars **[102].**De ce fait, cette micro-algue fait l'objet d'utilisation comme complément alimentaire incitant ainsi à sa production en masse. Depuis, plusieurs entreprises se sont implantées un peu partout dans le monde: Siam Algae Company à Bangkok en 1979, Cyanotech Corporation à Hawaï aux Etats-Unis en 1983 dont les ventes nettes se sont améliorées de 32 millions de dollars avec une marge bénéficiaire brute de 38,1% (2017) à 34 millions de dollars avec une marge

bénéficiaire brute de 39,2% (2018) **[103].**A l'instar des autres pays, l'Algérie, le Maroc, la Tunisie contribuent à la valorisation et au développement des cultures de spiruline. Au Maroc, Atlas Spiruline a été lancé en 2010 née d'un partenariat avec l'association française TAMOUNTE, Vitalina, implantée à Agadir depuis 2008. En Tunisie une dizaine d'entreprises de production de spiruline existent, parmi elles: Bioalgues et Eden Life qui élaborent des molécules à haute valeur ajoutée destinées à la nutrition humaine et à la cosmétique .

En Algérie, il existe quelques fermes de culture artisanale de spiruline: la ferme de BEHATAM à Tamanrasset **[104].**et la ferme de M. Redouane dans la région d'Oran (communication personnelle).

Chlorella vulgaris, une micro-algue verte est aussi connue pour son utilisation dans l'alimentation humaine. Elle se caractérise par ses qualités nutritionnelles élevées en acides gras saturés et insaturés, vitamines, pigments, minéraux et oligo-éléments avec une composition riche en protéines entre 50 à 60% de son poids sec **[105].**Chlorella a été produite et consommée d'abord en Asie, principalement au Japon. Elle est considérée comme l'aliment d'intérêt national pour la santé. En 1957, l'institut de recherche sur la Chlorelle a été créé **[106].**

La production mondiale annuelle de la chlorelle dépasse 2 000 tonnes **[107].** Le plus grand système fermé utilisé à des fins commerciales est le photobioréacteur tubulaire de Roquette Klötze GmbH et Co. KG (Klötze, Allemagne). D'un volume de 700 m^3, ce photobioréacteur produit annuellement environ 100 tonnes de biomasse micro-algale de haute qualité pour le marché de l'alimentation et de la santé **[108].**

Outre leur utilisation comme complément alimentaire, les micro-algues représentent une source importante de production de métabolites de grande valeur ajoutée. Des pigments de micro-algues tels que les phycobiliprotéines, trouvent leur utilisation comme colorants alimentaires naturels, ou comme antioxydants (caroténoïdes) **[109].**

Différents groupes d'intérêt se sont constitués pour l'exploitation industrielle des caroténoïdes. Des entreprises telles que Eurocaroten, CaRed (Réseau Espagnol de caroténoïdes), la Société internationale des caroténoïdes et IBERCAROT (Réseau ibéro-américain pour l'étude des caroténoïdes en tant qu'ingrédient alimentaire) travaillent sur ces

molécules pour des applications dans différents usages et de trouver de nouvelles sources naturelles **[110].**

Parmi les métabolites les plus prisés présents chez les micro-algues en quantités appréciables les acides gras polyinsaturés (PUFA) notamment les omégas 3, EPA et DHA.

Les PUFA sont extraits des huiles de poissons. Ces PUFA ne sont pas synthétisés par les poissons mais sont d'origine micro-algale consommés par ces derniers. Les omégas extraits à partir d'huiles de poisson se trouveraient contaminés principalement de métaux lourds accumulés dans leurs foies **[111].**L'extraction directe de ces PUFA à partir de micro-algues permettrait d'obtenir des molécules non contaminées. L'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5 n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6 n- 3) sont connus pour leur propriétés antifongiques, antibactériennes, antivirales et antihistaminiques **[112]** mais surtout pour leur rôle protecteur du système cardiovasculaire et hypocholesterolemiant **[113]** Le DHA joue également un rôle important dans le développement du système nerveux central du nourrisson **[114]**

Selon la FAO (Food and Agriculture Organiszation, 2014), la demande mondiale en oméga-3 passerait de 21 900 tonnes en 2012 à plus de 135 500 tonnes en 2025 avec un prix au kilo estimé en 2000 à 650 dollars **[115]** et un chiffre d'affaire mondial en 2016 de 33 billions de dollars **[116].**

D'autres molécules récemment découvertes et dérivant des acides gras polyinsaturés présentent un intérêt certain de par leurs activités antibactériennes **[117]** mais surtout anticancéreuses **[118]** Ainsi les aldéhydes poly insaturés PUA dérivant des PUFA sont synthétisées uniquement par certaines micro-algues dans certaines conditions physiologiques. Ces molécules rares font l'objet de travaux très ciblés en tant que nouvelles substances anticarcinogène **[119].**

2.7.2. Utilisation des micro-algues dans l'industrie cosmétique

Des pigments, acides aminés essentiels, antioxydants, polyphénols sont extraits des micro-algues et sont utilisés dans des formules cosmétiques comme agents épaississants, agents régénérant et antioxydants. Des extraits d'Arthrospira sp. et Chlorella sp. sont présents dans des formules de soin du visage et de la peau tels que les crèmes anti-âge,

lotions pour le visage et le corps, les produits de soin rafraîchissant ou régénérant **[120].** Ces extraits sont également retrouvés dans les produits de soin capillaire **[121].**

2.7.3. Utilisation des micro-algues en agriculture

Les extraits de micro-algues sont employés comme engrais **[122].**Ils seraient d'un grand apport pour les sols sahariens dont la structure est appauvrie de matière organique de par l'abondance des ions sodium et le manque d'azote dissout **[123].**Aussi, certaines espèces de cyanobactéries de par leur capacité à fixer l'azote atmosphérique pourraient être utilisées comme biofertilisant **[124].** et protecteurs de cultures en limitant la prolifération des parasites **[125].**

2.7.4. Utilisation des micro-algues comme source de biocarburant

Les micro-algues de par leur richesse en lipides sont des organismes prometteurs pour la production de biocarburants, pouvant se substituer aux agrocarburants (biocarburants de première génération) source de déséquilibre des écosystèmes et des biocarburants d'origine ligno-cellulosique (2ème génération) d'abondance limitée.

Dans la première génération de biocarburants, des produits alimentaires tels que le maïs, la canne à sucre, les huiles végétales (huiles de palme, de soja et d'arachide) en constituent la matière première. Le Brésil est considéré comme le deuxième pays producteur de bioéthanol en utilisant comme matière première la canne a sucre **[126].**

Cependant, les plantations de canne à sucre utilisent de grandes quantités de produits agrochimiques qui menacent écosystèmes et santé humaine **[127].**mais aussi, l'extension future de la culture de la canne à sucre pourrait poser un problème plus important pour la biodiversité conduisant à sa perte **[128].**Parmi les biocarburants de deuxième génération, on peut citer l'éthanol dit cellulosique.

Ce biocarburant est obtenu des différents déchets agricoles et d'arbres ayant une croissance rapide (la paille de blé, le peuplier, les sciures de bois …). Cependant, ce dernier pourrait avoir un impact défavorable sur l'environnement (déforestation), sur la sécurité alimentaire et la biodiversité (perte de la diversité des espèces) **[129].** Les micro-algues sont considérées comme biocarburants de 3ème génération. Ces « algocarburants » auraient la capacité de remplacer les carburants d'origine fossiles sans affecter les ressources alimentaires, la consommation d'eau et la détérioration des sols cultivables

[130]. et ce de par leur capacité de multiplication cellulaire rapide et leur production et stockage de grandes quantités de lipides **[131].** Ce biocarburant est produit par transésterification des lipides en présence d'alcool (Figure 2.8) conduisant à des esters utilisables dans les moteurs à combustion. Scenedesmus, Chlorella, Chlorococcum, Tetraselmis, Nannochloropsis et la Synechococcus sont les genres les plus utilisés dans la production de ce biocarburant **[132].**

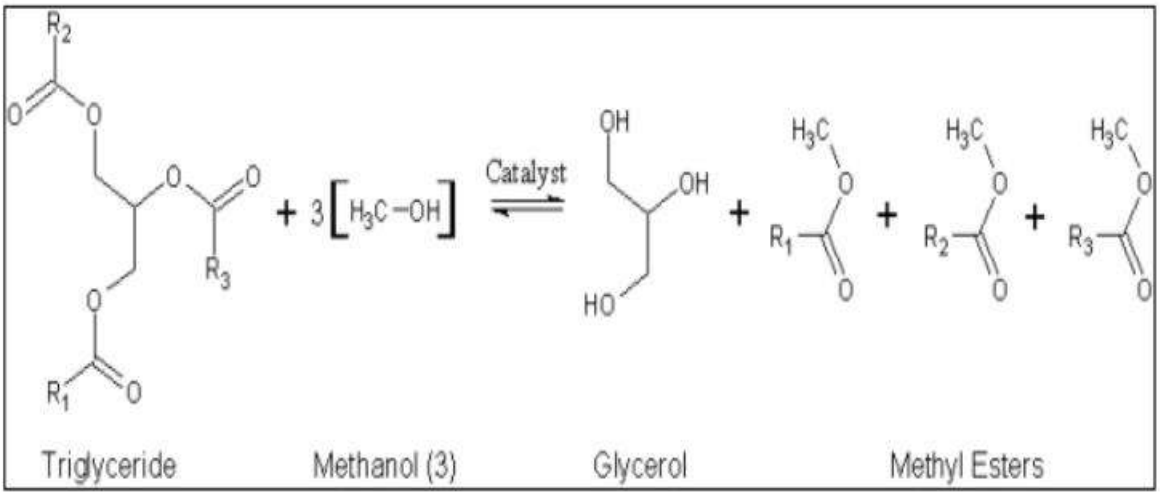


Figure 2.8: Réaction de transestérification **[124].**

Partie expérimental

3.1. Introduction :

Dans le cadre de la valorisation des rejets industrielle, une étude a été menue au paravent a fin d'isoler une biomasse (micro-algues) ayant un fort pouvoir de dégradation de polluant organique. Ceci nous a encouragé à réalisé cette étude dans le but d'évaluer le pouvoir de cette micro-algue dans la production d'enzymes. Pour cela, notre travaille s'articule autour des points suivants :

- L'étude de la croissance des micro-algues ;
- L'évaluation de leurs pouvoirs enzymatiques.

3.2. Matériels et méthode :

3.2.1. Verreries et matériels :

a) Verrerie de laboratoire: Erlenmeyers, Tube à essai, Seringue, Entonnoirs, Pipette Pasteur, Verre à montre, Boîte Pétri,....etc ;

b) Petit matériel: Balance, Bec benzène, Agitateur, pH-mètre....etc ;

c) Grand matériel : Shaker, Bain marie, Autoclave, Etuve, Spectrophotomètre, Centrifugeuse, Plaque d'agitation,.....etc.

3.2.2. Matériels biologiques :

La souche de micro-algue *"clorella sorokiniana "* a été isolée à partir d'un échantillon 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 [**Optimisation de l'élimination des micropolluants organique]**. Cette souche a été retenue pour sa capacité de produire des enzymes d'intérêt industriel.

3.2.3. 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 Magnesium ($MgSO_4$);
- Sulfate d'ammonium;
- Acetate 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 (NH4Cl)
- Acide borique(H3Bo3]
- Chlorure de manganèse(MnCl2)
- Ethylène diamine tétra acétique (EDTA)

3.2.4. Tampons

– Tampon Glycine NaOH 100 mM à pH 9,0-10,6 ;
– Tampon KCl-NaOH(100mM) aditioner 5 Mm CaCl2 à pH 12.5

3.2.5. Milieux de culture

a) Milieu de croissance des micro-algues

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 à 120 °C pendant 20 mn.

b) Gélose nutritive à base de lait (GNL)

C'est un milieu solide utilisé pour mettre en évidence le pouvoir protéolytique des souches en hydrolysant la caséine du lait introduite dans le milieu.

Ce milieu est utilisé pour l'isolement et le criblage des souches productrices de protéases. L'activité protéolytique se manifeste par la diffusion d'un halo transparent dans le milieu qu'indique la sécrétion des protéases par les souches et l'hydrolyse des protéines du lait (caséines). Il est composé de:

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

On ajuste le pH de 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 clones 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 est composé de :

- Eau distillée 1000 mL ;
- Farine de plume 5g ;
- Peptone de soja 2g ;
- Extrait de levure 3g ;
- Agar 20g

On ajuste le pH du milieu à 7.4 avec une solution de NaOH puis subit une stérilisation pendant 20 min à 120°C.

d) Gélose à base d'amidon

Pour la mise en évidence de l'activité amylasique chez les micro-algues, nous avons utilisés un milieu gélose à l'amidon, l'amidon se colore en bleu par l'iode. Lorsque l'amidon est hydrolysé, les produits de dégradation ne donnent plus de réaction. Il est composé de :

- Eau distillée 1000 mL ;
- Agar 15g ;
- Amidon 10g ;
- Extrait de levure 5g ;
- Sulfate d'ammonium 5g ;
- Acétate de sodium 2g ;
- Chlorure de calcium 0.08g ;
- Sulfate de magnésium 0.5g.

Le pH du milieu est ajusté à 7 puis est stérilisé à 120 °C pendant 20 min.

3.3. Cinétique de croissance et production de chlorophylle

La cinétique de croissance des micro-algues et la concentration de chlorophylle (a + b) ont été suivie par spectrophotométrie en mesurant les densités optiques au quotidiens à 680 nm, 665,2 nm et à 652,4 nm sur un intervalle de 15 jours.

Un échantillon de 1 mL de culture a été utilisé pour déterminer le taux de croissance des micro-algues par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 680 nm [133,134]. La cinétique de croissance des micro-algues a été obtenue en traçant les variations de la densité optique à 680 nm en fonction du temps d'incubation.

Un deuxième échantillon de 1 mL de culture a été prélevé pour la détermination de la concentration en chlorophylle (a + b). L'échantillon a été placé dans un tube Eppendorf de 1 mL puis centrifugé à 13 000 tr / min pendant 10 min. Après élimination du surnageant, 1 mL du méthanol a été ajouté en présence de billes de verre. Par la suite, un traitement au vortex pendant cinq à dix minutes a été effectué à 4 ° C. A la fin il est incubé à 60 °C pendant 5 min[235]. La solution obtenue a été centrifugé à nouveau à 13 000 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 spectrophotométriques à 665,2 nm et 652,4 nm [134].

La concentration de chlorophylle (a + b) a été calculée par l'équation suivante [135]:

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

3.4. 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 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, 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 la méthode de Kembhavi.

Méthode de Kembhavi

Elle est évaluée selon le protocole suivant [136]

- ✓ 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 :

$$Activité\ protéolytique\ (U/ml) = \frac{DO*D*d}{t*0.0055} \qquad 3.2$$

Avec :

DO: densité optique ;

D: correspond à la dilution de l'enzyme ;

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

t : temps de la réaction en minute.

3.5. Dosage de l'activité kératinolytique

L'activité kératinolytique a été mesurée dans le surnageant de culture obtenue après centrifugation de 20 min à 10000 rpm en utilisant la kératine-azure comme substrat.

L'activité kératinolytique est estimée selon le protocole de Jaouadi *et al.* **[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} de 0,1.

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 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.

Au cours de ce travail, nous avons poursuivi un programme de mise en évidence de différentes activités enzymatiques.

4.2. Cinétique de croissance des micro-algues

La culture de la souche Chlorella sorokiniana 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. Des mesures de l'absorbance sont effectuées tous les 24 h (**Figure 4.1**).

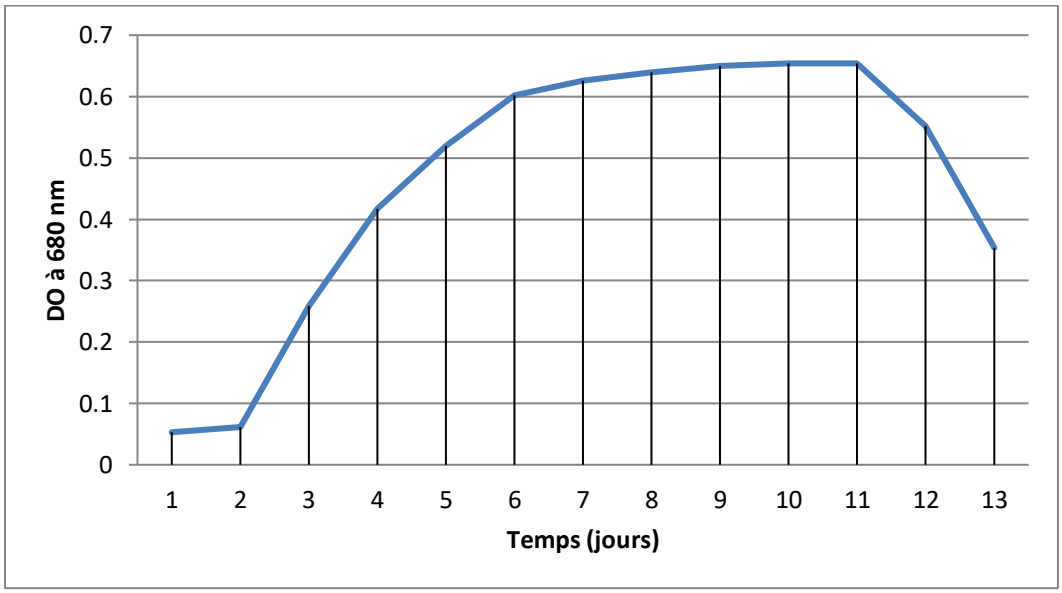


Figure 4.1 : Profils de croissance des micro-algues

Le suivi de production de la croissance des micro-algues en fonction du temps, montre que la multiplication 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 ainsi que la composition du nouveau milieu par rapport à celle du milieu d'origine.

Suite à cette période d'adaptation les micro-algues commençant à se multiplier, ils entrent alors en phase de croissance exponentielle. A ce moment, la vitesse de croissance atteint sa valeur maximale après 6 jrs et pendant cette période la population est homogène et chaque cellule possède les mêmes propriétés chimiques et physiologiques.

La phase stationnaire (de 6 à 11 jours) commence au moment où les nutriments du milieu s'épuisent la population deviens alors stable de plus les déchets métaboliques produit par les cellules commencent à s'accumuler dans le milieu. En suite la phase de déclin commence à partir du 11 jours. On observe la diminution de la croissance qui se traduit par la mortalité des cellules due à l'accumulation des déchets métaboliques inhibiteurs et l'épuisement des nutriments essentiel.

4.3. Production de chlorophylle

Le surnageant de culture de 30 mL de la souche *Chlorella sorokiniana* dans le milieu de croissance constitue l'extrait brut. Ce surnageant présente une concentration en chlorophylle. Le protocole expérimental de dosage de chlorophylle comporte les étapes suivantes: solubilisation du culot dans du méthanol, traitement au vortex à 4 °C pendant 5 à 10 min, traitement thermique à 60 °C pendant 5 min suivie d'une 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.

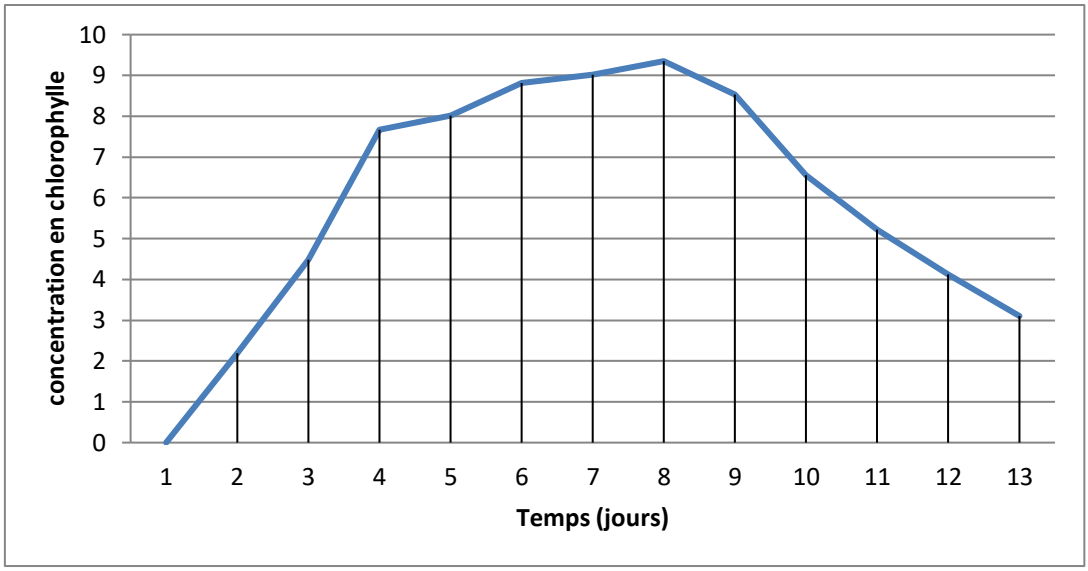


Figure 4.2 : Profils de production de la chlorophylle par les micro-algues.

L'analyse des résultats obtenus montre que la production de chlorophylle atteint sa valeur maximale au bout du huitième jour, au-delà elle commence à diminuer. Cette diminution est probablement due à plusieurs phénomènes :

- Epuisement du milieu de croissance ;
- Inhibition par excès de production d'enzymes ;
- Une dégradation par les enzymes endogènes libérés suite à la lyse cellulaire ou à une auto-protéolyse.

4.4. Pouvoir protéolytiques des micro-algues

4.4.1. Test qualitatif

L'échantillon contenant les micro-algues isolées *Chlorella sorokiniana* a partir des rejets industriels a été étalé sur milieu GNL (milieu utilisé pour déceler les activités protéolytiques extracellulaires) et incubés à la température ambiante (**Figure 4.3**).

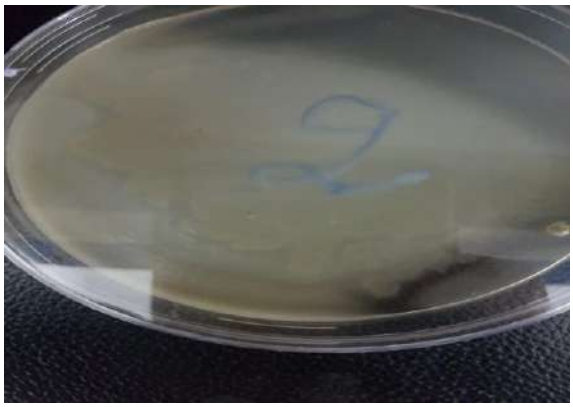


Figure 4.3 : Mise évidence de l'activité protéolytique des micro-algues

Le test semi-qualitatif est visualisé par la diffusion des protéases secrétées par les micro-algues dans la gélose environnante tout en hydrolysant les protéines du lait (notamment les caséines) ce qui se traduit par l'apparition d'un halo transparent autour de la colonie (Figure **4.4**).



Figure 4.4 : Aspect du halo sur le milieu GNL après incubation

4.4.2. Test quantitatif

Le test réalisé sur milieu solide GNL est un test quantitatif. Ainsi, afin d'évaluer le niveau de production de protéases par les micro-algues, des cultures on été réalisées sur milieu liquide. Les activités protéolytiques ont été mesurées suivant la méthode de Kembhavi dans les surnageant de culture après avoir déterminé le temps optimale de croissance. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 4.1 : Résultats du dosage protéolytique

Temps (jours)	Activité protéolytique (U/ml)
8	3.81
11	8.45

D'après les résultats illustrés dans le tableau 4.1, on constate que les micro-algues sécrètent des enzymes protéolytiques, et ces derniers atteignent leurs productions maximales au bout de 11 jours, c'est-à-dire a la fin de la phase stationnaire. Ceci nécessite une étude plus approfondie.

4.5. Activité 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 Aa 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.

4.5.1. 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 la mise en évidence du pouvoir kératinolytique des micro-algues (**Figure 4.5**)



Figure 4.5: Mise évidence de l'activité kératinolytique des micro-algues

La souche de *Chlorella sorokiniana* est apte de se multiplier et de produire des kératinases sur milieu de culture à base de kératines (figure 4.5). 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 a base de kératine.

4.5.2. Test quantitatif

L'activité kératinolytique de la souche *Chlorella sorokiniana* est estimer suite à une incubation du surnageant en présence de la kératine azure. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 4.2, montrent que les micro-algues sécrètent des enzymes ayant un pouvoir kératinolytique. Ce dernier est estimer a environ

Tableau 4.2 : Résultats du dosage kératénolytique

Temps (jours)	Activité protéolytique (U/ml)
8	6.81
11	10.09

Le niveau de production de kératinase est maximal au bout du 11 jours.

4.6. Activité α-amylase

La production de α-amylase a été testée sur milieu solide contenant de l'amidon comme seule source de carbone (**figure 4.6**). L'hydrolyse de l'amidon est mise en évidence par l'absorbance de coloration autour de colonies. A l'inverse les zones contenant de l'amidon se colorent en blanc.



Figure 4.6 : Mise évidence de l'activité amylolytique des micro-algues

L'activité amylolytique est révélée aussi par coloration avec une solution d'iode. Cette

activité est estimée par la visualisation d'halo d'hydrolyse clair autour de la colonie (**Figure 4.7**).

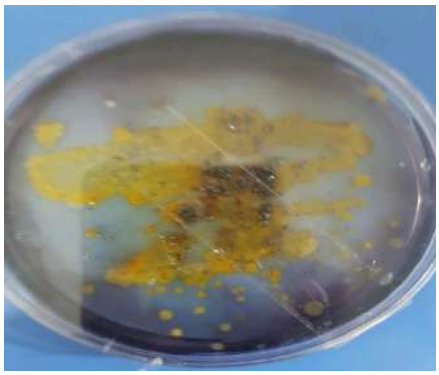


Figure 4.7 : Détection de l'activité amylolytique des micro-algues par l'iode.

4.7. Conclusion

Le contexte de notre travail proposé est de trouvé de nouvelles souches productrices d'enzymes de différentes activités. Ces derniers ont été sécrétés par des micro-algues « *Chlorella sorokiniana* »isolés a partir des rejets industriels. Nous avons aussi démontré et estimer le pouvoir protéolytique, kératinolytique et amylolytique qui lui confère différente application industriel.

CONCLUSION GENERALE

Les enzymes des micro-algues sont sollicités par beaucoup d'applications dans plusieurs domaines entre autres l'agriculture, les détergents, la pétrochimie, la bio-remédiation des sols et bien d'autres.

Les micro-algues se développent de façon optimale à des températures de 30°C. Ils sont isolés à partir de différents environnements extrêmes et leurs enzymes présentent une thermo stabilité très recherchée par différentes industries à cause de leurs propriétés dépassant celles de leurs contreparties mésophiles.

Une mise en évidence de la production de trois enzymes hydrolytiques extracellulaires (protéase, amylase, kératinase) par la souche de micro algue *chlorella sorokiniana*. Cette micro-algue a été isolée depuis un rejet industriel. Le milieu de culture utilisé pour l'isolement est le GN spécifique aux micro-algues. Leur croissance a été réalisée dans un bouillon liquide qui assure même la production de la chlorophylle. Des différents milieux gélosés ont été utilisés avec addition de substrat spécifique pour mètre en évidence chaque activité enzymatique.

A la fin, la souche *chlorella sorokiniana* a montré clairement sa capacité a produire des enzyme très intéressante.

Ce travail nécessite une étude plus approfondie afin de déterminer le temps optimal de production des enzymes et même lui faire subir des étapes de purification pour savoir s'il s'agit d'une seule enzyme qui assure les trois activités ou non.

1- Jaouadi, B., et al., "Purification and characterization of a thermostable keratinolytic serine alkaline proteinase from Streptomyces sp. strain AB1 with high stability in organic solvents". Bioresour Technol, 2010. 101(21): p. 8361-9.

2- Nobel e-Museum. (2004). Nobel Prize. Eduard Buchner

http://nobelprize.org/chernistry/laureates/1907 /

3- Van Behen J. B. Enzyme technology Z. Li. (2002). Enzyme technology: an overview. CUITent Opinion in Biotechnology, 13 :338-344.

4- Duchaufour P. (1965). Précis de pédologie. Paris : 2ème édition, 481 p. Dvail, S., Grety, J. et Lenzini, M. (2010). Les actinomycetes, source de biomoléculesd'interet industriel. Haute école de la province de liège.

5- George S., Raju V., Krishnan M.R.V., Subramanian T.V., Jayaraman K. (1995).

Production of protease by Bacillus amyloliquefaciens in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. Proc. Biochem., 30; 457–462.

6- Dvail, S., Grety, J. et Lenzini, M. (2010). Les actinomycetes, source de biomoléculesd'interet industriel. Haute école de la province de liège.

7-(Granner, 2008) :Granner D.K., Murray R.K., Rodwell V.W. (2008). Biochimie de HARPER. 3èmeédition.

De Boeck. Bruxelle., 47. pp. 49-51, 483.

8-(Bergmeyeret al., 1979 ; Amaudet al.,1993 ; Pelmont, 1995 ;Drouin, 2005). ; Bergmeyer H.U., Gawekn K., et al. (1979). Principes de l'analyse enzymatique. Tech.

et Doc. Lavoisier. Paris. 17p.

9- Patel et al., 2005 : Patel R., Dodia M., Singh S.P. (2005). Extracellular alkaline protease from a newly isolatedhaloalkaliphilic Bacillus sp. : Production and optimization. Proc. Biochem., 40; 3569– 3575.

10- Leisolaet al., 2001 :Leisola M., Jokela J., Pastinen O., Turunen O. (2001). Industrial use of enzymes.Laboratory Bioproc. Eng., Helsinki University of Technology, Finland, nd Hans Schoemker,DMS Reserch, MD Geleen, The Netherlnds.

11- Vincent, 1996 :Vincent M. (1996). Blood glucose: Its measurement and clinical importance. ClinicaChimica.

12- Raoet al.,1998 ; Assamoiet al., 2009 : Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. (1998). Molecular andbiotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62; 597-635.

13-(Amaudet al., 1993 ; Scriban, 1993 ; Raoet al.,1998 ; Meunier,1999). :

Biotechnologies.4ièn'" ed., Scriban R. (éd), Technique et Documentation LavoisieE Paris, France, 904 p.

14- Barnabé et al., 2003 :Barnabé S., Sasseville J. L., Tyagi R. D. et Valéro J. R. (2003). Eaux usées et résidusindustriels, matières tertiaires ou matières premières ,VECTEUR environnement. 36 (2), 50-62 p.

15- Liet al., 2005 : Li W. F., Zhou X. X. et Lu P. (2005). Structural features ofthermozymes. BiotechnologyAdvances. 23 (4) : 271-281.

16- Zeikus J. G., Vieille C. et Savchenko A. (1998). Thermozymes : biotechnology and structure- function relationships. Extremophiles. 2 (3), 179-183 p.

17- Bruinset al., 2001 : Bruins M. E., Janssen A. E. et Boom R. M. (2001). Thermozymes and their application : Areview of recent literature and patents. Applied Biochemistry and Biotechnology. 90 (2), 155-186 p.

18- Van den burg, 2003Van den Burg B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. Current Opinion inmicrobioligy. 6 : 213-218.

19- Kumar et al., 2008a :Kumar A.G., Nagesh N., Prabhakar T.G., Sekaran G. (2008a). Purification ofextracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by Synergistes sp. Utilizingproteinaceoussolidwastefrom tanneries. Bioresour. Technol., 99; 2364–2372.

20:Pelmont J. (1995). Enzymes : Catalyseurs du monde vivant. Presse Universitaire deGrenoble. 7; 621. 652-654.

21-Rao et al., 1998Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., &Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR, 62(3), 597–635.

22-Alais, 1975Alais, C. (1975). Sciences du lait. Principes des techniques laitières. 3e édition. Paris.

23-Lehninger,1982, Lee et al., 2009

Lehninger, A. (1982). Principles of Biochemistry. USA: Worth Publisher.

Lee, E. Y., Choi, D. Y., Kim, D. K., Kim, J. W., Park, J. O., Kim, S., … Gho, Y. S. (2009). Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: Proteomics-based characterization of Staphylococcus aureus-derived membrane vesicles. Proteomics, 9(24), 5425–5436.

24-Lodish et al., 2000Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000).

25-Scriban, 1993:Scriban R. (1993).Trichodermareeseiexhibitis true revercibility and a high exchange rateon cristalline cellulose. Biotechnologie. P : 32-690,4éme édition.

26-Sandhya et al., 2005: Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G. and Pandey A. (2005). Comparative evaluation ofneutral protease production by Aspergillus oryzae in submerged and solid-state fermentation. ProcessBiochemistry, 40: 2689-2694.

27- Bruno, M. A., Trejo, S. A., Caffini, N. O., & López, L. M. I. (2008). Isolation and characterization of hyeronymain II, another peptidase isolated from fruits of Bromelia hieronymi Mez (Bromeliaceae). Protein Journal, 25, 224–231.

28- Domsallaet Melzig, 2008 Domsalla, A., &Melzig, M. F. (2008, June). Occurrence and properties of proteases in plant latices. Planta Medica. 74,699–711.

29- Beers, E. P., Woffenden, B. J., & Zhao, C. (2000). Plant proteolytic enzymes: Possible roles during programmed cell death. Plant Molecular Biology, 44(3), 399–415.

30- Schaller, 2004Schaller, A. (2004). A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. Planta, 220(2), 183–197.

31-AVIRON-VIOLET P., BARET J.L., (1982). Les enzymes. Production et Utilisation Industrielles. Durand G. et Monsan P. (éds), Bordas, Paris

32-RAO M.B., TANKSALE A.M., GHATGE M.S. et DESHPANDE V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Revew, 62, 597–635.

33-SUMANTHA A., LARROCHE C. et PANDEY A. (2006). Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. Food Technology and Biotechnology, 244, 211-220.

34-AGUILAR C.N., GUTIERREZ-SANCHEZ G., RADO-BARRAGAN P.A., RODRIGUEZ-HERRERA R., MARTINEZ-HERNANDEZ J.L. et CONTRERAS-ESQUIVEL J.C. (2008). Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes. American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 4 (4), 354 366

35-MEUNIER, 1999

36-DURAND G. et MONSON P. (1982). Les Enzymes: Production et Utilisations Industrielles. Bordas, Paris.

37-KUDRYA V.A. et SIMONENKO I.A. (1994). Alkaline serine proteinase and lectin isolation from from the culture fluid of Bacillus subtiIis. Applied Microbiology and Biotechnology, 41, 505–509.

38 COLWELL R.R. et GRIGOROVA R. (1989). Methods in Microbiology. St dimundsburt press limited (ed.), London.

39-SINE J-P. (2010). Enzymologie et applications. Ellipses Edition marketing S.A, Paris.

40- Guptaet al., 2003 : Gupta R., Gigras P., Mohapatran H., Goswami K.V., Chauhan B. (2003). Microbial- a amylase: a biotechnological perspective. ProcessBiochem 38: 1599-1616.

41- Fogarty et al.,1980:Fogarty W.M., et Kelly C.T. (1980). Amylase, amyloglucosidase and related glucanases.In Rose (A.H.) Ed. Economic microbiology, microbial enzymes and bioconversion. London: Academic Press, Vol. 5, 115-170 p.

42-Lonsaneet al., 1990 : Lonsane B. K., Ramesh M. V. (1990). Production of bacterial thermostable α- amylase bysolid state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis. In: Advances in applied microbiology, vol. 35. San Diego: California Academic Press:1-56.

43-Graber,1989 :Graber M., Combes D. (1989). Microbial α-amylases: Enzyme and Microbiol Technology. 2: 663-687.

44-Kellyet al.,1997 :Kelly C.T., Bolton D. J., Fogarty W.M. (1997). Bi-phasic production of α-amylase ofBacillus flavothermusin batch fermentation Biotechnology. 19-7:675-677.

45- Pandey et al., 2000: Pandey A., Nigam P., Soccol C. R., Soccol V. T., Singh D., Mohan R. (2000).

46- Chiba, 1988 :Chiba S. (1988). Amyloglycosidase. In: Handbook of Amylases and related enzymes (TheAmylase Research Society of Japan, ed. Pergamum Press, Oxford, U.K. 104-116.

47- Bernfeld P., 1955. Amylase. In. Clowck S.P and Kaplan N.O.(Ed): Methods in• enzymology.Volume 1. Academic press. New York, pp.149-157.

48- Sexana R.K., Dutt K., Agarwal L., Nayyar P A; 2007 highly thermostable and alkaline amylase from a Bacillus sp. PN5. Bioresour Technol.;98: 260–265.

49- Burhanet al., 2003: Burhan A., Unaldi N., Coral G., Colak O., Aygan A., Gülnaz O. (2003). Enzymaticproperties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic Bacillus sp.Isolate ANT-6. ProcessBiochem, 38: 1397-1403.

50-Prakash B., Vidyasagar M., Madhukumar M.S., Muralikrishna G., Sreeramulu K;2010 Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable α-amylases from Chromohalobacter sp. TVSP 101. Process Biochem. ; 44:210–215.

51-Nielsen J. E and Borchet T. V. 2000. Biochim. Biophys. Acta. 1543, p: 253-274

52-Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami I V.K., Chauhan B. 2003. Microbial α-amylases: a biotechnological perspective, Process Biochemistry. 38(1):599-616.

53- Van Der Maarel MJ, Van der Veen B., Uitdehaag J.C.M., Leemhuis H. et Dijkhuizen L. ;, 2002. Properties and applications of starch converting enzymes of alpha amylase family. Biotechnol; 94.

54 Vieille C and Zeikus J.G; 2001 Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability .Microbiology and Molecular BiologyReviews . 65(1), p : 1-43.

55 Mitidieri, S .; Souza Martinelli, AH; Schrank, A .; Vainstein, MH ;2006

56Ahlawat, S .; Dhiman, SS; Battan, B .; Mandhan, RP; Sharma ,J 2009

57-Bruinenberg P.M., Hulst A.C., Faber A., Voogd R.H. A 1996 process for surface sizing or coating of paper. In: European Patent Application

58-Fogarty W. M. and Kelly, C. T. 1999 Microbial Enzymes and Biotechnology .Applied Science, London, New York. (43):71-132.

59- Moraes L.M.P., Filho S.A., Ulhoa C.J.; 1997 Purification and some properties of an α-amylase glucoamylase fusion protein from Saccharomyces cerevisiae. World J. Microbiol. Biotechnol. ; 15:561–564.

60 Chi M., Chen Y., Wu T., Lo H., Lin L;2005 Engineering of a truncated αamylase of Bacillus sp. strain TS-23 for the simultaneous improvement of thermal and oxidative stabilities. J. Biosci. Bioeng.

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

62-Jacques C. (2003). Etude De La Valorisation Des Déchets D'origine Keratinique ParVoie Thermo-Mecano-Chimique En Vue De L'obtention De Filaments Continus : CasSpecifique De La Laine. Institut National Polytechnique, Toulouse, 291p.

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

64-Scott, J., et Untereiner, W. Determination of keratin degradation by fungi using keratin azure. Medical Mycology, (2004); 42 (3), 239–246.

65-Jacques C. (2003). Etude De La Valorisation Des Déchets D'origine Keratinique Par Voie Thermo-Mecano-Chimique En Vue De L'obtention De Filaments Continus : Cas Specifique De La Laine. Institut National Polytechnique, Toulouse, 291p.

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

67- 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

68- 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.

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

70- 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.

71- 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.

72- 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.

73- 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.

74-Drouin M. (2005). Etude de production de protéases alcalines par Bacillus licheniformis en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire présentée pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.), Institut national de la recherche scientifique, Québec, 142 p.

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

76Farag, A. M., et Hassan, M. A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from Aspergillus oryzae. Enzyme and Microbial Technology, (2004); 34 (2) 85–93.

77-Fujiwara, N., Tsumiya, T., Katada, T., Hosobuchi, T., Yamamoto, K. Continuous recovery of silver from used X-ray films using a proteolytic enzyme. Process Biochem,(1989), 24: 155–156.

78-Deré A. (2007). Essais de reconstitation d'objets medievaux en cuir. http://asteliermedieval- du-cuir.over-blog.com. consulté le (29.03.2017).

79-Andersen, L. Method for dehairing of hides or skins by means of enzymes. (1998); United States Patent 5: 834-299.

80-Brutt, E., Ichida, J. Keratinase produced by Bacillus licheni-formis. (1999); US Patent 5,877,000.

81-Vignardeta, C., Guillaume, Y., Michel, L., Friedrich, J., Millet, J.. Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. International Journal of Pharmaceutics, (2001); 224. p115-122.

82-Dejoye Tanzi, C., Abert Vian, M., Chemat, F., 2013. New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: A green clean and scalable process. Bioresource Technology 134, 271–275.

83 -Becker EW (2007) Micro-algae as a source of protein. Biotechnology Advances. 25: 207-210.

84 - Andersen et al. In sialve B, steyer J.P, 2013. les microalgues, promesses et défis.Innovations agronomiques ; 26 : 26.

85- Sharma N.K et Rai A.K, 2011.biodiversity and biogeography of mircoalgue.Progress and pitfalls; 19 : 1-15.

86- Jeffrey S.W, Brown M.R, Volkman J.K, Dustan GA, 1997. Nutrition properties of microalgae for maricuture; Aquaculture; 151(1) : 315-331.

87-Hall DO, Rao KK (1999) Photosynthesis, 6th edition, Cambridge University Press, UK.

88- Alberts et al., 1995

89- Andersen, 2005

90- Grobbelaar JU (2004) Algal nutrition. In: Richmond A (ed). Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, Blackwell Publishing Ltd, 107pp.

91- Bechet Q, Shilton A, Guieysse B (2013) Modeling the effects of light and temperature on algae growth: State of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation. Biotechnology Advances 31:1648-1663.

92- Hill WR, Fanta SE, Roberts BJ (2009) Quantifying phosphorus and light effects in stream algal. Limnology and Oceanography 54: 368- 380.

93- Han BP, Virtanen M, Koponen J, Straskraba M (2000) Effect of photoinhibition on algal photosynthesis: a dynamic model. Journal of Plankton Research 22: 865- 885.

94- Chisti Y (2007) Biodiesel from Microalgae. Biotechnology Advances 25: 294-306.

95- Salvucci ME, Crafts-Brandner SJ (2004) Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. physiologia plantarum 120:179- 186.

96- Jiang H, Gao K (2004) Effects of lowering temperature during culture on the production of polyunsaturated fatty acids in the marine diatomPhaeodactylum tricornutum (Bacillariophyceae). Journal of Phycology 40: 651- 654.

97- Gardner R, Peters P, Peyton B, Cooksey KE (2011) Medium pH and nitrate concentration effects on accumulation of triacylglycerol in two members of the Chlorophyta. Journal of Applied Phycology 23: 1005- 1016.

98- Sharma P, Sharma N (2017) Industrial and Biotechnological Applications of Algae. Journal of Advances in Plant Biology 1: 2638- 4469.

99- Gutiérrez-Salmeán G, Fabila-Castillo L, Chamorro-Cevallos G (2015) Nutritional and toxicological aspects of Spirulina (Arthrospira). Nutricion Hospitalaria 32: 34- 40.

100-Farrar W (1966) Tecuitlal: A glimpse of Aztec food technology. Nature 211: 341- 342.

101- Brandilly M (1959) Depuis des lustres une tribu primitive du Tchad exploite la nourriture de l'an 2000. Sciences et Avenir 152: 516-519.

102- Habib M, Ahsan B, Parvin M, Tim C, Hasan MR (2008) A Review on Culture, Production and Use of Spirulina as Food dor Humans and Feeds for Domestic Animals and Fish.

105-Raymundo A, Gouveia L, Batista P, Empis J, Sousa I (2005) Fat mimetic capacity of Chlorella vulgaris biomass in oil-in-water food emulsions stabilized by pea protein. Food Research International 38: 961- 965.

106- Iwamoto H (2004) Industrial production of microalgal cell mass and secondary products major industrial species Chlorella. In: Richmond A, ed: Handbook of microalgal culture. Blackwell, Oxford, 255-263.

107- Pulz O, Gross W (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbioogy andl Biotechnoly 65:635- 648.

108- Guccione A, Biondi N, Sampietro G, Rodolfi L, Bassi N, Tredici MR (2014) Chlorella for protein and biofuels: from strain selection to outdoor cultivation in a Green Wall panel photobioreactor. Biotechnology of Biofuels 7: 84.

109- Safi C, Zebib B, Merah O, Pontalier PY, Vaca-Garcia C (2014) Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris. Renewable and Sustainable Energy 35: 265- 278.

110- Torregrosa-Crespo J, Montero Z, Fuentes JL, García-Galbis MR, Garbayo I, Vílchez C, Martínez-Espinosa RM (2018) Exploring the valuable carotenoids for the large-scale production by marine microorganisms. Marine Drugs 16: 203.

111- Hong MY, Turner ND, Murphy ME, Carroll R, Chapkin RS, Lupton JR (2015) In vivo regulation of colonic cell proliferation, differentiation, apoptosis and P27Kip1 by dietary fish oil and butyrate in rats. Cancer Prevention Research 8:1076- 83.

112- Rania MA, Hala T (2008) Antibacterial and antifungal activity of Cynobacteria and green Microalgae evaluation of medium components by Plackett-Burman design for antimicrobial activity of Spirulina platensis. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry 3: 22- 31.

113- Sapieha P, Stahl A, Chen J, Seaward MR, Willett KL, Krah NM (2011) 5 Lipoxygenase metabolite4-H DHA is a mediator of the antiangiogenic effect of ω-3 polyunsaturated fatty acids. Science Translational Medicine 3: 69 ra12.

114- Crastes De Paulet A (1994) Importance des apports lipidiques pour le développement psychomoteur du petit enfant : insuffisance en acides gras polyinsaturés des laits premier âge. Oilseeds and Fats, Crops and Lipids 1:15- 7.

115- Belarbi EH, Molina Grima E, Chisti Y (2000) A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. Enzyme and Microbial Technology 26: 516- 29.

117-Ribalet F, Intertaglia L, Lebaron P, Casotti R (2008) Differential effect of tree polyunsaturated aldehydes on marine bacterial isolates. Aquatic Toxicology 86: 249- 255

118- Fuchs P, Loeseken C, Schubert J, Miekisch W (2010) Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer. International Journal of Cancer 126: 2663-70.

119- sansone C, Braca A, Ercolesi E, Romano G, Palumbo A, Casotti R, Francone M, Ianora A (2014) Diatom-Derived Polyunsaturated Aldehydes Activate Cell Death in Human Cancer Cell Lines but Not Normal Cells. PLoS ONE 9:7, e101220.

120- De Jesus Raposo MF, De Morais RM, De Morais AM (2013) Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. Life Sciences 93: 479- 486

121-Mobin S, Alam F (2017) Some promising microalgal species for commercial applications. Energy Procedia 110: 510- 517.

122- **Bloemberg GV, Wijfijes AHM, Lamers GEM, Stuurman N, Lugtenberg BJJ (2000)** Simulataneous imaging of Pesudomonas flourescens WCS 3655 populations expressing three different autofluorescent proteins in rizosphere: new perspective for studying microbial communities. Molecular Plant-Microbe Interactions 13: 1170.

123- Chader S (2003) Le Génie des Micro-Algues: de l'aliment au carburant. Bulletin des Energies Renouvelables. CDER Bouzareah (Algérie).

124- Bergman B, Sandh G, Lin S, Larsson J, Carpenter EJ (2012) Trichodesmium– a widespread marine cyanobacterium with un-usual nitrogen fixation properties, FEMS Microbiology Reviws 37: 1-17.

125- Abdel-Raouf N, Al-Homaidan AA, Ibraheem IBM (2012) Microalgae and waste water treatment. Saudi Journal of Biological Sciences 19: 257- 275.

126- Gasparatos A, Borzoni M, Abramovay R (2012) The Brazilian bioethanol and biodiesel programs: Drivers, policies and impacts. In: Gasparatos A, Stromberg P (eds). Socioeconomic and Environmental Impacts of Biofuels: Evidence from Developing Nations. Cambridge Univ. Press, Cambridge, England: 111- 143.

127- Lara LL, Artaxo P, Martinelli LA, Victoria RL, Camargo PB, Krusche A, Ayers GP, Ferraz ESB, Ballester MV (2001) Chemical composition of rainwater and anthropogenic influences in the Piracicaba River Basin, southeast Brazil. Atmospheric Environment 35: 4937- 4945.

128- Gasparatos A, Borzoni M, Abramovay R (2012) The Brazilian bioethanol and biodiesel programs: Drivers, policies and impacts. In: Gasparatos A, Stromberg P (eds). Socioeconomic and Environmental Impacts of Biofuels: Evidence from Developing Nations. Cambridge Univ. Press, Cambridge, England: 111- 143.

129- Evans SG, Kelley LC, Potts MD (2013) The potential impact of second-generation biofuel landscapes on at-risk species in the US. GCB Bioenergy 7: 337-348.

130-Chisti Y (2008) Biodiesel from Microalgae Beats Bioethanol. Trends in Biotechnology 26: 126-131

131- Chisti Y (2007) Biodiesel from Microalgae. Biotechnology Advances 25: 294-306.

132- HAMEDI CHAHINEZ CARACTERISATION GENETIQUE, PHYSIOLOGIQUE, BIOCHIMIQUE ET BIODIVERSITE DES DIATOMEES pdf .

133- 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.

134- 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.

135- 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.

136- 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.

SITE WEB

103-Cyanotech,2018https://www.cyanotech.com/pdfs/Cyanotech_2018_Annual_Report-20460.pdf

104- http://www.les-sahariens.com/abdelkader-hiri-a-tamanrasset-les- gens-appellent-la-spiruline-le-sang-vert/

116-(https://www.statista.com/statistics/758383/omega-3-supplement-market-size-worldwide/