الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun, Tiaret

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du

Diplôme de Master académique

Domaine : **Sciences de la Nature et de la Vie**

Filière : **Sciences Biologiques**

Spécialité : **Microbiologie Appliquée**

Présenté par :

- *Berag fatima zohra*
- *Chaker Fatiha Ikram*
- *Dif Hayet*

Thème

Lyophilisation et caractérisation biochimique des micro-algues d'eaux douces récoltées de la région de Honaine

Soutenu le ***25/06/2024****, devant le jury composé de :*

Président	: Dr. Yezli Wassim	M.C.A	Université de Tiaret
Examinatrice	: Dr. Mokhfi Fatima Z.	M.C.B	Université de Tiaret
Encadrant	: Dr. Ali-Nehari Abdelkader	M.C.A	Université de Tiaret
Co-Encadrant :	Dr. Djamai Wissam	M.C.B	Université de Tlemcen

Année Universitaire 2023-2024

Dédicaces

Avant tout, je remercie Allah (mon dieu) de m'avoir donné la capacité, la volonté et de la patience pour réaliser ce travail.

Ce mémoire est dédié

À mon père KHALED. Qui a contribué à ma formation scolaire au primaire et qui a travaillé dur pour que j'atteigne ce jour.

À ma mère HALLOUZ MOKHTARIA Qui m'ont toujours poussé et motivé dans mes études, qui m'ont donné la confiance, le courage et la sécurité, je vous remercie pour tout le soutient et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère votre bénédiction m'accompagne toujours.

À mes chers frères FOUAD, SAMIR, ALI

À mes chères amies

« Pour son investissement et son dévouement qui ont permis la réussite de ce projet »

À toute la famille BERAG qui m'encourage et me soutient tout au long de ma période d'études

Je tiens à remercier mon binôme **IKRAM** et **HAYET** pour sa collaboration et sa patience.

À ma mémoire pour que ce travail reste un de mes meilleurs souvenirs.

FATIMA ZOHRA

Dédicaces

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force, la capacité, la volonté pour réaliser ce travail.

À mes chers parents LARBI ET GHANIA la prunelle de mes yeux en les remerciant pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leur prière tout au long de mes études, qu'ils soient toujours fiers de moi.

À ma grande sœur ;

LALIA KHOULOUD que j'aime plus que tout ma confidents ma perle rare que dieu la protège et la garde

À toute la famille CHAKER et FERAH qui m'encourage et me soutient tout au long de ma période d'études

À mes chères amies « pour son investissement et son dévouement qui ont permis la réussite de ce projet »

À mes collègue « FATIMA et HAYET »

À tous ceux que j'aime et qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

FATIHA IKRAM

Dédicaces

Avant tout nous tenons à remercier DIEU le tout puissant qui nous avons donné le courage, la sante, la patience et la force de terminer ce travail.

À mes chers parents et mes grands-parents aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

À mes grandes sœurs

MEBARKA, KHADIDJA, NOURA, dans tes yeux je vois le sens de l'amour, et près de toi je ressens le bonheur, je te remercie pour ton soutien, tes encouragements et tes prières pour moi. Je demande à Dieu de vous donner la santé, le bonheur et le succès dans votre vie.

À mes plus belles

NIHAL, HIBA, mes alliées dans les bons moments comme dans les mauvais. Votre force, votre gentillesse et votre soutien ont été ma motivation constante.

À mes chers frères

Votre soutien indéfectible et votre amour ont été ma lumière dans les moments sombres.

À mon encadrant

Mr ALI NEHARI ABDELKADER dont la guidance éclairée, la patience infinie et le soutien inconditionnel ont été les piliers de ce travail de recherche. Merci de m'avoir motivé et aidé jusqu'au dernier moment, je vous exprime ici toute reconnaissance."

À Monsieur SEGHIER NOUREDINE votre soutien inestimable a été un moteur essentiel de notre réussite. Merci pour votre dévouement sans faille.

À mes chères amies

« En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble. »

À tous ma chère famille

Mes oncles, tantes, cousins et cousines ainsi que BELKHAYR, ABDELKERIM, ISMAIL.

À ma binôme IKRAM et FATIMA et à mes collègues de ma promotion AYA, FADWA, CHERIFA, CHAHINEZ, AMARIA, WAFA, que j'ai passé avec des moments inoubliables malgré la courte duré que je les ai rencontré.

HAYET

Remerciements

Nous remercions tout d'abord Allah le tout puissant, pour nous avoir

donné la force et la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail. Car l'homme propose mais Dieu dispose.

Seigneur, veuillez toujours diriger nos pas.

Nous tenons à exprimer notre plus profonde gratitude à notre promoteur Mr. ALI-NEHARI Abdelkader, d'avoir accepté de nous encadrer, pour son soutien infaillible et son engagement indéfectible tout au long de notre parcours académique. Ses conseils éclairés, sa patience infinie et son expertise inestimable ont été des piliers essentiels dans la réalisation de ce mémoire. Son dévouement à notre apprentissage et son désir sincère de voir chaque étudiant exceller ont été une source d'inspiration constante. Chaque rencontre avec lui a été une opportunité d'apprendre et de grandir, et nous sommes profondément reconnaissants pour la confiance qu'il a placée en nous et pour son engagement à nous pousser vers l'excellence. Son influence positive restera gravée dans notre mémoire et dans notre parcours professionnel.

Merci infiniment pour tout ce que vous avez fait.

Aussi, on tient vivement à remercier notre Co-promoteur Mme. DJAMAI Wissam, qui nous a aidées dans la réalisation de ce travail par leurs précieux conseils, son soutien, ses encouragements.

Nos profonds remerciements s'adressent à Mr. YEZLI Wassim, pour l'honneur qu'il nous a fait de présider ce jury.

Nous adressons aussi nos plus vifs remerciements à Mme. MOKHFI Fatima Zohra, d'avoir bien voulu s'intéresser à ce travail et d'accepter de l'examiner, nous sommes très honorés de sa présence dans ce jury.

Un grand merci à Mr. HOUCINE L. chef de spécialité de microbiologie appliquée qui se consacre à mettre de l'ordre dans le département et à pousser les étudiants à se surpasser dans leurs études.

Nous remercions les personnelles du laboratoire technologie agroalimentaire Mr. BENHLIMA et Mr. HOUARI, et laboratoire Microbiologie Mme. LAILA pour leur aide et d'avoir partagé leur savoir-faire avec nous.

En fin, nous remercions tous ceux qui ont du pré ou du loin contribuée à la réalisation de ce travail. On présents remerciements et notre gratitude.

ملخص

حاليا، تحتل الطحالب الدقيقة مكانا بارزا في البحث عن منتجات طبيعية جديدة .كما أنها تستقطب اهتمامًا كبيرًا كمصدر محتمل للعناصر الغذائية والمواد النشطة بيولوجيًا لتحل محل نظيراتها الاصطناعية .أحد الأسباب التي جعلها واعدة بالنسبة للعديد من التطبيقات في مختلف المجالات .الهدف من هذه الدراسة هو توصيف الطحالب الدقيقة المجمعة من أحواض تربية الأسماك بهنين بولاية تلمسان، فضلا عن محاولة المساهمة في تثمين مختلف منافعها المحتملة .وبعد تحضير المادة الجافة بالتجفيف بالتجميد، قمنا بتوصيفها من خلال تحديد تركيبها الكيميائي الحيوي .ثم قمنا باختبار المستخلصات التي تم الحصول عليها لتقييم قوتها المضادة للبكتيريا والفطريات .أظهرت نتائج التركيب البيوكيميائي الجزئي مستوى رطوبة قدر بحوالي 1.25 ± 0.23 .% تحتوي على نسبة رماد بلغت 6.8 ± 0.34؛ نسبة الدهون 2.92 ± 0.93%؛ محتوى بروتيني 49.12 ± 0.74 % ومستوى الكربوهيدرات يقدر بحوالي 16.31 ± 0.87 % بالنسبة لنتائج استخلاص المادة الجافة من الطحالب الدقيقة، لوحظ أن أعلى مردود سجل للمستخلص المائي (21.13 %)، أما أقل القيم فقد سجلت لمستخلص الكلوروفورم بنسبة 2.75 %. أظهرت نتائج التأثيرين المدروسين أن لمستخلصات الطحالب نشاط تثبيطي على السلالات المختبرة بشكل ملحوظ.

كلمات دالة : الطحالب الدقيقة ؛ التجفيف بالتجميد؛ المركبات النشطة بيولوجيا ؛ التركيبة الكيميائية الحيوية: النشاط المضاد للبكتيريا؛ النشاط المضاد للفطريات.

RESUME

À présent, les microalgues occupent une place prépondérante dans la recherche de nouveaux produits naturels. Elles suscitent un vif intérêt en tant que source potentielle d'éléments nutritifs et substances bioactifs pour remplacer leurs équivalents de synthèse. Une raison pour laquelle elles présentent un fort potentiel pour de nombreuses applications dans divers domaines. L'objectif de cette étude est de caractériser les microalgues récoltées des bassins d'aquaculture de Honaine, situés à la Wilaya de Tlemcen, ainsi que de contribuer à la valorisation de leurs divers intérêts potentiels. Après avoir préparé la matière sèche par lyophilisation, nous l'avons caractérisée en déterminant sa composition biochimique. Ensuite, nous avons testé les extraits obtenus pour évaluer leur pouvoir antibactérien et antifongique. Les résultats de la composition biochimique partielle ont montré un taux d'humidité au voisinage de 1,25 ± 0,23 %. Elles renferment un taux de cendres de 6,8 ± 0,34 ; une teneur en matière grasse de 2,92 ± 0,93% ; une teneur en protéines de 49,12 ± 0,74% et un taux de glucides au voisinage de 16,31 ± 0,87%. Pour les résultats d'extraction de la matière sèche des microalgues, nous avons pu constater que le rendement le plus élevé a été noté pour l'extrait aqueux (21,13 % (g/g), cependant, les plus faibles valeurs ont été notées pour l'extrait chloroformique de l'ordre de 2,75 % (g/g). La lecture des résultats pour les deux effets étudiés a significativement montré que les extraits des microalgues ont une activité inhibitrice sur les souches testées.

Mots clés : Microalgues; lyophilisation; composés bioactifs; caractérisation biochimique ; effet antibactérien; effet antifongique.

Abstract

Currently, microalgae occupy a prominent place in the search for new natural products. They are attracting great interest as a potential source of nutrients and bioactive substances to replace their synthetic equivalents, a reason, why they have a great potential for several applications in various fields. The objective of this study is to characterize the microalgae collected from the breeding ponds of Honaine, located in the Wilaya of Tlemcen, as well as to contribute to the valorization of their various potential interests. After preparing the dry material by freeze-drying, we characterized it by determining its biochemical composition. Then, we tested the extracts obtained to evaluate their antibacterial and antifungal power. The results of the partial biochemical composition showed a humidity level of around 1.25 ± 0.23%. They contain an ash content of 6.8 ± 0.34; a fat content of 2.92 ± 0.93%; a protein content of 49.12 ± 0.74% and a carbohydrate level of around 16.31 ± 0.87%. For the results of extraction of dry matter from microalgae, we could see that the highest yield was noted for the aqueous extract (21.13% (g/g), however, the lowest values were noted for the chloroform extract of the order of 2.75% (g/g). Reading the results for the two effects studied, has significantly showed that the microalgae extracts have an inhibitory activity on the strains tested.

Keywords: Microalgae; freeze-drying; bioactive compounds; biochemical characterization; antibacterial effect; antifungal effect

Tables des Matières

Tables des matières..…….. ix

Liste des Abréviations...……..... xi

Liste des Tableaux……..... xii

Liste des Figures……..... xiii

Résumés…..……..……..... vi

1ère partie : Introduction Générale

Introduction ……..……..……..... 1

Partie expérimentale

Chapitre 1 : Matériel & Méthodes

I. Matériel et Méthodes…… 9

I. 1. Période et lieu de travail…….. 9

I. 2. Matériels et produits ……... 9

I. 2.1. Matériel biologique ……. 10

I. 2.2. Matériel microbiologique…… 12

I. 3. Échantillonnage …….. 12

I. 4. Préparation de la matière sèche …….. 13

I.5. Caractérisation biochimique des microalgues récoltées …… 15

I. 5.1. Teneur en cendre…….. 15

I. 5.2. Teneur en matières grasses…….. 16

I. 5.3. Teneur en protéines…….. 17

I. 5.4. Teneur en glucide……. 17

I. 6. Valorisation des extraits bioactifs des microalgues…… 18

I. 6.1. Extraction des composés bioactifs……... 18

I.6.2. Evaluation de l'activité antibactérienne…….. ……. 20

I. 5.3. Evaluation de l'activité antifongique…… 25

I.6. Analyses statistiques…… 27

Chapitre 2 : Résultats et discussions

II. Résultats et Discussions ……. 29

II. 1. Identification de microalgues récoltées ……. 29

II. 1. 1. Observation microscopique …….. 29

II. 2. Caractérisation biochimique des microalgues lyophilisées…….. 30

II. 2.1. Détermination du taux de l'humidité ……..... 31

II. 2.2. Détermination de la teneur en cendre …… 31

II. 2.3. Détermination de la teneur en matières grasses …… 31

II. 2.4. Détermination de la teneur en protéine…… 32

II. 2.4. Détermination de la teneur en glucides…….. 32

II. 3. Valorisation des extraits bioactifs des microalgues ……. 33

II. 3.1. Extraction des composés bioactifs ……..... 33

II. 3.1.1. Rendements des extractions…. ……..... 34

II. 3. 2. Effet antibactérien des extraits obtenus des microalgues……..... 35

II. 3.2.1. Test microscopique…….. 35

II. 3.2. 2. Test antibactérien……. 36

II. 3. 3. Effet antifongique des extraits obtenus des microalgues……..... 38

II. 3. 3.1. Test microscopique ……. 34

II. 3. 3.1. Test antifongique …… 39

Conclusion……..... 42

Références bibliographiques ……. 45

Annexes ……..... 51

Liste des abréviations

DMSO	**:**	DiMéthyl SulfOxide
GN	**:**	Gélose nutritive
MH	**:**	Mueller Hinton
MS	**:**	Matière sèche
GS	**:**	Gélose sabouraud
ALA	**:**	Alpha-linolenic acid
EPA	**:**	Eicosapentanoic acid
DHA	**:**	Docosahexaenoic acid
ARA	**:**	Arachidonic acid

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Matériel et produits utilisés dans les différents dosages et analyses.	P.09
Tableau 2 :	Classification des différentes souches bactériennes testées	P.12
Tableau 3 :	Caractérisation biochimique de la matière sèche des microalgues.	P.30
Tableau 4 :	Rendement d'extraction par les différents solvants utilisés	P.34
Tableau 5 :	Observation microscopique des souches bactériennes à tester	P.35
Tableau 6 :	Diamètre des zones d'inhibition des extraits contre les souches bactériennes	P.36
Tableau 7 :	Résultats de l'antibiogramme des différents extraits sur les souches bactériennes	P.37
Tableau 8 :	Résultat de l'observation microscopique de la souche fongique	P.39
Tableau 9 :	Diamètre des zones d'inhibition des extraits contre *C. albicans*	P.39

Liste des figures

Figure 1 :	Protocole expérimental	P.10
Figure 2 :	Photographie de la ferme aquacole de Honaine - Wilaya de Tlemcen	P.11
Figure 3 :	Photographie du bassin du prélèvement des microalgues	P.11
Figure 4 :	Echantillon de microalgue collecté du bassin de culture	P.13
Figure 5 :	Lyophilisation des microalgues	P.14
Figure 6 :	Matière sèche de microalgues lyophilisée	P.14
Figure 7 :	Cendres contenues dans l'échantillon après calcination	P.15
Figure 8 :	Extraction des lipides par le soxhlet	P.16
Figure 9 :	Préparation des solutions pour la détermination de la teneur en glucide	P.18
Figure 10 :	Extraction des composés bioactifs	P.19
Figure 11 :	Extraction des composés bioactifs	P.21
Figure 12 :	Repiquage des souches bactériennes	P.21
Figure 13 :	Protocole de standardisation des souches bactériennes	P.23
Figure 14 :	Protocole d'ensemencement et dépôt des disques	P.24
Figure 15 :	Préparation des milieux de culture	P.26
Figure 16 :	Protocole du test antifongique	P.27
Figure 17 :	Photo microscopique des souches de microalgues	P.30
Figure 18 :	Courbe d'étalonnage du glucose utilisée dans le dosage des glucides.	P.33
Figure 19 :	Résultats de l'antibiogramme des différents extraits sur *C. albicans*	P.40

Introduction

Introduction

Les algues sont des organismes eucaryotes principalement trouvés dans des environnements aquatiques, capables de réaliser la photosynthèse oxygénique en réduisant le CO_2 et en oxydant l'eau à l'aide de l'énergie lumineuse. Ces organismes n'ont pas d'ancêtre commun et forment donc un groupe polyphylétique (Gaignard, 2019). Il convient de prendre en considération deux types d'algues aux caractéristiques très différentes : les macroalgues, qui sont des macroorganismes pluricellulaires avec des organes bien différenciés, et les microalgues, qui sont des microorganismes unicellulaires (Borowitzka et al., 2016). Les cyanobactéries, également appelées "microalgues bleues", font partie du groupe des procaryotes et sont parfois amalgamées ou confondues avec les microalgues dans le langage courant. Cependant, elles constituent un groupe phylogénétique distinct. Les microalgues et les cyanobactéries représentent une part importante de la biomasse végétale sur Terre. Elles présentent une grande diversité, regroupant selon les chercheurs entre 200 000 et 800 000 espèces (Ebenezer et al., 2012), parmi lesquelles seules 35 000 ont été complètement identifiées à ce jour (Cheng et Ogden, 2011). Les microalgues étant polyphylétiques, elles ne peuvent donc pas être considérées comme un taxon (Kherraf, 2018). La classification a été remaniée depuis les années 1990 à l'aide de la biologie moléculaire et permet désormais de réarranger les organismes selon leur histoire évolutive (Pasquet, 2011). Aussi, le classement des microalgues se base sur la diversité de leurs propriétés, notamment leurs caractéristiques morphologiques, leur pigmentation et l'organisation de leurs membranes (Chen, 2011). Les microalgues eucaryotes et procaryotes partagent la capacité de réaliser la photosynthèse oxygénique. Cette réaction

permet de convertir le carbone inorganique en énergie chimique en captant la lumière comme source d'énergie (Sialve et Steyer, 2013).

Faisant partie du règne des algues, les microalgues d'eaux douces sont des microorganismes unicellulaires, qui se caractérisent par leur petite taille, généralement inférieure à 0,5 millimètre. Ces organismes sont capables de réaliser la photosynthèse, convertissant ainsi l'énergie solaire en matière organique. Elles sont présentes dans divers types d'écosystèmes d'eau douce, tels que les lacs, les rivières, les étangs et les marais. Les microalgues jouent un rôle important dans la chaîne alimentaire en tant que producteurs primaires, fournissant de la nourriture pour les autres organismes aquatiques (Moscoso et al., 2013).

Le terme "microalgue" s'est peu à peu imposé dans les sphères scientifique et industrielle. En effet, ces dernières années, la biotechnologie des microalgues est devenue un domaine de recherche privilégié permettant d'explorer et de tirer parti du vaste potentiel de ces micro-organismes intervenant dans de nombreux systèmes et secteurs industriels divers tels que l'énergie, la pharmacie, l'alimentation et plus récemment l'environnement **(**Filali, 2012)**..**

Une importance qui peut être justifiée par l'immense diversité de molécules au sein de leurs cellules. Cette biomasse se différencie principalement des autres végétaux par sa richesse en lipides, en protéines, en vitamines et en antioxydants. Ils présentent aussi une grande diversité de couleurs et de pigments. Leur couleur peut varier du vert au bleu, en passant par le brun, le jaune et le rouge. Ces couleurs sont le résultat des pigments présents dans les cellules des microalgues (Borowitzka et al., 2016). Les pigments les plus

communs chez les microalgues d'eaux douces sont les chlorophylles a et b, responsables de la photosynthèse, ainsi que les caroténoïdes, tels que la β-carotène et la xanthophylle. La présence de ces pigments permet aux microalgues d'eaux douces de capter la lumière et de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique lors de la photosynthèse (Samarakoon et Jeon, 2012).

En terme de qualité nutritive, elles sont une source importante de presque toutes les vitamines essentielles à savoir B1, B6, B12, C, E, KI, et possèdent un large panel de pigments, fluorescents ou non, pouvant aussi avoir un rôle d'antioxydants. En plus de la chlorophylle qui représente 0,5 à 1% de la matière sèche et qui est le pigment photosynthétique primaire chez toutes les algues photosynthétiques, on trouve toute une gamme de pigments supplémentaires de type caroténoïdes avec un taux de 0,1 à 0,2% de la matière sèche et les phycobiliprotéines de type phycoérythrine et phycocyanine (Findeling, 2011).

Il a été prouvé que les micro-algues peuvent accumuler plus de 50% de leur poids sec en lipides. Ces derniers sont principalement constitués de triglycérides, de phospholipides, et de glycolipides. Ces lipides contiennent des acides gras saturés et polyinsaturés (AGPI) comme les oméga-3 ALA, EPA, DHA, ou les oméga-6 : ARA. (Julie, 2011).

Aussi, le contenu élevé en protéines, peptides et acides aminés (jusqu'au 65% de matière sèche) de plusieurs espèces de micro-algues est une des principales raisons pour les considérer comme une source non conventionnelle de protéines dans l'alimentation humaine et animale en particulier la pisciculture (Sassi, 2011). Certaines espèces

présentent aussi une richesse en oligosaccharides et polysaccharides, d'autres encore peuvent produire des molécules à activité antivirales, antibiotiques, ou antiprolifératrices chez l'homme (Lepine, 2011).

L'intérêt des micro-algues se manifeste par la diversité de leurs compositions biochimiques, elles se révèlent très prometteuses pour de nombreuses applications dans des domaines variés tels que, le domaine de l'agroalimentaire en fournissant des gélifiants comme les carraghénanes et les alginates, qui n'ont pas d'équivalents d'origine terrestre (Jansson et Northen, 2010; Moscoso et al., 2013).

Les premières utilisations des micro-algues datent de 2000 ans en Chine, *Nostoc*, une Cyanobactérie, avait été utilisée comme nourriture afin de survivre à une famine (Spolaore et al., 2006). Toujours dans un contexte de pénurie alimentaire, en 1940, les chercheurs se sont intéressés aux micro-algues comme aliments pour leurs teneurs en protéines. En France, l'activité commence à la fin des années 1970 avec l'apparition des premières écloseries de mollusques et la production de micro-algues pour l'aquaculture. En 2005, la production mondiale toutes espèces confondues est estimé à 7000 tonnes de matière sèche par an. Aujourd'hui avec seulement quelques dizaines d'espèces cultivées, la production mondiale n'excède pas 10000 tonnes (Person, 2010). Actuellement, les applications commerciales des micro-algues sont en plein essor. La diversité des espèces et la richesse en métabolites permet un large panel d'applications impliquant ainsi de nombreux secteurs industriels.

Leur usage croissant dans les secteurs de la cosmétique et de la chimie témoigne d'un regain d'intérêt pour leur exploitation à l'échelle industrielle. Leurs utilisation

principal est en effet de nourrir les larves d'aquaculture. Elles sont aussi cultivées pour produire du bêta-carotène ainsi que différentes autres molécules d'intérêt pour l'alimentation humaine (Mathieu, 2011). Et dans le domaine énergétique consiste à la synthèse biologique d'hydrogène, de méthane et de carburant. Le développement des technologies environnementales a pris une place de plus en plus importante dans la politique mondiale actuelle. En effet, du fait des conséquences du réchauffement climatique et des émissions importantes de gaz à effet de serre, plusieurs études se sont orientées vers le rôle potentiel des systèmes biologiques, et plus spécialement l'implication de la biotechnologie microalgale, dans la réduction et l'élimination de ces émissions. Une des pistes prometteuses consiste dans la bio-fixation du dioxyde de carbone par les microalgues, celui-ci étant le principal gaz à effet de serre (Filali, 2012). Les extraits obtenus des microalgues trouvent également leur application dans l'industrie pharmaceutique. En effet, les principes actifs extraits des microalgues sont utilisés pour leurs propriétés anti-inflammatoires liées à l'œsophage, pour combattre l'excès de poids, pour leurs effets laxatifs, ainsi que pour les soins des plaies. De plus, les microalgues peuvent contribuer à améliorer le confort des personnes diabétiques, par le fait que certain polysaccharides issus des microalgues peuvent moduler l'absorption intestinale du glucose et la réponse insulinique à l'alimentation. Par ailleurs, des oligosaccharides extraits des microalgues peuvent améliorer l'équilibre de la flore intestinale du colon, en favorisant la croissance des bactéries comme favorables pour la santé. Ces bactéries sont actuellement largement utilisées des préparations à base de lait peu caloriques, riches en vitamines et en minéraux. (Gana, 2014). Les microalgues utilisées par la filière cosmétique sont souvent les mêmes que celles utilisées pour les applications alimentaires. Cependant, les travaux de recherche mettent en évidence de nouvelles applications pour de nouvelles espèces. La

filière cosmétique utilise les microalgues sous forme d'extraits de plantes, broyées (pour les gommages par exemple) ou en tant qu'agents de coloration. Etant donné que le marketing joue un rôle important dans l'industrie des cosmétiques, les microalgues sont souvent utilisées afin de véhiculer une image de produits naturels apportant les bienfaits de la mer (IDEALG, 2014).

Compte tenu de la variété d'activités liées aux microalgues d'eau douce, en particulier leurs propriétés bioactives, ainsi que leur richesse nutritive, l'exploration des milieux aquatiques doux dans cette optique d'algoulture pourrait s'avérer très prometteuse. Ainsi que la recherche de nouvelles molécules bioactives capables de garantir des fonctions assurées par les molécules chimiques; ce qui est devenue nécessaire.

C'est dans cette optique que s'inscrit notre travail de recherche, dont l'objectif est la caractérisation des microalgues d'eaux douces cultivées dans des bassins de la ferme aquacole de Honaine- Wilaya de Tlemcen pour évaluer leur composition biochimique, ainsi qu'une contribution à la valorisation de leurs différents intérêts potentiels en termes d'activités biologiques.

Pour pouvoir atteindre cet objectif, notre étude s'articule autour de trois volets :

1. *Récolte des microalgues et préparation de la matière sèche ;*
   - *Centrifugation, filtration et lyophilisation*
2. *Caractérisation de la matière sèche préparée ;*
   - *Teneur en protéine, lipide, glucides,etc.*
3. *Valorisation des extraits bioactifs des microalgues ;*
   - *Extraction des composés bioactifs*
   - *Evaluation du pouvoir antibactérien*
   - *Evaluation du pouvoir antifongique*

Partie expérimentale

Chapitre 1

Matériel & Méthodes

I. Matériel et Méthodes :

L'objectif de notre travail est de caractériser les microalgues d'eaux douces récoltées de la région de Honaine – Wilaya de Tlemcen. Ainsi que l'évaluation du pouvoir antimicrobien de leurs extraits obtenus par macération. Le protocole expérimental qui montre les différentes étapes du travail est représenté dans la figure 1.

I.1. Période et lieu de travail

Les analyses et testes ont été réalisé au niveau du laboratoire de science alimentaire et de microbiologie de la Faculté de science de la nature et de la vie, Université Ibn Khaldoun-Tiaret durant la période entre 20 Février et 10 Mai 2024.

I. 2. Matériels et produits :

Le matériel utilisé pour réaliser cette étude est composé de verreries, d'équipements et d'appareils. Il comprend aussi un ensemble de réactifs et produits chimiques qui sont mentionnés dans le tableau 01.

Tableau 01: Matériel et produits utilisés dans les différentes analyses.

Verrières et autres	Appareillage	Réactifs et produits
• Ballon en verre • Béchers • Entonnoirs • Eprouvettes • Erlen meyer • Etiquettes • Fioles jaugées • Micropipettes • Papier aluminium • Papiers filtre • Boites de pétri • Papier filtre Whatman	⌗ Agitateur ⌗ Étuve ⌗ Centrifugeuse ⌗ Balance électrique ⌗ Bain Marie ⌗ Lyophilisateur ⌗ Spectrophotomètre ⌗ Evaporateur rotatif ⌗ Réfrigérateur ⌗ Soxhlet	- Eau distillée - Acide sulfurique - Fuchsine - Violet de gentiane - Lugol - Méthanol - Acétone - Hexane - Chloroforme - Diméthylsulfoxyde - (DMSO) à 1 % - ATB - Antifongique

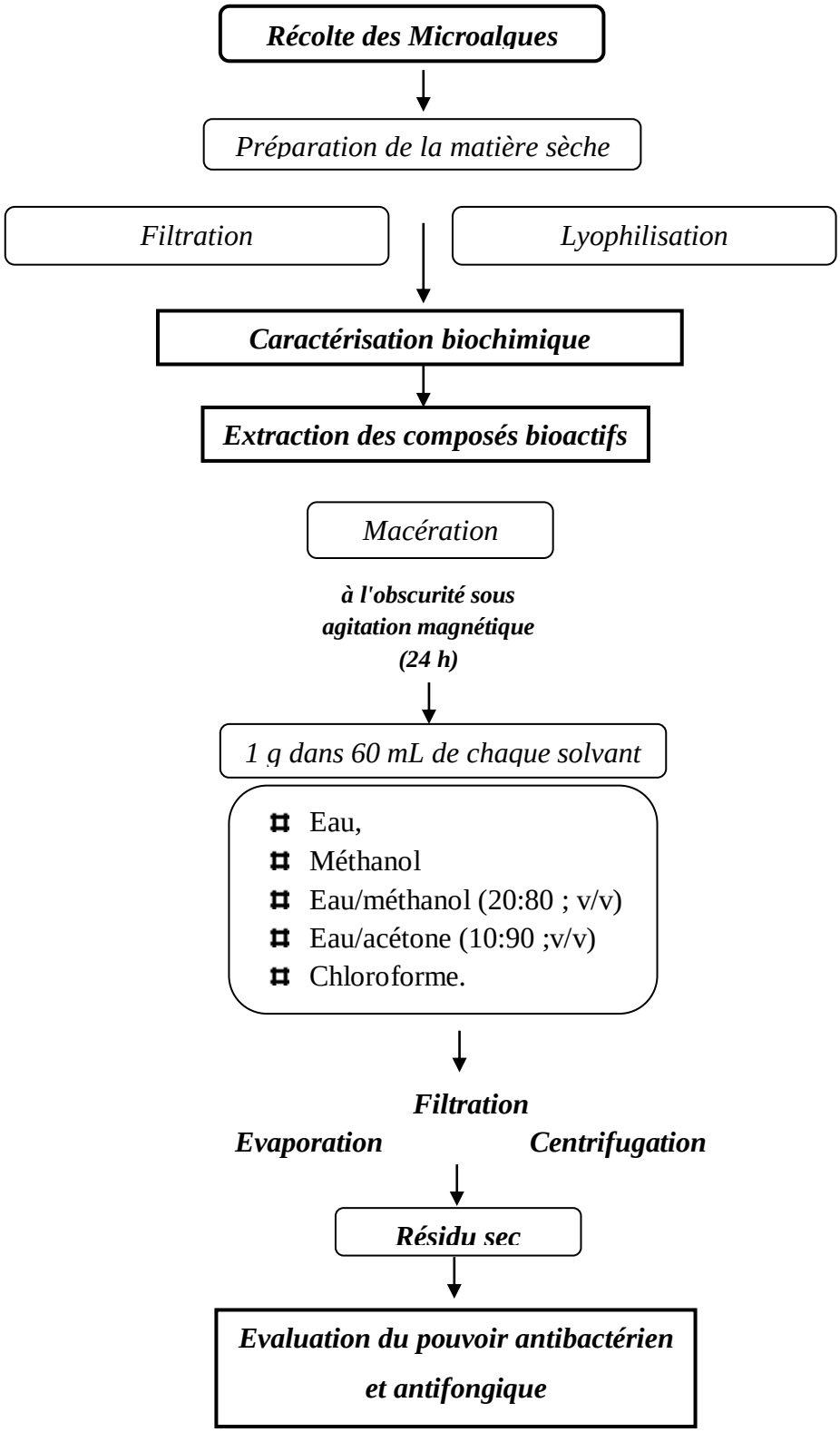


Figure 1: Protocole expérimental

I. 2.1. Matériel biologique :

Le matériel biologique de notre étude est une microalgue. Ce sont des phytoplanctons naturels, poussant à l'air libre ou à l'état sauvage qui sont collectés de la ferme aquacole Beni Ayyadh à Honaine, situé au nord de Tlemcen (Figure 2).

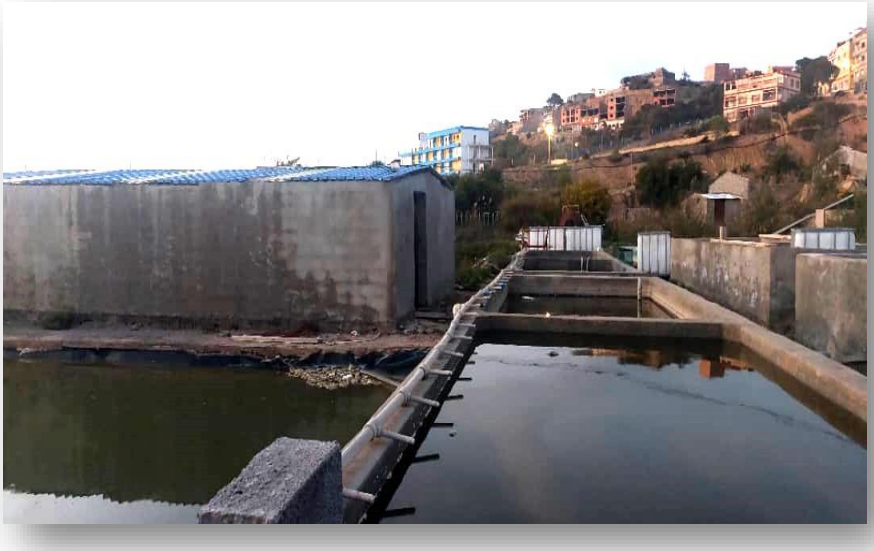


Figure 2: Photographie de la ferme aquacole de Honaine - Wilaya de Tlemcen (*Photo originale*)

Figure 3: Photographie du bassin du prélèvement des microalgues (*Photo originale*)

I.2.2. Matériel microbiologique :

Afin de tester l'effet antibactérien et antifongique des extraits obtenus des microalgues, quatre souches bactériennes et une souche fongique ont été utilisées (Tableau 2), elles sont des germes :

- Gram négative : *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027)
- Gram positive : *Staphyloccocus aureus (*ATCC 43300) *et Bacillus subtilis* (ATCC 6633)
- *Fongique : Candida albicans*

Tableau 02 : Classification des différentes souches bactériennes testées

	Escherichia coli	***Pseudomonas aeruginosa***	***Staphylpccocus aureus***	***Bacillus subtilis***
Règne	*Bactéria*	*Pseudomonas*	*bacteria*	*Bacteria*
Division	*Proteobacteria*	*Proteobacteria*	*firmicutes*	*Bacillota*
Classe	*Gamma proteobacteria*	*Gamma proteobacteria*	*Bacilli*	*Bacilli*
Ordre	*Enterobacteriaceae.*	*Pseudomonadales*	*Bacillales*	*Bacillales*
Famille	*Enterobacteriaceae*	*Pseudomonadaceae*	*Staphylococcaceae*	*Bacillaceae*
Genre	*Escherichi*	*Pseudomonas migula*	*Staphylococcus*	*Bacillus*
Espèce	*E. Coli*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*B. subtilis*

I. 3. Échantillonnage :

La récolte des échantillons de microalgues a été faite le *18 Février 2024* au niveau de la ferme aquacole de Honaine – Wilaya de Tlemcen. Le prélèvement des échantillons se fait manuellement à partir des bassins de culture (Figure 3). On prélève litre par litre à la profondeur qui ne doit pas dépasser 30 cm de la surface de l'eau. L'échantillon collecté est versé dans un flacon en verre (Figure 4). Les microalgues prélevées ont été rincées sur place avec de l'eau distillée au niveau du laboratoire. L'ensemble des phytoplanctons collecté, représente un mélange de différentes espèces. Les échantillons doivent être transportés dans une glacière. Une fois les algues concentrées et séparées du milieu de culture, une pâte d'algues est obtenue. La durée de vie de celui-ci est limitée et il faut donc la traiter rapidement.

Leur conservation doit se faire à 4°C et à l'obscurité au laboratoire jusqu'à la préparation pour l'analyse.

Figure 4 : Echantillon de microalgue collecté du bassin de culture (*Photo originale*).

I.4. Préparation de la matière sèche :

Les microalgues récoltées ont été rincées sur place avec de l'eau distillée au niveau du laboratoire. La biomasse peut être utilisée humide ou séchée. Dans notre travail, et afin de préparer de la matière sèche des microalgues, nous avons procédé à trois étapes principales :

1. ***Filtration du milieu de culture:*** Cette méthode consiste à faire circuler le milieu de culture perpendiculairement à la surface d'un filtre (moins de 40 µm), sur lequel les cellules de microalgue se concentrent constamment.

2. ***Centrifugation :*** On appliquant une force de centrifugation comprise entre 500 et 1000g jusqu'à 90% des microalgues contenues dans le milieu de culture ont été isolé rapidement de la solution de prélèvement.

3. ***Lyophilisation :*** L'échantillon congelé de microalgues brutes (environ 150 g) a été introduit directement dans le lyophilisateur au niveau du laboratoire de Chimie, Université de Tlemcen (Figure 5). La température a été réduite à -51,4°C et la pression a encore été réglée à 0,011 mbar. Le processus de la lyophilisation a été réalisé sous vide pendant 48h. La matière sèche a été stockée à -20°C jusqu'à utilisation pour les extractions.

Figure 5 : Lyophilisation des microalgues (*Photo originale*)

Figure 6: Matière sèche de microalgues lyophilisée (Photo originale)

I. 5. Caractérisation biochimique des microalgues récoltées :

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 (Becker, 2007).

Dans ce travail, la caractérisation des microalgues récoltées a été réalisée en déterminant la teneur en cendre, en matières grasses, en protéines et en glucides.

I.5.1 Teneur en cendre :

La teneur en matière minérale de la matière sèche préparée est déterminée après calcination selon la méthode standard (AOAC, 1995). Un (1) g d'échantillon sec est placé dans un creuset en porcelaine préalablement pesé. Le creuset est mis dans un four à mufles à 600°C pendant 6 heures. Après refroidissement à température ambiante à l'abri de l'humidité dans un dessiccateur, le creuset est pesé contenant le résidu (Figure 7). Le taux de cendres contenu dans l'échantillon se calcule de la manière suivante :

$$\boldsymbol{Cendre}\ (\%) = \frac{\mathbf{m2}}{\mathbf{m1}}\ \mathbf{x\ 100}$$

D'où :

m1 : Masse initiale de l'échantillon.

m2: Masse du résidu après calcination.

La mesure de la différence entre le poids sec initial et le poids sec final permet de déduire la teneur en matière minérale de l'échantillon.

Figure 7 : Cendres contenues dans l'échantillon après calcination

I.5.2 Teneur en matières grasses :

Le principe consiste à effectuer une extraction par un solvant organique à l'aide de dispositif Soxhlet d'une capacité de 250 ml (Figure 8). Trois (3) g d'échantillon sont pesés dans une cartouche en carton poreux, après introduction de 150 ml de n-hexane pur dans le ballon à col rodé, la cartouche est déposée dans l'extracteur et les trois parties de l'appareil sont assemblées. L'hexane est alors porté à ébullition pendant 6 h sur des plaques chauffantes jusqu'à obtention d'un maximum d'hexane dans l'extracteur. La matière grasse extraite est mesurée après élimination du solvant en utilisant un évaporateur rotatif sous vide pour évaporer le n-hexane à 35°C pendant 60 minutes. La teneur en lipides est ainsi déduite (Kherraf, 2018).

Le taux de matière grasse est calculé par la formule suivante :

$$\mathbf{MG}\ (\%) = \frac{\boldsymbol{P1 - P2}}{\boldsymbol{ME}}\boldsymbol{x100}$$

D'où :

- MG% : Taux de la matière grasse.
- P1 : Poids du ballon après évaporation.
- P2 : Poids du ballon vide.
- ME : la masse de la prise d'essai

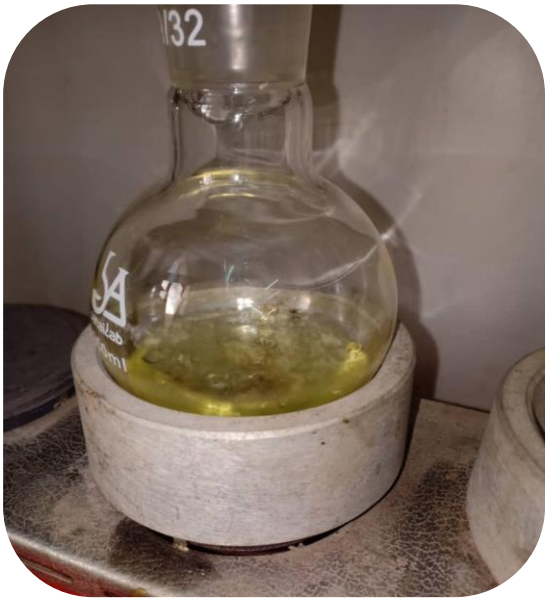


Figure 8 : Extraction des lipides par le soxhlet

I.5.3. Teneur en protéines :

La détermination de la teneur en protéines totales a été effectuée par la détermination de l'azote total selon la méthode de Kjeldhal qui est une méthode officielle et standard (AOAC, 1995). Un (1) g de la matière sèche est introduit dans des tubes prévus à cette analyse. Une pastille de minéralisation et 15 mL d'acide sulfurique concentré sont ajoutés dans les tubes. Ensuite, les tubes coiffés de leurs capteurs de fumée sont mis à chauffer progressivement jusqu'à 450°C. Après une heure et 30 min et lorsque la solution est devenue de couleur vert pâle, la minéralisation a été arrêtée. Après refroidissement des tubes, les capteurs de fumée sont rincés avec de l'eau distillée récupérée dans les tubes. Le contenu des tubes est installé dans une unité de distillation automatisée (Unité de Distillation et Titration UDK 152).

Le taux de protéines brutes a été déterminé en multipliant la quantité d'azote par le facteur (5,95), qui est un facteur utilisé pour la conversion de l'azote en protéine dans les microalgues (Lopez et al. 2010).

I.5.4. Teneur en glucide :

Afin de déterminer la teneur en glucides dans la matière sèche de microalgues, nous avons utilisé la méthode décrite par Albalasmeh et al., (2013) en utilisant le phénol et l'acide sulfurique. Elle est considérée comme la méthode colorimétrique la plus largement utilisée pour la détermination de la teneur en glucides dans des solutions aqueuses. Le principe de base de cette méthode est la production de dérivés de furfural par déshydratation de glucides par réaction avec de l'acide sulfurique concentré. Une autre réaction entre les dérivés du furfural et le phénol développe une couleur détectable (Figure 9).

L'absorbance de la solution a été mesurée à 490 nm. Le glucose a été utilisé comme solution de référence pour la courbe d'étalonnage dans les mêmes conditions opératoires à des concentrations comprises entre 0 et 0,5 mg/mL.

La concentration des glucides est exprimée en milligramme équivalent de glucose par gramme d'extrait (mg EG/mg ES) et elle est calculée selon l'équation suivante :

$$[\boldsymbol{Glucides}] = (\boldsymbol{Ax\ F}) \div \boldsymbol{C}$$

D'où :

A : Concentration des glucides (mg/mL) déterminée à partir de courbe étalonnage ;

C : Concentration de l'extrait ;

F : Facteur de dilution.

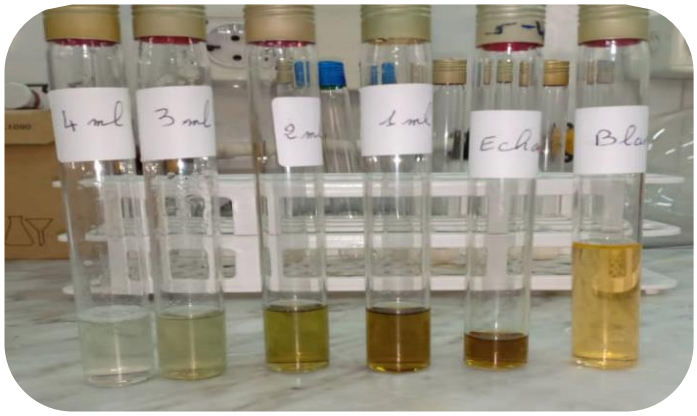


Figure 9 : Préparation des solutions pour la détermination de la teneur en glucide

I. 6. Valorisation des extraits bioactifs des microalgues :

Les microalgues sont considérées comme une source de biomasse et de biodiversité unique dans le monde vivant. Leur diversité est plus grande que toutes les plantes terrestres; elles sont riches en protéines, minéraux, vitamines, pigments et lipides. Leurs performances biologiques et la variété des espèces prédisposent les micro-algues à se placer dans la course aux énergies renouvelables et notamment vers la production de biodiesel (Becker, 2004). Mais aussi pour d'autres applications aux profits d'autres domaines (Aquaculture, Agriculture, Production de biomasse à but alimentaire, traitement des eaux usées, production de molécules à haute valeur ajoutée, etc.).

Dans cette étude, nous avons essayé d'étudier la possibilité d'utiliser les extraits bioactifs de la matière sèche des microalgues obtenue comme des agents antimicrobiens. Pour se faire, nous avons procédé d'abord à l'extraction des composés bioactifs en utilisant cinq solvants organiques par macération et tester le pouvoir antibactérien et antifongique des extraits obtenus.

I.6.1. Extraction des composés bioactifs :

Il a été démontré que les composés bioactifs y compris les lipides des micro-algues sont stockés au sein des cellules qui peuvent être protégées par une épaisse paroi (Dejoye Tanzi, 2013). Ainsi, leur extraction nécessite donc une étape visant à fragiliser les parois cellulaires afin de les rendre accessibles aux solvants. Pour ce faire, plusieurs traitements sont possibles : le broyage, les ultrasons (Kim et al., 2013), les micro-ondes (Koberg et al., 2011), les chocs osmotiques, la lyse enzymatique, etc (Cho et al., 2013). Les principaux solvants utilisés pour l'extraction des pigments sont l'acétone et le méthanol. Le méthanol présente certains avantages

pour l'extraction, tels qu'une volatilité inférieure à celle de l'acétone, et produit également des pics avec une résolution plus élevée par rapport aux pigments extraits dans l'acétone (Dejoye Tanzi, 2013). Le solvant d'extraction idéal des lipides marins doit non seulement satisfaire les critères mentionnés précédemment mais aussi posséder un point d'ébullition faible afin de faciliter son élimination.

Dans cette étude, la méthode de macération a été optée pour extraire les composés actifs présents dans les microalgues (Figure 10), en utilisant cinq solvants de polarités différentes: eau, méthanol, eau/méthanol (20:80 ; v/v), eau/acétone (10:90 ;v/v) et le chloroforme. Un (1) g de la biomasse lyophilisée a été macéré dans 60 mL, à l'obscurité et sous agitation magnétique pendant 24h, à la température ambiante (25°C). Ces extractions ont pour but d'essayer de couvrir tout le spectre de polarité des différentes molécules de la microalgue. Tous les extraits ont été ensuite filtrés en utilisant du papier filtre Whatman (grade 1) et évaporés sous pression réduite dans un évaporateur rotatif afin d'obtenir un résidu sec. Les extraits aqueux ont été centrifugés et le surnageant récupéré a été filtré et séché. Les extraits ont été stockés à – 20°C jusqu'au analyse ultérieure (Djamai, 2019).

Le rendement d'extraction est calculé selon l'équation suivante :

$$\boldsymbol{R}\ (\%) = \frac{\mathbf{Me}}{\mathbf{Mt}}\ \mathbf{x\ 100}$$

D'où :

Me : Masse d'extraits ;

Mt : Masse totale de la matière sèche ;

Figure 10: Extraction des composés bioactifs (Photo originale)

I. 6.2. Évaluation de l'activité antibactérienne :

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits obtenus à partir de la matière sèche a été réalisée par la technique de l'antibiogramme contre quatre souches bactériennes (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphyloccocus aureus* ATCC 43300, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027*)*.

C'est une méthode qui reflète l'aspect quantitatif de sensibilité bactérienne aux antibiotiques. Elle est d'un intérêt capital pour le clinicien qui doit établir ou rectifier une thérapie déjà entreprise. Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique.

La sensibilité aux extraits est étudiée par la méthode de diffusion en milieu solide par la méthode de disque. Cette méthode permet de déterminer la sensibilité des bactéries à croissance rapide vis-à-vis d'une gamme d'antibiotiques (Cavallo, 2007).

Il est à signalé que nous avons évalué l'activité antibactérienne des extraits obtenus par la solution hydrique avec différentes concentrations.

- **Préparation de milieux de cultures :**

Nous avons préparé deux milieux de culture pour ensemencer les germes à tester, il s'agit du milieu Muller Hinton et Gélose nutritive. La figure 11 résume les étapes suivies pour les préparer.

- **Repiquage des souches bactériennes :**

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées (Figure 12). Les colonies isolées ont servi à préparer l'inoculum (Moroh et *al*, 2008).

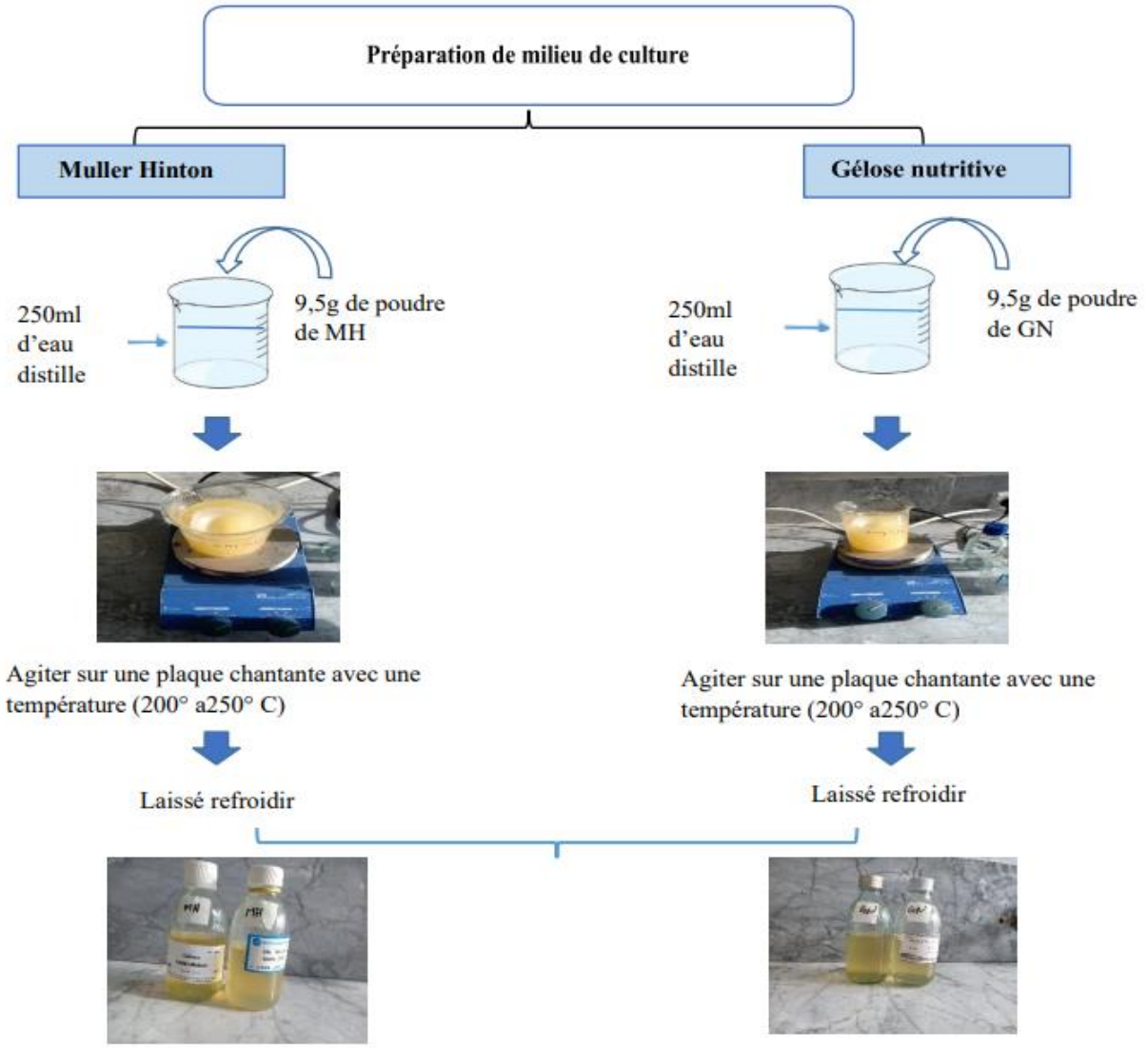


Figure 11: Extraction des composés bioactifs (Photo originale)

Figure 12 : Repiquage des souches bactériennes

- **Test microscopique :**

L'examen est effectué par la coloration de Gram, une technique qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne. Elle permet de colorer les bactéries et de distinguer leur aptitude à fixer le violet de gentiane (Gram+) ou la fuchsine (Gram-). Cette opération se déroule en (07) sept étapes :

Mise en œuvre pratique **(Cavallo, 2007):**

- Réaliser un frottis sur une lame de microscope a partir d'une suspension bactérienne, agiter la suspension afin de l'homogénéiser et d'éviter d'avoir un culot au fond du tube.
- Étaler une goutte de la suspension bactérienne sur une lame propre.
- Procéder à la fixation du frottis en faisant passer la lame trois fois dans la flamme du bec Bunsen.
- Plonger la lame pendant une minute dans le violet de gentiane, puis rincer à l'eau
- Distillée.
- Étaler le Lugol et laisser agir une minute puis rincer à l'eau distillée. (Cette étape a pour but de stabiliser la coloration violette).
- Verser goutte à goutte de l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Surveiller la coloration (15 à 30 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer avec de l'eau distillée.
  - Si l'alcool pénètre dans la bactérie, la coloration au violet de Gentiane disparait. Les bactéries donc sont de type Gram-
  - Si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.
- Réaliser une contre coloration avec de la fuchsine : laisser agir 30 secondes à une minute, laver doucement à l'eau distillée. Puis Sécher la lame entre 2 feuilles de papier buvard.
- Enfin, observation a l'objectif (×100).

Lecture **:**

Les bactéries Gram+ apparaissent en violet foncé, tandis que les bactéries Gram- sont colorées en rose.

- **Préparation de l'inoculum :**

A partir d'une culture jeune de 18 à 24 heures, des colonies isolées sont prélevées puis mises dans 09 ml d'eau physiologique, après homogénéisation de la suspension bactérienne, l'absorbance de la suspension est ajustée à une absorbance de (0.08 - 0.13) à 625 nm. La figure 13 montre le protocole de la standardisation des souches bactériennes.

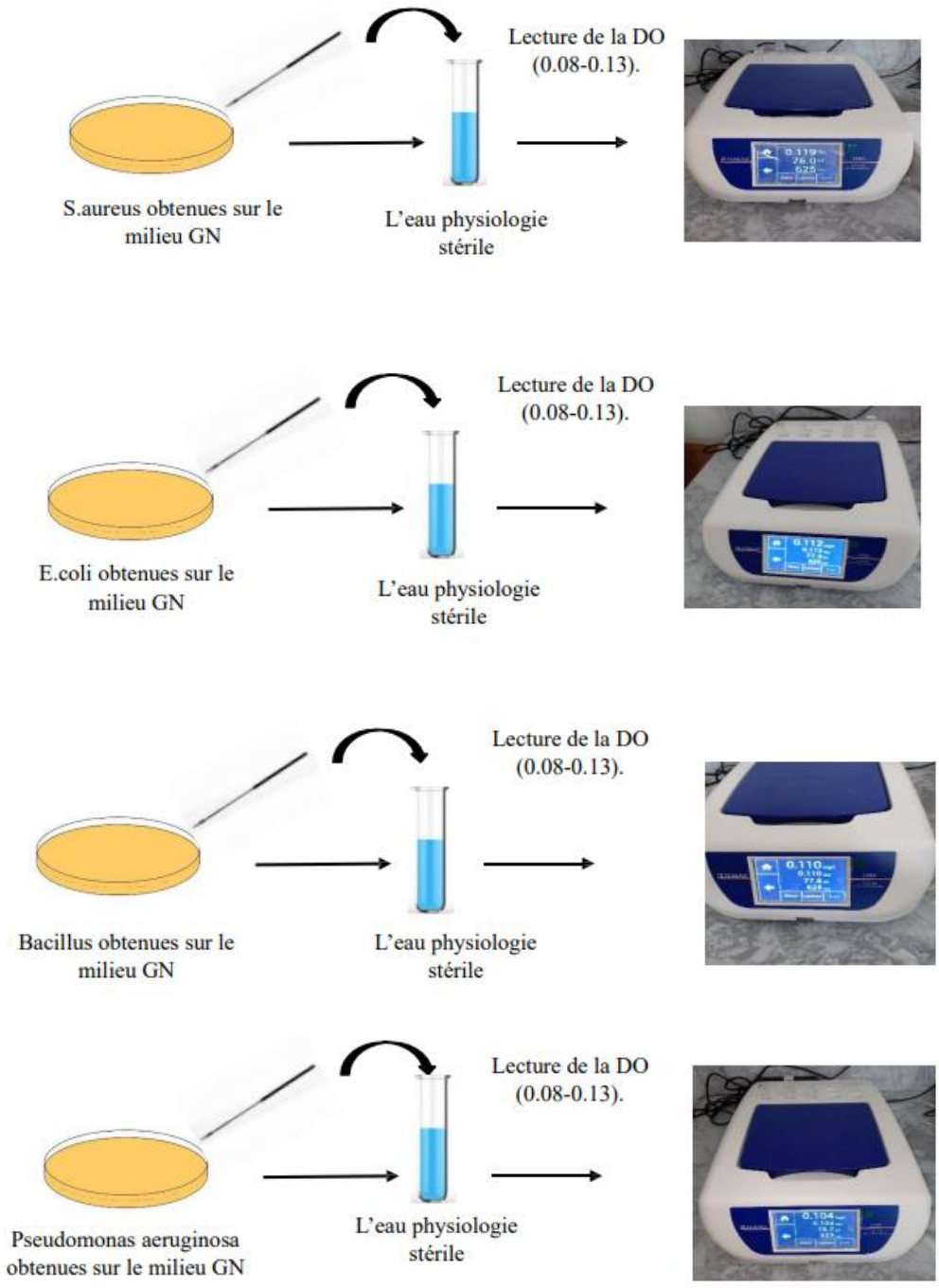


Figure 13 : Protocole de standardisation des souches bactériennes

⌗ Préparation de déférentes concentrations des extraits :

Les extraits aqueux sont dissout dans le DMSO, le test antibactérienne a été effectué avec deux concentrations : 2 mg/ml, 4mg/ml.

⌗ Ensemencement et dépôt des disques :

Des boites de pétri coulées avec le milieu gélosé *Mueller Hinton* de 4mm d'épaisseur, sont ensemencées, par écouvillons stérile, à partir de suspensions de souches standardisées, des disques de papier Whatman stériles sont déposés dans des boites de pétri stérile puis imprégnés avec un volume de 10µl des extraits de microalgues. D'autres disques, imbibé de DMSO sont utilisés comme témoins négatif. Un antibiotique (Chloramphénicol C30) est effectué en parallèle avec les antibiogrammes comme témoins positif.

Les boites de Pétri sont mises au réfrigérateur à 4°C pendant trois heures pour un pré diffusion. Des zones d'inhibition autour des disques sont mesurées en millimètres après incubation à 37°C/24 heures pour les souches bactériennes (Bansemir *et al*., 2006).

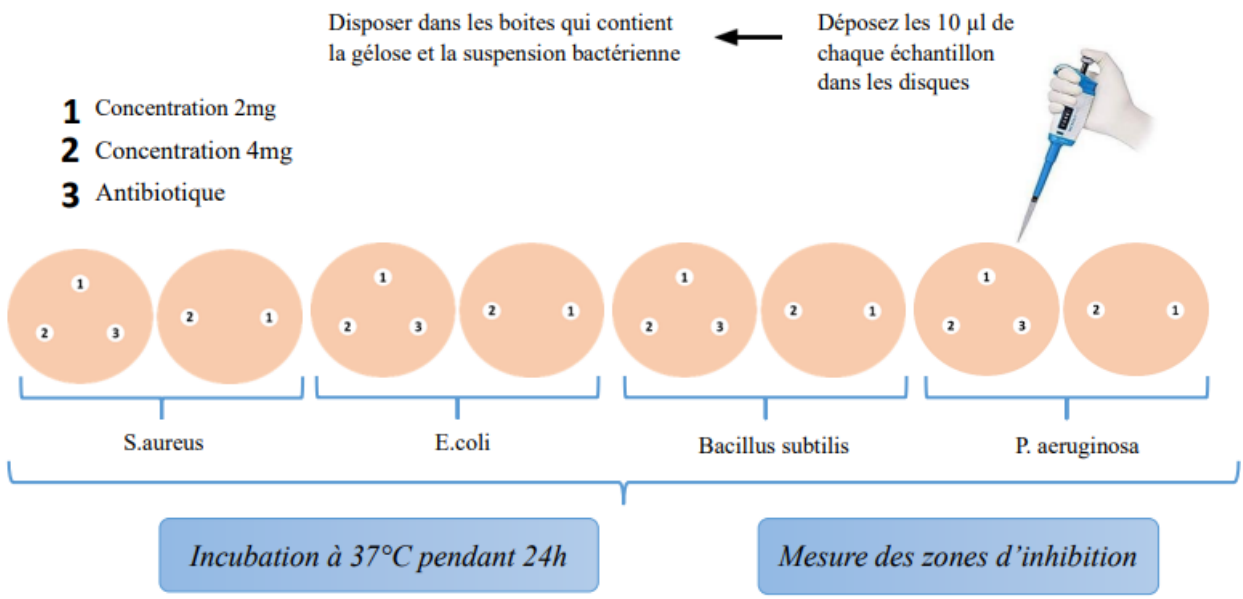


Figure 14 : Protocole d'ensemencement et dépôt des disques.

I. 6.3. Évaluation de l'activité antifongique :

Avant d'entamer la purification de la souche fongique (*C. albicans*), le milieu de culture Gélose sabouraud, (GS) préalablement préparé, a été coulé dans les boites de Pétri et laissé se solidifier. La purification a été effectuée à l'aide d'une série de repiquage avec un matériel stérile et sur une paillasse bien désinfectée autour du bec benzène. Après incubation à 28°C pendant 7 jours sur milieu GS, la pureté de la souche est vérifier par examen microscopique, la lecture sur GS est utilisée également pour l'appréciation de quelques critères macroscopiques telles que : la forme, la taille, la couleur des colonies et la coloration simple.

- **Le principe de coloration simple :**

La coloration simple constitue l'une des façons la plus rapide d'observer des caractéristiques de l'aspect physique d'un champignon comme sa forme, sa taille ainsi que son arrangement. Suite à une coloration simple il est possible de bien voir les champignons à l'aide du microscope et constater les éléments relatifs à leur apparence qui sont primordiaux à leur identification éventuelle.

- **Procédé :**

Pour commencer, il faut rincée la lame avec l'eau distillée. ensuite; on prend une goutte de l'eau distillée sur la lame ; après étaler une goutte de la suspension de champignon sur une lame propre; et procédés à la fixation du frottis en faisant passer la lame trois fois dans la flamme du bec bunsen, prolonger la lame pendant une minute dans le fuchsine , puis rincer à l'eau distillée, après, sécher la lame pendant deux minutes, et enfin observer à l'objectif à l'huile d'immersion .

- **Préparation des milieux de culture :**

Nous avons utilisé le milieu GS de concentration 19,5 g à 500 ml de l'eau distillé en agitant le mélange jusqu'à d'ébullition dans un agitateur et on met dans les flacons de verre puis déposer dans l'autoclave pendant 25 minutes (Figure 15).

Figure 15: Préparation des milieux de culture.

- **Préparation de l'inoculum :**

- A partir d'une culture pure du champignon a testé sur milieu d'isolement, racler par une anse de platine, quelques colonies bien isolé et parfaitement identiques.
- Déchargé pipette dans 1 ml d'eau physiologie stérile à 0.9 %, bien homogénisé la suspension de la souche dans le vortex.
- Afin de préparer des suspensions ayant une turbidité équivalente au standard MacFarland 0.5 ce qui correspond à 1- 5 × 10^6 UFC/ml pour la levure *C. albicans* (D.O= 0.12 à 0.15 λ = 530 nm) l'inoculum peut être ajustée en ajoutant de la culture si la DO est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile si elle est trop forte.
- La culture se fait dans un milieu stérile en présence de bec bunsen ;
- Tromper un écouvillon stérile dans la suspension de champignons.
- L'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne de tube, afin de la décharge en maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, séché, de haut en bas.
- En fin l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

- **Test antifongique :**

Des boites de pétri stérile préalablement coulées, sont ensemencées en surface, ensuite des disques de papier Whatman stériles sont déposés dans chaque boites de pétri, puis imprégnés avec un volume de 10µl des extraits à tester. Des témoins négatif et positif ont été préparés en imbibant des disques par 10µl de DMSO et antifongique (Fluconazole), respectivement (Figure 16).

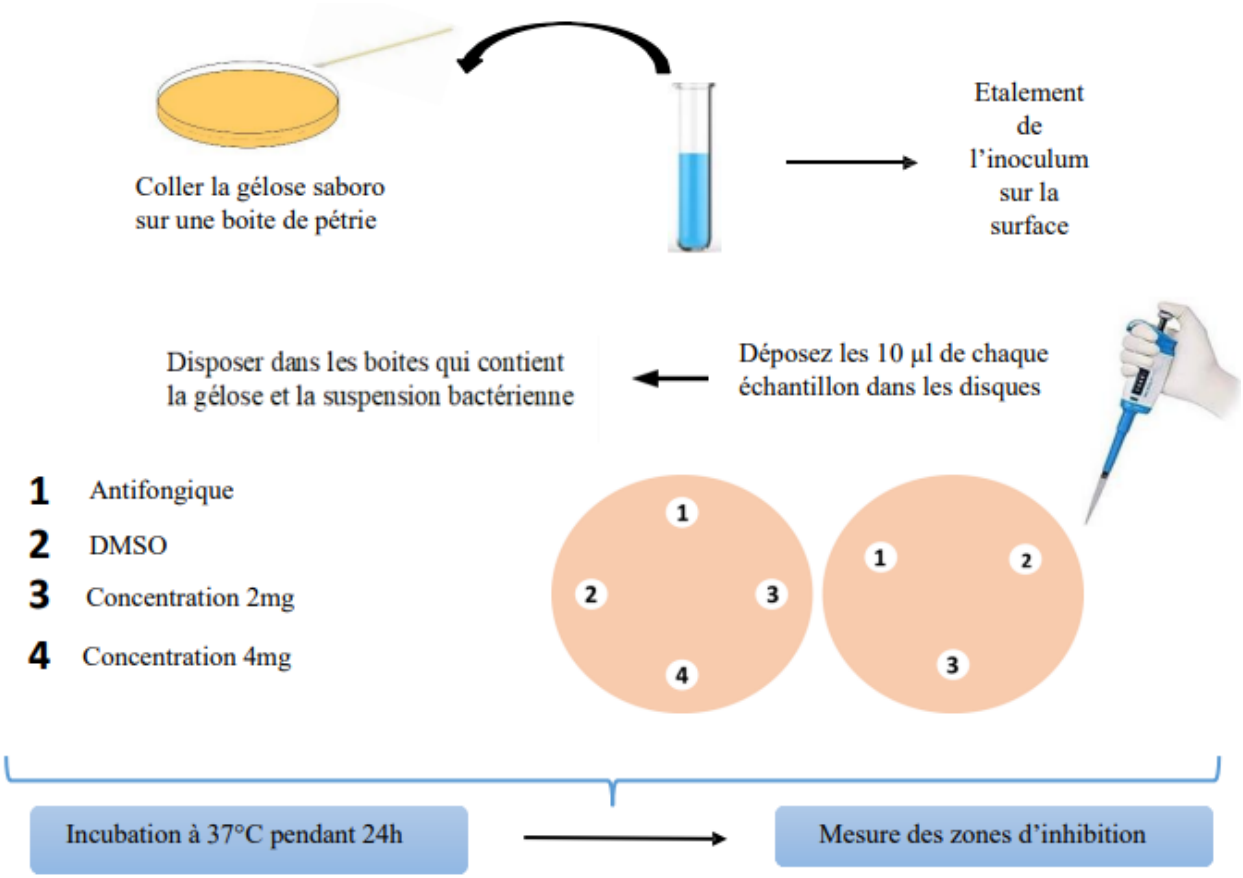


Figure 16: Protocole du test antifongique.

I.7. Analyses statistiques :

L'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel statistique informatisé STATISTICA. Tous les analyses et dosages des échantillons ont été réalisés en triplet dans un ordre aléatoire et des moyennes ont été considérées (sous forme de moyenne ± écart type).

Chapitre 2

Résultats & Discussions

II. Résultats et Discussions :

Dans cette partie, nous allons présenter et interpréter les résultats obtenus des différents dosages et analyses réalisés afin d'évaluer la qualité biochimique de la matière sèche des microalgues d'eaux douces récoltés de la ferme aquacole de Honaine, d'une part. Et d'évaluer le pouvoir antibactérien et antifongique de leurs extraits d'autre part.

II.1. Identification de microalgues récoltées:

Les microalgues présentent une grande diversité, avec environ 30 000 espèces déjà étudiées, représentant moins de 10 % du total estimé. Les chercheurs les ont analysées afin de les différencier et de les regrouper en différentes classes selon divers critères tels que la pigmentation, la structure biologique, l'organisation des membranes photosynthétiques et le métabolisme (Carlsson et al., 2007). Elles peuvent avoir des formes variables, souvent sphériques (Porphyridium), en forme de croissant (Clostridium), de spirale (Arthrospira), de gouttelette (Chlamydomonas) et même d'étoile (Staurastrum) (Djamai, 2019).

En ce qui concerne leur dimension, les microalgues peuvent avoir des tailles variant de quelques micromètres à plusieurs centaines de micromètres, en fonction des espèces. Elles renferment une grande diversité de molécules à l'intérieur de leurs cellules (Kherraf, 2018). Par ailleurs, elles se sont très rarement regroupées en fonction de leur métabolisme énergétique ou encore en fonction de leur habileté à synthétiser les métabolites nécessaires, mais plutôt en fonction de leurs propriétés morphologiques. Il existe donc différentes classes taxinomiques de microalgues dont les principales sont les cyanophycées, les chrysophycées, les rhodophycées, les euglénophycées, les chlorophycées et les bacillariophycées (Mitchell, 1974).

II.1.1. Observation microscopique :

L'observation microscopique de la morphologie a été optée pour identifier les espèces présentes dans la solution microalgale récoltée. La comparaison des différentes formes présentes a montré que l'espèce dominante parmi les souches d'eau douce isolées était *Chlorella* (Figure 17).

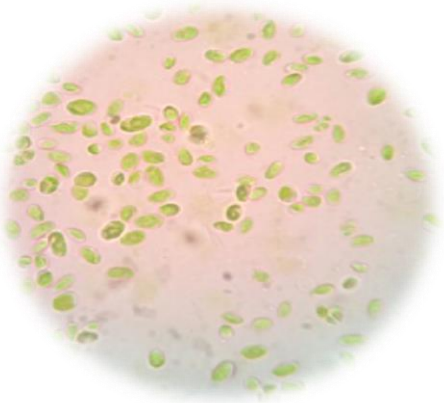


Figure 17 : Photo microscopique des souches de microalgues (*Photo originale*)

Le genre Chlorella fait partie des Chlorophycées, présentes dans divers habitats. Ces microorganismes se caractérisent par des formes filamenteuses (Pulz et al., 2004). On dénombre actuellement 8 000 espèces, dont 1 000 sont des chlorophytes marines (Alcaine, 2010).

II. 2. Caractérisation biochimique des microalgues lyophilisées :

Dans notre étude, et dans le but de caractériser la biomasse de microalgues récoltée et lyophilisée, nous avons évalué leur teneur en cendre, en lipide, en protéine et en glucides. Les résultats de la composition biochimique des microalgues analysées ainsi que celle trouvée par d'autres chercheurs à titre comparatif sont présentées dans le tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3: Caractérisation biochimique de la matière sèche des microalgues.

	Résultats	***Becker, 2007***	***Trivedi et al., 2015***	***Kherraf, 2018***
Cendres (%)	*6,8 ± 0,34*	-	-	6,4
Humidité (%)	*1,25 ± 0,23*	-	-	9,33
Lipides (g/100g)	*2,92 ± 0,93*	14 - 22	2	7
Protéines (g/100g)	*49,12 ± 0,74*	51 - 58	57	13,38
Glucides (g/100g)	*16,31 ± 0,87*	12 - 17	26	7,13

(Moyenne ± écart-type ; n = 3)

II.2.1. Détermination du taux de l'humidité :

Afin de tester l'efficacité de la lyophilisation comme méthode de conservation, le taux d'humidité des microalgues lyophilisées a été déterminé. 2 g d'échantillon ont été pesés pour déterminer le poids humide, puis placés dans une étuve à une température de 90°C jusqu'à obtention d'une masse sèche constante (AOAC, 1990). Un taux de 1,25 ± 0,23% a été trouvé; une valeur nettement inferieur à celle trouvée par Kherraf (2018), ce qui a confirmé l'efficacité de la lyophilisation.

II.2.2. Détermination de la teneur en cendre :

Les analyses réalisées ont montré que l'échantillon contient un pourcentage de cendres proche de 6,8±0,34 %. Une teneur trop élevée en cendres dans les aliments est généralement indésirable; cependant, les cendres d'algues peuvent contribuer à satisfaire la dose journalière recommandée de minéraux dans la nutrition humaine (Sánchez-Machado et al., 2004). Cette abondance en minéraux varie selon les paramètres de culture (Camacho Rodríguez et al., 2009).

II.2.3. Détermination de la teneur en matières grasses :

La teneur en matières grasses trouvée est de 2,92 g / 100g de matière sèche algale. Une valeur largement inférieure à celles trouvée par Becker, 2007 et moins inferieure aux valeurs mentionnées par Kherraf, (2018). Mais elle reste identique à celle trouvée par Trivedi et al., (2015).

Il est évident que la quantité de matière grasse présente dans les microalgues varie en fonction de l'espèce et est influencée par les conditions de culture telles que les nutriments, la salinité, l'intensité lumineuse, la température, le pH et la présence d'autres micro-organismes (Li et al., 2009). Pour l'exemple de la *Chlorella vulgaris*, environ 68% d'acides gras saturés et monoinsaturés peuvent être accumulés dans des conditions de croissance mixotrophes, ce qu'est plus adaptable à la production de biodiesel (Djamai, 2019).

II.2.4. Détermination de la teneur en protéine :

La teneur en protéines a été déterminée en utilisant la méthode de Kjeldahl en basant sur le facteur de conversion de l'azote 5,95. La multiplication de la quantité d'azote trouvée par ce facteur, nous a donné une valeur de 49,12 ± 0,74 g/100g qui est légèrement inferieur à celle rapportée par Trivedi et al., (2015) (57 %), mais supérieure à celle trouvée par Kherraf, (2018) (13,38 %).

Il a été rapporté que les protéines représentent un élément indispensable dans la cellule microalgale, dont ils jouent un rôle capitale dans leur croissance, réparation ainsi que leur maintenance (Djamai, 2019). Il est aussi un régulateur cellulaire et de défense contre les intrus qui menace la cellule (Kherraf, 2018). Ainsi, les microalgues représentent une source alternative des protéines et de divers acide aminés qui est due à son contenu élevé estimé entre 40 et 60% de la matière sèche (Sialve et Steyer, 2013). D'autres études ont signalé qu'une élévation de la concentration en CO_2 peut induire une diminution des protéines chez *Spirulina platensis* (Gordillo et al., 1998). Donc, la qualité de l'eau de culture détermine la composition de la biomasse microalgale.

II.2.5. Détermination de la teneur en glucides :

Wijesekara et al., (2011) a rapporté que les glucides des microalgues peuvent offrir des avantages pour la santé humaine en tant qu'anticoagulants, antiviraux, fibres alimentaires et antioxydants. Les glucides représentent entre 8 et 30% de la matière sèche microalgale, ils ont un rôle de structure car ils rentrent dans la composition de la paroi cellulaire. Ce sont aussi une matière de réserve énergétique de la cellule (Sialve et Steyer, 2013).

Dans ce travail, le dosage des glucides contenant dans les échantillons de microalgues a été réalisé en utilisant la courbe d'étalonnage de glucose présenté dans la figure 18. Nous avons trouvé un taux de glucides de 16,31 ± 0,87 qui reste presque identique à celui trouvé par Becker, (2007), supérieure à la valeur présentée par Kherraf, (2018) mais inférieure à celle rapportée par Trivedi et al., (2015). Comme toute la composition microalgale, le taux des glucides peut être affecté par le changement des paramètres de culture (Azote, température, pH, CO_2, ..).

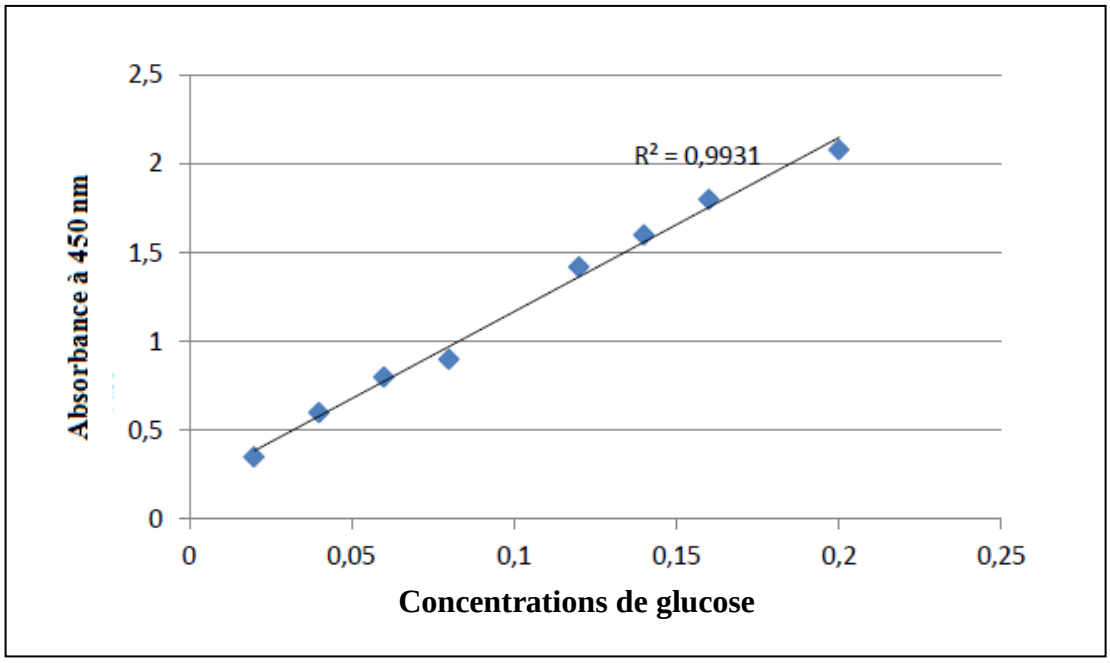


Figure 18 : Courbe d'étalonnage du glucose utilisée dans le dosage des glucides.

II. 3. Valorisation des extraits bioactifs des microalgues :

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons essayé d'étudier la possibilité d'utiliser les extraits bioactifs de la matière sèche obtenue par lyophilisation comme des agents antimicrobiens à travers l'évaluation de leurs effets antibactériens et antifongiques. Pour ce faire, d'abord les composés bioactifs ont été obtenus par macération et les rendements d'extraction ont été calculés.

II. 3.1. Extraction des composés bioactifs :

L'opération d'extraction des composés bioactifs des cellules de microalgues est très délicate. D'une part, car elle nécessite une procédure susceptible à décomposer la paroi cellulaire afin d'extraire les composés bioactifs qui sont renfermés dans la cellule et d'autre part, il faut minimiser les risques de les dégrader. Pour cela, nous avons utilisé des solvants, qui ont la capacité de pénétrer à la paroi cellulaire, avec une polarité correspondante à la molécule cible.

II. 3. 1. 1. Rendements des extractions :

Les résultats de l'extraction par macération en utilisant les différents solvants sont présentés dans le tableau 4. Le rendement le plus élevé a été noté pour l'extrait aqueux avec un taux de 21,13 %, cependant, les plus faibles valeurs ont été notées pour l'extrait chloroformique de l'ordre de 2,75 %. Djamai, (2019) avait reporté des taux qui sont en concordance avec nos résultats comme il est bien indiqué sur le tableau 4 ci-dessous.

Il est à noter que le choix de ces solvants était basé sur les résultats de plusieurs travaux précédents qui ont montré que le rendement d'extraction augmente de manière significative avec l'utilisation d'éthanol aqueux ou du méthanol aqueux par rapport à des extractions aux solvants organiques purs (Kherraf, 2018; Mussatto et al., 2011; Vazquez et al., 2008). Chaouche, (2014), a expliqué ce comportement par le fait que la présence de l'eau déstabilise les parois cellulaires; ce qui va favoriser la pénétration profonde dans la matrice cellulaire, et par conséquent, le solvant va être en liaison avec une quantité plus grande de soluté, favorisant ainsi un bon rendement d'extraction. Aussi, Il a été démontré que le rendement d'extraction dépend de la polarité et la nature des solvants utilisés (Franco et al., 2008). D'après Quan et *al*., (2013), le rendement d'extraction dépend de plusieurs paramètres tels que: le solvant, le pH, la température, le temps d'extraction et la composition de l'échantillon.

Tableau 4: Rendement d'extraction par les différents solvants utilisés

Solvant Utilisé	Rendement d'extraction (%)	
	Nos résultats	***Djamai, (2019)***
Méthanol	11.01± *1,25*	10.42
Méthanol/eau (80/20)	10.42 ± *2,33*	9.39
Acétone/eau (90/10)	5.92 ± *0,87*	7.59
Chloroforme	2.75 ± *1,05*	2.01
Eau	21.13 ± *1,86*	20.74

(Moyenne ± écart-type ; n = 3)

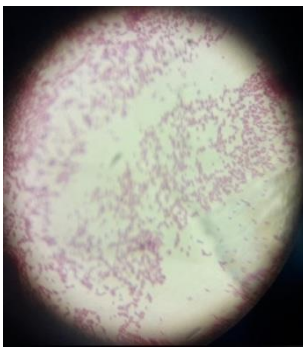
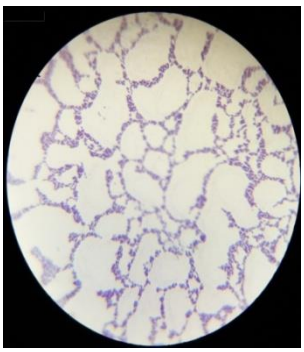
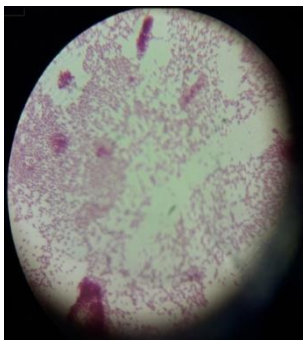
II. 3.2. Effet antibactérien des extraits obtenus des microalgues :

Avant d'entamer l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits obtenus, nous avons procédé à la ré-identification des souches bactériennes qui vont êtres utilisées et vérification de leur pureté. Pour ce qui est de la ré-identification des souches, on s'est contenté de l'étude microscopique.

II. 3.2.1. Tests microscopiques :

Les résultats de l'observation microscopique des souches bactériennes testées sont représentés dans le tableau 5. Après la réalisation de coloration de gram pour les germes isolés, on a obtenu des cellules colorées avec le rose ce qui confirme qu'il s'agit de bactéries à Grams négatif (*Escherichia coli, Pseudomanas aeruginosa),* et des cellules colorées en violet qui correspond aux bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*).

Tableau 5 : Observation microscopique des souches bactériennes à tester

Souches	***Escherichia coli***	***Staphylococcus aureus***	***Pseudomonas aeruginosa***
Gram et mode de regroupement	**Gram négatif,** bacilles avec extrémités arrondies (coccobacilles)	**Gram positif,** cocci arrondies isolées en diplocoques ou en grappe de raisin	**Gram négatif,** bacilles avec extrémités arrondies
Observation microscopique			

II. 3.2.2. Test antibactérien :

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antibactérienne des extraits aqueux des microalgues par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solides.

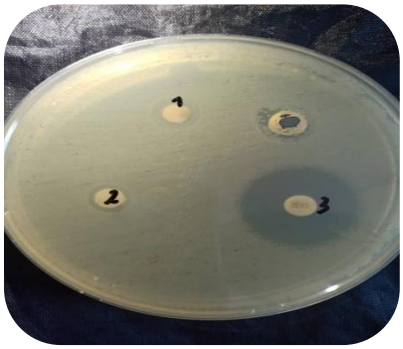
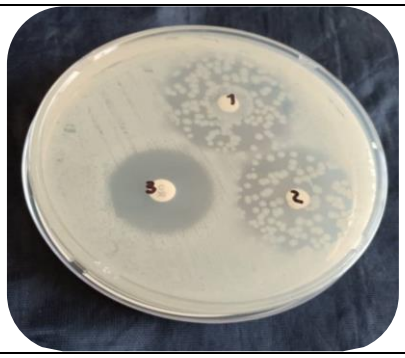
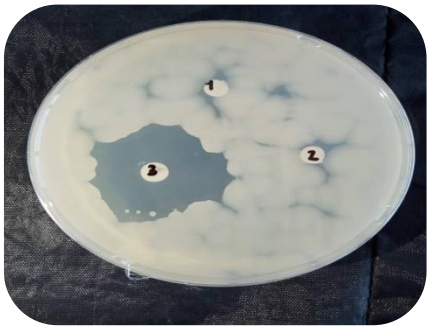
L'activité antibactérienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les différentes concentrations des extraits obtenus par macération hydrique vis-à-vis les bactéries Gram (+) : *Staphylococcus aureus*, Bacillus subtilis et Gram (-) : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats sont présentés dans le tableau 6 et la figure 13.

Tableau 6 : Diamètre des zones d'inhibition des extraits contre les souches bactériennes

Souches	Diamètre des zones d'inhibition (cm)		
	Antibiotique	Concentration des extraits (mg/ml)	
		2	4
E . coli	*2,5*	*1± 0,1*	*0,9 ± 0,1*
S. aureus	*2,5*	*3,3± 0.2*	*3,3± 0,5*
B. subtilis	*3,6*	-	-
P. aeroginosa	*1,6*	*1± 0,54*	*1,2± 0,66*

D'après ces résultats, les activités des extraits composés par les éléments bioactifs de microalgues contre les souches bactériennes testées et qui sont qualitativement évalué par la présence ou l'absence d'une zone d'inhibition, ont été confirmé. Du fait que, la croissance de la souche *S. aureus* a été inhibée par les deux concentrations 2 et 4 mg/ml, avec une zone d'inhibition qui égale à 3,3 cm. Une activité moins élevée a été remarquée pour la souche *E coli* avec une zone d'inhibition de 1 cm. Pour la souche *Pseudomonas aeruginosa*, la zone d'inhibition avec les deux concentrations d'extraits était de l'ordre de 1± 0,2 cm une activité presque identique à celle de l'antibiotique utilisé. Par contre aucune activité n'a été trouvée dans les boites ensemencées par B. subtilis. Le tableau 7 indique les résultats de l'antibiogramme de chaque souche avec les concentrations d'extraits testés.

Tableau7: Résultats de l'antibiogramme des différents extraits sur les souches bactériennes

Souches bactériennes	Résultats
Escherichia coli	
Staphylococcus aureus	
Pseudomonas aeruginosa	
Bacillus subtilis	

Dans ce contexte, il a été démontré que la croissance de plusieurs bactéries, champignons et levures est inhibée par les tanins. Leur structure chimique leur confère une capacité très développée de se fixer sur des molécules telles que les alcaloïdes, la gélatine, les polysaccharides, et essentiellement les protéines (Djemai, 2019). Du fait que la principale cible des composés naturels est la membrane bactérienne, l'activité antibactérienne des substances naturelles s'explique par la lyse de ces membranes. Les huiles essentielles, polyphénols, flavonoides, alcaloïdes voire même les tanins pourraient induire une fuite d'ions potassium au niveau de la membrane et par voie de conséquences des lésions irréversibles au niveau de cette membrane (Djahra, 2014).

De même, les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, probablement du à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité (Cowan, 1999). Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés et plus ils sont inhibiteurs des microorganismes (Scalbert, 1991).

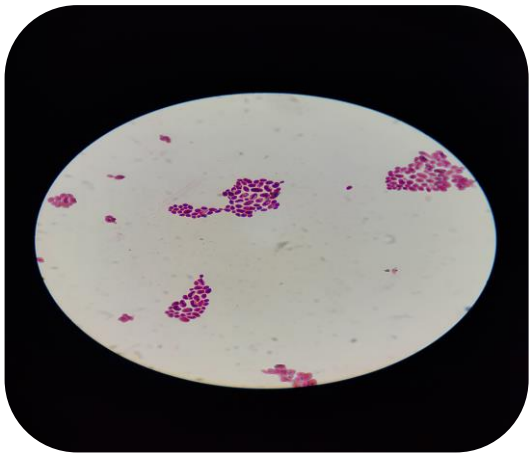
II. 3. 3. Effet antifongique des extraits obtenus des microalgues :

Nous avons procédé à la ré-identification de la levure qui va être utilisée et vérification de leur pureté, avant d'entamer l'évaluation de l'activité antifongique des extraits obtenus, Pour ce qui est de la ré-identification des souches, on s'est contenté de l'observation microscopique.

II. 3.3.1. Tests microscopiques :

Le résultat de l'observation microscopique de souche fongique testée est représenté dans le Tableau 8. Après la réalisation de coloration simple pour les germes isolés, on a obtenu des cellules colorées en violet avec une forme ovoïde (*Candida albicans).*

Tableau 8 : Résultat de l'observation microscopique de la souche fongique.

Caractères Morphologiques	*Candida albicans*
Caractère macroscopique	Sur le milieu de gélose nutritive, les colonies de *Candida albicans* ont des couleurs violets.
Caractère Microscopique	Forme ovoide, coloration simple 

II. 3.3.2. Test antifongique :

L'activité antifongique des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les différentes concentrations préparées. Les résultats de la réaction de la souche fongique sont présentés dans le tableau 9 ci-dessous.

Tableau 9 : Diamètre des zones d'inhibition des extraits contre *C. albicans*

Souches	Diamètre des zones d'inhibition (cm)		
	Antifongique	Concentration des extraits (mg/ml)	
		2	4
C . albicans	*2*	*1,2± 0,1*	*1,2 ± 0,1*

A travers la lecture des résultats, nous avons pu constater que les extraits obtenus de la matière sèche des microalgues ont un effet antifongique sur la souche testée. Vu la zone d'inhibition causée par le témoin positif (fluconazole) comparée avec celle des extraits, le pouvoir antifongique de ces derniers est plus ou moins important (Figure 15).

Figure 19 : Résultats de l'antibiogramme des différents extraits sur *C. albicans*

De ce fait, la détermination des composés bioactifs présents dans les extraits responsable de l'induction de tels effet est nécessaire pour établir si les effets étaient dus à un seul composé ou à l'interaction de plusieurs. L'isolement du composé bioactif présent dans l'extrait aqueux de ces microalgues est nécessaire pour identifier spécifiquement la molécule responsable ou en cas d'éventuelles interactions synergiques entre plusieurs substances bioactives présent dans l'extrait. La détermination de la dose spécifique non toxique doit être effectuée pour évaluer l'efficacité antifongique des extraits (Djahra, 2014).

Conclusion

Conclusion

Dans cette étude, nous avons réalisé une caractérisation biochimique des microalgues cultivées au niveau de la ferme aquacole de Honaine, situé à la Wilaya de Tlemcen. Ainsi qu'une contribution à la valorisation de leurs différents intérêts potentiels. Après avoir récoltés la biomasse microalgale et préparation de la matière sèche par lyophilisation, leur caractérisation a été réalisée en déterminant la teneur en cendre, en matières grasses, en protéines et en glucides. Les extraits obtenus par la suite, ont été testés en termes du pouvoir antibactérien et antifongique.

Les résultats de la composition biochimique des microalgues analysées ont montré un taux d'humidité au voisinage de 1,25 ± 0,23 %. Elles renferment un taux de cendres de 6,8 ± 0,34; une teneur en matière grasse de 2,92 ± 0,93 g / 100g ; une teneur en protéines de 49,12 ± 0,74 g/100g et un taux de glucides au voisinage de 16,31 ± 0,87. Il a été constaté que la composition microalgale est conditionnée par la qualité de l'eau, et elle peut être affectée par le changement des paramètres de culture tels que l'Azote, la température, le pH, le CO_2, etc.

Pour les résultats d'extraction de la matière sèche des microalgues, nous avons pu constater que le rendement le plus élevé a été noté pour l'extrait aqueux (21,13 % (g/g), cependant, les plus faibles valeurs ont été notées pour l'extrait chloroformique de l'ordre de 2,75 % (g/g).

Pour ce qui est de la valorisation, il est bien connu que les différentes espèces de microalgues ont un potentiel important dans une grande variété d'applications puisqu'elles pourraient contenir différents composés bioactifs. La lecture des résultats a clairement montré que les extraits ont donné une activité sur les souches bactériennes testées (*S. aureus* avec un maximum d'inhibition égale à 3,3 cm). Ainsi que sur la levure *C. albicans* avec un maximum d'inhibition égale à 1,2 cm). Ce qui va permettre leurs utilisations dans le domaine de la santé.

Les résultats obtenus à l'issue de ce travail confirment l'intérêt d'étudier les différentes possibilités de la valorisation des microalgues des eaux douces. D'une part, pour réduire leur quantité énorme et par conséquent leur impact négatif sur l'environnement aquatique. Et d'autre part, pour les utiliser comme sources des produits d'intérêt dans les différents secteurs économiques.

Des études supplémentaires sont nécessaires pour Isoler les molécules de ces extraits actifs des microalgues d'eaux douces afin de les tester *in vivo*, sur différents modèles biologiques, dans le but de chercher des applications possibles dans les domaines de la santé et de l'agro-alimentaire.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- Albalasmeh, A. a, Berhe, A. A., & Ghezzehei, T. a. (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. Carbohydr Polym, 97(2), 253–261.
- Alcaine, A.A. (2010). Biodiesel from microalgae. Final degree project. Royal School of Technology Kungliga Tekniska Högskolan, Stockholm, Sweden.
- AOAC (1990). Official methods of analysis. Washington, DC, USA: Association of official analytical chemists.
- AOAC (1995) . Official methods of analysis. Washington, DC, USA: Association of official analytical chemists.
- Becker, W. (2004). "Microalgae in human and animal nutrition." Handbook of microalgal culture. Blackwell; Oxford
- Becker, W. (2007). Micro-algae as a source of protein. Biotechnology Advances 25, 207–210.
- Borowitzka, M. A., Beardall, J., & Raven, J. A. (2016). The physiology of microalgae. Springer.
- Camacho Rodríguez J., Cerón-García M.C., Fernández-Sevilla J.M, González López C.V,&Molina-Grima E.(2009). Effective and low-cost culture media for Nannocloropsis gaditana & Isochrysis galbana biomass optimized for aquaculture. Chemical Engineering Department, University of Almería, Almería, Spain.
- Carlsson, A.S., van Beilen, J.B., Möller, R., Clayton, D (2007). Micro-and macroalgae: utility for industrial applications, In: Bowles D, editor. Outputs from the EPOBIO project. UK: CPL Press. pp. 82.
- Cavallo JD., (2007). Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.
- Chaouche,T (2014). Contribution à l'étude des activités anti oxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales. Thèse de doctorat. Université Abou-Bakr-Belkaid, Tlemecen, Algérie.
- Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J., Chang, J.-S., (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology 102, 71–81*.

- Cheng, K.C., Ogden, K.L., (2011). Algal Biofuels: the research. Chemical Engineering Progress. 3, 42-47.
- Cho, H.-S., Oh, Y.-K., Park, S.-C., Lee, J.-W., Park, J.-Y., (2013). Effects of enzymatic hydrolysis on lipid extraction from Chlorella vulgaris. Renewable Energy 54, 156–160.
- Cowan M. M. (1999). Plant Products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 12(4), 564-582.
- Dejoye Tanzi, C. (2013). Eco-Extraction et Analyse de lipides de micro-algues pour la production d'algo-carburant. Thèse de Doctorat. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. France
- Djahra A. (2014). Etude photochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, anti hépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* Thèse de doctorat en Biologie. Université Badji Mokhtar –Annaba, Algérie.
- Djamai, W. (2019). Valorisation des microalgues par extraction et séparation des molécules bioactifs. Thèse de Doctorat. Université de Tlemcen. Faculté des sciences, Algérie.
- Ebenezer, V., Medlin, L.K., Ki, J.S., (2012). Molecular detection, quantification, and diversity evaluation of microalgae. Marine Biotechnology. 14, 129-142.
- Filali. R. (2012). Estimation et commande robustes de culture de microalgues pour la valorisation biologique de CO_2, Thèse doctorat, Ecole Doctorale des Sciences et Technologies de l'Information des Télécommunications et des Systèmes, Paris, p. 17.
- Findeling. A, (2011) [Veolia Environnement]. Algues, filières du futur Édition Adebiotech - Romainville 182p. 2011.
- Franco, D.; Sineiro, J.; Rubilar, M.; Sánchez, M.; Jerez, M.; Pinelo, M.; Costoya, N.; Núñez, M.J.(2008).Polyphenols from plant materials: Extraction and antioxidant power. Electron J. Environ. Agric. Food Chem. 7, 3210–3216.
- Gaignard, C. (2019). Criblage, identification et caractérisations physico-chimiques 'exopolysaccharides de microalgues et Cyanobactéries. Thèse de doctorat. Université Clermont-Auvergne, France
- Gana N., (2014). Détermination de certains paramètres biochimiques urinaires chez le rat wistar recevant un régime cafeteria supplémenté en algues vertes. Mémoire Mastère physiopathologie cellulaire. Université Abou Bekr Belkadi Tlemcen.41p.

- Gordillo, F.J.L.; Jiménez, C.; Figueroa, F.L.; Niell, F.X. (1998). Effects of increased atmospheric CO2 and N supply on photosynthesis, growth and cell composition of the cyanobacterium Spirulina platensis (Arthrospira). J. Appl. Phycol. 10, 461–469.
- IDEALG., (2014). Etude de la consommation des algues alimentaires en France. AGROCAMPUS OUEST. France.71p.
- Jansson C & Northen T (2010). Calcifying cyanobacteria - the potential of biomineralization for carbon capture and storage, Curr Opin Biotechnol, 21, 365–371.
- Julie, P. (2011) Julie PERSON [Trimatec] Livre turquoise, Algues, fihières du futur. Livre turquoise ÉditionAdebiotech - -Romainville 182p.
- Kherraf A. (2018). Caractérisation physicochimique et évaluation du potentiel antioxydant, antimicrobien et antiinflammatoire dela microalgue Nannochloropsis gaditana. These de doctorat. Université Djillali Liabes faculté des sciences de la nature et de la vie Sidi bel Abbes, 74.
- Kim, Y.-H., Park, S., Kim, M.H., Choi, Y.-K., Yang, Y.-H., Kim, H.J., Kim, H., Kim, H.-S., Song, K.-G., Lee, S.H., (2013). Ultrasound-assisted extraction of lipids from Chlorella vulgaris using [Bmim][MeSO4]. Biomass and Bioenergy 56, 99–103.
- Koberg, M., Cohen, M., Ben-Amotz, A., Gedanken, A., (2011). Biodiesel production directly from the microalgae biomass of Nannochloropsis by microwave and ultrasound radiation. Bioresource Technology 102, 4265–4269.
- Lepine, 0. (2011). [Alpha Biotech], Algues, filières du futur. Livre turquoise. Édition Adebiotech - Romainville 182p. 2011.
- Li-Jun Ma, David M Geiser, Robert H Proctor, Alejandro P Rooney, Kery O'Donnell, Frances Trail, Donald M Gardiner, John M Manners kemal Kazan (2013). Revue annuelle de microbiologie. P 399-416.
- López CV, García Mdel C, Fernández FG, Bustos CS, Chisti Y, Sevilla JM.(2010). Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. Bioresour Technol.101(19):7587-91.
- Mathieu, D. (2011) [CEVA] livre turquoise, Algues, filières du futur Édition Adebiotech - Romainville 182p. 2011.
- Mitchell, R. (1974). Introduction to Environmental Microbiology. s.l.: Prentice-Hall.

- Moroh J, Bahi C, Dje K, Loukou Y, Gued-Guina F, (2008). Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétique de morinda morindoides sur la croissance in vitro des souches d'Escherichia coli. Bulletin de la société royale des sciences de liège : pp44-66
- Moscoso JLG, Obeid W, Kumar S, Hatcher PG (2013) Flash hydrolysis of microalgae (Scenedesmus sp.) for protein extractionand production of biofuels intermediates. J Supercritical Fluids 82:183–190.
- Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JA, (2011). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. Separation and Purification Technology, 83(15): 173-179.
- Pasquet, V. (2011). Recherche bioguidée de molecules anticancéreuse issues de microalgues maines. Thése de Doctorat. Université de La Rochelle.
- Person J. [Trimatec] (2010). Algues, filières du futur. Livre turquoise.
- Pulz, O., Gross, W.(2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. Minireview, Applied Microbiology and Biotechnology, Volume 65, Number 6, pp. 635648.
- Quan V., Hirun S., Paul D.Roach., Michael C., Bowyer., Phoebe A. Phillips and Christopher J. Scarlett. (2013) Effect of extraction conditions on total phenolic compound and antioxidant activities of Carica papaya leaf aqueous extracts, *journal of herbal medicine*. 3: 104–111.
- Samarakoon K, Jeon Y (2012) Bio-functionalities of proteins derived from marine algae - A review. Food Res Int 48:948–960
- Sánchez-Machado DI, López-Cervantes J, López-Hernández J, Paseiro-Losada P (2004). Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. Food Chem. 85: 439–444 Sassi, J-F (2011) [CEVA], Algues, filières du futur. Livre turquoise Édition Adebiotech - Romainville 182p. 2011.
- Sassi, J-F (2011) [CEVA], Algues, filières du futur. Livre turquoise Édition Adebiotech - Romainville 182p. 2011.
- Scalbert A (1991). Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry, 30, 3875-3883.
- Sialve, B., & Steyer, J.-P. (2013). Les microalgues, promesses et défis. Innovations Agronomiques, 26, 25–39. Retrieved from https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01137072/
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering 101, 87–96.*

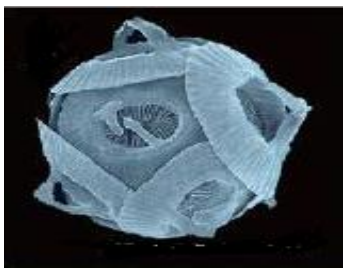
- Trivedi, J., Aila, M., Bangwal, D. P., Kaul, S., & Garg, M. O. (2015). Algae based biorefinery - How to make sense? Renewable and Sustainable Energy Reviews. Pergamon.https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.03.052
- Vazquez G, Fontenla E, Santos J, Freire MS, Gonzalez-Alvarez J, Antorrena G, (2008). Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (Castanea sativa) shell and eucalyptus (Eucalyptus globulus) bark extracts. Industrial crops and products, 28(3): 279-285.
- Wijesekara I, Pangestuti R, Kim S-K. (2011). Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. Carbohydr Polym. 84:14–21.

Annexes

Annexe 1

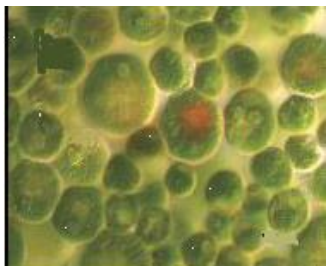
Microalgues

Exemples de diversité morphologique des microalgues (Sumi, 2009).



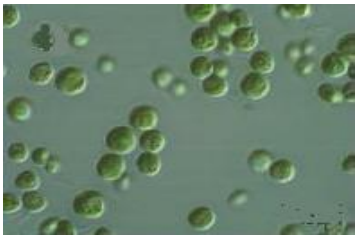
Gephyrocapsa

Dunaliella tertiolecta

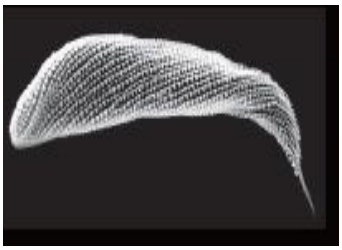


Haematococcus lacustris

Spirulina platensis

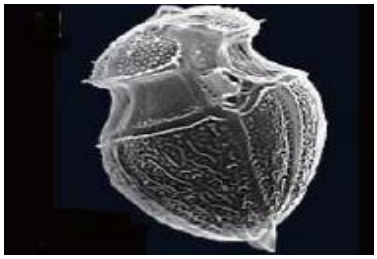


Chlorella vulgaris



Chaetoceros calcitrans

Chlamydomonas

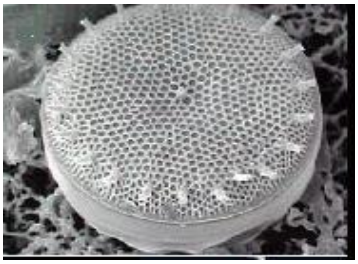


Dinophysis acuminate

Alexandrium

Raphidophceae

Botryococcus



Bacillariophycea

Annexe 2

Récapitulatif des groupements majeurs des algues selon Mitchell, 1974

Phylum	Nom Commun et *Espèces*	Pigments	Caractéristiques
Cyanophyte	Algues bleues-vertes Spirulina, Anabaena	bleu-vert: phycocyanine, phycoérythrine, chlorophylle a et b	Multicellulaire ou unicellulaire mais Habituellement microscopique.
Euglenophyte	Euglenoide Euglena	Vert	Unicellulaire, mobile, sans membrane cellulaire.
Chlorophyte	Algues vertes Chlorella, Scenedesmus	Vert: chlorophylle a et b.	Unicellulaire, multicellulaire, quelques unes microscopiques, membrane cellulaire formée de cellulose et de pectine.
Chrysophyte	Algues jaune-vertes ou brunes claires Diatomées	Jaune - vert, brun clair: xanthophylle, carotènes et chlorophylle.	Microscopique, unicellulaire, leur membrane cellulaire contient de la silice.
Pyrophyte	Dinoflagellés, Peredinium, Massartia	jaune-vert, brun foncé: Xanthophylle, chlorophylle a et c.	Unicellulaire, mobile, membrane cellulaire en cellulose.
Phaeophyte	Algues brunes Fucus	Vert d'Olive, brun foncé: fucoxanthine, xanthophylle, chlorophylle a et c.	Multicellulaires principalement, vivent dans les eaux marines, leur membrane cellulaire est formée en pectine et en cellulose.
Rhodophyte	Algues rouges Polysiphonia	Rouge: phycocyanine, phycoérythrine et chlorophylle a.	La plupart sont multicellulaires, vivent dans les eaux marines et possèdent une membrane en cellulose et en pectine.

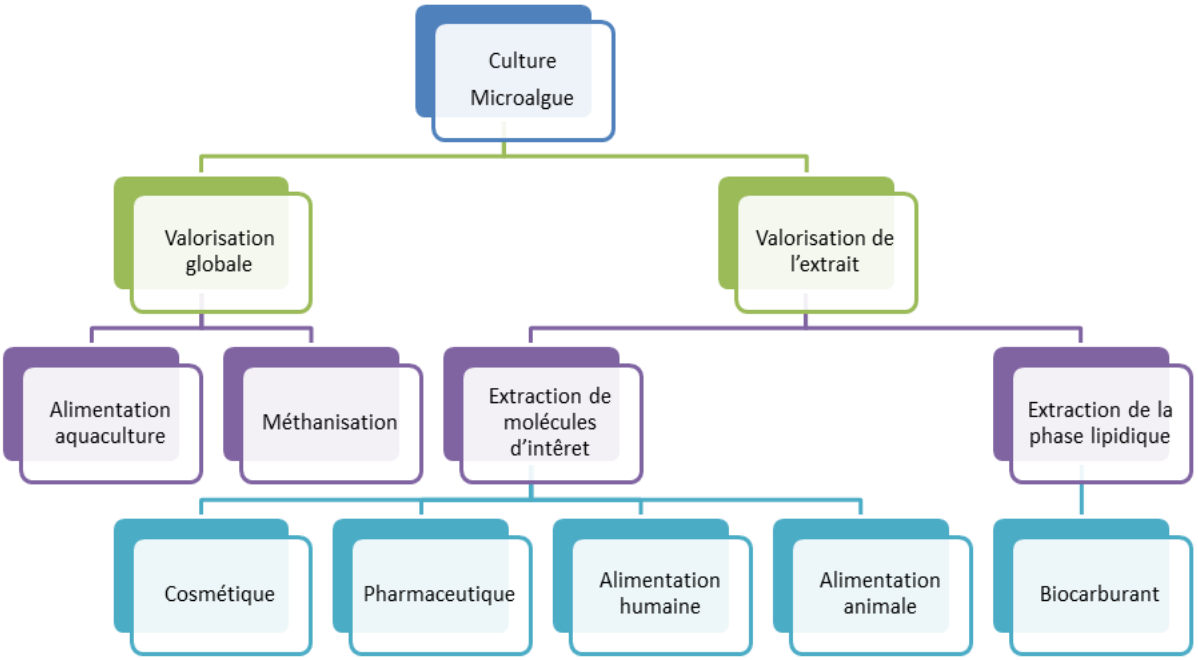
Annexe 3

Tableau: Composition générale de différentes espèces microalgale (% de matière sèche) (Trivedi et al., 2015)

Espèce	Protéine	Glucide	Lipide
Anabaenacylindrica	43–56	25–30	4–7
Aphanizomenonflos-aquae	62	23	3
Chlamydomonas rheinhardii	48	17	21
Cholrellapyrenoidosa	57	26	2
Cholrella vulgaris	51–58	12–17	14–22
Dunaliella salina	57	32	6
Dunaliellabioculata	49	4	8
Euglena gracilis	39–61	14–18	14–20
Porphyridiumcruentum	28–39	40–57	9–14
Prymnesiumparvum	28–45	25–33	22–38
Scenedesmusobliquus	50–56	10–17	12–14
Scenedesmusquadricauda	47	-	1,9
Scenedesmusdimorphus	8–18	21–52	16–40
Spirogyrasp.	6–20	33–64	11–21
Arthrospira maxima	60–71	13–16	6–7
Spirulinaplatensis	46–63	8–14	4–9
Synechococcussp.	63	15	11
Tetraselmismaculate	52	15	3

Annexe 4

Les principales voies de valorisation des micro-algues



Ssélection d'espèces de micro-algues avec leurs produits et domaines d'application

Espèces	**Produits**	**Domaines d'application**
Spirulina Cyanobactérie	Phycocyanine Biomasse	Aliments naturels , Cosmétique
Chlorella vulgaris Chlorophycée	Biomasse	Aliments naturels Suppléments alimentaires Substituts alimentaires
Dunaliella salina Chlorophycée	β-carotène	
Haematococcus pluvialis	Astaxanthine	
Odontella aurita Bacillariophycée	AGPI	Pharmaceutique Cosmétique Aliments pour enfants
Porphyridium cruentum Rhodophycée	Polysaccharides	
Isochrysis galban Chlorophycée	AGPI	Nutrition animale
Phaeodactylum tricornutum Bacillariophycée	Lipides AGPI	Nutrition Production de carburants
Lyngbya majuscule Cyanobactérie	Immunomodulateur	Pharmaceutique Nutrition
Muriellopsis sp. Chlorophycée	Lutéine	Aliments naturels Suppléments alimentaires