



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCEM

THÈSE LMD

Présentée à la

FACULTE DES SCIENCES – DÉPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT

Spécialité: Chimie Physique et Analytique

Par

Melle DJAMAI Wissam

Sur le thème

Valorisation des microalgues par extraction et séparation des molécules bioactives

Soutenue publiquement le 26/06/2019 à Tlemcen devant le jury composé de :

Dr. BENGUELA Belkacem	Professeur	Université de Tlemcen	Président
Dr. DAHMANI Benamar	Professeur	Université de Tlemcen	Directeur
Dr. GIORNO Lidietta	Directrice de recherche	ITM-CNR Italie	Co-directrice
Dr. BEY Said	Maître de conférences A	Université de Bejaia	Examinateur
Dr. TAVOLARO Adalgisa	Directrice de recherche	ITM-CNR Italie	Examinatrice
Dr. BEDJAOUI Lamia	Professeure	Université de Tlemcen	Examinatrice

*Laboratoire de Recherche : Spectrochimie et Pharmacologie Structurale (LSPS)
BP 119, 13000 Tlemcen - Algérie*

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, je remercie le bon Dieu pour toutes ces bénédictions qu'il m'a offertes, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a été réalisé dans le cadre d'une collaboration fructueuse entre le Laboratoire de Recherche de Spéctrochimie et pharmacologie structurale (LSPS), du département de chimie de la faculté des sciences de l'Université de Tlemcen, et l'Institut de Technologie Membranaire (Institute on Membrane Technology National Research Council, ITM-CNR, c/o University of Calabria).

Je tiens à remercier le gouvernement algérien pour m'avoir allouée une bourse ministérielle durant 11 mois dans le cadre du programme national exceptionnel PNE au titre de l'année universitaire (2016-2017), pour la finalisation de thèse de doctorat.

Je souhaite exprimer ma plus sincère reconnaissance et ma gratitude à mon directeur de thèse monsieur Benamar DAHMANI, professeur à l'université de Tlemcen et directeur de laboratoire de recherche de Spéctrochimie et pharmacologie structurale (LSPS), qui a dirigé mon travail. Il a su me guider dans un sujet riche tout en m'accordant sa confiance, ses compétences et son enthousiasme scientifiques, ont été des sources permanentes de soutien et de motivation.

J'adresse également ma profonde reconnaissance à ma co-directrice de thèse Dr. Lidietta GIORNO Directeur de Recherche, une experte en sciences membranaires et en bioingénierie et ex-directrice de l'Institut de Technologie Membranaire (ITM-CNR, Italie), pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, et de m'avoir donné l'opportunité de travailler au sein de son institut et de son équipe dynamique et accueillante, mais aussi pour m'avoir fait découvrir le « monde de la technologie des membrane ».

Je tiens à remercier vivement Dr. Rosalinda MAZZEI, chercheur à l'ITM-CNR, pour sa permanente disponibilité, pour nos discussions fructueuses, la pertinence et la qualité de ses conseils et avis sur les travaux que j'ai pu mener.

Je tiens aussi à remercier vivement Dr. Fabio BAZZARELI, chercheur à l'ITM-CNR, pour sa fraternité, ses conseils et ses aides pertinents et sa longue patience.

J'ai été touchée par la bienveillance et la sympathie avec laquelle vous m'avez accueilli.

J'adresse également ma profonde reconnaissance à madame Kawther BELBACHIR, Ingénieure de soutien à la recherche au centre CRAPC pour sa présence permanente et ses précieuses aides et conseils avisés. Merci de tout cœur.

J'adresse l'expression toute particulière de ma gratitude et respect aux membres de jury pour m'avoir fait l'honneur de consacrer de leur temps précieux à la lecture de ce manuscrit et qui ont bien voulu juger et critiquer ce travail :

Dr. Belkacem BENGUELLA, professeur et doyen de la faculté des sciences à l'université de Tlemcen qui m'a fait l'honneur de présider ce jury,

Dr. Said BEY, professeur à l'université de Bejaia qui a bien voulu examiner ce travail,

Dr. Adalgisa TAVOLARO, directeur de recherche à l'institut de technologie membranaire (ITM-CNR, Italie) qui a bien voulu participer à ce jury.

Dr. Lamia BEDJAoui, professeure en Chimie de la faculté des sciences à l'université de Tlemcen d'avoir accepté d'examiner et discuter ce travail.

Je tiens à dire un immense merci à tous mes collègues et les membres de laboratoire LSPS, qui contribuent par leur bonne humeur à créer un cadre de travail agréable. Et à toute ma famille, en particulier "ma tante Leila", mes proches et mes amis (es) « Nousseiba, Khalida, Ahmed, Hocine et Hamdi » pour leur soutien et leurs encouragements. Mes remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cet ouvrage.

Enfin, ils ont été toujours à mes côtés, ils sont tout pour moi, c'est à eux que je dédie cette thèse. A mon père, à ma mère, à ma sœur Ikram et mes frères Yassine et Noré. Je vous aime.

Wissam DJAMAI

ملخص

تعد الطحالب الدقيقة مصدرًا مهمًا للمنتجات الحيوية (مثل المواد الغذائية، المغذيات، مضادات الأكسدة والأصبغ) والوقود الحيوي. ومن ثم أصبح الإقدام على تطوير تقنيات فصل وتنقية مناسبة أمرًا حتميًا. في هذا العمل، تم استخدام الطحالب الدقيقة التي تم تجميعها من سد حمام بوغرارة، الواقع في ولاية تلمسان (شمال غرب الجزائر)، كمورد لاستخلاص جزيئات نشطة بيولوجيًا. تحقيقًا لهذه الغاية، تم إجراء تقييم للمركبات النشطة بيولوجيًا بالإضافة إلى نشاط مضادات الأكسدة، من ناحية أخرى، تم إجراء فصل وتنقية للمركبات الرئيسية لهذه الكتلة الحيوية باستخدام طريقة الترشيح الغشائي.

يُظهر مزيج الطحالب المجهرية المدروسة مجموعة متنوعة من جزيئات مضادات الأكسدة الطبيعية مثل البوليفينول والفلافونويدات وكذلك الأصبغ. بالإضافة إلى ذلك، خواص مضادات الأكسدة، التي أكدها تحديد عامل الإرتباط مما يدل على مساهمة قوية من البوليفينول بواسطة قوة اختبار كسح الراديكالية (لتثبيت الجذور الالكيلية الحرة) (DPPH)؛ وقدرة جيدة من الكاروتينات والفلافونويد، التي تحتوي عليها المستخلصات، لمنع بيروكسيد β -كاروتين. وكذلك مع قدرة الإرجاع. ملاحظة بشكل جيد للمجموعات الجزيئية الثلاث التي تمت دراستها (البوليفينول والفلافونويد والكاروتينات). كما سمحت النتائج التي تم الحصول عليها بتحديد أربع مركبات فينولية "حمض الغاليك، الكاتشين، حمض السيرنجيك و جزيئة النارنجين" في المستخلص الميثانولي الذي يكشف عن عامل مضاد للأكسدة أكثر فعالية مقارنة بالمستخلصات الأخرى المدروسة.

من ناحية أخرى، تم تطوير إستراتيجية مناسبة لفصل الجزيئات الحيوية باستخدام الترشيح الفائق (UF) بعد اختيار طريقة فعالة لكسر الخلية. للحفاظ على تدفق نفاذية مستقرة، كان من الضروري فصل الدهون الثلاثية (TAGs) والأصبغ بعد كسر الخلايا عن طريق استخراجهم باستعمال مذيب بديل. سمح الترشيح الغشائي (UF) للمحلول المائي المتبقي بالحصول على عامل الاسترداد بنسبة 70% من البروتينات وأكثر من 85% من الكربوهيدرات. تم فصل الدهون الغير مستخلصة في المذيبات البديلة، المتبقية في المستخلص المائي مع نقاوة حوالي 70% وعامل استرداد حوالي 60%.

الكلمات الرئيسية: الطحالب، النشاط المضاد للأكسدة؛ معامل تكرير أحيائية؛ المذيبات البديلة؛ الترشيح الفائق، المغذيات، المنتجات الحيوية، سد حمام بوغرارة.

Résumé

Les microalgues représentent une source importante de bioproduits (tels que les aliments, les nutraceutiques, les antioxydants et les pigments) et de biocarburants. Il est donc avantageux de développer des technologies pour séparation et de purification appropriées qui doivent être affinées et sélectionnées. Dans ce travail, les microalgues récoltées dans le barrage de Hammam Boughrara, situé à la Wilaya de Tlemcen (nord-ouest de l'Algérie), ont été utilisées comme ressource pour récupérer et fractionner des molécules bioactives. Pour ce faire, une évaluation des composés bioactifs en plus de l'activité antioxydante a été réalisée, d'autre part, une séparation/purification des principaux composés de cette biomasse a été effectuée à l'aide de procédé assisté par membrane.

Le mélange microalgale étudié montre une variété de molécules antioxydantes naturelles telles que des teneurs en polyphénols, flavonoïdes ainsi qu'en pigments importantes. Il possède de modestes propriétés antioxydantes, confirmé par la détermination du facteur de corrélation indiquant une forte contribution des polyphénols par un pouvoir antiradicalaire (le piégeage du radical libre DPPH•); et une bonne capacité des caroténoïdes et des flavonoïdes, contenant les extraits, à l'inhibition de la peroxydation du β -carotène; ainsi qu'avec un pouvoir réducteur bien remarquable des trois groupement moléculaire étudiés (polyphénols, flavonoïdes et caroténoïdes). Les résultats obtenus ont permis aussi l'identification de quatre composés phénoliques « Acide Gallique, Catéchine, Syringique et Naringinine » dans l'extrait méthanolique qui révèle un agent antioxydant plus efficace vis-à-vis les autres extraits étudiés.

D'autre part, une stratégie appropriée pour fractionner les biomolécules en ultrafiltration (UF) a été développée après la sélection d'une méthode de destruction cellulaire efficace. Afin de maintenir un flux de perméat stable, il était nécessaire de réduire la complexité de la solution avant l'ultrafiltration. Ceci a été réalisé en séparant les triglycérides (TAGs) et les pigments, après rupture des cellules, par extraction solide-liquide-liquide avec un solvant alternative. L'UF de la phase aqueuse restante permettait un facteur de récupération de 70% des protéines et plus de 85% des glucides dans le retentât. Les TAGs non récupérés dans le solvant alternative, restant dans la phase aqueuse ont été séparés dans le perméat avec une pureté d'environ 70% et un facteur de récupération d'environ 60%.

Mots clés : Microalgues ; activité antioxydante ; bioraffinerie ; solvant alternatif ; ultrafiltration ; les nutraceutiques ; bioproduits ; Barrage de Hammam Boughrara.

Abstract

Microalgae represent an important source of valuable bioproducts (such as food, nutraceuticals, antioxidants, and pigments) and biofuel. There is thus an urgent need to develop an appropriate separation and purification technologies. In this work, microalgae harvested in the Hammam Boughrara dam, situated in Tlemcen (north-west of Algeria), were used as source to recover and fractionate bio-derived molecules using membrane-assisted processes. Thus, an evaluation of the bioactive compounds in addition to the antioxidant activity was performed, on the other hand, a separation/purification of the main compounds of this biomass was carried out using membrane-assisted method.

The microalgal mixture studied shows a variety of natural antioxidant molecules such as polyphenol, flavonoids as well as pigments. In addition, modest antioxidant properties, confirmed by the determination of the correlation factor indicating a strong contribution of polyphenols by an antiradical power (Test of DPPH•); and a good ability of carotenoids and flavonoids, containing the extracts, to inhibit the peroxidation of β -carotene; as well as with a very significant reducing power of the three molecular groups studied (polyphenols, flavonoids and carotenoids). The results obtained also allowed the identification of four phenolic compounds "Gallic Acid, Catechin, Syringic and Naringinine" in the methanolic extract which reveals more effective antioxidant agent compared to the other extracts studied.

On the other hand, an appropriate strategy to fractionate biomolecules using ultrafiltration (UF) has been developed after the selection of an effective cell disruption method. To maintain a stable permeate flux it was necessary to decrease the complexity of the solution prior to UF. This was achieved by separating triglycerides (TAGs) and pigments after cell disruption by solid-liquid-liquid extraction with a green solvent. The UF of the remaining aqueous phase allowed a recovery factor of 70% of the proteins and more than 85% of the carbohydrates in the retentate. TAGs not recovered in the alternative solvent, remaining in the aqueous phase were separated in the permeate with a purity of about 70% and a recovery factor of about 60%.

Key words: Microalgae ; antioxidant activity; biorefinery ; Green solvent; ultrafiltration ; nutraceuticals ; bioproducts ; Hammam Boughrara dam.

LISTE DES FIGURES

Figure I. 1 : Photographie des microalgues procaryotes, les cyanophycées : (A) <i>Nostoc sphaericum</i> , (B) <i>Spirulina</i>	5
Figure I. 2 : Photographie de quelque microalgues eucaryotes, Chlorophycées en (A) « <i>Dunaliella salina Teodoresco</i> », Diatomée en (B) « <i>Diadismisgallica</i> » et Euglenophycée en (C) « <i>Euglenamucifera Mainx</i> ».....	7
Figure I. 3 : Photographie d'un bassin ouvert de culture de la <i>Nannochloropsis</i> sp. à grande échelle	8
Figure I. 4 : Photographie des Photobioréacteurs tubulaires « A », et plats « B ».....	9
Figure I. 5 : Les microalgues en tant que système de production inépuisable & Applications	14
Figure I. 6 : Fermentation de glucose.....	15
Figure I. 7 : Transestérification d'un triglycéride	16
Figure I. 8 : Structures chimiques des carotènes	18
Figure I. 9 : Structures chimiques des xanthophylles.....	18
Figure I. 10 : Piégeage d'un radical libre par les flavonoïdes	19
Figure II.1 : Courbe d'étalonnage utilisant de l'acide gallique.....	32
Figure II.2 : Courbe d'étalonnage utilisant de la catéchine.....	32
Figure II.3 : Courbe d'étalonnage du radical DPPH à différentes concentrations.....	36
Figure II.4 : Courbe de pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique	36
Figure II.5 : Pourcentage d'inhibition du radicale DPPH en fonction des différents concentrations utilisées des extraits Chloroformique (A), méthanolique (B), Hydroacétonique (C) Hydrométhanolique(D) & Aqueux (E).	37
Figure II.6 : Pourcentage d'inhibition (IC_{50}) dans différents extraits par la méthode de macération et de décoction	38
Figure II.7 : Pourcentage d'inhibition du blanchiment du β -carotène en fonction des différentes concentrations utilisées de BHA et des extraits Chloroformique (A), Méthanolique (B), Hydroacétonique (C) Hydrométhanolique(D) & Aqueux (E).....	41

Figure II.8 : Pourcentage d'inhibition BCB (IC ₅₀ , mg ES mL ⁻¹) dans différents extraits de macération et de décoction.....	42
Figure II.9 : Pouvoir réducteur des différentes concentrations de BHA et des extraits Chloroformique (A), Méthanolique (B), Hydroacétonique (C) Hydrométhanolique(D) & Aqueux (E).....	44
Figure II.10 : Pourcentage d'inhibition FRAP (EC ₅₀ , mg ES mL ⁻¹) dans différents extraits par la méthode de macération et de décoction	45
Figure II.11 : Identification des polyphénols dans l'extrait microalgale méthanolique de macération par HPLC.....	47
Figure III.1 : Images microscopiques des cellules de microalgues avant et après destruction (a) Cellules de microalgue non traitée (Lyophilisées); (b) Cellules de microalgue vortexées; (c) Cellules de microalgue homogénéisées; et (d) Cellules de microalgue soniquées.....	61
Figure III.2 : Teneur des protéines, des glucides et des TAG libérée dans l'eau après chaque technique de destruction cellulaire	63
Figure III.3 : Teneur des polyphénols et des flavonoïdes libérée dans l'eau après chaque technique de destruction cellulaire.	64
Figure III.4 : Teneur en pigments libérée dans l'eau après chaque technique de destruction cellulaire et après extraction dans une solution d'acétone (80% v/v)	65
Figure III.5 : La consommation spécifique d'énergie (kj/kg) pour chaque technique de destruction cellulaire.....	66
Figure III.6 : Schéma descriptif de la stratégie proposée pour le fractionnement des biomolécules	67
Figure III.7 : Cellules de filtration tubulaire avec les membranes en céramique (a), et plane avec membrane cellulosique (b).....	69
Figure III.8 : Schéma du pilote de filtration membranaire (filtration tangentielle)	70
Figure III.9 : Teneur en pigments après extraction solide–liquide–liquide de la solution des microalgues soniquées par cyclopentylméthyléther (CPME), l'acétate d'éthyle (EA) et l'hexane	73
Figure III.10 : Teneur des TAGs estimé dans l'acétate d'éthyle et la phase aqueuse après extraction solide–liquide–liquide de la suspension microalgale soniquée.....	74
Figure III.11 : Les valeurs de flux en fonction de la pression transmembranaire croissante et décroissante lors des expériences UF en mode recyclage en utilisant des membranes CR de 30 kDa.....	77
Figure III.12 : UF de la phase aqueuse après sonication et extraction des pigments/TAGs. Évolution dans le temps du flux de perméat (J _p) et du VRF	78

Figure III.13 : Teneur en glucides, protéines et TAGs dans la solution d'alimentation, le retentât et le perméat après l'UF en mode de concentration avec membrane CR de 30 kDa à 25°C..... 79

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. 1 : Composition générale de différents espèces microalgale	13
Tableau II. 1 : Solvants et réactifs utilisés pour les expérimentations	22
Tableau II.2 : Indice de polarité des solvants et rendement des extraits.....	31
Tableau II. 3 : Teneur en polyphénols et en flavonoïdes dans les extraits de microalgues obtenus par macération et décoction	32
Tableau II. 4 : Teneur en pigments dans les extraits de microalgues obtenus par macération et décoction	34
Tableau II. 5 : Corrélation entre l'activité antiradicalaire et la teneur en polyphénols, flavonoïdes et les caroténoïdes	39
Tableau II. 6 : Corrélation entre l'inhibition du test de blanchiment du β -carotène et la teneur en polyphénols, flavonoïdes et les caroténoïdes	43
Tableau II. 7 : Corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en polyphénols, flavonoïdes et les caroténoïdes	46
Tableau III. 1 : Solvants et réactifs utilisés pour les expérimentations	54
Tableau III. 2: Les caractéristiques des différentes membranes utilisées.....	69
Tableau III. 3 : Récupération de la perméabilité d'eau (RPE) après contact statique avec la suspension des cellules microalgales soniquées.....	76

LISTE DES ABREVIATIONS

BCA:	Acide bicinchoninique
BCB:	Blanchiment du β -carotène
BHA:	Butylhydroxyanisole
CPME:	Méthoxycyclopentane
DPPH :	2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle
ECA:	Equivalent de catéchine
EC ₅₀ :	Concentration d'extrait à une absorbance de 0,5
EG:	Equivalent de glucose
ES:	Extrait sec
FRAP:	Ferric reduction antioxydant power
GAE:	Equivalent d'acide gallique
HPLC:	high performance liquide chromatographic
HSH:	Homogénéisateur à grande vitesse
IC ₅₀ :	La concentration d'extrait à 50 % d'inhibition
MEB:	Microcopie électronique à balayage
RC:	Regenerated cellulose
TAG:	Triacylglycérides
TCA:	Acide trichloracétique
TMP:	La pression transmembranaire
UF:	Ultrafiltration
US:	Ultrasonication
V:	Vortex
VRF:	Volume reduction factor

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I	
RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE	
<i>LES MICROALGUES : UN POTENTIEL DE RESSOURCES INEPUISABLES</i>	
I.1. DEFINITION ET ORIGINE DES MICROALGUES	4
I.2. DIVERSITE	4
I.2.1 Les procaryotes	4
I.2.2 Les eucaryotes.....	5
I.3. CULTURE DES MICROALGUES	7
I.3.1. But et Avantage de la culture des microalgues	7
I.3.2. Méthodes utilisées.....	8
I.3.2.1 Les raceways	8
I.3.2.2. Photobioréacteur (PBR)	9
I.3.2.3. Les fermenteurs	9
I.4. RECOLTE DES MICROALGUES.....	10
I.4.1. Centrifugation	10
I.4.2. Flocculation	10
I.4.3. Sédimentation	11
I.4.4. Flottation.....	11
I.4.5. Filtration.....	12
I.6. COMPOSITION BIOCHIMIQUES DES MICRO-ALGUES & INTERET POTENTIEL	13
I.6.1. Protéine	14
I.6.2. Polysaccharides.....	15
I.6.3. Lipides	16
I.6.4. Pigments.....	17
I.6.5. Composés phénoliques.....	18

CHAPITRE II
COMPOSES BIOACTIFS & POUVOIR ANTIOXYDANT
DES MICROALGUES

II.1. INTRODUCTION.....	20
II.2. MATERIELS ET METHODES.....	22
II.2.1. Solvants et réactifs utilisés.....	22
II.2.2. Biomasse microalgale.....	22
II.2.3. Extraction des composés bioactifs.....	24
II.2.3.1. Rendement & Indice de polarité	25
II.2.3.2. Détermination de la teneur en polyphénols.....	25
II.2.3.3. Détermination de la teneur en flavonoïdes.....	26
II.2.3.4. Détermination de la teneur en pigments.....	26
II.2.4. Évaluation des activités antioxydantes	27
II.2.4.1. Piégeage du radical libre DPPH.....	27
II.2.4.2. Test du blanchiment du β -carotène	28
II.2.4.3. Réduction de fer FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power)	29
II.2.5. Analyse par HPLC des polyphénols	30
II.2.6. Analyse statistique.....	30
II.3. RESULTATS ET DISCUSSION.....	31
II.3.1. Rendement & Indice de polarité.....	31
II.3.2. Teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux	32
II.3.3. Teneur en pigments	34
II.3.3. Evaluation de l'activité antioxydante.....	36
II.3.3.1 Evaluation du pouvoir antiradicalaire par le test de DPPH'	36
II.3.3.2 Corrélation entre les composés bioactifs et le pouvoir antiradicalaire par le test de DPPH'	39
II.3.3.4. Evaluation du pouvoir antiradicalaire par le test de blanchiment du β -carotène	40
II.3.3.5. Corrélation entre les composés bioactifs et le pouvoir antiradicalaire par le test de blanchiment du β -carotène	43
II.3.3.6. Pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP).....	43
II.3.4. Identification des polyphénols par analyse chromatographique HPLC.....	46
II.4. CONCLUSION.....	48

CHAPITRE III

DESTRUCTION CELLULAIRE

& FRACTIONNEMENT DES PRINCIPAUX COMPOSANTS

III.1. INTRODUCTION	51
III.2. DESTRUCTION CELLULAIRE	54
III.2.1. Matériels et méthodes.....	54
III.2.1.1. Solvants et réactifs utilisés.....	54
III.2.1.2. Biomasse microalgale	54
III.2.1.3. Destruction de la paroi cellulaire	55
III.2.1.3.1 Destruction cellulaire par vortex (V).....	55
III.2.1.3.2. Destruction cellulaire par un bain ultrasonique (US)	55
III.2.1.3.3. Destruction cellulaire par homogénéisateur à grande vitesse(HSH)	56
III.2.2. La consommation spécifique d'énergie	56
III.2.3. Caractérisation des extraits de microalgue	56
III.2.3.1. Analyse microscopique.....	56
III.2.3.2. Quantification des biomolécules.....	57
III.2.3.2.1. Détermination de la teneur en glucide.....	57
III.2.3.2.2. Détermination de la teneur en triglycérides (TAG).....	58
III.2.3.2.3. Détermination de la teneur en protéine	59
III.2.3.2.4. Détermination de la teneur en polyphénols.....	60
III.2.3.2.5. Détermination de la teneur en flavonoïdes.....	60
III.2.3.2.6. Détermination de la teneur en pigments.....	60
III.2.4. Résultats et discussions	61
III.2.4.1. Destruction de la paroi cellulaire	61
III.2.4.1.1. Analyse microscopique	61
III.2.4.1.2. Effet de la destruction cellulaire sur la libération des biomolécules	62
III.2.4.1.3. La consommation spécifique d'énergie	65
III.3. FRACTIONNEMENT DES PRINCIPAUX COMPOSES HYDROPHOBES DES COMPOSES HYDROPHILES.....	67
III.3.1. Introduction	67

III.3.2. Matériels et méthode	68
III.3.2.1. Extraction des pigments et des TAGs par un solvant alternatif.....	68
III.3.2.2. Séparation des biomolécules hydrophiles par ultrafiltration	68
III.3.2.2.1. Equipement d'ultrafiltration	68
III.3.2.2.2. Test d'adsorption et flux critique.....	71
III.3.2.2.3. Ultrafiltration des biomolécules hydrophiles	71
III.3.3. Résultats et discussions	73
III.3.3.1. Extraction des pigments et des TAGs par un solvant alternatif.....	73
III.3.3.2 Ultrafiltration pour fractionner des biomolécules hydrophiles.....	75
III.4. Conclusion.....	79
CONCLUSION GENERALE.....	81
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	84
PRODUCTION SCIENTIFIQUE.....	94

INTRODUCTION GENERALE

Les microalgues ont récemment suscité un intérêt considérable dans le monde entier dans les domaines des énergies renouvelables en raison de leur potentiel de réduction de la dépendance aux carburants et aux produits chimiques à base de pétrole. Ce sont d'excellents convertisseurs d'énergie solaire en produisant un grand nombre de composés métaboliques menant à la production et l'accumulation de composés actifs présentant un intérêt pour plusieurs secteurs industriels: chimie fine, ingrédients nutraceutiques, cosméceutiques, produits pharmaceutiques et biomatériaux. Quelques espèces de microalgues ou leurs extraits sont déjà utilisés comme suppléments nutritifs et alimentaires pour l'Homme et chez les animaux d'élevage et de compagnie. En comparaison avec les plantes terrestres, cette matière première présente un intérêt particulier en raison de leur diversité, l'efficacité plus élevée de la photoconversion, de la possibilité de s'adapter aux différentes conditions de milieu de culture et de se développer dans des zones qui ne nécessitent pas de terres arables ni des exigences particulières.

En plus, cette biomasse représente une source renouvelable, durable et économique de biocarburants, et elle est considérée comme une alternative des énergies fossiles, dont son utilisation a plus que doublé depuis les années 1970, et selon la demande actuelle qui s'est accrue par leur utilisation plus rapide que leurs reconstitutions génétiques qui demandent des millions d'années, il serait impossible d'assurer les besoins en carburants sans provoquer d'importantes conséquences environnementales et sociales.

De nos jours, bien que les microalgues ont attiré beaucoup d'attention en tant que source potentielle d'antioxydants naturels pour remplacer celles de synthèse, tels que les pigments, les composés phénoliques et les vitamines, la majorité des recherches menées au cours des deux dernières décennies ont été principalement axées sur la production et l'accumulation de lipides pour la production de biodiesel. De même, un certain nombre de secteurs industriels se tournent de nouveau vers l'incorporation de ces molécules aux caractéristiques biologiques intéressantes dans leurs formulations (Bazzarelli et al., 2016)

Cette matière première convient beaucoup mieux à la transformation dans le cadre d'une bioraffinerie, et il sera plus avantageux si ces micro-organismes sont complètement valorisés pour leur exploitation commerciale à grande échelle.

Pour ces raisons, l'objectif ultime de ce travail est d'étudier une approche alternative pour valoriser les principaux constituants des microalgues, avec une stratégie de bioraffinage adaptée, efficace et écologique. La biomasse microalgale est représentée par un mélange de phytoplancton naturel d'eau douce de barrage de Hammam Boughrara situé à la Wilaya de Tlemcen (nord-ouest de l'Algérie).

Ce manuscrit sera décliné en trois chapitres présenté comme ainsi:

Le premier chapitre (Chapitre I) présentera une recherche bibliographique sur les microalgues, leur diversité, les méthodes de culture et de récolte ainsi que le potentiel de leur composition biochimiques qui représentent différentes applications dans plusieurs domaines.

Le chapitre qui suit (Chapitre II) sera axé à la valorisation des microalgues par l'extraction et l'estimation des biomolécules à haute valeur ajoutée, en utilisant différents solvants et éventuellement une évaluation du pouvoir antioxydant des différents extraits issu de microalgues.

Le troisième chapitre (chapitre III) est constitué de deux parties, dont la première partie consiste à décrire le choix de la meilleure méthode appropriée à la destruction cellulaire de cet assemblage de phytoplancton; en ce qui suit, une stratégie sera proposée pour l'extraction et le fractionnement des principaux composés hydrophobes à des composés hydrophiles de notre biomasse aquatique avec une bonne efficacité. Les travaux décrits dans ce chapitre sont exposés sous forme de publication déjà parue dans le *Journal of Biofuels, Bioproducts and Biorefining*.

En fin, on donnera les conclusions essentielles sur l'ensemble de ce travail ainsi que les perspectives de sa continuité seront dégagées.

CHAPITRE I

RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

LES MICROALGUES :

UN POTENTIEL DE RESSOURCES INEPUISABLES

I.1. DEFINITION ET ORIGINE DES MICROALGUES

Le terme microalgue comprend par définition les organismes microscopiques photosynthétiques uni- et oligo-cellulaire, avec une taille qui varie de quelques micromètres à une centaine de micromètres, à la base de la chaîne alimentaire et producteurs primaires d'oxygène. Leur existence et plus précisément les cyanobactéries, remontent à plus de 3,4 milliards d'année.

Ces micro-organismes, dénommées également phytoplancton, produits rapidement à partir de l'énergie solaire, du dioxyde de carbone et des nutriments présents dans divers habitats aquatiques (eau douce, saumâtre et salé), ou même terrestres (le sol ou sur le tronc des arbres). Cette biomasse reconnue ubiquistes, c'est-à-dire qu'ils croissent dans différents écosystèmes démontrant un haut degré de biodiversité, une grande variété de formes et conséquemment une multitude de voies métaboliques. Il a été considéré comme une alternative prometteuse, dite biomasse de la troisième génération (Soha S.M. Mostafa., 2012).

I.2. DIVERSITE

Les microalgues représentent une immense biodiversité, ensemble très hétérogène en terme de morphologie et de physiologie, où il est estimé qu'il existe plus de 50 000 espèces parmi lesquelles environ 40 000 ont été étudiées et analysées (Hu et al., 2008). Ce sont des cellules simples qui sont classées comme procaryotes (microalgues bleues ou cyanobactéries) ou eucaryotes (microalgues vertes, rouges et brunes). Ce classement se fait à la base de leurs propriétés et caractéristiques morphologiques.

I.2.1 Les procaryotes

Les microalgues procaryotes sont des organismes unicellulaires dépourvues de noyau (une structure bactérienne classique), où les chromosomes se trouvent dans le cytoplasme, entourés par des membranes lamellaires qui contiennent les pigments photosynthétiques.

- Les cyanobactéries se caractérisent par leurs structures cellulaires procaryotes, dont la présence de la chlorophylle a et des pigments hydrosolubles (les phycobilines rouge et bleu) les distinguent des bactéries. Ce groupe représente éventuellement

le groupe photosynthétique le plus important sur terre par la présence de plus de 6 000 espèces, dont la *Spirulina* et la *Nostoc* (Figure I.1) sont parmi les espèces les plus connues (Nabout, J. C. et al. 2013), d'une coloration bleu-verte et d'une taille d'environ 10 μm . La reproduction des cyanobactéries est connue végétative (asexuée) et leurs croissance peut être d'une manière naturelle sur les surfaces d'eau et également dans le sol avec la présence de la lumière (la seule exigence) qui est considérée comme un paramètre indispensable pour son développement. A l'absence de cette dernière, ces microorganismes font en sorte d'emmagasiner principalement leur énergie sous forme de lipide ou d'amidon (Pulz, O., & Gross, W., 2004). De ce fait, en plus de leur importance comme producteurs primaires d'oxygène, les cyanobactéries sont une source de métabolite primaire.

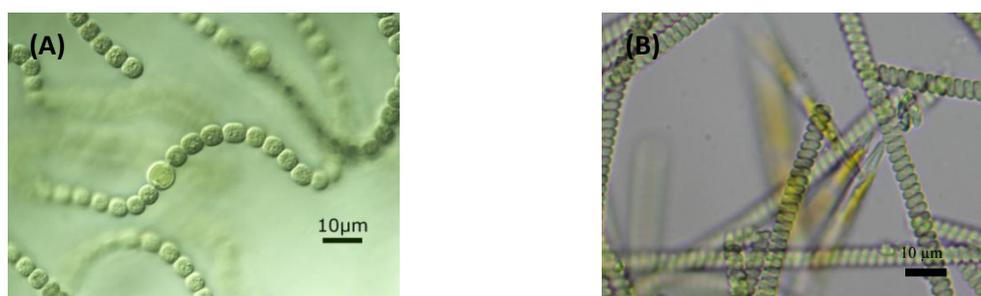


Figure I. 1 : Photographie des microalgues procaryotes, les cyanophycées :
(A) *Nostoc sphaericum*, (B) *Spirulina* (<http://www.algaebase.org>)

I.2.2 Les eucaryotes

Les microalgues eucaryotes (Figure I.2) sont des organismes uni ou pluricellulaires qui possèdent une structure végétale classique compartimenté contenant un noyau entouré d'une membrane ainsi que plusieurs organites intracellulaires y compris les chloroplastes qui renferment les pigments photosynthétiques.

- Les Chlorophycées sont des microalgues vertes, la plus grande classe variée de la division des chlorophyta, faciles à être cultivé dans les eaux douces ou marines. Elles sont unicellulaires ou pluricellulaires avec généralement une petite taille (<20 μm), dont la paroi cellulaire peut être épaisse (ex : *Chlamydomonas*) ou absente et entourée seulement par la membrane plasmique (ex : *Dunaliella*).

- Chez ces microorganismes, l'amidon est considéré comme la substance de réserve fondamentale ainsi que les lipides. En outre, elles renferment de la chlorophylle a et b, avec les principaux caroténoïdes (β -carotène, lutéine, violaxanthine) en plus des caroténoïdes mineurs (zéaxanthine) identique à celle des plantes supérieures, par conséquent, elles ont été commercialisées à diverses applications tel qu'un additif alimentaire diététique, colorant alimentaire...etc (Jeffrey, S. W. et al., 1997).
- Les Diatomées forment une classe des microalgues très répandues dans tous les types d'habitats, caractérisées par leurs structures eucaryotes et unicellulaires qui mesurent généralement de 2 à 200 μm avec certaines atteignant quelques millimètres (1 à 3 mm), ces espèces sont d'ailleurs reconnues par une coquille en silice (frustule) enveloppant la cellule, ainsi que par la présence de chlorophylle a et c et des pigments accessoires comme le β -carotène et la fucoxanthine dans des chloroplastes (Wehr, et al., 2015). En outre, il est bien connu que ces phytoplanctons sont riches en polysaccharide (chrysolaminaran) et les lipides plus particulièrement les triglycérides comme composant majeurs, qui constituent une réserve énergétique très importante (Caballero et al., 2016).
- Les Euglenophycées sont une classe de flagellés de l'embranchement des Euglenophyta, des algues vertes unicellulaires entourées d'une pellicule de bande protéique autour de la cellule. Leur croissance peut être généralement sur les eaux douces et très rarement dans les eaux marines et saumâtres, comme elles ont tendance à se développer dans de petits bassins enrichis en composés organiques, avec un mode de culture autotrophe ou hétérotrophe dépendant de l'espèce microalgale. L'aliment de réserves de ces microorganismes est bien des glucides ou de l'amidon, le chrysolaminarine et plus particulièrement le paramylon qui est un polysaccharide de réserve spécifique des Euglenophyta. Les Euglenophycées semblent être aussi une source riche en pigments et cela par la présence des chlorophylles a et b dans leurs chloroplastes en plus des caroténoïdes et des xanthophylles (Sahoo & Kumar, 2015).

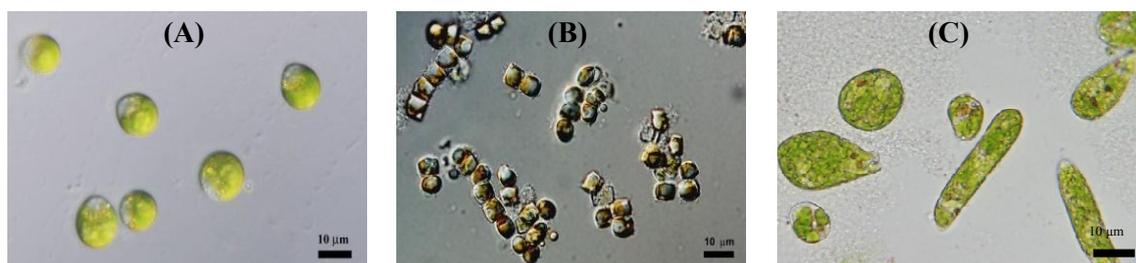


Figure I. 2 : Photographie de quelques microalgues eucaryotes, Chlorophycées en (A) « *Dunaliella salina* Teodoresco », Diatomée en (B) « *Diadesmis gallica* » et Euglenophycée en (C) « *Euglenamucifera Mainx* » (<http://ccala.butbn.cas.cz/en>)

I.3. CULTURE DES MICROALGUES

Les microalgues sont capables de se développer rapidement et peuvent être cultivées par différentes méthodes et dans différentes conditions. Cette biomasse est révélée être une matière première attrayante pour la génération rapide des biomolécules, pouvant compléter les besoins nutritionnels, pharmaceutique, cosmétique et énergétiques de la population.

I.3.1. But et Avantage de la culture des microalgues

L'importance de la culture des microalgues se résume dans la découverte et la revalorisation des espèces microalgales qui existent naturellement dans les écosystèmes et qui ont suscité un intérêt notable par leur profil biochimique qui dépend de l'espèce microalgale et aux paramètres environnementaux, et plus particulièrement, parce que certaines d'entre elles contiennent des molécules uniques. Ces microorganismes photosynthétiques se développent très rapidement, par la transformation d'environ 10% de l'énergie solaire en biomasse avec un dédoublement de 0,3 à 3 fois plus et un rendement théorique estimé d'environ 77g/biomasse/m²/jour, (Khan et al., 2018; Cadoret & Bernard, 2008).

Les microalgues sont une source en grande partie inexploitée de composés bioactifs nouveaux et très intéressants, éventuellement, elles ont des avantages permettant d'envisager un potentiel important d'exploitation industrielle.

I.3.2. Méthodes utilisées

Afin de produire de la biomasse désirée en quantité, comme elle a la capacité de se croître rapidement, diverses méthodes de culture sont aujourd'hui pratiquées en tenant compte de mode de vie de l'espèce microalgale et de différentes conditions environnementales convenable à leur croissance. Des cultures dans des milieux ouverts (Raceways) ainsi que dans des milieux fermés (Photobioréacteur PBR) peuvent être réalisées pour les microalgues phototrophes et mixotrophes, sinon des fermenteurs sont utilisés pour les microalgues hétérotrophes.

I.3.2.1 Les raceways

Les systèmes raceways sont des systèmes ouverts, les plus souvent utilisés et les moins chers pour la production des microalgues à grande échelle. Ils s'agissent de grands bassins ovale ou circulaire avec une recirculation fermée (Fig.I.3), de quelques dizaines de centimètres en profondeur. Ils sont munis d'une ou de plusieurs roues à aube pour assurer un processus de culture continue en permettant le rapport nutriments aux microalgues et l'empêchement de leur sédimentation en créant un flux constant. Concernant le transfert de CO₂ dans la phase liquide, le système utilise un bullage afin de permettre une bonne diffusion dans le milieu. En plus du CO₂ atmosphérique naturel absorbé par la biomasse, l'utilisation des eaux de rejet recyclées peuvent être un autre avantage étant une source de nutriments. Cependant, les milieux ouverts ont tendance à avoir quelques contraintes à propos des conditions de culture: Intensité de la lumière et température incontrôlable, évaporation de l'eau de culture ainsi qu'une contamination par la croissance d'autre espèce microalgale et/ou bactéries peut être rencontrer (Safi, et al., 2014;Frey et al., 2016).



Figure I. 3 : Photographie d'un bassin ouvert de culture de la *Nannochloropsis sp.* à grande échelle (Greenwell, et al., 2010)

1.3.2.2. Photobioréacteur (PBR)

Les Photobioréacteurs sont des systèmes fermés et hermétiques, sous forme de plusieurs conceptions, qui peuvent être tubulaires, à colonne verticale ou plat (Fig.I.4). Cette technologie a été principalement mise en œuvre pour surmonter certains facteurs limitant dans les systèmes de bassins ouverts, permettant la croissance de la biomasse dans un environnement avec des paramètres de culture mieux gérés ainsi qu'une production importante. Un photobioréacteur est un système qui doit être transparent en plastique ou en verre, assurant le passage maximal de la lumière incidente (source essentielle de la photosynthèse) éventuellement naturelle ou artificielle. Et à l'aide d'une pompe, le dioxyde de carbone est bien injecté dans le système pour une bonne diffusion avec des nutriments à partir de réservoir, permettant aussi une circulation des microalgues à travers les tubes. Quant à l'oxygène issu de la photosynthèse, le système est muni d'une sortie pour son évacuation. Et utilise de l'eau pour le refroidissement afin de contrôler la température. Néanmoins, les principaux inconvénients du système fermé sont le coût de la construction sophistiquée, la petite zone d'éclairage et les coûts de stérilisation (Carl Safi et al., 2014;Sadi, 2012).



Figure I. 4 : Photographie des Photobioréacteurs tubulaires « A » (<https://newscientist.nl/>),, et plats « B » (<https://explorebiotech.com>)

1.3.2.3. Les fermenteurs

Les microalgues cultivées dans des fermenteurs ce sont des microorganismes dites hétérotrophes, qui ne nécessitent pas de la lumière pour leur développement. Également pour les microalgues qui ont la capacité de se développer même à l'absence de la lumière (le cas de *Chlorella vulgaris* et *Chlorella protothecoides*). Les bioréacteurs fermés utilisent une source de carbone organique pour l'alimentation de

la culture sous agitation dans des cuves et avec des conditions optimales bien maîtrisées, le système reflète un bon rendement de la biomasse microalgale obtenue qui est estimé de 40 à 100 fois plus en comparant aux systèmes ouverts (Borowitzka, 1999), ainsi qu'un faible coût de récolte en raison de leurs concentrations élevés et aussi bien développé en limitant la contamination par la stérilisation de bioréacteur et de milieu de culture (Perez-Garcia, et al., 2011; Carvalho, et al., 2006).

I.4. RECOLTE DES MICROALGUES

La récolte des microalgues de leur milieu de culture peut être effectuée en utilisant différentes méthodes, et cela dans le but d'une récupération et concentration efficaces de cette biomasse. Par conséquent, le choix du processus devrait être pour une récolte atteignant une concentration élevée tout en nécessitant des coûts de fonctionnement, d'énergie et de maintenance modérés. Cependant, il n'existe pas une méthode universelle vue qu'elle dépend de la nature de l'espèce microalgale et aussi du produit final, à savoir sa valeur et ses propriétés (Barros, et al., 2015).

I.4.1. Centrifugation

Le procédé de la centrifugation utilise la force centrifuge pour permettre la séparation des microalgues de leur milieu de culture. Cette technique permet d'avoir 10 fois plus la concentration initiale d'une suspension de microalgue (Sadi, 2012). Elle est connue d'être une méthode rapide et efficace à 90 % ainsi que la méthode la plus courante pour l'utilisation à l'échelle industrielle en traitant de grand volume dans un peu de temps. Cependant, cette technique comme elle peut être nuisible à certaines parois cellulaires, elle contribue à 20-30 % du coût total de production de biomasse ce qui la rend difficilement réalisable économiquement (Molina Grima, et al., 2003; Chen, et al., 2011).

I.4.2. Flocculation

La flocculation est un processus dans lequel les particules en suspension sont agrégées pour former de grosses particules à sédimenter. Cette technique peut se produire naturellement (auto ou bioflocculation) dans les milieux de culture exposés au soleil, provoquée par l'assimilation du CO₂, des nitrates et des phosphates qui causent l'augmentation du pH, permettant aux cellules de se rejoindre afin de former

des agrégats. Selon la littérature ce phénomène peut être aussi affecté par l'ajout d'hydroxyde de sodium qui est un produit non couteux permettant d'avoir le pH voulu et la précipitation de la biomasse (efficace à 90 %) dans un peu de temps (Vandamme, et al., 2012). Plus loin, la coagulation des microalgues peut avoir lieu par l'ajout d'un flocculant qui peut être un polymère anionique ou cationique, synthétiques ou naturels, ainsi qu'elle peut être réalisé par l'ajout des bactéries au milieu de culture, cependant leur croissance demande une source d'énergie et peut être même des substrats organiques supplémentaire, une chose qui favorise l'incidence des contaminations bactérienne et fongique sur les microalgues (Barros et al., 2015).

La floculation est considérée peu coûteuse et consomme peu d'énergie, ce qui rend cette technique de récolte une alternative attrayante, ainsi qu'elle peut être plus efficace en se combinant à la sédimentation ou à la filtration.

I.4.3. Sédimentation

La sédimentation par gravité est une technique de séparation, elle se base sur la densité des cellules de microalgue en suspension par une formation d'un dépôt de ces particules dans la partie inférieure d'un bassin de sédimentation, ainsi qu'elle peut être améliorée par l'utilisation des séparateurs à lamelles. L'efficacité de ce processus est fortement liée à la taille et la densité des cellules qui influent sur la vitesse de la décantation, étant donné que les microalgues de faible densité ont tendance à ne pas être sédimenté facilement et plus rapidement, ça peut causer une dénaturation de quelques cellules. L'ajout d'un flocculant est fréquemment réalisé et considéré comme une pré-récolte pour une amélioration de l'efficacité de cette technique en terme de concentration et vitesse de sédimentation avec un taux plus élevé (Uduman, et al., 2010; Chen et al., 2011).

I.4.4. Flottation

Le phénomène de flottation des microalgues dans leurs milieux de culture peut être naturel lorsque leur teneur en lipides augmente, ce qui facilite leur récolte pour passer à l'étape suivante. Ce processus permet de récupérer en sortie un concentré représentant 1 à 6 % de matière sèche, dont il peut être effectué par la dissolution d'air dans le milieu de culture afin de créer des bulles de 10 à 100 μm , qui se lient sur

les cellules et permettent le transport et la formation des floccs à la surface de milieu de culture. D'autre part, une flottation par injection d'air avec une forte agitation peut aussi être effectuée, qui engendre des microbulles (700 à 1 500 μm), d'hydrogène de charge positive à l'intérieur de milieu entraînant les microalgues en suspension de charge négative vers la surface d'eau (Chen et al., 2011). La flottation a été appliquée avec succès à la séparation des microalgues d'eau douce, telles que *C. vulgaris*, et considérée comme une méthode de récolte à grande échelle prometteuse et peu coûteuse (Liu, et al., 1999).

I.4.5. Filtration

Cette méthode est principalement un moyen d'assèchement, elle implique le passage de la suspension microalgale à travers un filtre sur lequel les cellules de microalgue se concentrent constamment. Généralement et pour une récolte plus efficace, elle peut aussi être une étape qui suit la floculation/coagulation. Ils existent plusieurs types de filtration mise à part la filtration conventionnelle telle que la microfiltration, la filtration sous vide, sous pression, l'ultrafiltration et la filtration à flux tangentiel. Le choix du processus approprié dépend principalement de la taille de la cellule microalgale à récolter. L'ultrafiltration et la microfiltration tangentielle sont connues d'être un processus plus agissant pour la récolte des microalgues dont la taille est inférieure à 40 μm (cas pour la plupart des microalgues). Ce processus permet le passage de la suspension parallèlement à la surface de la membrane en appliquant une pression qui maintient les particules dans le fluide de circulation. Cette technique est principalement influencée par le type de filtre, la pression transmembranaire, la vitesse d'écoulement, le flux croisé turbulent ainsi que la phase de croissance. Un compromis doit être trouvé prenant en compte ces paramètres, afin d'avoir le flux critique, le plus faible flux qui crée un dépôt irréversible des cellules microalgales sur la membrane (Carl Safi et al., 2014; Barros et al., 2015). Néanmoins, même en travaillant dans ces conditions, les molécules solubles telles que les exopolysaccharides (PSE), généralement sécrétées par quelques microalgues dans les conditions de stress, génèrent le phénomène d'encrassement sur la membrane et représentent une des limites majeure du processus par l'augmentation du flux et l'exigence d'élimination par un nettoyage chimique (Rossi et al., 2008). En outre, cette technique peut aussi être coûteuse en énergie vue que le système nécessite une énergie pour le pompage de la biomasse ainsi qu'un remplacement des membranes usées (Show & Lee, 2014).

I.6. COMPOSITION BIOCHIMIQUES DES MICRO-ALGUES & INTERET POTENTIEL

Les microalgues ont été reconnues comme une matière première, dite de troisième génération, non seulement parce qu'elles éliminent le dioxyde de carbone de l'atmosphère, mais aussi parce qu'elle est une source inépuisable d'une variété de bioproduit photosynthétiques, sous diverses forme, tels que des composants cellulaires ou des matériaux de stockage, dont les principales biomolécules (Tableau I.1) comprennent les protéines, les polysaccharides ainsi que les lipides. Par conséquent, ils ont un potentiel énorme dans une grande variété d'applications (Figure I.5). C'est grâce à la teneur importante en protéines, qu'en 1940, des chercheurs se sont intéressés aux microalgues comme aliments, alors qu'une cyanobactérie avait été une première à être utilisée comme nourriture en Chine et avant 2000 ans comme aliment aussi pour survivre une famine (Spolaore et al., 2006).

Tableau I. 1: Composition générale de différents espèces microalgale (% de matière sèche) (Trivedi et al., 2015)

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

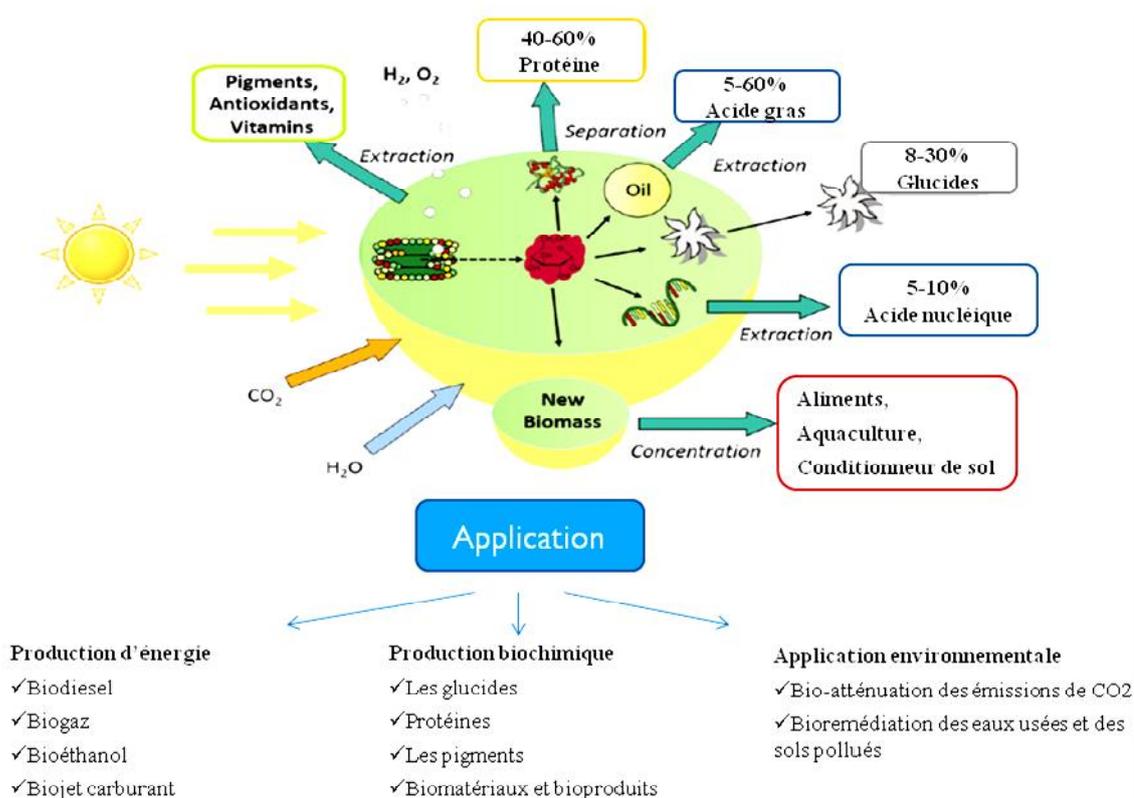


Figure I. 5 : Les microalgues en tant que système de production inépuisable & Applications (Hariskos & Posten, 2014)

I.6.1. Protéine

Les microalgues représentent une source alternative des protéines et de divers acide aminés qui est due à son contenu élevé estimé entre 40 à 60 % de matière sèche. Les protéines représentent un constituant essentiel dans la cellule microalgale, dont ils jouent un rôle capitale dans leur croissance, réparation ainsi que leur maintenance en plus d'être un régulateurs des activités cellulaires et de défense contre les intrus qui menace la cellule (Carl et al., 2014; Sialve & Steyer, 2013). De nombreuses espèces de microalgues reproduisent des quantités de protéines plus importantes, son contenu élevé dans la spiruline (60 % protéine de sa matière sèche) est une des principales raison pour être actuellement cultivée. *Anabeana*, *Chlorella*, *Dunaliella* et *Euglena* sont aussi décrites comme une bonne source de protéine. Les protéines peuvent être utilisées dans des domaines différents, en tant qu'aliments pour l'homme ou en tant qu'additifs pour l'alimentation animale, en outre, elles peuvent également être utilisées pour produire des peptides bioactifs, pour une application pharmaceutique (Trivedi et al., 2015). Cependant, la variété des protéines joue un rôle très important, dont la teneur

en protéines et la composition en acides aminés peut varier selon la saison, la température et l'endroit de la récolte, qui influent sur le rendement. En outre l'exploitation à l'échelle industrielle constitue un autre obstacle, d'où les méthodes d'extraction des protéines sont encore appliquées à petite échelle (Bleakley & Hayes, 2017). La technologie membranaire peut être également utilisée pour surmonter ces difficultés, selon Denis, et al., (2009), l'ultrafiltration étant considérée comme appropriée et évolutive pour l'extraction des protéines de la *G. Turuturu*.

I.6.2. Polysaccharides

Les polysaccharides forment 8 à 30 % de la matière sèche des microalgues, ils sont considérés comme une matière de structure (paroi cellulaire) ainsi que de matière de réserve énergétique (amidon par exemple) de la cellule microalgale, qu'ils sont due à la fixation du CO₂ pendant le processus de la photosynthèse (Sialve & Steyer, 2013). En plus, la teneur en glucides des microalgues peuvent être également améliorer par diverse stratégies de culture tant que cette dernière est influencée par les conditions de culture, telles que l'appauvrissement en azote, la variation de la température, le décalage du pH et le supplément de CO₂ (Trivedi et al., 2015). Les propriétés de ces biomolécules comme la solubilité dans l'eau ainsi que leurs propriétés rhéologique rend de cette biomasse une source intéressante de divers types de glucides et même exploitable à l'échelle industrielle, source de carbone pour la bioénergie en particulier biocarburants (bioéthanol) en transformant le sucre en éthanol (Figure I.6) et en tant que sources chimiques pour les biomatériaux et les bioproduits (John, et al., 2011). Leurs propriétés bioactives associées, des activités immunomodulatrices, anticancéreuses, anti-inflammatoires, antivirales ou antioxydantes ont été mises en évidence (Li, et al., 2008).

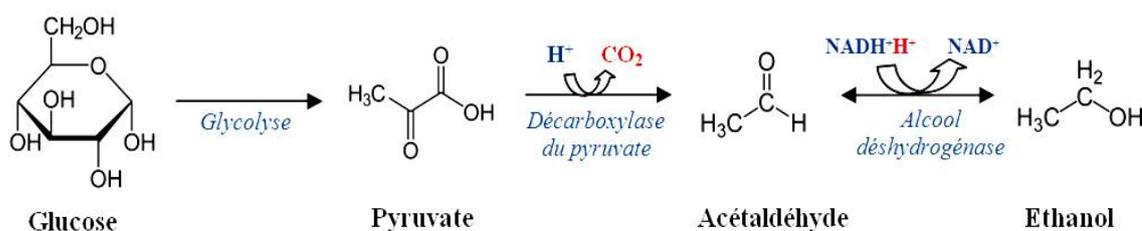


Figure I. 6: Fermentation de glucose

I.6.3. Lipides

Les microalgues jouent un rôle majeur dans la production alternative des biocarburants en raison de leur teneur élevée en lipides (5–60 %) principalement les triglycérides. En plus qu'elles peuvent accumuler jusqu'à 80 % de leur poids sec en acides gras dans des conditions de culture appropriées, les microalgues produisent 15 à 300 fois plus d'huile que les plantes cultivées (Chisti, 2007). La composition des lipides dans la biomasse dépend fortement des conditions de culture qui est relative à leur utilisation par la suite. Prenant l'exemple de la *C. vulgaris*, environ 68 % d'acide gras saturés et monoinsaturés peuvent être accumulés dans des conditions de croissance mixotrophes, ce qu'est plus adaptable à la production de biodiesel (Figure I.7). En revanche, son profil en acide gras, dans une culture à des conditions favorables, favorise leur utilisations nutritionnelle (Carl et al., 2014). Les lipides peuvent être présents dans les organites cellulaires, des constituants de la paroi et participant à diverses fonctions ainsi que sont présents sous forme de réserve cellulaires. Des informations sur la composition de la paroi microalgale, pour le choix approprié de la méthode d'extraction, sont nécessaires pour les utiliser efficacement en tant que bio-surfactant ou émulsifiant en agroalimentaire, du même que pour la bioénergie (Show & Lee, 2014).

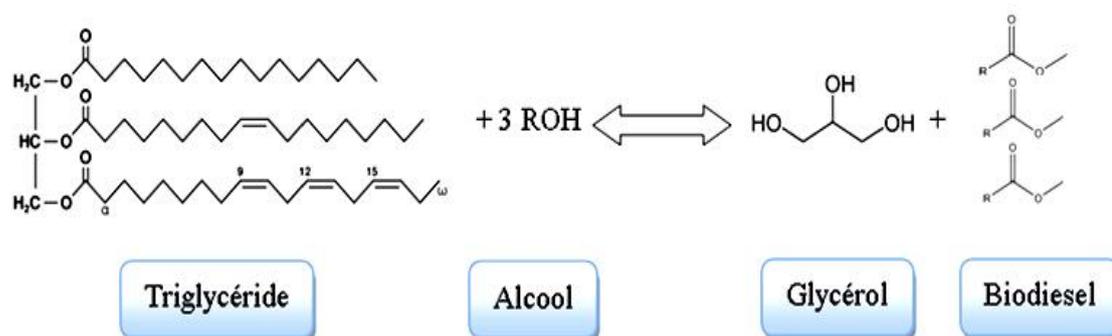


Figure I. 7 : Transestérification d'un triglycéride

I.6.4. Pigments

Les microalgues contiennent une multitude de pigments associés à l'incidence de la lumière et ce qui les fait paraître colorés. Outre l'élément principal de la photosynthèse qui est la chlorophylle (0,5% à 1%), les caroténoïdes (0.1% to 0.2%) et les phycobiliprotéines retiennent les plus grands intérêts (Spolaore et al., 2006). Ce sont des composés qui possèdent d'importantes activités biologiques dédiés à de nombreuses applications et présentent donc un grand intérêt commercial, en assurant des conditions de culture très contrôlées. Les phycobiliprotéines composés hydrosolubles et propres aux cyanobactéries, cryptophytes et rhodophytes, elles représentent 60% de leur teneur en protéines solubles (Lawrenz, et al., 2011). En se basant sur les propriétés colorantes et fluorescentes de ces complexes pigment-protéine, elles sont exploitées pour le diagnostic médical comme immunotraceurs, ainsi que dans l'industrie alimentaire comme colorant. Leur production relative à la production des acides aminés essentiels, augmente leur potentiel d'utilisation en tant qu'aliments riches en protéines (Sahoo & Seckbach, 2015). Quant à les caroténoïdes, ils sont des molécules photosynthétiques plutôt oranges et jaunes, et présents généralement dans les algues vertes ils peuvent agir comme des photoprotecteurs en protégeant les molécules de chlorophylle contre la dégradation et le blanchiment lors d'une forte exposition aux radiations et à l'oxygène (les dommages photo-oxydants)(Carl et al., 2014). Ces pigments liposolubles, sont regroupés en carotènes (ne contenant aucun atome d'oxygène) et xanthophylles (Figure I.8 et I.9), qui sont couramment extraits dans des solvants organiques. La *Dunaliella salina* est connue d'être riche en β -carotène en produisant jusqu'à 10 à 14% de sa masse sèche. Les caroténoïdes jouent un rôle important dans plusieurs domaines. En raison de leur forte activité antioxydante, ils sont essentiels dans les traitements de la tumorigenèse, des troubles neuronaux et des maladies optiques; comme ils peuvent être utilisé en tant que complément vitaminé (provitamine A); ainsi que plusieurs utilisations dans l'industrie agro-alimentaires et pharmaceutiques autant qu'additifs et agents colorants: le β -carotène, l'astaxanthine, la lutéine, la zéaxanthine, etc..., dont leur demande augmente suite aux prévisions de suppression des colorants de synthèse (Khan et al., 2018).

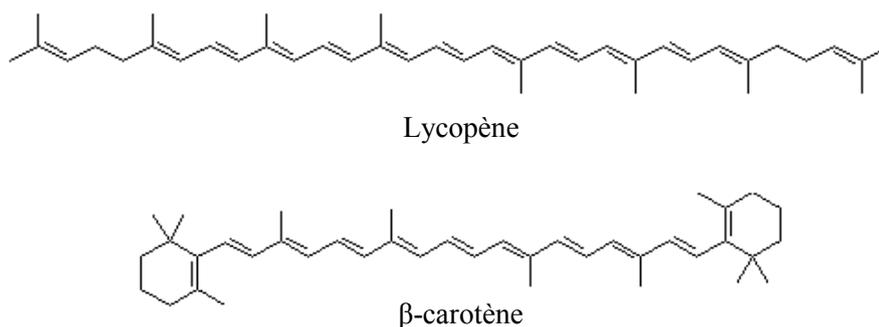


Figure I. 8: Structures chimiques des carotènes

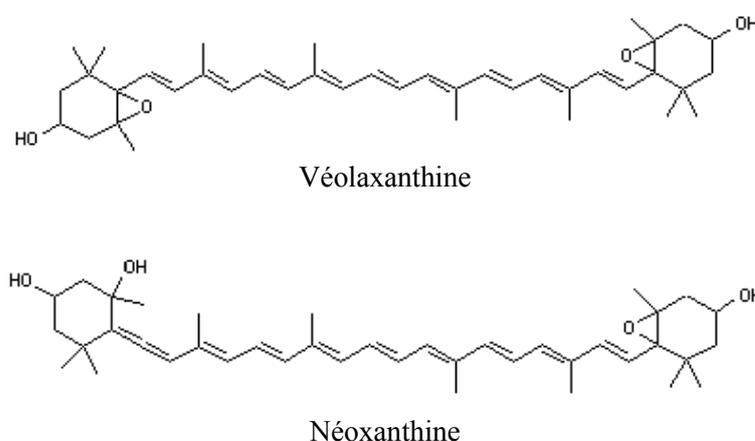


Figure I. 9: Structures chimiques des xanthophylles

I.6.5. Composés phénoliques

Les microalgues ont acquis un intérêt considérable et croissant en tant que source majeure de produits à haute valeur ajoutée, riches en antioxydants, dotés de propriétés pharmacologiques significatives. Différents preuves scientifiques ont signalé la présence des composés phénoliques, dite métabolites secondaires dans les microalgues (Maadane et al., 2015; Safafar et al., 2015; Bulut et al., 2019). La présence de ces groupement moléculaires, joue un rôle crucial en tant qu'agent de protection contre les produits chimiques dans les facteurs biotiques induits par le stress, tels que le règlement des bactéries et le pâturage, il est à noter aussi que ces biomolécules sont des précurseurs importants pour la biosynthèse de composés phénoliques plus complexes

tels que les lipides phénoliques. En outre, ils existent sous une forme de stockage pour les métabolites plus actifs (Santi et al., 2010). Les principales classes des composés phénoliques comprennent les alcaloïdes, les flavonoïdes, les phénoliques, les tannins et les terpénoïdes qui présentent des propriétés anti-radicalaire, grâce à leurs groupement hydroxyles fortement réactifs par une simple donation d'atome d'hydrogène suivant la figure I.10, antimicrobienne, anti-tumorale; de divers avantages pour la santé, ainsi qu'elles peuvent être utilisées dans les biocapteurs pour diverses applications telles que les aliments, l'analyse de la qualité de l'eau, les médicaments (Sudhakar et al., 2019).

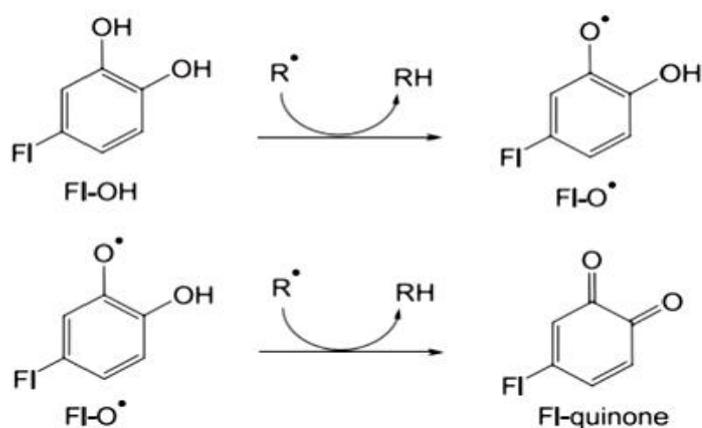


Figure I. 10 : Piégeage d'un radical libre par les flavonoïdes

CHAPITRE II

COMPOSES BIOACTIFS

&

POUVOIR ANTIOXYDANT DES MICROALGUES

II.1. INTRODUCTION

Les antioxydants sont des molécules biologiques qui peuvent prévenir ou ralentir les dommages oxydatifs d'organismes ou de leurs composés biologiques par interaction avec les radicaux libres. Pour retarder les processus d'oxydation et de peroxydation dans les industries alimentaire et pharmaceutique, de nombreux antioxydants commerciaux de synthèse, tels que l'hydroxytoluène butylé (BHT), l'hydroxyanisole butylé (BHA), la tert-butylhydroquinone (TBHQ) et le propyl gallate (PG), ont été utilisés. Cependant, l'utilisation de ces antioxydants synthétiques doit être soumise à une réglementation stricte en raison de leurs risques potentiels pour la santé (C. Chen et al., 1992).

Il existe dans le monde un intérêt croissant pour la recherche de nouveaux antioxydants sûrs et puissants à partir de sources naturelles. Par conséquent, un grand nombre d'espèces de microalgues existantes constitue un réservoir unique de biodiversité. Ceux-ci sont bien connus comme une excellente source de composés biologiquement actifs. Outre les protéines de haute qualité contenant des acides aminés essentiels, des fibres alimentaires, des acides gras essentiels, des minéraux, des vitamines et des pigments, notamment les chlorophylles et les caroténoïdes, les algues pourraient également constituer une bonne source de composés phénoliques (Maadane et al., 2015). En conséquence, l'utilisation d'algues ou de molécules extraites de celles-ci, en tant qu'antioxydants, constitue une excellente perspective pour fournir des alternatives plus sûres dans différentes applications dans l'industrie pharmaceutique, alimentaire et autres industries relatives (Gupta & Abu-Ghannam, 2011; Olaizola, 2003; Spolaore, et al. 2006).

L'extraction complète des composants actifs dépend fortement de la température et du temps d'extraction, de la nature des solvants utilisés et de la composition chimique de l'échantillon. Il est bien connu que les microalgues sont riches en composés antioxydants qui pourraient avoir différentes polarités. Par conséquent, l'activité antioxydante des microalgues est invariablement affectée par la polarité du solvant d'extraction (Ahmed et al., 2014a; López, et al., 2011; H.-B.Li et al., 2007; Goh, et al., 2010).

Diverses études précédentes ont été menées pour évaluer la capacité antioxydante et estimer la teneur en composés phénoliques ainsi que des flavonoïdes de différentes espèces de microalgues. Néanmoins, cette étude est la première à évaluer le potentiel

antioxydant et à estimer les composés bioactifs d'un mélange de microalgues cultivées dans des conditions naturelles et récoltées à partir d'eau douce du barrage de Hammam Boughrara.

L'objectif de cette partie (Fig.II.1) est de valoriser le mélange phytoplanctonique par l'estimation de la capacité antioxydante et de la teneur en extraits phénoliques, flavonoïdes et pigments de dix extraits, en utilisant cinq solvants de différentes polarités et méthodes d'extraction, afin de déterminer le solvant le plus efficace avec un potentiel antioxydant plus important. La capacité antioxydante a été évaluée avec la méthode de piégeage radicalaire à base de 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), le test de FRAP (Ferric ion Reducing Antioxydant Power) ainsi que la méthode de blanchiment du β -carotène.

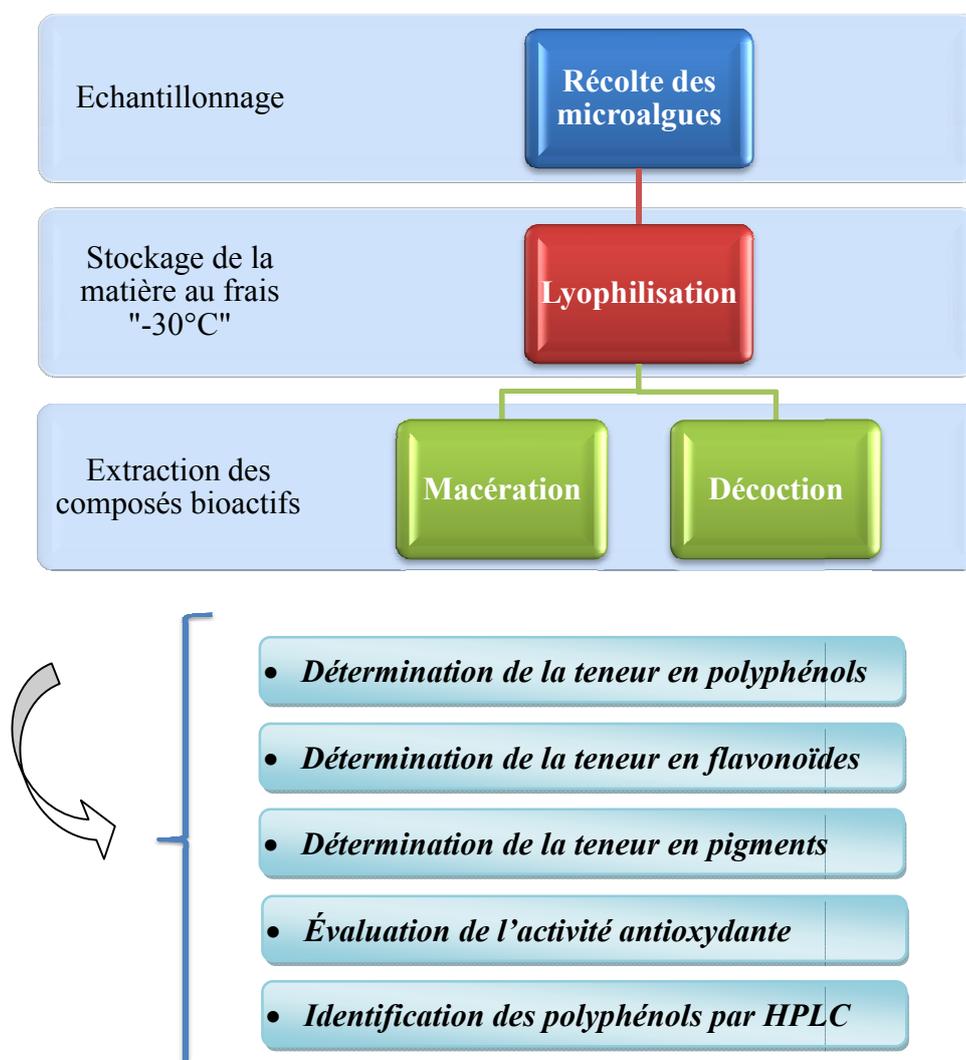


Figure II. 1 : Schéma descriptif de déroulement de l'étude

II.2. MATERIELS ET METHODES

II.2.1. Solvants et réactifs utilisés

Le tableau II-1 regroupe les solvants et les réactifs utilisés au cours des expérimentations et analyses réalisées.

Tableau II. 1 : Solvants et réactifs utilisés pour les expérimentations

Nom du produit	CAS	Fournisseur
2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle (DPPH)	1898-66-4	Sigma-Aldrich
β-carotène	7235-40-7	Sigma-Aldrich
Acétone HPLC	67-64-1	Sigma-Aldrich
Acide ascorbique	62624-30-0	Sigma-Aldrich
Acide gallique	149-91-7	Sigma-Aldrich
Acide linoléique	60-33-3	Sigma-Aldrich
Acide trichloracétique (TCA)	76-03-9	Sigma-Aldrich
Carbonate de sodium	497-19-8	Sigma-Aldrich
Chloroforme (HPLC)	67-66-3	Scharlau
Hydroxyde de sodium	1310-73-2	Merck
Méthanol HPLC	67-56-1	Sigma Aldrich
Tween-40	9005-66-7	Sigma-Aldrich

II.2.2. Biomasse microalgale

Les expérimentations de cette étude ont été portées sur des phytoplanctons naturels (poussant à l'air libre ou à l'état sauvage) collectés au barrage de Hammam Bouhrara (Figure II.2), du bassin hydrographique de la Tafna d'une capacité totale de 177 Hm³, situé au nord-ouest de la province de Tlemcen (Algérie) (Altitude: 34,88 N, Longitude: -1,67 E). Ce réservoir (mise en eau en 1999) est destiné à satisfaire les besoins en eau potable des villes d'Oran (33 Hm³) et de Maghnia (17 Hm³). Par ailleurs, cette région est caractérisée par un climat semi-aride, dont la température moyenne annuelle est de 18,5°C.

L'ensemble des phytoplanctons collecté, représente un mélange de différentes espèces comprenant : 49,04 % de *Chlorophycée*, 23,13 % de *Cyanophycées*, 20,86 % et 4,43 % *Diatomophycées* de *Euglenophycée* qui sont représentés par quatre sortes : *Euglena*, *Phacus*, *Trachelomonas* et *Strombomonas* (Bouزيد-Lagha & Djelita, 2012).

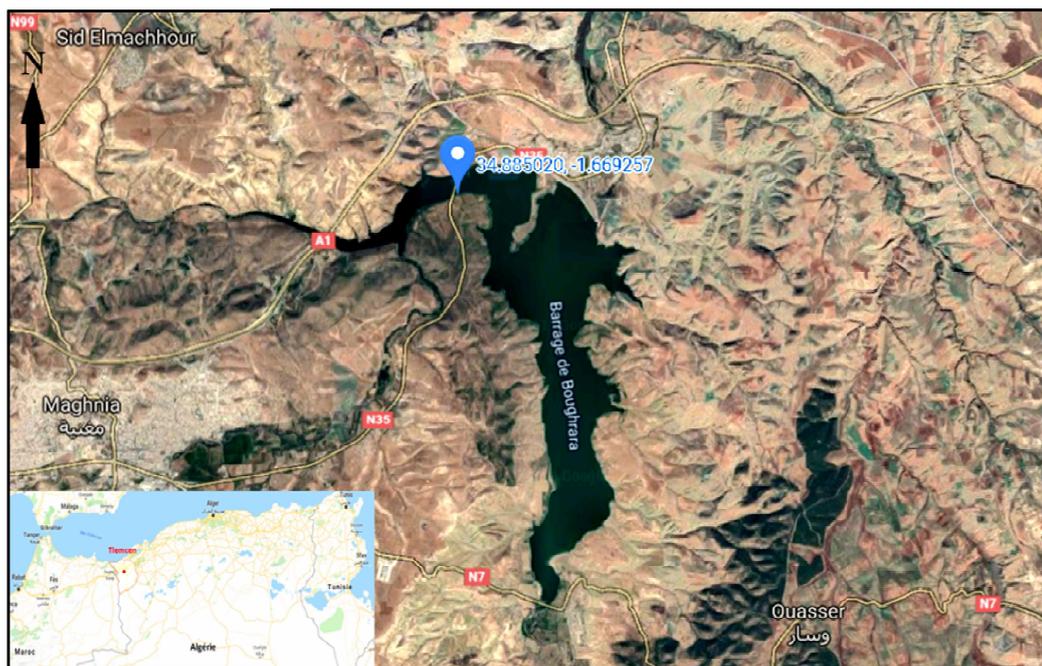


Figure II. 2 : Photographie de la situation de la Wilaya de Tlemcen et de lieu de prélèvement au Barrage de Hammam Boughrara (Google Maps)

Les microalgues prélevées (Fig.II.3) ont été rincées sur place avec de l'eau du barrage puis avec de l'eau distillée au niveau du laboratoire. Etant donné que la lyophilisation est considérée comme la technique la plus adoptée pour le séchage des microalgues sans affecter les composés cellulaires (Al hattab & Ghaly, 2015). L'échantillon congelé de microalgues brutes (environ 100 g) a été introduit directement dans le lyophilisateur (Christ Martin ALPHA 1-2 LD plus) où la température a été réduite à $-51,4^{\circ}\text{C}$ et la pression a encore été réduite à 0,011 mbar dont la lyophilisation a été réalisée sous vide pendant 48h. La biomasse sèche a été stockée à -20°C jusqu'à extraction.

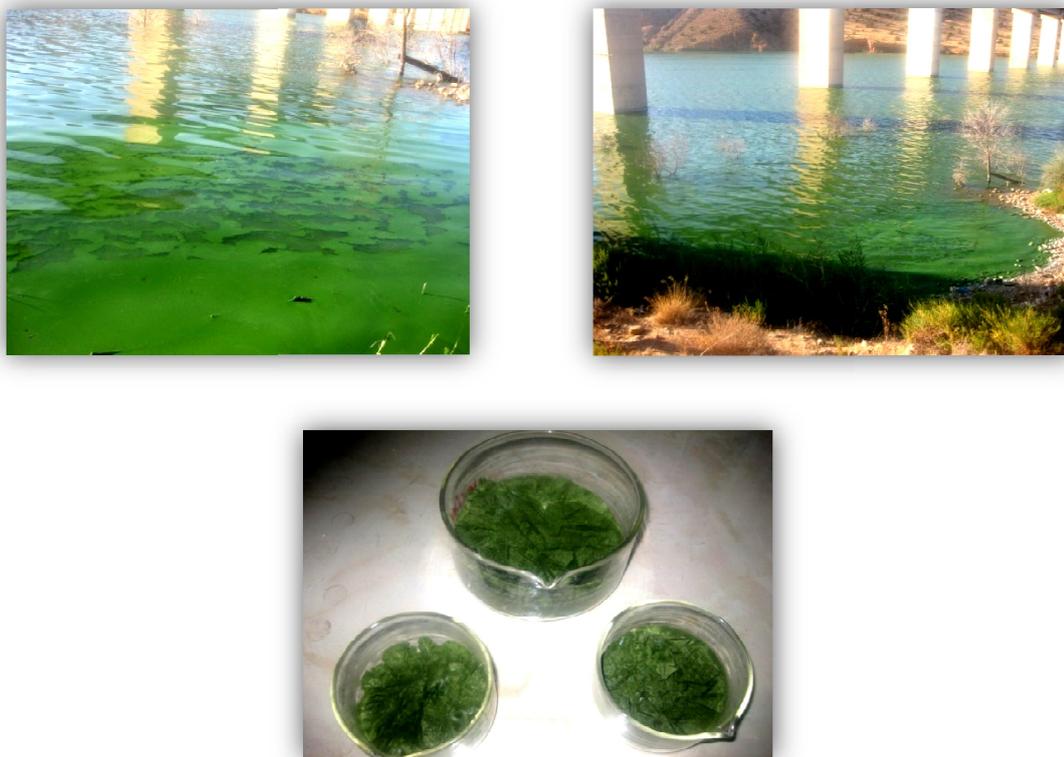


Figure II. 3 : Photographie des microalgues poussant au barrage de Hammam Boughrara (Bloom) et les microalgues lyophilisées.

II.2.3. Extraction des composés bioactifs

Pour cette étude, deux méthodes différentes ont été réalisées (décoction et macération) pour extraire les composés actifs présents dans les microalgues, en utilisant cinq solvants de polarités différentes: eau, eau/méthanol (20:80 ;v/v), méthanol, eau/acétone (10:90 ;v/v) et le chloroforme. Pour l'extraction par macération, un gramme (1 g) de la biomasse lyophilisée a été macéré dans 60 mL de chaque solvant organique à une température ambiante (25°C), à l'obscurité et sous agitation magnétique pendant 24h.

Pour la méthode de décoction, une quantité d'un gramme (1 g) de microalgue lyophilisée a été mélangé avec 60 ml de chaque solvant et soumise sous reflux dans l'obscurité pendant 3 heures. Tous les extraits ont été ensuite filtrés en utilisant du papier filtre Whatman (grade 1) et évaporés sous pression réduite dans un évaporateur rotatif (BOECO RVO 400 SD) afin d'obtenir un résidu sec. Les extraits aqueux ont été centrifugés et le surnageant récupéré a été filtré et lyophilisé.

Les extraits secs ont été stockés à -20°C , pour être récupéré en suite dans le méthanol pour une analyse ultérieure.

II.2.3.1. Rendement & Indice de polarité

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait après évaporation du solvant et la masse de la matière sèche ayant servi pour l'extraction. Il est exprimé en pourcentage (%), et calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \quad (\text{II.1})$$

Où m_1 est la masse de l'extrait évaporé et m_2 est la masse de la matière sèche (microalgues lyophilisés).

Les valeurs de l'indice de polarité (P_i) des mélange de solvants utilisés ont été calculées en utilisant l'équation (II.2) appropriée à un mélange de deux solvants (Hemwimon, Pavasant, & Shotipruk, 2007) :

$$P_i = \varnothing_a P_a + \varnothing_b P_b \quad (\text{II.2})$$

- \varnothing_a et \varnothing_b sont les fractions volumiques des solvants 1 et 2 respectivement.
- P_a et P_b sont les indices de polarité du solvant 1 et du solvant 2, respectivement.

II.2.3.2. Détermination de la teneur en polyphénols

La méthode de Folin–Ciocalteu (Singleton et al., 1999) a été utilisée pour estimer les phénols totaux dans différents extraits. Le principe de base de cette méthode est de en milieu alcalin, ce qui donne un produit de couleur bleu.

Le dosage des polyphénols a été réalisé selon le protocole suivant :

- 200 μL de l'extrait étudié est mélangé avec 1 mL du réactif de Folin-Ciocalteu (1 N) ;
- Ajouter 0,8 mL de la solution de carbonate de sodium à 7,5 % fraîchement préparée au mélange ;
- Agitation des tubes à l'aide d'un vortex ;
- Incubation pendant 30 minutes à température ambiante ;
- L'absorbance est mesurée à 765 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible, type Nicolet Evolution 100 (Thermoelectron).

Une gamme d'étalon est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme étalon.

La concentration des polyphénols totaux dans les extraits est exprimée en milligramme équivalent acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g ES).

II.2.3.3. Détermination de la teneur en flavonoïdes

La quantité de flavonoïdes présente dans les extraits a été déterminée selon la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl_3) et la soude (NaOH). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510nm (Ardestani & Yazdanparast, 2007).

Le dosage de flavonoïde a été réalisé selon le protocole suivant:

- 500 μL de chaque extrait est mélangé avec 2 ml d'eau distillée ;
- Ajoutez 150 μL d'une solution de nitrite de sodium (NaNO_2) à 15 % ;
- 1^{ère} incubation pendant 6 minutes à température ambiante ;
- Ajouter 150 μL de chlorure d'aluminium ($\text{AlCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$) à 10 % ;
- 2^{ème} incubation pendant 6 minutes à température ambiante ;
- Ajoutez 2 mL d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4 % ;
- Le volume total est complété à 5 mL avec de l'eau distillée ;
- Agitez et incubez les tubes pendant 15 minutes à température ambiante ;
- Mesurez l'absorbance à 510 nm contre un blanc au spectrophotomètre UV-Visible.

Une gamme étalon a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine à différentes concentrations.

Les résultats obtenus sont exprimés en milligramme équivalent de catéchine par gramme d'extrait sec (mg ECA/g ES).

II.2.3.4. Détermination de la teneur en pigments

L'estimation de la teneurs en pigments dans les extraits a été effectuée par la dissolution de l'extrait sec dans le mélange de solvant méthanol/eau (80:10 ; v/v) afin de pouvoir utiliser les équations de Lichtenthaler & Claus, (2001). L'absorbance de la solution a été ensuite mesurée à 470, 652,4 et 665,2 nm pour la quantification de la

chlorophylle a (Chl a), chlorophylle b (Chl b) et les caroténoïdes selon les équations suivantes :

$$\text{Chla } (\mu\text{g/mL}) = 16,82 A_{665,2} - 9,28A_{652,4} \quad (\text{II.3})$$

$$\text{Chlb } (\mu\text{g/mL}) = 36,92 A_{652,4} - 16,54A_{665,2} \quad (\text{II.4})$$

$$\text{Caroténoïdes}(\mu\text{g/mL}) = (1000A_{470} - 1,91 \text{ Chla} - 95,15 \text{ Chlb})/225 \quad (\text{II.5})$$

II.2.4. Évaluation des activités antioxydantes

II.2.4.1. Piégeage du radical libre DPPH

L'activité d'élimination des radicaux libres des extraits de microalgues a été déterminée en utilisant le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH[•]), ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène, selon la méthode de Sanchez-Moreno et al (Larrauri & Saura-calixto, 1998). Cette méthode est simple, rapide et pratique, indépendante de la polarité de l'échantillon, pour le criblage de nombreux échantillons à la recherche d'une activité de balayage radicalaire (Marxen et al., 2007).

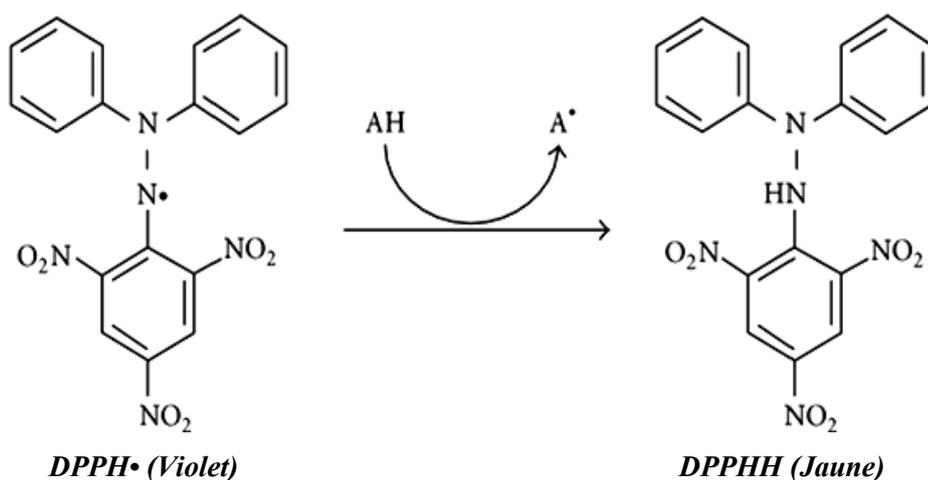


Figure II. 4: Mécanisme réactionnelle de la méthode de DPPH

Un volume de 50 µL de chaque extrait à différentes concentrations est ajouté à 1,950 mL de la solution méthanolique de DPPH[•] fraîchement préparée (0,025 mg/mL). Le mélange a été vortexé et maintenu pendant 30 minutes à l'obscurité. La diminution de l'absorbance de la solution, due à l'activité donneuse de proton par composant (s), a été mesurée à 517 nm dans un spectrophotomètre UV-visible. Les mesures ont été effectuées en triplicat pour chaque concentration. L'activité antioxydante de l'extrait a été exprimée en IC₅₀ (concentration d'inhibition à 50 %). Cette valeur a été définie comme la concentration en mg de matière sèche par mL (mg/mL). L'acide ascorbique (Vitamine C) est utilisé comme référence (un antioxydant puissant), et son IC₅₀ a été utilisée pour comparer l'activité de balayage radicalaire des différents extraits.

Le pourcentage de réduction du DPPH[•] (DPPH %) est calculé par la formule suivante :

$$DPPH^{\bullet}(\%) = \frac{(Do\ contr) - (Do\ éch)}{(Do\ contr)} \times 100 \quad (II.6)$$

DPPH[•] (%) : Pourcentage de réduction du DPPH[•].

DO contr : Densité optique du tube contrôle négatif.

DO éch : Densité optique de l'échantillon.

La valeur IC₅₀ est la concentration d'extrait qui assure la réduction de 50 % du DPPH[•], déterminée graphiquement par la régression linéaire, pour chaque extrait à partir de la courbe du pourcentage de réduction en fonction de la concentration. La stabilité et la linéarité de la solution de DPPH[•] doivent être évaluées avant de commencer le test antioxydant et le résultat est présenté graphiquement. Cinq solutions de DPPH[•] (20, 40, 60, 80, 100 µg/mL) ont été préparées, puis l'absorbance des échantillons a été mesurée à 30, 60 et 120 min à 517 nm dans l'obscurité, avec du méthanol à blanc avec le spectrophotomètre UV-Visible.

II.2.4.2. Test du blanchiment du β-carotène

Le blanchiment du β-carotène dans ce test (BCB) est du à la sensibilité de ses doubles liaisons aux radicaux libres dérivés d'hydroperoxydes générés par l'oxydation de l'acide linoléique dans un système d'émulsion aqueuse. Cependant, La présence des

antioxydants dans les extraits pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléiques et donc prévenir l'oxydation et le blanchiment du β -carotène (Kadri et al., 2011).

L'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits par la méthode de blanchiment du β -carotène (Bourkhiss et al., 2010), a été effectuée avec une légère modification. En bref, dans une fiole et dans un volume de 1 ml de chloroforme, 2 mg de β -carotène, 20 mg d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 ont été dissous. Le solvant a été éliminé en utilisant un appareil d'évaporation sous vide. À ce moment, 50 ml d'eau distillée oxygénée (eau distillée saturée en oxygène par agitation pendant 30 min) ont été ajoutés au ballon sous agitation vigoureuse pour obtenir une émulsion aqueuse, ce mélange est utilisé comme solution mère. Dans un tube à essai, un volume de 60 μ L de chaque extrait à différente concentration a été mélangé à 1 mL de la solution mère. Après cela, les tubes bien fermés ont été placés dans une étuve à une température fixe de 50 °C pendant 120 min. Ensuite l'absorbance de chaque extrait a été mesurée à 470 nm. Pour le control positif, l'échantillon est remplacé par le BHA. Le control négatif est constitué par 200 μ l de méthanol au lieu de l'extrait où de l'antioxydant de synthèse. Tous les échantillons sont répétés en trois essais.

Le pourcentage d'activité antioxydante a été calculé à partir de l'équation suivante:

$$Inhibition = \frac{A_{\text{extrait (120)}} - A_{\text{control (120)}}}{A_{\text{control (0)}} - A_{\text{control (120)}}} \times 100 \quad (\text{II.7})$$

A extrait (120) : Absorbance de l'extrait à 120 min

A control (0) : Absorbance du control à 0 min

A control (120) : Absorbance du control à 120 min

La valeur IC_{50} est définie comme la concentration des antioxydants correspondant à 50 % d'inhibition. Elle est calculée en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait.

II.2.4.3. Réduction de fer FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power)

Le pouvoir réducteur d'extraits de microalgues a été mesuré selon la méthode d'Oyaizu (1986). On a mélangé 1 mL d'extraits à différentes dilutions avec 2,5 mL

de tampon phosphate (0,2 M; pH 6,6) et 2,5 ml de $K_3Fe(CN)_6$ (1% m/v), après une incubation de 20 min à 50°C, on a ajouté 2,5 ml d'acide trichloroacétique (10% m/v). Après centrifugation pendant 10 min à 2000 tr/min, 2,5 mL de surnageant ont été ajoutés aux tubes contenant 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (1% m/v). L'absorbance de la solution résultante a été mesurée à 700 nm en utilisant de l'eau à blanc. Le butylhydroxyanisole (BHA) a été utilisé comme standard car il possède de bonnes propriétés réductrices. Une absorbance accrue du mélange réactionnel indique un pouvoir réducteur accru.

II.2.5. Analyse par HPLC des polyphénols

L'analyse des polyphénols dans l'extrait méthanolique de microalgue pour une identification a été effectuée en injectant un volume de 20 µL d'échantillon filtré (filtre seringue 0,45 µm) dans un système HPLC équipé d'un détecteur UV (HEWLETT PACKARD 1100 HP) et d'une colonne à phase inversée (RESTEK Pinnacle II C18, 5 µm), d'une longueur de 15 cm et d'un diamètre intérieur de 4,6 mm, utilisant un débit de 1 ml/min, et une phase mobile : MeOH/H₂O acidifiée à 0,1% (Solvant A) et acétonitrile (ACN) (Solvant B), à une température de 25°C et détection à 254 nm.

L'élution a été utilisée dans le gradient suivant, 90% de solvant A et 10% de solvant B pendant 10 min, puis augmentation du solvant B à 30%, après 5 min, augmentation du solvant B à 40% pendant 10 min, puis 50% durant 15 min, pour finir à 100% de solvant B pendant 10 min.

II.2.6. Analyse statistique

Les données expérimentales du dosage et l'évaluation de l'activité antioxydante obtenues ont été exprimées par une moyenne et plus ou moins l'écart type. Le coefficient de corrélation des propriétés antioxydantes a été déterminé en utilisant les logiciels OriginPro 9 et l'Excel 2007.

II.3. RESULTATS ET DISCUSSION

L'emplacement des composés phénoliques ainsi que les pigments dans les microalgues, renfermés dans la paroi cellulaire, nécessite une procédure capable de décomposer cette paroi afin d'extraire les composés bioactifs avec un risque minimal de dommage. Pour cela une extraction par solvant, qui a la capacité de pénétrer la paroi cellulaire, avec une polarité correspondante à la molécule cible est indispensable.

II.3.1. Rendement & Indice de polarité

Les rendements d'extraction relatifs aux différents extraits de microalgues exprimés en % g/g de matière sèche ainsi que l'indice de polarité des solvants utilisés sont présentés dans le tableau ci-dessous (II.3):

Tableau II.2: Indice de polarité des solvants et rendement des extraits

Solvant	Indice de polarité (Pi) ^a	Rendement	
		Macération	Décoction
Chloroforme	4,1	2,01	2,84
Méthanol	5,1	10,42	9,26
Acétone 90%	5,59	7,59	8,8
Méthanol 80%	6,08	9,39	10,61
Eau	10	20,74	29,74

Nous constatons d'après les résultats d'extraction de la biomasse microalgale obtenus que le rendement le plus élevé a été enregistré pour l'extrait aqueux des deux méthodes d'extraction (20,74 et 29,74 % g/g MS, macération et décoction respectivement), tandis que les plus faibles valeurs ont été notées pour l'extrait chloroformique de l'ordre de 2,01 et 2,84 % g/g MS (macération et décoction, respectivement). Il convient de noter aussi une légère augmentation de rendement d'extraction de décoction par rapport à celle de macération. Cependant, nous constatons également une augmentation dans les extraits par l'augmentation de la polarité des solvants utilisés, qui pourrait s'expliquer par la présence de certains composés polaires (composants hydrosolubles) tels que les glucides solubles, protéines et peptides, c'est peut-être aussi la raison pour laquelle l'extrait aqueux obtenu était très visqueux en raison de la forte teneur en alginate dans les microalgues (Wang et al., 2009).

II.3.2. Teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux

Les analyses quantitatives des phénols totaux et des flavonoïdes sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage exprimées successivement en mg équivalent d'acide gallique et mg équivalent de catéchine par g d'extrait respectivement (Figure II.5 et II.6).

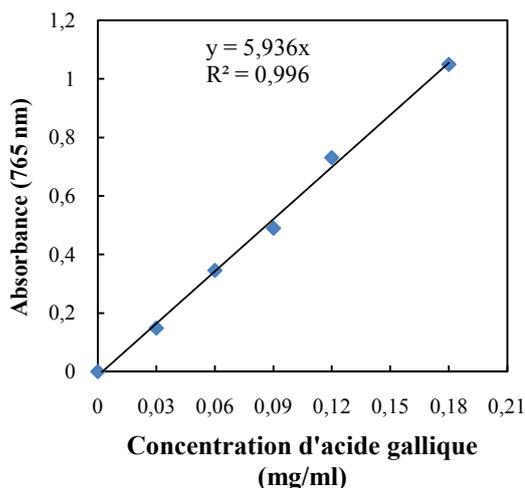


Figure II.1: Courbe d'étalonnage utilisant de l'acide gallique

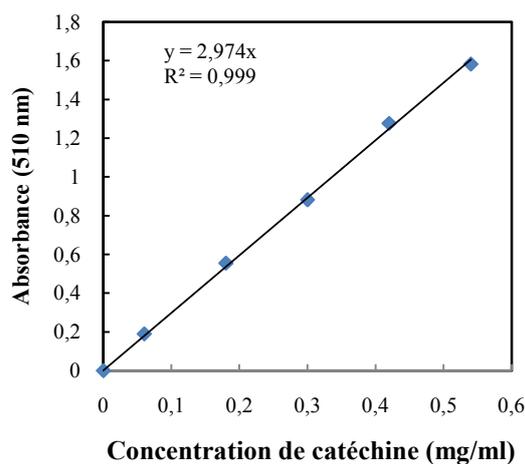


Figure II.2: Courbe d'étalonnage utilisant de la catéchine

Les résultats du dosage des polyphénols et des flavonoïdes dans les extraits obtenus par macération et décoction de la biomasse microalgale, sont indiqués dans le tableau II.3.

Tableau II. 3: Teneur en polyphénols et en flavonoïdes dans les extraits de microalgues obtenus par macération et décoction

Extrait	Polyphénols (mg GAE / g ES)		Flavonoïdes (mg ECA / g ES)	
	Macération	Décoction	Macération	Décoction
Chloroforme	52,05±0,9	74,79±0,8	25,5 ±1	45,17±1.8
Méthanol	58,45±7,6	43,63±3,4	27,24±0,7	15,86±1,4
Acétone 90%	20,04±1,8	30,99±1,1	18,83±0.03	14,48±0.3
Méthanol 80%	46,32±2,3	49,35±5,4	26,90±0.2	20,00±0.8
Eau	42,94±1,3	49,21±0,3	7,93±1,3	8,28±0,3

Moyenne ± écart type de trois mesures expérimentales.

La concentration des composés phénoliques dans les extraits de microalgues a été déterminée par spectrophotométrie après deux processus d'extraction. Les résultats obtenus (Tableau II.3) ont révélé une variation de la quantité de composés phénoliques totaux allant de $20,04 \pm 1,8$ à $74,79 \pm 0,8$ mg EAG/g ES. La quantité la plus élevée a été trouvée dans l'extrait chloroformique utilisant la méthode de décoction ($74,79 \pm 0,8$ mg GAE/ g ES), tandis que la quantité la plus faible a été observée pour l'extrait hydroacétonique en utilisant la méthode de macération ($20,04 \pm 1,8$ mg GAE / g ES). Des résultats de l'extrait chloroformique de *Rhizoclonium hieroglyphicum* ont aussi montré une teneur élevée des polyphénols par rapport à l'extrait méthanolique (Tapan et al., 2015).

Une bonne quantité de composés phénoliques obtenue par les deux méthodes d'extraction, ont également été déterminées dans l'extrait méthanolique et hydrométhanolique ainsi que l'extrait aqueux, suivie par l'extrait hydroacétonique avec une quantité modérée qui a été notée. Selon les résultats obtenus par Maadane et al.,(2015), les teneurs en polyphénols des microalgues étudiées varient de 8.1 ± 0.16 à 32.0 ± 0.57 mg GAE/ g ES, des résultats moyennement comparable à ceux obtenu dans le présent travail, contrairement aux résultats trouvés dans le travail de Safafar et al., (2015), où il a rapporté que *Desmodesmus sp.* présente (7.72 ± 0.08 mg GAE/ g) la teneur en composés phénoliques la plus élevée parmi les extraits de 7 différentes souches de microalgues.

En ce qui concerne les flavonoïdes, la teneur la plus élevée est observée dans l'extrait chloroformique après extraction par décoction, qui révèle une teneur égale à $45,17 \pm 0,8$ mg ECA / g ES, suivie par des teneurs importantes notées dans les extraits méthanolique (extrait de macération) ainsi que les extraits hydrométhanoliques allant de $15,86$ à $27,24$ mg ECA / g ES. Dont il est bien connu que pour l'extraction des polyphénols et les flavonoïdes plus particulièrement, le méthanol ou le mélange méthanol/eau est le solvant le plus largement utilisé. En outre, les teneurs en flavonoides dans la *H.elongata* et la *E.spirulina* obtenues semblent être similaire aux taux des résultats obtenus (Cox et al., 2010), alors que ces derniers, sont significativement plus importantes que celles obtenus par des travaux antérieurs (Uma et al., 2011, Safafar et al., 2015, Bulut et al., 2019).

Pour la totalité des extraits, une légère augmentation de la teneur en composés phénoliques a été notée en utilisant la méthode de décoction, quant à la teneur en flavonoïdes, on a observé l'inverse, mise à part l'extrait chloroformique, dont environ 20 mg supplémentaires, non seulement des composés phénoliques mais aussi des flavonoïdes, ont été récupérés par la méthode de décoction.

Les résultats obtenus ont montré une grande capacité d'extraction des polyphénols et des flavonoïdes de cette biomasse par les solvants avec une polarité modérée, ce qui peut être expliquée par la nature moyennement polaire des composés phénoliques présents dans ces microalgues. La teneur estimée dans l'extrait aqueux peut être due à la présence des polyphénols polaires, aussi la présence des complexes hydrosolubles polyphénols-protéine et/ou polyphénols-polysaccharides peut être également une raison simultanée (Hwang & Thi, 2014).

II.3.3. Teneur en pigments

Le tableau II.4 résume les résultats des teneurs en pigments exprimées en $\mu\text{g/g ES}$ des différents extraits de microalgues obtenus par macération et décoction.

Tableau II. 4: Teneur en pigments dans les extraits de microalgues obtenus par macération et décoction

Extrait	Chlorophylle a ($\mu\text{g/g ES}$)		Chlorophylle b ($\mu\text{g/g ES}$)		Caroténoïdes ($\mu\text{g/g ES}$)	
	<i>Macération</i>	<i>Décoction</i>	<i>Macération</i>	<i>Décoction</i>	<i>Macération</i>	<i>Décoction</i>
Chloroforme	16,8 \pm 0,09	17,32 \pm 0,2	3,68 \pm 0,1	1,28 \pm 0,04	5,67 \pm 0,03	7,44 \pm 0,04
Méthanol	22,04 \pm 0,6	3,34 \pm 0,3	7,71 \pm 0,6	7,31 \pm 0,2	4,56 \pm 0,6	1,28 \pm 0,3
Acétone 90%	10,09 \pm 0,03	12,87 \pm 0,4	0,06 \pm 0,03	2,95 \pm 0,4	3,98 \pm 0,03	3,07 \pm 0,6
Méthanol 80%	2,97 \pm 0,9	6,79 \pm 0,07	4,36 \pm 0,4	4,90 \pm 0,07	0,65 \pm 0,9	1,2 \pm 0,08

Moyenne \pm écart type de trois mesures expérimentales.

Les résultats montrent que la teneur en chlorophylle a, varie de 22,04 \pm 0,6 $\mu\text{g/g ES}$ pour l'extrait méthanolique à 2,97 \pm 0,9 $\mu\text{g/g ES}$ correspondante à l'extrait hydrométhanoliques, dont l'extrait chloroformique révèle aussi une concentration importante qui égale à 16,8 et 17,32 $\mu\text{g/g ES}$ (macération et décoction respectivement). Quant à la chlorophylle b, des teneurs appréciables (7,71 \pm 0,6

et $7,31 \pm 0,2 \mu\text{g} / \text{g ES}$) ont été trouvées ainsi dans l'extrait méthanolique des deux méthodes d'extraction, suivie par l'extrait chloroformique, par ailleurs, nous remarquons une teneur relativement faible en chlorophylle b dans l'extrait hydroacétonique de macération qui égale à $0,06 \pm 0,03 \mu\text{g} / \text{g ES}$.

En ce qui concerne la teneur en caroténoïdes, l'extrait chloroformique possède la teneur la plus élevée avec un taux de $7,44 \pm 0,04 \mu\text{g} / \text{g ES}$ relative à la méthode de décoction suivie par celle obtenu par macération $5,67 \pm 0,03 \mu\text{g} / \text{g ES}$, l'extrait méthanolique et hydroacétonique aussi révèlent des taux importantes en caroténoïdes de $3,07 \pm 0,6$ à $4,56 \pm 0,6 \mu\text{g} / \text{g ES}$, qui se situent dans la plage indiquée précédemment (Goiris et al., 2012, Ahmed et al., 2014b, Safafar et al., 2015, Bulut et al., 2019). Dont il a été démontré que la teneur en caroténoïdes est dépendante de l'espèce microalgale, outre qu'elle est influencée par les conditions de cultures, telles que la composition du milieu de culture et l'intensité de la lumière en entraînant une bonne accumulation (Goiris et al., 2012).

Par rapport à l'extrait aqueux, aucun taux de pigments n'a été détectable, ce qui est due à la nature lipophile de ces molécules, dont leur solubilité dépend principalement de la polarité du solvant utilisé.

II.3.3. Evaluation de l'activité antioxydante

Dans la présente étude, la capacité antioxydante des différents extraits a été effectuée simultanément par les tests DPPH, BCB et FRAP, pour bien évaluer la capacité des composés à réagir au stress oxydatif, où la signification et la pertinence des antioxydants naturels, qui sont souvent multifonctionnels, dépendent fortement du test appliqué (Oquet et al., 2008).

II.3.3.1 Evaluation du pouvoir antiradicalaire par le test de DPPH

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée par la détermination du pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH^{*}. La stabilité et la linéarité de la solution de DPPH^{*} ont été évaluées avant le début du test, dont aucune différence significative n'a été observée dans l'absorbance entre 0 et 120 minutes pour les concentrations testées dans l'obscurité (résultats non présentés), avec une très bonne linéarité obtenue de l'absorbance par rapport à différentes concentrations de DPPH^{*} (Figure II.7).

Une droite d'étalonnage a été rétablie avec des solutions d'acide ascorbique à différentes concentrations présentée dans la figure II.8.

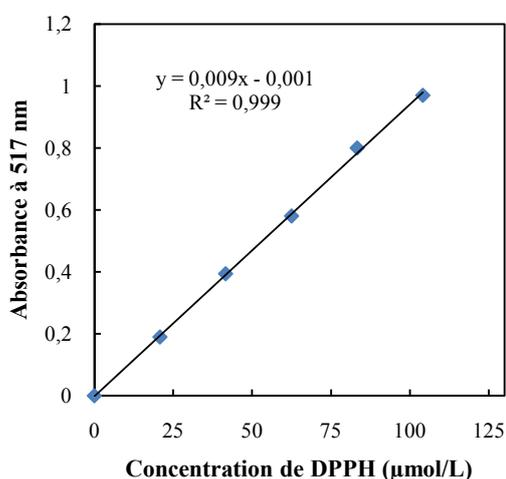


Figure II.3: Courbe d'étalonnage du radical DPPH à différentes concentrations

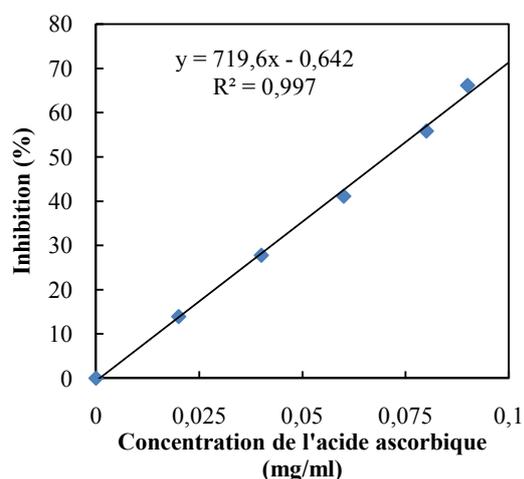


Figure II.4: Courbe de pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique

Les courbes illustrées dans la figure (II.9) présentent les résultats exprimés par le pourcentage d'inhibition du radical DPPH^{*} en fonction des concentrations croissantes de chaque extrait obtenus par macération et décoction.

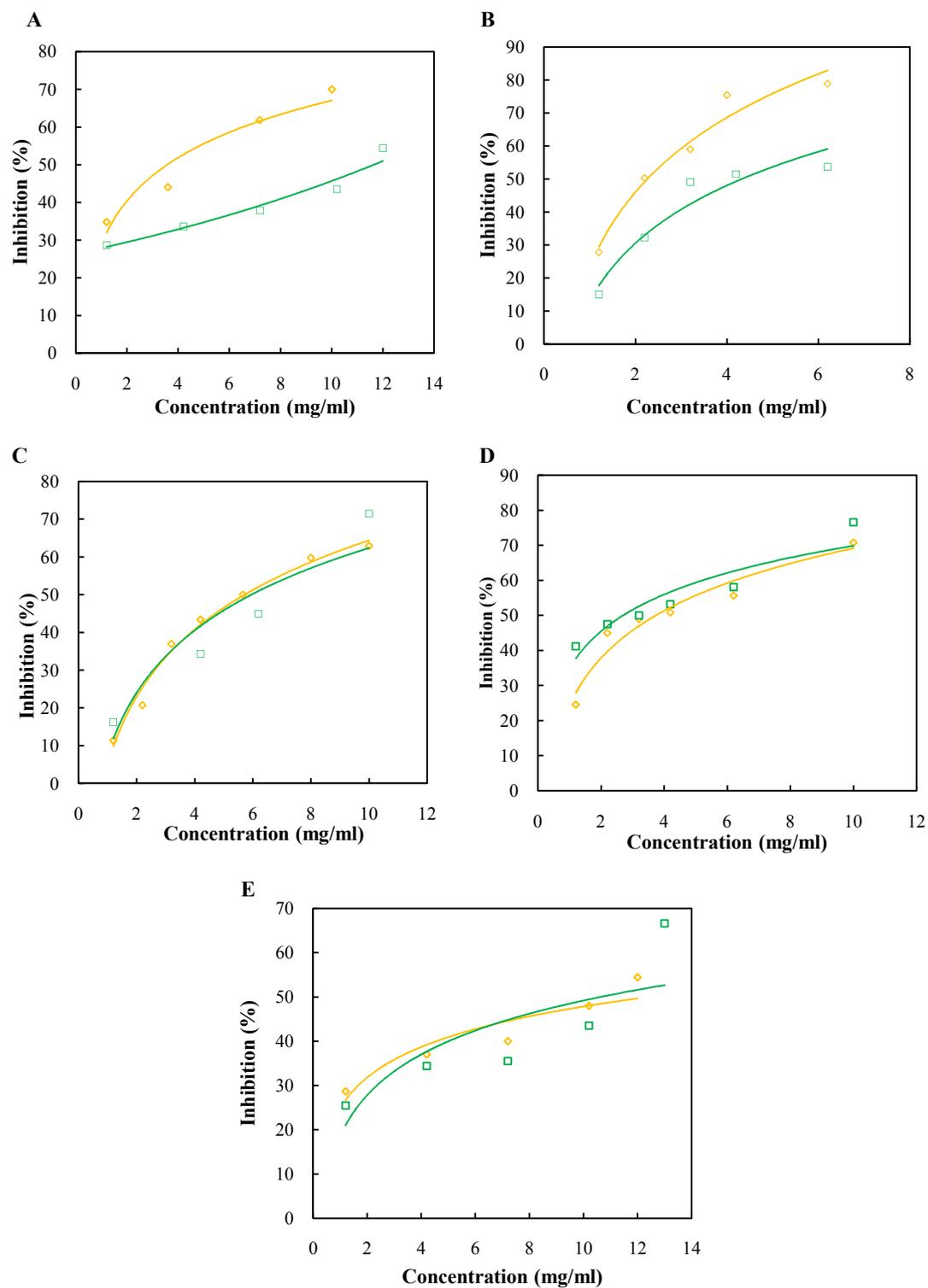


Figure II.5: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées des extraits Chloroformique (A), méthanolique (B), Hydroacétonique (C) Hydrométhanolique (D) & Aqueux (E). « —◇— : Macération et —□— : Décoction »

Les résultats obtenus prouvent que tous les extraits de microalgue testés, possèdent la capacité de piéger le radical DPPH^{*}, et montrent que le pourcentage d'inhibition augmente significativement par l'augmentation de la concentration d'extrait. La concentration nécessaire pour inhiber 50% de radicales libres de chaque extrait (IC_{50}), a été déterminée graphiquement et présentée dans la figure (II.8), et sa valeur a été comparée à celle de l'antioxydant de référence (Acide ascorbique) qui présente une activité antiradicalaire très puissante, avec une IC_{50} de 0,07 mg/ml.

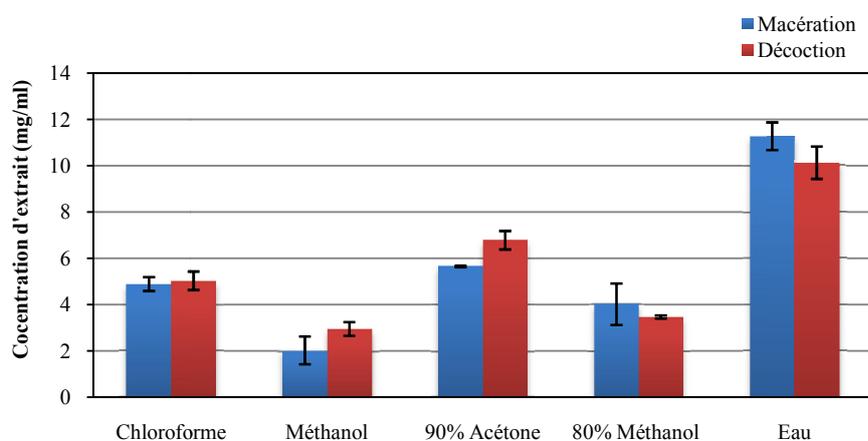


Figure II.6: Pourcentage d'inhibition (IC_{50}) dans différents extraits par la méthode de macération et de décoction. Moyenne \pm écart type de trois mesures expérimentales

Selon les résultats obtenus, le pouvoir antiradicalaire le plus élevé a été obtenu par la méthode de macération dans l'extrait méthanolique ($IC_{50} = 2,04 \pm 0,6 \text{ mg ES mL}^{-1}$), alors que l'extrait aqueux obtenu par la même méthode d'extraction (macération) présente la plus faible activité ($IC_{50} = 11,29 \pm 0,6 \text{ mg ES mL}^{-1}$). Une forte inhibition a également été observée dans l'extrait hydrométhanolique des deux méthodes d'extraction utilisées d'une valeur d' IC_{50} de $4,03 \pm 0,9$ et $3,47 \pm 0,07 \text{ mg ES mL}^{-1}$, macération et décoction respectivement. Quant aux autres extraits, ils semblent avoir des pouvoirs de piégeage modérés à faibles en tenant compte de leurs IC_{50} obtenus. En outre, il a été observé une différence non significative entre les deux méthodes d'extraction, montrant que la température élevée pour l'extraction n'avait pas un effet considérable sur l'extraction des composés ayant la propriété de piégeage de radical.

Les résultats obtenus sont également comparable à ceux trouvés dans 1mg d'extrait hydroéthanolique ainsi que dans l'extrait d'acétate d'éthyle de *Scenedesmus sp* ($25,65 \pm 2,58\%$ et $52,02 \pm 2,61\%$ respectivement) (Bulut et al., 2019); aussi, l'extrait éthanolique et méthanolique de *N. gaditana* révèlent des valeurs d'IC₅₀ qui égales à $1,16 \pm 0,06$ mg/ml et $2,02 \pm 0,04$ respectivement (Kherraf et al., 2017). Les algues d'*Ulva prolifera* présentent aussi des taux d'IC₅₀ dans le même intervalle des résultats obtenus dans le présent travail (Farasat et al., 2014), contrairement aux études réalisées à propos des algues rouges, brune et vertes qui rapportent des taux d'IC₅₀ proches et même mieux par rapport aux taux obtenus par un antioxydant de référence (Cox et al., 2010). Tandis que, les espèces microalgales étudiées par Safafar et al., (2015) ainsi que Maadane et al., (2015) présentent des extraits aussi riches en composés ayant les propriétés de piégeage des radicaux libres, ce qui peut être dû à l'existence des groupes hydroxyles.

II.3.3.2 Corrélation entre les composés bioactifs et le pouvoir antiradicalaire par le test de DPPH

Dans le but de vérifier la relation entre le pouvoir antiradicalaire des extraits de microalgues et leur teneur en polyphénols, flavonoïdes et en caroténoïdes, le facteur de corrélation (r) entre le taux de ces biomolécules et les valeurs du pouvoir antiradicalaire appropriées a été déterminé dans le tableau II.5.

Tableau II. 5: Corrélation entre l'activité antiradicalaire et la teneur en polyphénols, flavonoïdes et les caroténoïdes

Extrait	DPPH	
	Macération	Décoction
Polyphénols	0,868	0,504
Flavonoïdes	0,141	0,469
Caroténoïdes	0,303	0,258

Les résultats obtenus montrent une corrélation importante pour la majorité des extraits qui égale à 0,868 entre l'activité antiradicalaire et les polyphénols utilisant la méthode de macération. Tandis qu'une corrélation moyenne de 0,504 et 0,469 ont été observées entre l'activité et les teneurs en polyphénols et flavonoïdes accordé par décoction respectivement, en ce qui concerne les pigments, une faible corrélation a été constatée.

Contrairement à quelques travaux antérieurs qui ont trouvé des corrélations non significatives entre l'activité antioxydante et les composés phénoliques et/ou les caroténoïdes (Shetty & Sibi, 2015; Maadane et al., 2015; Goiris et al., 2012); nos résultats concordent avec ceux d'études précédentes (Farasat et al., 2014; Bulut et al., 2019) suggérant que les composés phénoliques, qui dépendent fortement de la polarité du solvant utilisé, sont les principaux constituants en tant que piègeur des radicaux dans les microalgues, y compris la possibilité de contenir des dérivés de vitamines, d'acides organiques et de complexes métalliques qui peuvent aussi être détectés par le réactif du Folin (Everette et al., 2010).

II.3.3.4. Evaluation du pouvoir antiradicalaire par le test de blanchiment du β -carotène

Pour le test de BCB, les résultats obtenus ont été présentés dans la figure (II.7) par le pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations croissantes de chaque extrait, dont il ressort que tous les extraits inhibent le blanchiment du β -carotène à différentes valeurs par le piégeage du radical libre.

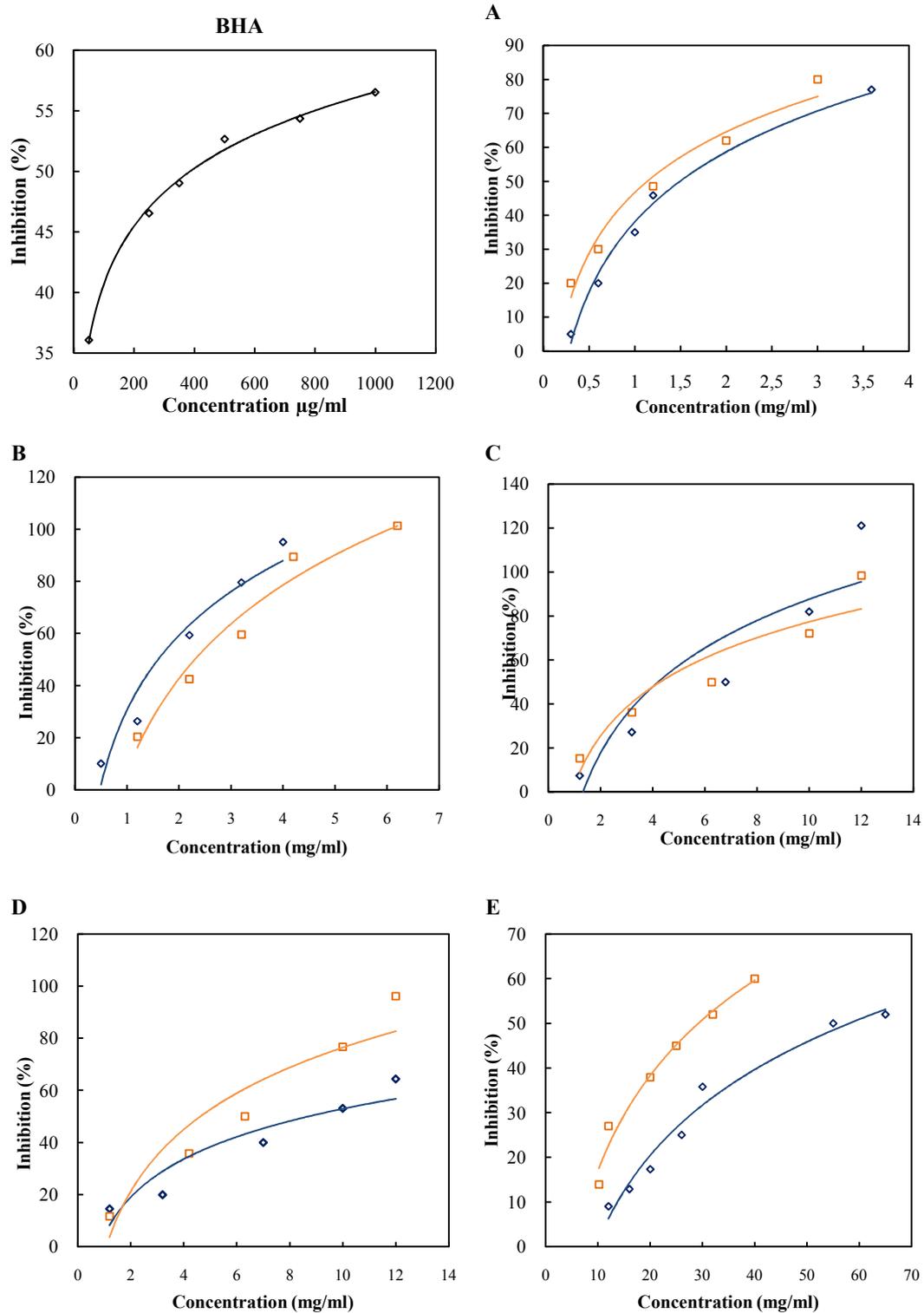


Figure II.7: Pourcentage d'inhibition du blanchiment du β -carotène en fonction des différentes concentrations utilisées de BHA et des extraits Chloroformique (A), Méthanolique (B), Hydroacétonique (C) Hydrométhanolique (D) & Aqueux (E).
 « \diamond : Macération et \square : Décoction »

La figure (II.8) présente la concentration inhibitrice de 50% de l'oxydation du β -carotène par les différents extraits (IC_{50} , mg ES mL⁻¹).

Selon les résultats obtenus, l'extrait chloroformique des deux méthodes d'extraction présente l'activité antioxydante la plus élevée avec une valeur d' IC_{50} de $1,58 \pm 0,3$ et $1,27 \pm 0,4$ mg ES mL⁻¹ respectivement, suivie par l'extrait méthanolique, hydroacétonique puis l'hydrométhanolique, dont elles sont comparables à celle obtenue dans les algues *Padina antillarum*, *Caulerpa racemosa* et *Kappaphycus alvarezzi* étudié par Chew et al., (2008). L'étude de Santos et al.,(2019) sur les algues marine aussi révèlent des concentrations si importante en comparant à celle d'un antioxydant de référence.

En ce qui concerne l'extrait aqueux, il a révélé le plus faible pouvoir antiradicalaire avec une IC_{50} égale à $55 \pm 0,6$ et $30 \pm 0,7$ mg ES mL⁻¹ (méthodes de macération et de décoction, respectivement). Il convient de noter que la capacité antioxydante de nos extraits a été augmentée en diminuant la polarité du solvant utilisé pour le processus d'extraction. Cela peut suggérer une coexistence en plus des composés phénoliques, d'autres biomolécules de nature peu et/ou moyennement polaire tels que les chlorophylles, les caroténoïdes et les phospholipides en particulier le phosphatidylcholine (Cox et al., 2010).

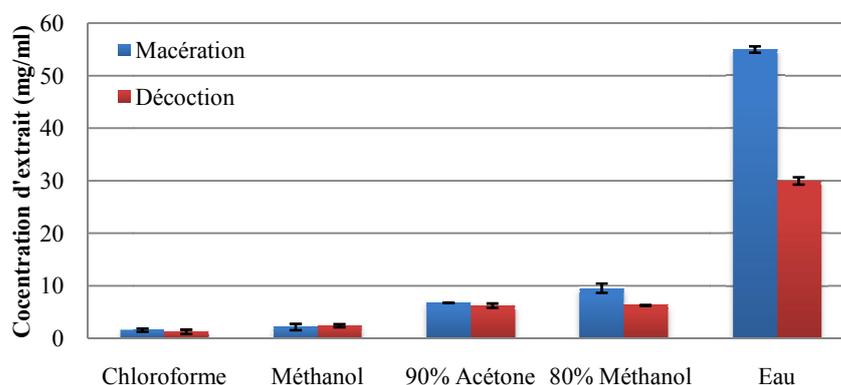


Figure II.8: Pourcentage d'inhibition BCB (IC_{50} , mg ES mL⁻¹) dans différents extraits de macération et de décoction. Moyenne \pm écart type de trois mesures expérimentales

II.3.3.5. Corrélation entre les composés bioactifs et le pouvoir antiradicalaire par le test de blanchiment du β -carotène

L'évaluation de corrélation (r) entre le pouvoir antiradicalaire par la méthode de BCB et le contenu total en composés phénoliques, flavonoïdes et caroténoïdes des microalgues extrait dans différents solvants, est présentée dans le tableau (II.6).

Tableau II. 6: Corrélation entre l'inhibition du test de blanchiment du β -carotène et la teneur en polyphénols, flavonoïdes et les caroténoïdes

Extrait	BCB	
	Macération	Décoction
Polyphénols	0,587	0,723
Flavonoïdes	0,69	0,952
Caroténoïdes	0,636	0,929

Une forte corrélation positive et significative qui égale à 0,952 a été obtenu entre la teneur en flavonoïdes obtenu par décoction et le pouvoir antiradicalaire; aussi, les résultats indiquent une forte corrélation avec les pigments obtenus par décoction (0,929). Alors que, concernant les teneurs en polyphénols (décoction et macération), leurs facteurs de corrélation montrent qu'il ya une bonne contribution des polyphénols dans l'inhibition de l'autoxydation du β -carotène. Cependant, il existe toujours des divergences, selon des travaux antérieurs, concernant la contribution des composés phénoliques et les caroténoïdes à l'activité antiradicalaire, et cela est du à la méthode de détection des antioxydants présent dans l'extrait. Si le test de BCB nous indique beaucoup plus sur les composé lipophile (Chew et al., 2008), ceci peut être confirmé par la forte corrélation en pigments ainsi que par la présence d'autres composés lipophiles tels que les lipides.

II.3.3.6. Pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP)

La figure II.10 montre les résultats de l'activité réductrice de chaque extrait de microalgue obtenus par macération et décoction. Selon les résultats obtenus, l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle aux concentrations utilisées de nos extraits, qui signifient la contribution des antioxydants donneurs des électrons, présents dans les différents extraits

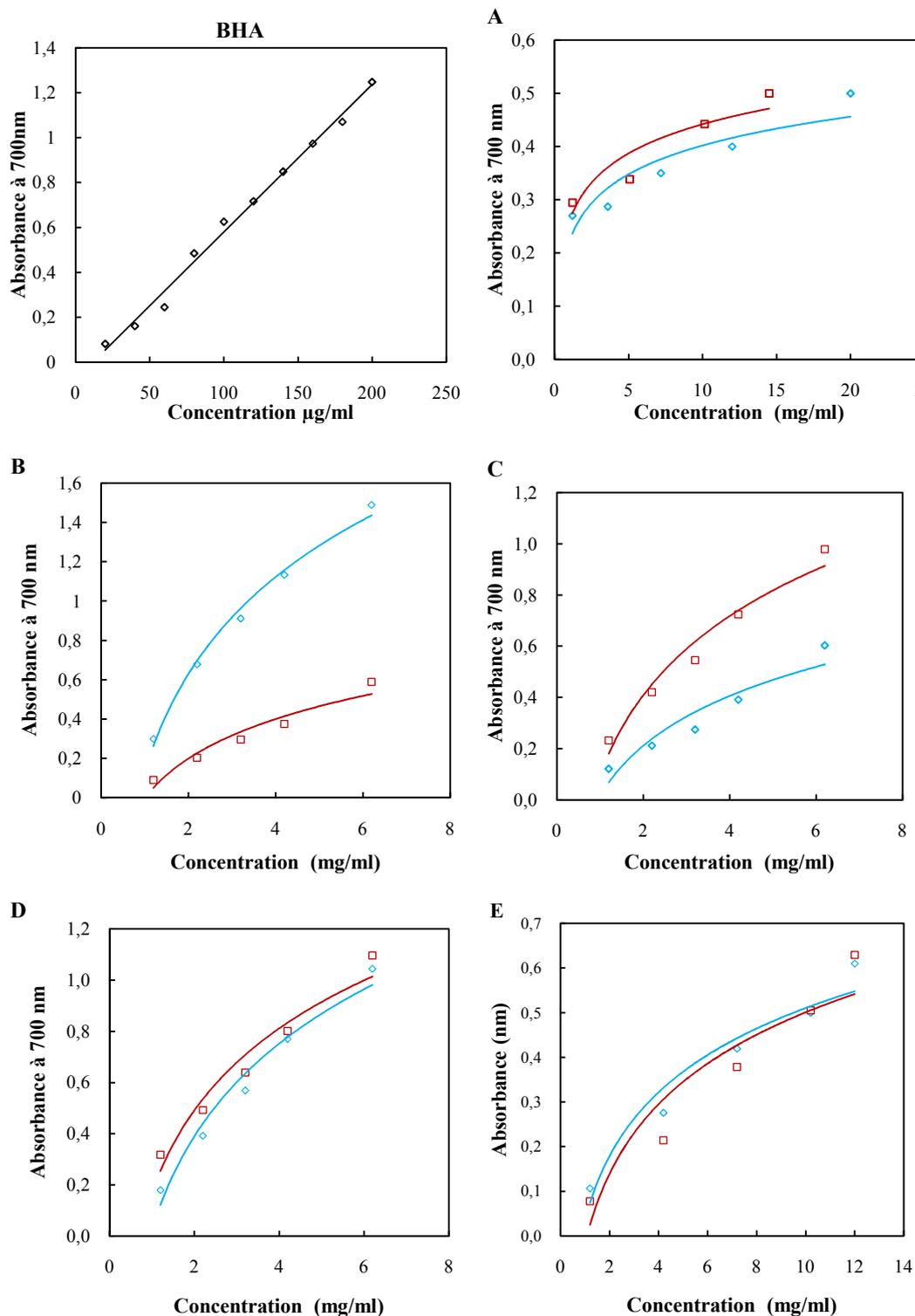


Figure II.9: Pouvoir réducteur des différentes concentrations de BHA et des extraits Chloroformique (A), Méthanolique (B), Hydroacétonique (C) Hydrométhanolique(D) & Aqueux (E). « —◇— : Macération et —□— : Décoction »

Les EC_{50} déterminées graphiquement de chaque extrait de microalgue sont présentées dans la figure (II.14). Il est bien évident que l'extrait méthanolique utilisant la méthode de macération ($1,7 \pm 0,6$ mg ES mL^{-1}) présente la plus forte capacité de réduction, suivie par l'extrait hydrométhanolique ($2,76 \pm 0,9$ et $3,13 \pm 0,08$ mg ES mL^{-1} obtenu par la méthode de macération et décoction, respectivement) et hydroacétonique ($2,78 \pm 0,6$ mg ES mL^{-1}). Contrairement au teste de BCB, la capacité de réduction la plus faible a été présentée par l'extrait chloroformique ($20,3 \pm 0,3$ et $14,5 \pm 0,4$ mg d'ES mL^{-1}) suivi par l'extrait aqueux ($9,44 \pm 0,6$ et $9,78 \pm 0,44$ mg ES mL^{-1} macération et décoction). En revanche des extraits aqueux des algues brunes de *S.vulgare*, dont il révèle une forte activité de réduction (Santos et al., 2019). L'extrait moyennement polaire de *Scenedesmus sp.* (hydroéthanolique), ainsi que celui de *Desmodesmus sp* (méthanolique) aussi révèle un pouvoir réducteur important similaire à nos résultats, ce qui indique la présence des antioxydants capables de transférer un électron pour la réduction du Fe^{3+} à Fe^{2+} (Bulut et al., 2019; Safafar et al., 2015).

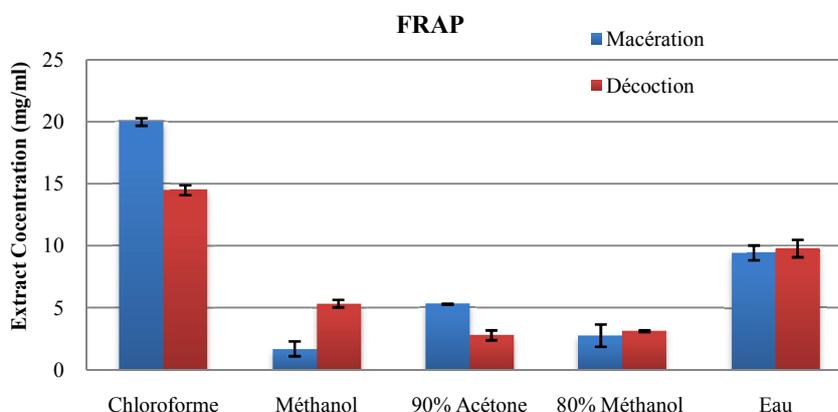


Figure II.10: Pourcentage d'inhibition FRAP (EC_{50} , mg ES mL^{-1}) dans différents extraits par la méthode de macération et de décoction. Moyenne \pm écart type de trois mesures expérimentales

I.3.3.7. Corrélation entre les composés bioactifs et le pouvoir réducteur

Le tableau (II.7) présente la corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en polyphénols, flavonoïdes et en caroténoïdes des extraits obtenus par des solvants de différente polarité ainsi que les deux méthodes d'extraction.

Tableau II. 7: Corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en polyphénols, flavonoïdes et les caroténoïdes

Extrait	FRAP	
	Macération	Décoction
Polyphénols	0,779	0,417
Flavonoïdes	0,78	0,787
Caroténoïdes	0,488	0,841

L'effet le plus marqué correspond à la contribution des pigments obtenus par décoction qui présente un $r = 0,841$ suivis des composés phénoliques (flavonoïdes et polyphénols). En plus de son pouvoir antiradicalaire important, les caroténoïdes montrent une capacité de réduction aussi importante basés sur les réactions de transfert d'électron, et cela est en plus des principaux constituants contributeurs au pouvoir antioxydant tels que les polyphénols. La corrélation entre le contenu en caroténoïdes ainsi les polyphénols, et le pouvoir de réduction de fer avait déjà été rapportée et confirmée auparavant (Safafar et al., 2015; Goh et al., 2010). Cependant, une corrélation non significative a été indiquée entre le pouvoir réducteur et la teneur en flavonoïdes dans les travaux de Bulut et al., (2019), ou encore, les rapport dans la littérature sur les flavonoïdes dans les microalgues semblent être généralement rares (Bulut et al., 2019).

II.3.4. Identification des polyphénols par analyse chromatographique HPLC

Globalement, selon les résultats obtenu concernant l'estimation des polyphénols totaux ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante des différents extrait, le méthanol était le solvant le plus efficace pour l'extraction des propriétés antioxydantes de ces microalgues par la méthode de macération, qui révèle une concentration importante en polyphénols ($58,45 \pm 7,6$ mg GAE/ g ES) ainsi qu'un pouvoir antiradicalaire

avec une IC50 de $2,04 \pm 0,6$ et $2,18 \pm 0,6$ mg ES/mL pour le test de DPPH et BCB respectivement, et un pouvoir réducteur de $1,7 \pm 0,6$ mg ES/mL.

Une analyse complémentaire de l'extrait méthanolique, pour l'identification des polyphénols a été effectuée par HPLC. La Figure (II.13) présente le chromatogramme obtenus dont quatre (4) molécules de polyphénols ont été identifiées: *l'acide Gallique*, la *catéchine*, la *syringique* et la *naringinine*, en comparant le temps de rétention du pic approprié avec ceux des étalons présentés dans la banque de donnés de l'appareil.

Généralement, l'acide gallique est parmi les polyphénols les plus abondants dans les microalgues, *Desmodesmus sp.*, *Nanochloropsis limnetica* et *Nannochloropsis salina* montrent des teneurs intéressantes, mais pas aussi importante que celle trouvée dans la *Scenedesmus sp.* qui révèle $653,6 \pm 54,3 \mu\text{g/g}$ MS d'acide gallique en plus de $4,5 \pm 2,2 \mu\text{g/g}$ MS d'acide syringique dans l'extrait d'acétate d'éthyle. (Safafar et al., 2015, & Bulut et al., 2019). Il existe peu d'études, à notre connaissance, sur la détection des composés phénoliques dans les microalgues utilisant la chromatographie HPLC, qui nous permettent de comparer nos résultats.

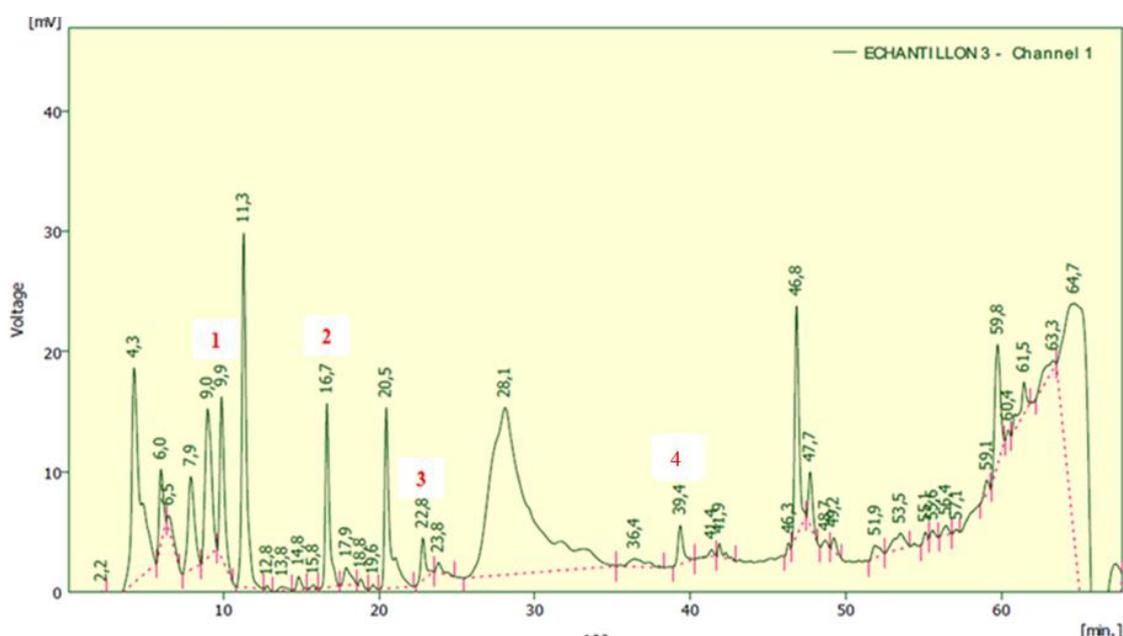


Figure II.11: Identification des polyphénols dans l'extrait microalgale méthanolique de macération par HPLC « colonne C18, Débit : 1 ml/min, Phase mobile : MeOH/H₂O acidifiée 0,1% ACN, Température : 25°C et détection à 254 nm ».

1. Acide Gallique, **2.** Catéchine, **3.** Syringique, **4.** Naringinine

II.4. CONCLUSION

Sur la base des résultats présentés, le mélange microalgale étudié montre une variété de molécule antioxydant naturelle telle que des teneurs en polyphénols, flavonoïdes ainsi qu'en pigments importantes. Ces résultats, nous ont permis aussi de conclure que les différents extraits obtenus relatif aux différents solvants (polarité), possèdent de modestes propriétés antioxydantes, confirmé par la détermination du facteur de corrélation indiquant une forte contribution des polyphénols par un pouvoir antiradicalaire (le piégeage du radical libre DPPH•); et une bonne capacité des caroténoïdes et des flavonoïdes, contenant les extraits, à l'inhibition de la peroxydation du β -carotène; ainsi qu'avec un pouvoir réducteur bien remarquable des trois groupement moléculaire étudiés (polyphénols, flavonoides et caroténoids).

L'extrait méthanolique de macération s'est montré plus efficace vis-à-vis les autres extraits obtenus, par une teneur en biomolécules estimé plus importante capables d'agir comme agent antioxydant tels que les polyphénols, flavonoïdes et les pigments. L'analyse par HPLC nous a permis d'identifier quatre composés phénoliques dans l'extrait méthanolique « *Acide Gallique, Catéchine, Syringique et Naringinine* ».

Des études complémentaires sont nécessaires pour l'isolement et la caractérisation des antioxydants actifs, car il pourrait y avoir un potentiel d'utilisation de tels extraits ou composés bioactifs dans le traitement de diverses maladies liées au stress oxydatif, ou encore dans un large éventail de produits alimentaires.

CHAPITRE III

DESTRUCTION CELLULAIRE

&

FRACTIONNEMENT DES PRINCIPAUX COMPOSANT

III.1. INTRODUCTION

Dans le monde entier, la biomasse microalgale a récemment suscité un intérêt considérable en raison de leur potentiel dans les domaines des énergies renouvelables, du secteur biopharmaceutique et de la production nutraceutique. Ils représentent une source renouvelable, durable et économique de biocarburants, de médicaments bioactifs et d'ingrédients alimentaires (Trivedi et al., 2015).

Les principaux bioproduits comprennent les protéines (40 à 60 %), les polysaccharides (8 à 30 %), les lipides (5 à 60 %), pigments, vitamines et antioxydants (Sialve & Steyer, 2013; Khan et al., 2018). Les polysaccharides peuvent être utilisés comme source de carbone dans les processus de fermentation (Zhu, 2014) mais aussi comme additifs alimentaires. Quant aux protéines, ils peuvent être utilisées dans l'alimentation humaine ou dans l'alimentation animale, ainsi qu'elles peuvent également être utilisées dans la production de peptides bioactifs (le domaine pharmaceutique) (Bleakley & Hayes, 2017). D'autres travaux aussi montrent l'utilisation des acides gras polyinsaturés comme nutraceutiques dans les préparations pour nourrissons et comme suppléments nutritionnels (Kris-Etherton et al., 2000), de plus, les pigments sont importants en tant que colorants naturels. La teneur élevée en lipide, fait de cette matière première un atout précieux pour les carburants liquides renouvelables tels que le biodiesel et le bioéthanol, dont des travaux antérieurs, et de plus en plus nombreuses, le démontrent clairement (Kris-Etherton et al., 2000; Halim, et al., 2012).

La composition biochimique dépend principalement de l'espèce et des conditions de culture (Trivedi, et al, 2015). Ainsi, la stratégie de bioraffinage en aval doit dépendre à la base du type de microalgue traitée, en tenant compte de la nature différente (ex: hydrophile ou hydrophobe) des composés à récupérer et la durabilité du processus. Les études rapportées dans la littérature ont démontré que les étapes les plus critiques pour récupérer des biomolécules présentes à l'intérieur sont la rupture cellulaire et le fractionnement des produits obtenus par une technologie propre (Dixon & Wilken, 2018; Lee, et al. 2017; Kapoore et al., 2018). En général, les étapes de rupture de la paroi cellulaire et d'extraction de bioproduits sont suivies de fractionnement et/ou purification de différents composants. Le mélange contient une phase solide

et une phase liquide avec des molécules hydrophiles et hydrophobes. Cette solution hétérogène nécessite donc une stratégie de récupération, qui séparera chaque fraction en fonction de la nature du produit cible. L'extraction de pigments et de lipides à partir de microalgues, en tant que molécules hydrophobes, implique généralement l'utilisation de solvants organiques, tels que le chloroforme, le n-hexane et le propan-2-ol. Cependant, les solvants idéaux doivent non seulement être très sélectifs vis-à-vis des molécules hydrophobes, mais également être peu coûteux, non/peu nocif à la santé et l'environnement et éventuellement volatils, pour pouvoir être éliminés à la fin du processus (Ventura et al., 2017). La séparation mécanique est une autre approche de récupération consistant à séparer les composants afin d'éviter l'utilisation des solvants et des produits chimiques ou des produits chimiques nocifs pour l'environnement.

Pour améliorer la rentabilité des processus et promouvoir la récupération des biomolécules de microalgues à l'échelle industrielle, il convient de prendre en compte la robustesse des processus, l'efficacité énergétique, la minimisation de l'impact environnemental et la qualité du produit (Gerardo, et al., 2015; Halim et al., 2012; Trivedi et al., 2015; Wijffels & Barbosa, 2010; Williams & Laurens, 2010). Les processus membranaires sont considérés comme des "processus alternatifs", ils sont actuellement utilisés pour la récolte et la déshydratation des microalgues (Rios, et al., 2011; Ríos, et al., 2012; Nurra, et al., 2014; Singh & Patidar, 2018; Zhang & Fu, 2018; Monte et al., 2018). Cependant, sans prétraitement spécifique, généralement ils ne sont pas durables pour le traitement des microalgues en raison du phénomène de colmatage (Fasaei, et al., 2018). Peu d'études ont été menées sur la récupération/purification des composés biologiques (Giorno, et al., 2013; Patel et al., 2013; Pugh, et al., 2001; Safi, et al., 2014; Safi et al., 2017; Suarez Garcia et al., 2018), la plupart d'entre eux se concentraient généralement sur l'extraction des lipides. Les processus de prétraitement (pour détruire la paroi cellulaire et extraire les biocomposants) peuvent emprunter des voies alternatives en fonction du composé final souhaité (ex: pour récupérer les lipides, la technique récente d'extraction par solvant organique assistée par micro-ondes semble être l'approche la plus prometteuse (Halim et al., 2012; Safi et al., 2017; Suarez Garcia et al., 2018)). Toutefois, dans le cadre d'une stratégie dite « d'économie circulaire », la valorisation des principaux composés à haute valeur

ajoutée par l'utilisation des solvants alternatifs et des technologies environnementales est recherchée. De l'avis général, la valeur élevée des différents produits finaux est susceptible d'accroître la valeur totale de la biomasse de microalgues (Dixon & Wilken, 2018). Pour ces raisons, l'objectif de ce travail est d'étudier une approche alternative pour valoriser les principaux constituants de la biomasse de microalgues, le fractionnement des composés hydrophobes des composés hydrophiles avec une stratégie de bioraffinage durable et adaptée. La solution d'alimentation est représentée par des espèces de microalgues récoltées dans le barrage de Hammam Boughrara situé à Tlemcen (nord-ouest de l'Algérie). Après la rupture cellulaire, une extraction solide-liquide-liquide avec un solvant alternatif a été utilisée pour fractionner les principaux composés hydrophobes des composés hydrophiles. La solution aqueuse récupérée a ensuite été traitée par ultrafiltration (UF) pour fractionner davantage les biomolécules restantes. Le matériau membranaire permettant de fractionner les bioproduits hydrophiles a été identifié sur la base de la récupération de la perméabilité la plus élevée après les tests d'adsorption. La combinaison de l'extraction au solvant écologique et du procédé d'UF a permis une récupération élevée des triglycérides (TAG) et des pigments dans le solvant organique, ainsi qu'une récupération élevée des protéines et des glucides dans le retentât du processus d'UF. Les TAGs qui sont restés dans la solution aqueuse ont été séparés dans le perméat d'UF avec une pureté élevée.

III.2. DESTRUCTION CELLULAIRE**III.2.1. Matériels et méthodes***III.2.1.1. Solvants et réactifs utilisés*

Le tableau III-1 regroupe les solvants et les réactifs utilisés au cours des expérimentations et analyses réalisées.

Tableau III. 1 : Solvants et réactifs utilisés pour les expérimentations

Nom du produit	CAS	Fournisseur
Acétate d'éthyle	141-78-6	VWR
Acétone HPLC	67-64-1	Sigma-Aldrich
Acide gallique	149-91-7	Sigma-Aldrich
Acide sulfurique	7664-93-9.	Sigma-Aldrich
Carbonate de sodium	497-19-8	Sigma-Aldrich
Catéchine	154-23-4	Sigma-Aldrich
Glucose	50-99-7	Sigma-Aldrich
Hexane	110-54-3	Sigma-Aldrich
Hydroxyde de sodium	1310-73-2	Merck
Méthanol HPLC	67-56-1	Sigma Aldrich
Méthoxycyclopentane (CPME)	5614-37-9	VWR
Phénol	108-95-2	Sigma-Aldrich

III.2.2.2. Biomasse microalgale

L'étude de cette partie a été portée sur le mélange microalgale après lyophilisation (culture naturelle) collectés du barrage de Hammam Boughrara, du bassin hydrographique de la Tafna, situé au nord-ouest de la province de Tlemcen (Algérie).

(Veuillez trouver les détails dans le chapitre précédent "II.2.2").

III.2.3. Destruction de la paroi cellulaire

Afin de briser la paroi cellulaire des microalgues lyophilisées précédemment, différentes méthodes mécaniques ont été testées, notamment un vortex et un homogénéisateur à grande vitesse sous forme de forces de cisaillement solide d'une part, et sous forme de transfert d'énergie par des ondes en utilisant un bain à ultrasons d'une autre part, dont leur efficacité a été constatée après la lyse cellulaire par l'évaluation de l'énergie consommée et par des études de microscopie optique (pour évaluer la rupture des cellules) et en mesurant la concentration des biomolécules libérées dans la phase aqueuse.

Avant tout traitement de destruction, les cellules sèches ont été réhydratées vigoureusement dans de l'eau distillée (2,5 mg/mL) pour assurer une bonne homogénéité de l'échantillon.

III.2.3.1 Destruction cellulaire par vortex (V)

Un mélangeur Vortex est utilisé pour assurer un mouvement tourbillonnaire sur un axe, provoquant une pression sur le fluide ou les particules entourant sous forme de forces de cisaillement.

Un mélangeur Maxi Mix plus Vortex (M63210-33) avec une vitesse maximale de 3200 tr/min et une puissance de 26 W a été utilisé pour traiter 50 g de la solution en suspension pendant 1 mn à température ambiante.

III.2.3.2. Destruction cellulaire par un bain ultrasonique (US)

La rupture cellulaire provoquée par les ultrasons est causée par l'énergie des ondes acoustiques à haute fréquence qui déclenche un processus de cavitation et une onde de choc qui se propage et forme des jets dans le milieu environnant appelée des forces de cisaillement.

Le traitement de 250 g de la suspension microalgale par les ultrasons a été réalisé à l'aide d'un bain ultrasonique (VWR International, 120 W) à une fréquence de 45 kHz pendant 10 mn à température ambiante.

III.2.3.3. Destruction cellulaire par homogénéisateur à grande vitesse (HSH)

Un homogénéisateur à grande vitesse est un dispositif qui consiste généralement à un ensemble stator-rotor, de préférence en acier inoxydable. Les mécanismes efficaces de rupture cellulaire sont la cavitation hydrodynamique, générée par l'agitation à grande vitesse, et les forces de cisaillement à l'interphase solide-liquide.

La suspension des cellules microalgales (250 g) a été traitée à l'aide d'un homogénéisateur d'une puissance de 475 W (VelpScientifica OV5) à une vitesse de fonctionnement choisie de 10 000 tr/mn pendant 5 mn et à température ambiante.

III.2.4. La consommation spécifique d'énergie

Pour permettre la comparaison entre les différentes techniques, dans ce travail, la consommation spécifique d'énergie (kJ/kg) a été calculée en énergie totale consommée (kj) pour traiter 1 kg de biomasse de microalgues sèches. D'où la comparaison est plus indicative que quantitative et considérée valable que si les conditions utilisées sont similaires (la même concentration et la même biomasse microalgale).

La consommation spécifique d'énergie (W) de chaque traitement a été évaluée comme suit (Grimi et al., 2014):

$$W = W_{in} \cdot t / m \quad (III.1)$$

Où W_{in} représente la puissance de l'instrument, t correspond au temps de traitement (seconde) et m correspond à la masse traitée de la suspension microalgale (g).

III.2.5. Caractérisation des extraits de microalgue

III.2.5.1. Analyse microscopique

Le microscope optique nous permet de visualiser les échantillons qui sont invisibles à l'œil nu, il est muni d'un objectif et d'un oculaire qui permet de grossir l'image de l'objet avec son pouvoir de résolution afin d'obtenir une image agrandie observable à l'œil nu.

Les suspensions de microalgues ont été observées avec un microscope optique (Zeiss, model Axiovert 25, Carl Zeiss S.p.A., Milan, Italy). L'unité de détection du microscope était équipée d'une caméra (JVC, model TK-C1481BEG, Carl Zeiss S.p.A., Milan, Italy) et d'un ordinateur personnel. Les images ont été analysées par le programme d'imagerie Scion.

III.2.5.2. Quantification des biomolécules

Après le traitement de la suspension microalgale, les échantillons ont été prétraités en utilisant une centrifugeuse à grande vitesse (Scan Speed 1248R, Refrigerated Multi-purpose Centrifuge, Lyngø, Denmark) pendant 5 min à 9000 tr/min et à 20°C pour la quantification des différents biomolécules (glucides, triglycérides, protéines, polyphénols, flavonoïdes et pigments) présentes dans la solution aqueuse (surnageant obtenu).

III.2.5.2.1. Détermination de la teneur en glucide

La teneur en glucides dans les différents extraits de microalgue a été déterminée à l'aide de la méthode au phénol et à l'acide sulfurique (Albalasmeh et al., 2013). Elle est considérée comme la méthode colorimétrique la plus largement utilisée à ce jour pour la détermination de la concentration 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.

Le dosage des polyphénols a été réalisé selon le protocole suivant:

- 1 mL de l'extrait est mélangé avec 0,5 mL du phénol à 5% ;
- 2,5 mL d'acide sulfurique concentré sont ajoutés au mélange ;
- Agitation des tubes à essai à l'aide d'un vortex pendant 30 secondes;
- Incubation pendant 20 minutes à température ambiante.

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) ;

$$\text{Glucides} = \frac{a \cdot f}{C} \quad (\text{III.2})$$

- **a** : Concentration des glucides (mg/mL) déterminée à partir de la courbe étalonnage ;
- **C** : Concentration de l'extrait ;
- **f** : Facteur de dilution.

III.2.5.2.2. Détermination de la teneur en triglycérides (TAGs)

La teneur en TAG a été mesurée à l'aide d'un kit de quantification des triglycérides (Abcam Cambridge, MA) en suivant les instructions du fabricant relatives au dosage colorimétrique. Cet essai est simple et sensible, qui peut détecter des triglycérides de 2 pmol à 10 nmol dans divers échantillons biologiques.

Dans cette analyse, les triglycérides sont convertis en acides gras libres et en glycérol. Le glycérol est ensuite oxydé pour générer un produit qui réagit avec la sonde pour générer une couleur mesuré à une longueur d'onde de 570 nm (Shimadzu UV-160A, Japon).

La teneur en TAG a été déterminée selon le protocole indiqué par le fabricant :

- Addition de 2 μL de la solution de lipase dans un tube à essai contenant 50 μL de l'extrait,
- Agitation des tubes à essai à l'aide d'un vortex;
- incubation du mélange pendant 20 minutes à température ambiante;
- Addition de 50 μL du mélange réactionnel de triglycérides;
- Incubation pendant 60 minutes à température ambiante;

L'absorbance de la solution a été mesurée à 570 nm. Le triglycéride a été utilisé comme solution de référence pour la courbe d'étalonnage dans les mêmes conditions opératoires à des concentrations comprises entre 0,2 et 10 nmol.

La concentration de triglycérides en nmol/ μL dans les échantillons est calculée comme suit :

$$\text{Triglycérides} = \frac{C}{V} * f \quad (\text{III.3})$$

- **C** : Concentration des triglycérides (nmol) déterminée à partir de la courbe d'étalonnage;
- **V** : volume de l'extrait (μL)
- **f** : Facteur de dilution ;

III.2.5.2.3. Détermination de la teneur en protéine

La concentration de protéines dans différents extraits a été mesurée par la méthode de BCA (Mallia et al., 1985), en utilisant le kit « Thermo Scientific Pierce BCA ». Ce test est principalement basé sur la réduction de Cu^{+2} en Cu^{+1} par une protéine en milieu alcalin (la réaction du biuret) avec la détection colorimétrique hautement sensible et sélective du cation cuivreux (Cu^{+1}) en utilisant un réactif unique contenant de l'acide bicinchoninique. Le produit de réaction de couleur violette de cette analyse est formé par la chélation de deux molécules de BCA avec un ion cuivreux. Ce complexe hydrosoluble présente une forte absorbance à 562 nm.

La détermination de la concentration des protéines a été réalisée selon le protocole suivant :

- Pipeter 0,1 mL de chaque extrait dans un tube à essai;
- Ajouter 2 mL de la solution réactionnelle préparée (50 :1, Réactif A:B) à chaque tube et bien mélanger;
- Couvrir et incuber les tubes pendant 30 min à 37°C;
- Refroidir tous les tubes à température ambiante.

Note: le kit contient l'albumine de sérum bovin (BSA) et les réactifs A et B.

- **Réactif «A»** est une solution contenant du carbonate de sodium, bicarbonate de sodium, acide bicinchoninique et tartrate de sodium dans 0,1 M de l'hydroxyde de sodium.
- **Réactif «B»** contenant 4% de sulfate de cuivre

La lecture de l'absorbance de la solution a été effectuée contre un blanc (Eau distillée) à 562 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'albumine de sérum bovin (BSA) a été utilisée comme solution de référence pour la courbe d'étalonnage dans les mêmes conditions opératoires, à des concentrations comprises entre 0 et 1 mg/mL.

$$\text{Protéine} = \frac{a \cdot f}{c} \quad (\text{III.4})$$

- **a** : Concentration des protéines (mg/ml) déterminée à partir de la courbe d'étalonnage ;
- **C** : Concentration de l'extrait ;
- **f** : Facteur de dilution.

III.2.5.2.4. Détermination de la teneur en polyphénols

La teneur en polyphénols dans les différents extraits a été réalisé en utilisant la méthode de Folin–Ciocalteu (Singleton et al., 1999). Dont le mode opératoire est bien décrit auparavant dans le chapitre précédent (Chapitre II).

III.2.5.2.5. Détermination de la teneur en flavonoïdes

L'estimation de la quantité des flavonoïdes présente dans l'extrait a été déterminée selon la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl_3) et la soude (NaOH) (Ardestani & Yazdanparast, 2007). Dont le mode opératoire est bien décrit auparavant dans le chapitre précédent (Chapitre II).

III.2.5.2.6. Détermination de la teneur en pigments

La teneur en pigments libérée par les microalgues après chaque procédé de destruction cellulaire, a été évalué en prélevant 400 μL du surnageant aqueux et le mélanger avec 1600 μL d'acétone, afin d'utiliser les équations de Lichtenthaler et Caus concernant les extraits de d'acétone/eau (80:20 ; v/v). L'absorbance de la solution a été ensuite mesurée à 470, 663,2 et 646,8 nm pour la quantification de la chlorophylle a (Chla), chlorophylle b (Chlb) et les caroténoïdes selon les équations suivantes (Lichtenthaler & Claus, 2001) :

$$\text{Chla (mg/L)} = 12,25 A_{663,2} - 2,79A_{646,8} \quad (\text{III.5})$$

$$\text{Chlb (mg/L)} = 21,5 A_{646,8} - 5,1A_{663,2} \quad (\text{III.6})$$

$$\text{Caroténoïdes(mg/L)} = (1000A_{470} - 1,82 \text{ Chla} - 85,02 \text{ Chlb})/198 \quad (\text{III.7})$$

III.2.6. Résultats et discussions

III.2.6.1. Destruction de la paroi cellulaire

III.2.6.1.1. Analyse microscopique

Afin de briser la paroi cellulaire des microalgues, différentes méthodes ont été testées et leur efficacité a été contrôlée en observant la solution obtenue après chaque méthode, par observation sous un microscope optique ainsi qu'en mesurant les biomolécules libérées dans la phase aqueuse.

La figure III.1 montre les images d'observation microscopique obtenues des cellules de microalgues avant et après chaque méthode de destruction cellulaire. Avant le traitement, les cellules lyophilisées avaient une forme approximativement sphérique et d'un diamètre moyen d'environ 7 μm (Fig. III.1a). En ce qui concerne les cellules en suspension après traitement au vortex (Fig. III.1b) se sont révélées moins agrégées, et semblent rester intactes. Par contre, les cellules étaient complètement fragmentées après traitement par l'homogénéisateur (Fig. 1c) où la destruction des cellules microalgales par les ultrasons, détruisant efficacement la paroi cellulaire (Fig. 1d).

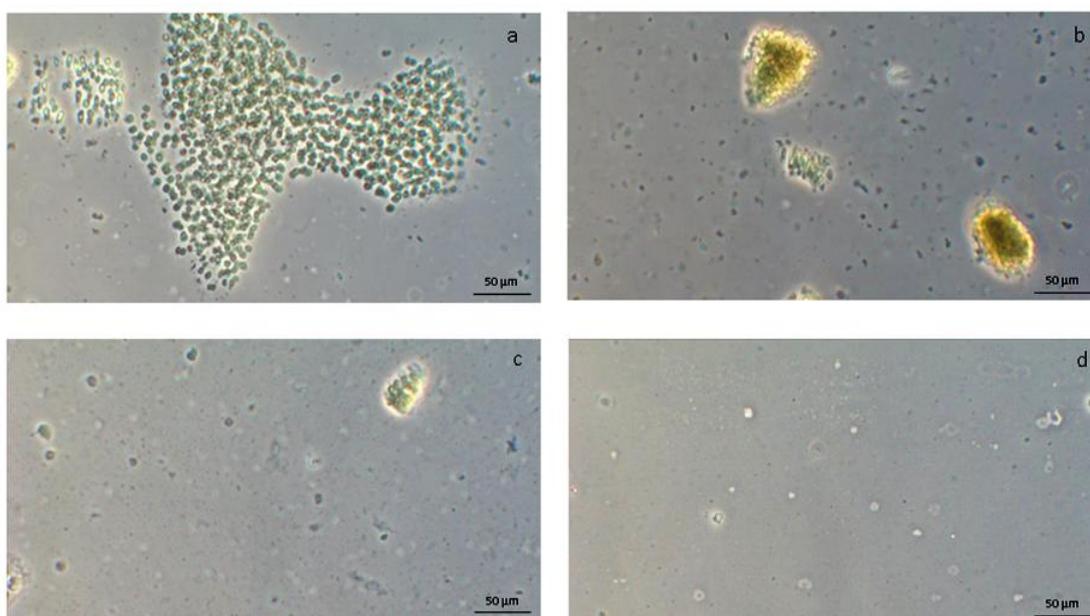


Figure III.1 : Images microscopiques des cellules de microalgue avant et après destruction. (a) Cellules de microalgue non traitée (Lyophilisées); (b) Cellules de microalgue vortexées; (c) Cellules de microalgue homogénéisées; et (d) Cellules de microalgue soniquées

III.2.6.1.2. Effet de la destruction cellulaire sur la libération des biomolécules

La figure III.2 illustre la teneur en protéines, glucides et triglycérides (TAGs) dans les surnageants aqueux de microalgues non traitées et détruites, en utilisant les trois méthodes de destructions. On constate que les biomolécules étaient également présentes dans la phase aqueuse de cellules lyophilisées réhydratées. Cela est due à la formation des pores sur les parois cellulaires pendant la lyophilisation qui facilite la libération des biomolécules lorsque les cellules sont remises en suspension dans de l'eau (Unterlander et al., 2017).

La plus grande quantité de protéine a été obtenue dans les surnageants des cellules détruites par la sonication. $301,77 \pm 7,1$ mg de protéine/g de MS, environ 80 mg de plus de cellules non traitées. Au contraire, la quantité de protéines après traitement au vortex et homogénéisation était similaire à celle des microalgues non traitées. La teneur en glucides était également plus élevée dans le surnageant des cellules traitées par la sonication; il était estimé d'environ le double ($82,8 \pm 8,7$ mg de glucides/g de MS) par rapport au surnageant des cellules non traitées ($42,61 \pm 2,2$ mg de glucides/g de cellules sèches). L'homogénéisation libère également une quantité importante de glucides ($72,73 \pm 2,7$ mg de glucides/g de MS) tandis que le vortex donne un contenu comparable aux cellules non traitées. L'augmentation de la récupération des glucides après le traitement par ultrasons est probablement liée à la perturbation des parois cellulaires et des chloroplastes dans lesquels ils sont principalement concentrés (effet de cavitation). Ce phénomène a déjà été décrit dans la littérature sur les cellules de *Chlorella vulgaris* (Ho, et al, 2013; Zheng et al., 2011).

La quantité des TAGs dans les surnageants (Fig. III.2) de la solution des microalgues lyophilisées était plus élevée ($251,15 \pm 19,6$ mg TAG/g de MS) que dans les cellules traitées, dont la plus faible concentration estimée ($143,74 \pm 18$ mg TAG/g de MS) a été trouvée dans le surnageant de microalgues traitées par vortex. Cette tendance a déjà été observée parce que, après une rupture cellulaire, une agrégation « réadsorption » lipidique peut être remarquée sur les petites particules de cellules qui peut être constatée sous les forces mécaniques utilisées pour briser les cellules (Halim et al., 2012). C'est la raison pour laquelle une procédure alternative pour les fractionner des autres molécules hydrophiles a été envisagée et décrite dans la partie suivante.

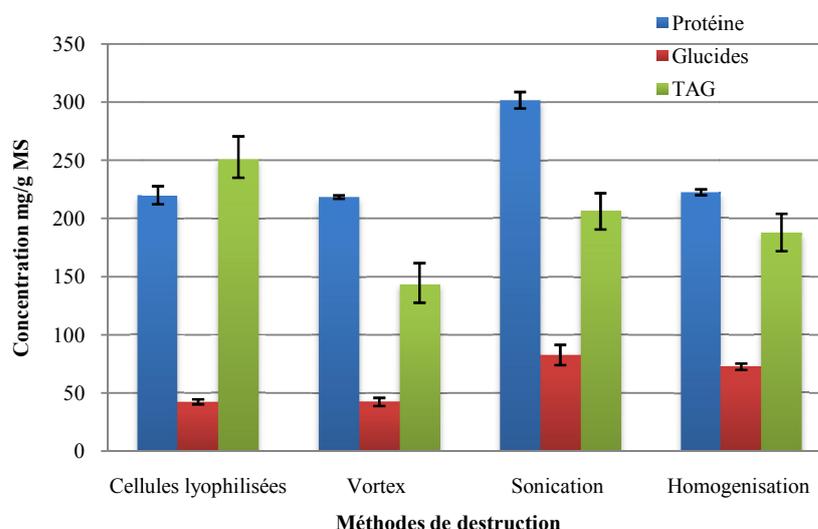


Figure III.2 : Teneur des protéines, des glucides et des TAGs libérée dans l'eau après chaque technique de destruction cellulaire

La quantité des polyphénols et des flavonoïdes (Fig. III.3) était plus élevée dans le surnageant obtenu dans des suspensions de cellules traitées par sonication ou homogénéisation par rapport au procédé de vortex et aux cellules non traitées (lyophilisés).

La quantité des polyphénols était de $20,8 \pm 0,3$ mg/g de MS dans une solution traitée aux ultrasons, contre $14 \pm 0,2$ mg/g de MS dans la solution des cellules non traitées. Un résultat similaire a été observé pour l'extraction des flavonoïdes, après traitement par sonication, la quantité des flavonoïdes obtenue était trois fois supérieure à celle des cellules non traitées. La teneur en polyphénols et flavonoïdes suit la séquence sonication > homogénéisation > vortex > non traitée.

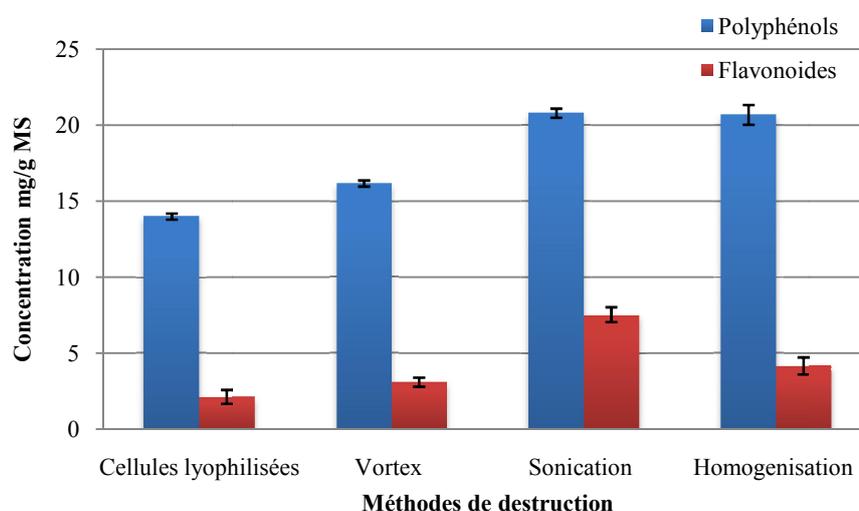


Figure III.3 : Teneur des polyphénols et des flavonoïdes libérée dans l'eau après chaque technique de destruction cellulaire.

La figure III.4 présente la concentration des pigments dans les surnageants pour chaque méthode de destruction. Une très petite quantité de pigments, tels que la chlorophylle a, b et les caroténoïdes, a été trouvée dans chacun d'entre eux après l'ordre sonication > homogénéisation > vortex. Le surnageant des suspensions soniquées contenait 3,18 mg/g de MS de chlorophylle a, et 0,77 mg/g de MS de chlorophylle b et 1,57 mg/g de MS de caroténoïdes.

D'autre part, lorsque l'extraction a été effectuée avec 80% (v/v) d'acétone, en utilisant des cellules lyophilisées, la concentration en pigments a été considérablement plus élevée que celle mesurée après le traitement par des méthodes mécaniques (22,8 mg/g de MS, 1,1 mg/g de MS et 10,9 mg/g de MS, pour la chlorophylle a, b et les caroténoïdes, respectivement). Cela est dû au fait que les pigments sont des molécules liposolubles et que leur extraction a longtemps été effectuée à l'aide d'acétone en solution aqueuse. Il s'agit en effet d'un excellent solvant pour l'extraction des pigments d'algues (Safi, et al., 2014).

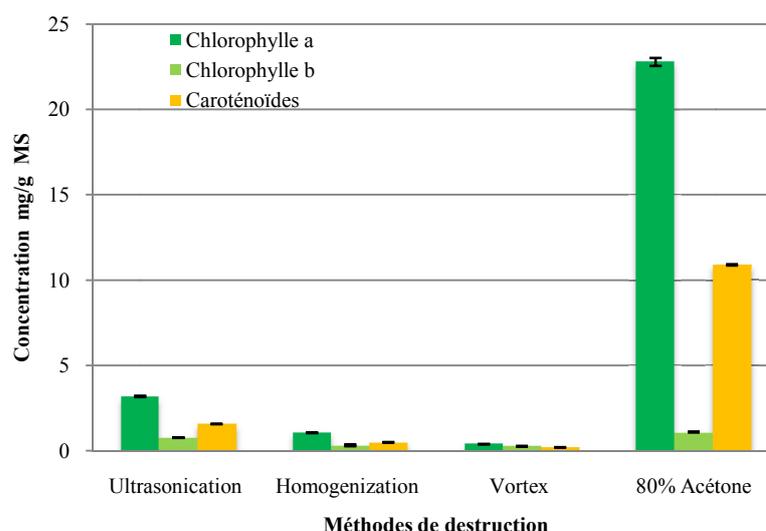


Figure III.4 : Teneur en pigments libérés dans l'eau après chaque technique de destruction cellulaire et après extraction dans une solution d'acétone (80% v/v)

III.2.6.1.3. La consommation spécifique d'énergie

Le choix du meilleur traitement pour briser les cellules de microalgues a également été effectué sur la base des besoins en énergie pour chaque méthode testée, condition préalable indispensable pour concevoir un processus efficace et écologique.

Le diagramme de la figure III.5 montre que la méthode au vortex nécessite 31,2 kJ/kg; Il s'agissait de la consommation d'énergie la plus faible par rapport aux ultrasons et à l'homogénéisation (288 kJ/kg et 570 kJ/kg, respectivement). Cependant, il n'a pas été efficace contre la rupture cellulaire ni la lyse des biomolécules dans l'eau. Par conséquent, en se basant sur l'efficacité de la rupture cellulaire et des besoins énergétiques, l'ultrasonication, est un compromis si on le compare au vortex, est identifiée comme la technique la plus appropriée pour détruire ce mélange particulier de cellules microalgales.

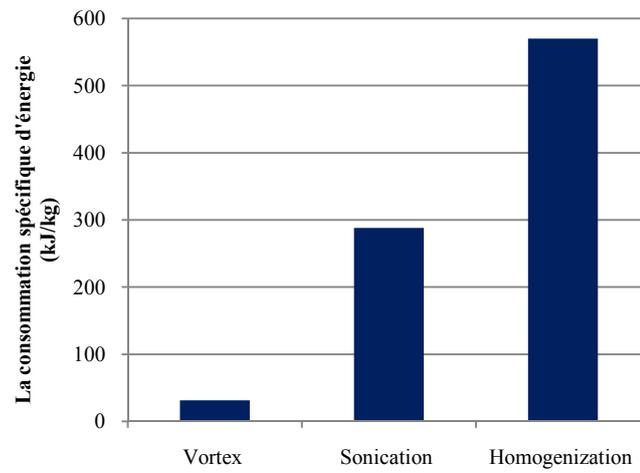


Figure III.5 : La consommation spécifique d'énergie (kJ/kg) pour chaque technique de destruction cellulaire

III.3. FRACTIONNEMENT DES PRINCIPAUX COMPOSES HYDROPHOBES DES COMPOSES HYDROPHILES

III.3.1. Introduction

La stratégie de cette étude est résumée dans l'organigramme présenté dans la Fig. III.6. En résumé, les cellules lyophilisées réhydratées ont été traitées aux ultrasons pour récupérer les différentes biomolécules dans la phase aqueuse. Afin de réduire la complexité de la solution et le colmatage de la membrane, l'extraction des composés lipophiles a été réalisée par extraction solide-liquide-liquide avant l'UF. La phase aqueuse issue du processus d'extraction a ensuite été ultrafiltrée pour fractionner davantage les différentes biomolécules hydrophiles.

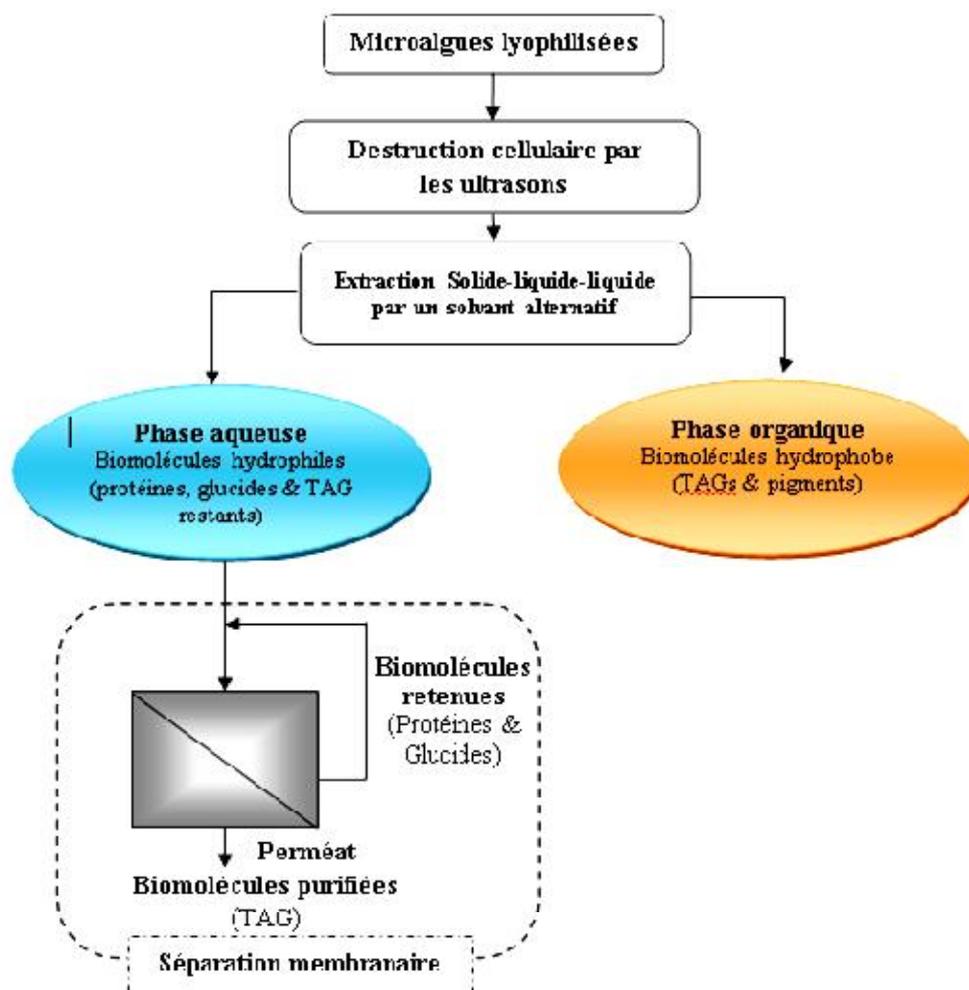


Figure III.6 : Schéma descriptif de la stratégie proposée pour le fractionnement des biomolécules

III.3.2. Matériels et méthode

III.3.2.1. Extraction des pigments et des TAGs par un solvant alternatif

Afin de diminuer la complexité de la solution microalgale après traitement par des ultrasons, une extraction des pigments et des TAGs par la sélection d'un solvant alternative a été proposée. Trois solvants organiques ont été utilisés pour une extraction solide-liquide-liquide, le n-hexane et deux autres solvants, dits « green solvant », Méthoxycyclopentane (CPME) et l'acétate d'éthyle (EA).

Une suspension microalgales d'une concentration de 2,5 mg/mL prétraitée auparavant par les ultrasons à 45 kHz pendant 10 minutes, a été mélangée rigoureusement avec le solvant organique (1:2, v/v), et laissée décanter à une température ambiante (25°C) pendant une nuit. Après centrifugation à 9000 tr/min pendant 5 minutes, la phase organique a été séparée de la phase aqueuse et évaporée sous vide en utilisant un évaporateur rotatif (BOECO RVO 400 SD). La partie solide récupérée a été reconstituée dans une solution de 80% d'acétone pour évaluer les TAGs en utilisant le kit de quantification des triglycérides (Abcam Cambridge, MA) et les pigments suivant les équations de Lichtenthaler et Claus (Lichtenthaler & Claus, 2001).

III.3.2.2. Séparation des biomolécules hydrophiles par ultrafiltration

III.3.2.2.1. Equipement d'ultrafiltration

Les expériences d'ultrafiltration ont été réalisées en mode tangentiel, dont différents membranes ont été testé afin de choisir la membrane appropriée. Deux modules membranaires en acier inoxydable (fabriqués au laboratoire) ont été utilisés sur la base de la configuration de la membrane à utiliser (Fig. III.7), un module pour les membranes planes d'une surface effective de 12,56 cm² et d'un diamètre de 4,7 cm, et un deuxième module pour les membranes tubulaires, avec 10 cm de longueur et d'un diamètre intérieur de 0,7 cm et une surface effective de 18,68 cm².

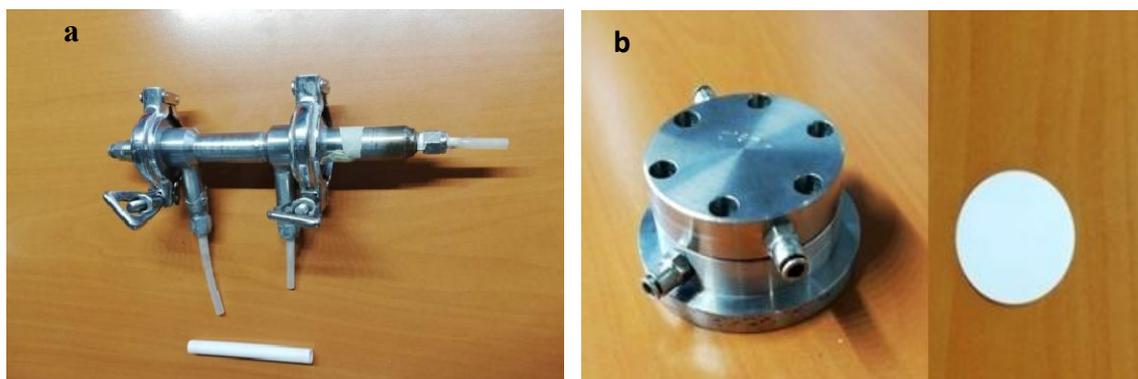


Figure III.7 : Cellules de filtration tubulaire avec les membranes en céramique (a), et plane avec membrane cellulosique (b).

Le tableau (III.2) représente les caractéristiques des différentes membranes utilisées afin de sélectionner la plus adéquate membrane à la séparation des composants extraits des microalgues.

Tableau III. 2: Les caractéristiques des différentes membranes utilisées.

Matériau de la membrane	Seuil de coupure (kDa)	Géométrie
Alumina (Al₂O₃) (Membrflow, Aalen, Germany)	600	Tubulaire
Polysulfone (PS) (Alfalaval, Lund, Sweden)	600	Plane
Cellulose régénérée (CR) (Merck Millipore, Burlington, USA)	100	Plane
Titania (TiO₂) (Membrflow, Aalen, Germany)	60	Tubulaire
Cellulose régénérée (CR) (Merck Millipore, Burlington, USA)	30	Plane

Le système comprenait également une pompe d'alimentation (Cole-Parmer, masterflex digital pump), deux manomètres situés à l'entrée (P_{in}) et à la sortie (p_{out}) de module de la membrane et un bain-marie thermostaté pour maintenir la température constante à 25°C (Fig. III.8). Avant son utilisation, la membrane a été rincée avec de l'eau ultra-pure afin d'éliminer les agents de conservation.

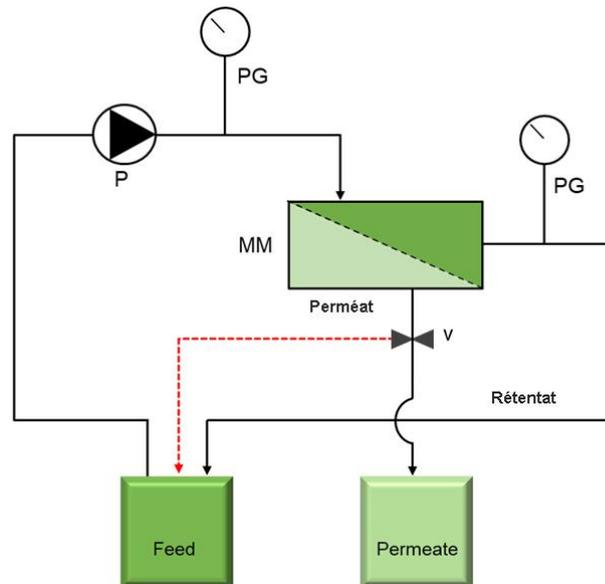


Figure III.8 : Schéma du pilote de filtration membranaire (filtration tangentielle).
PG: Manomètres, P: Pompe, MM: Module membranaire, V: Vanne.

Et afin de vérifier la performance de la membrane, la perméabilité de l'eau a été mesurée avant et après chaque expérience. Les valeurs de flux de perméation en régime permanent ont ensuite été tracées en fonction de la pression transmembranaire (TMP) et la perméabilité (L_p) (Equation III.8) (H Strathmann et al., 2011) a été calculée à partir de la pente de la droite obtenue:

$$J_v = L_p \Delta P \quad (\text{III.8})$$

Où J_v est le flux volumétrique du perméat ($L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$) et ΔP est la pression transmembranaire (bar).

III.3.2.2.2. Test d'adsorption et flux critique

Les tests d'adsorption ont été réalisés par un contact statique (20 min à 25°C) entre les différentes membranes et les solutions obtenues après la destruction cellulaire ainsi qu'après l'extraction des pigments et des TAGs. La perméabilité d'eau a été mesurée avant et après les tests afin d'évaluer l'influence de colmatage dû à l'adsorption des substances organiques sur la membrane (Conidi, et al. 2014). Après la sélection de la membrane qui représente le faible taux d'adsorption (récupération de la perméabilité initiale), le flux critique a été mesuré en augmentant et en diminuant la TMP dans un intervalle de 0,05 à 0,45 bar)(H Strathmann et al., 2011). L'objectif est d'identifier l'hystérésis et de sélectionner les conditions de fonctionnement permettant de limiter le colmatage. Des expériences d'ultrafiltration ont été conduites en mode de recyclage complet du retentât et du perméat dans le réservoir d'alimentation, dont le volume d'alimentation (100 mL) et la concentration initiale en microalgues (2,5 mg mL⁻¹) ont été maintenus constants à 25°C avec une vitesse axiale de 0,3 m s⁻¹.

III.3.2.2.3. Ultrafiltration des biomolécules hydrophiles

Afin de fractionner les biomolécules extraites dans la phase aqueuse issue du processus d'extraction des pigments et des TAGs, l'UF sur une membrane plane a été utilisé.

Les essais de filtration sur la cellule de laboratoire fonctionnant en écoulement tangentiel ont été conduits en mode « concentration », c'est-à-dire avec recyclage du rétentat dans le réservoir d'alimentation et collection continue du perméat. A une température maintenue à 25°C avec une vitesse axiale de 0,3 m s⁻¹. Pour ce faire, la pompe est d'abord lancée pour assurer la circulation de la suspension à la surface de la membrane puis la pression est appliquée pour la filtration. Seul le retentât est réinjecté dans la cuve d'alimentation, et la suspension initiale se concentre ainsi petit à petit sous l'effet de filtration de perméat.

Le facteur de réduction volumique (VRF) a été calculé à partir de l'équation (III.9)

$$VRF = \frac{V_i}{V_f} \quad (III.9)$$

Où V_i et V_f sont respectivement le volume initial et le volume final.

La solution d'alimentation, le perméat y compris le rétentat prélevés en fonction du temps ont été analysés pour mesurer les concentrations des protéines, des glucides et des TAGs. Les valeurs de concentration des différents composés (désignés ici par C_A , C_B , etc.) obtenus ont été utilisées pour évaluer la pureté à partir de l'équation suivante:

$$\text{Pureté} = \frac{[C_A]}{[C_B]+[C_A]} * 100 \quad (\text{III.10})$$

Le facteur de récupération (RF) a été calculé à partir de l'équation III.11 en considérant la masse (m) de la biomolécule A dans le perméat (A_P) par rapport à la masse initiale de la même molécule dans l'alimentation (A_a)

$$RF = \frac{m_{A_P}}{m_{A_a}} \quad (\text{III.11})$$

III.3.3. Résultats et discussions

III.3.3.1. Extraction des pigments et des TAGs par un solvant alternatif

Les pigments et les TAGs sont peu solubles dans l'eau et donc ils sont présents en très petites quantités dans les surnageants aqueux des microalgues soniquées. Pour récupérer ces biomolécules importantes et réduire la complexité de la solution aqueuse, une extraction solide-liquide-liquide a été réalisée. Pour ce faire, trois solvants organiques ont été utilisés: l'hexane, le CPME et l'AE. L'hexane est fréquemment utilisé pour extraire des composés lipophiles tels que les caroténoïdes et les lipides, à partir d'algues (Gilbert-López et al., 2015), et le CPME et l'AE sont considérés comme des solvants alternatifs 'Green solvent'. En particulier, le CPME a reçu l'approbation de son utilisation en vertu de la loi américaine sur le contrôle des substances toxiques (Toxic Substance Control Act 'TSCA') et de la liste européenne des substances chimiques notifiées (European List of Notified Chemical Substances 'ELINCS') (Unterlander et al., 2017). L'acétate d'éthyle a été reconnu «préférée» et «recommandée» par l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et la restriction des produits chimiques (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals 'REACH') et par l'industrie pharmaceutique (Prat et al., 2014). Les résultats présentés dans la figure III.9 montrent la quantification de la chlorophylle a, de la chlorophylle b et des caroténoïdes dans le solvant organique récupéré après extraction. La quantité de pigments extraits présentait l'ordre suivant: EA > CPME > hexane.

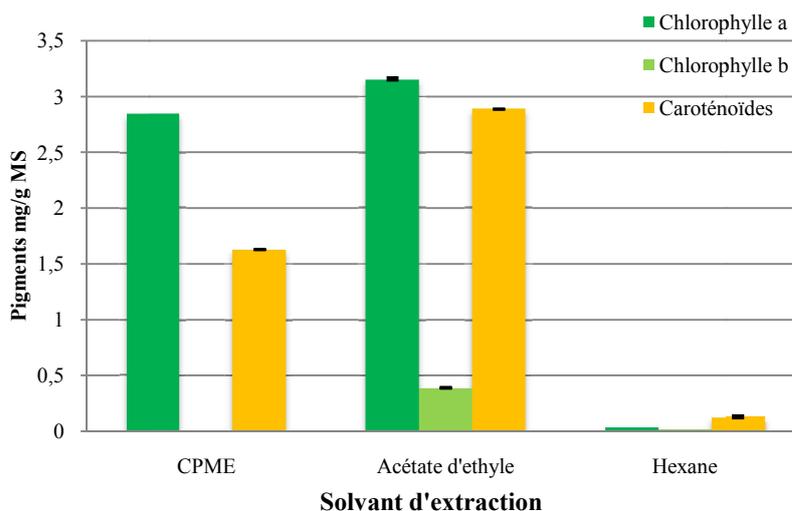


Figure III.9 : Teneur en pigments après extraction solide-liquide-liquide de la solution des microalgues soniquées par cyclopentylméthyléther (CPME), l'acétate d'éthyle (EA) et l'hexane.

Le CPME et l'AE étaient capables d'extraire beaucoup plus de chlorophylles et de caroténoïdes que l'hexane. La teneur la plus élevée en chlorophylle a et b et caroténoïdes ($3,16 \pm 0,01$ mg/g MS, $0,39 \pm 0,01$ mg/g de cellules, $2,89 \pm 0,01$ mg/g MS, respectivement) a été observée dans l'extrait AE. L'extrait de CPME contenait des concentrations plus élevées de chlorophylle a ($2,85 \pm 0,01$ mg/g MS) et de caroténoïdes ($1,63 \pm 0,01$ mg/g MS) que l'hexane, alors que la chlorophylle b semblait être nettement moins extractible dans les deux cas que l'AE. Dans les travaux de Yara-Varón et al., (2016), le CPME a été utilisé comme meilleur solvant d'extraction des caroténoïdes. Aucune autre référence dans la littérature n'a été trouvée indiquant que ces deux solvants alternatifs étaient utilisés pour l'extraction de la chlorophylle. L'acétate d'éthyle était le meilleur solvant d'extraction pigmentaire, car il offrait la plus grande capacité d'extraction et permettait de récupérer facilement le composé d'intérêt par évaporation (point d'ébullition d'acétate d'éthyle: $77,1^\circ\text{C}$ au lieu de 106°C). L'extraction des TAGs a également été évaluée par extraction solide-liquide-liquide en utilisant AE, car les TAGs représentent généralement la forme dominante d'énergie stockée dans les microalgues et pourraient être utilisés pour la production de biodiesel par le processus de transestérification (Prat et al., 2014). La figure III.10 montre la quantité de TAG divisée entre les phases organique et aqueuse. On peut constater qu'une quantité importante de TAG a été extraite au cours de la phase AE (419 ± 3 mg/g MS). Globalement, environ 56% de la masse sèche des microalgues a été récupérée sous forme de TAG, ce qui correspond à la quantité de lipides dans les microalgues (5 à 60%) généralement rapportée dans la littérature (Sialve & Steyer, 2013).

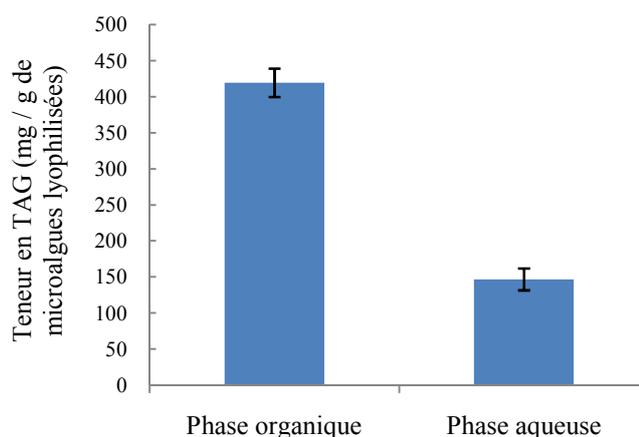


Figure III.10 : Teneur des TAGs estimé dans l'acétate d'éthyle et la phase aqueuse après extraction solide-liquide-liquide de la suspension microalgale soniquée

La quantité élevée des TAGs présente dans les microalgues traitées pourrait être due aux conditions environnementales stressantes dans lesquelles elles se développent, comme démontré dans la littérature (Siaut et al., 2011; Taleb et al., 2016; Clavijo Rivera et al., 2018). La quantité des TAGs extraites dans AE correspond à $74 \pm 6\%$, ce qui pourrait être augmenté en optimisant le rapport volume AE/ volume d'eau, sur la base du coefficient de partage des TAGs dans AE.

Dans la littérature (Halim et al., 2012; Halim, et al., 2011) il a été signalé que des mélanges de solvants organiques et d'alcools pourraient également être utilisés pour extraire les lipides et favoriser la production de biodiesel. Cette analyse a révélé que les solvants les plus utilisés à l'échelle du laboratoire étaient des mélanges chloroforme/méthanol ou hexane/isopropanol. Cette analyse montre clairement que l'extraction des lipides à l'aide des solvants organiques est lente et que de grandes quantités de composés coûteux/toxiques sont utilisées. La stratégie proposée dans ce travail a favorisé l'utilisation d'un solvant organique "green solvent" comme système alternatif et la possibilité d'extraire les pigments et les TAGs en une seule étape.

III.3.3.2 Ultrafiltration pour fractionner des biomolécules hydrophiles

Le procédé de filtration sur membrane a été appliqué à la solution aqueuse après destruction des cellules et extraction au solvant pour fractionner les biomolécules hydrophiles restantes. Initialement, des expériences d'identification de matériaux membranaires présentant une faible tendance au colmatage ont été réalisées avec des membranes de microfiltration et d'ultrafiltration. Les tests d'adsorption ont été réalisés sur des membranes polymères et céramiques présentant différents seuils de poids moléculaire au contact de suspensions des cellules traitées (Tableau III.3).

Tableau III. 3 : Récupération de la perméabilité d'eau (RPE) après contact statique avec la suspension des cellules microalgales soniquées.

Matériau de la membrane	Seuil de coupure (kDa)	Géométrie	L_{pi} (L/h bar m ²)	L_{pa} (L/h bar m ²)	RPE (%)
Alumina (Al₂O₃) (Membrflow, Aalen, Germany)	600	Tubulaire	1113,9 ±6	531,6 ±6	48
Polysulfone (PS) (Alfalaval, Lund, Sweden)	600	Plane	223 ±2	113 ±2	51
Cellulose régénérée (CR) (Merck Millipore, Burlington, USA)	100	Plane	1001 ±5	807 ±5	81
Titania (TiO₂) (Membrflow, Aalen, Germany)	60	Tubulaire	512,2 ±4	225,5 ±5	44
Cellulose régénérée (CR) (Merck Millipore, Burlington, USA)	30	Plane	497,6 ±3	474,4 ±3	95

L_{pi}: perméabilité initiale d'eau;

L_{pa}: perméabilité d'eau après test d'adsorption;

RPE: Récupération de la perméabilité d'eau.

Les résultats présentés dans le tableau III.3 indiquent que la plupart des membranes ont réduit de moitié leur perméabilité initiale à l'eau, à l'exception de celle en cellulose régénérée (RC). Avec une membrane RC de 100 kDa, la perméabilité initiale à l'eau a diminué d'environ 20%, alors qu'elle était pratiquement inchangée si la membrane RC de 30 kDa était utilisée. Cette membrane a ensuite été choisie pour effectuer le fractionnement des biomolécules par ultrafiltration.

Les membranes d'ultrafiltration telles que RC 30 kDa sont généralement moins disposés au phénomène de « colmatage des pores » que les membranes à pores plus larges (Giorno et al., 2013), c'est pourquoi on a observé une diminution plus faible de la perméabilité à l'eau initiale lors de l'utilisation de cette membrane. Lorsque le procédé d'UF a été exécuté en faisant recirculer le perméat dans la solution d'alimentation (afin de maintenir le volume et la concentration d'alimentation constant), une pression critique de 0,4 bar et un flux constant d'environ $42 \pm 2 \text{ Lh}^{-1}\text{m}^{-2}$ ont été obtenus (Fig. III.11). À la fin du processus, la perméabilité initiale à l'eau était complètement rétablie, ce qui démontrait l'absence de colmatage irréversible.

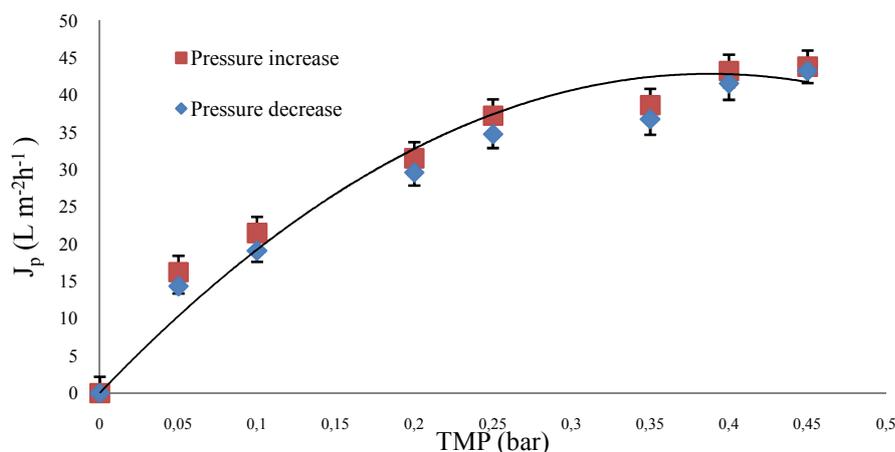


Figure III.11 : Les valeurs de flux en fonction de la pression transmembranaire croissante et décroissante lors des expériences UF en mode recyclage en utilisant des membranes RC 30 kDa (conditions de fonctionnement: $Q_f = 10,6 Lh^{-1}$; température, 25°C).

Le flux du processus UF, effectué en mode concentration (c'est-à-dire en retirant le perméat et en concentrant les composants retenus) est présenté dans la figure III.12. Les autres conditions opératoires étaient les mêmes que dans les expériences précédentes. Le flux de perméat initial était de $47 \pm 5 Lm^{-2}h^{-1}$, atteignant un flux de perméat en régime permanent de $15 \pm 3 Lm^{-2}h^{-1}$ lorsque le facteur de réduction volumique (VRF) était d'environ 2 (Fig. III.12). La perméabilité à l'eau pure mesurée après les expériences d'UF était la même que celle initiale. Cela confirmait l'absence de colmatage irréversible, même si le processus était effectué en mode concentration. En se référant au fractionnement de biomolécules présent dans la solution initiale, les résultats ont montré que les glucides et les protéines étaient principalement retenus dans le retentât (Fig. III.13) avec un facteur de récupération de 88% et 68%, respectivement. Les TAGs ont été collectés dans le perméat, avec un facteur de récupération de 60% et une pureté d'environ 70%.

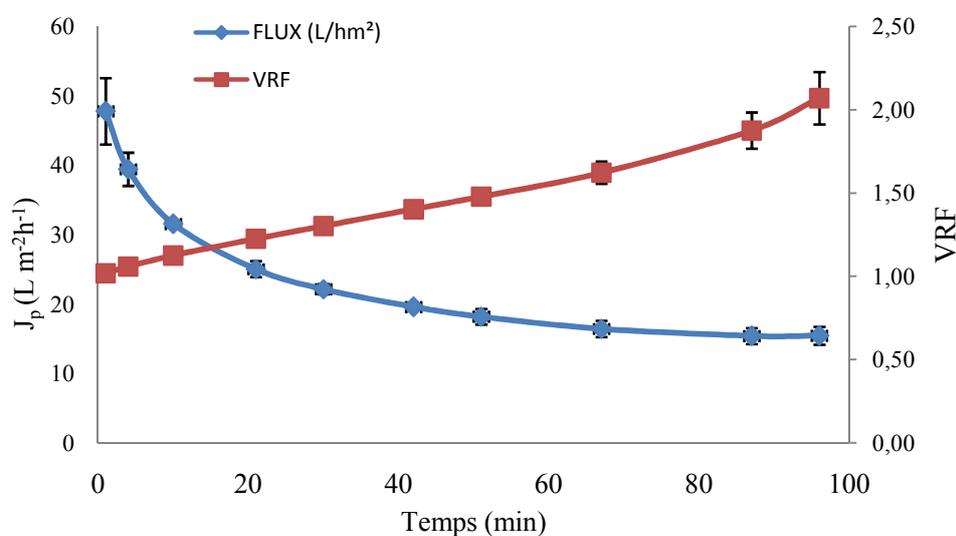


Figure III.12 : UF de la phase aqueuse après sonication et extraction des pigments/TAGs. Évolution dans le temps du flux de perméat (J_p) et du VRF (conditions de fonctionnement: pression transmembranaire (PTM): 0,4 bar; Q_f : 10,6 Lh⁻¹; température 25 °C).

Une bonne séparation des TAGs (19 ± 2 mg dans le perméat) a été obtenue par Giorno et al. (2013), cellules cassées par ultrafiltration à partir d'une culture de *Nannochloropsis*. Cependant, dans ce travail, de grandes quantités de protéines et de glucose étaient encore présentes dans la solution des TAGs purifiés (12 ± 3 mg et 10 ± 1 mg, respectivement). Dans le présent travail, les quantités de glucides ($2,3 \pm 0,4$ mg) et de protéines ($5,0 \pm 0,5$ mg) dans le perméat étaient si faibles qu'on ne s'attendait pas à ce qu'elles interfèrent avec la transestérification des TAGs (Williams & Laurens, 2010). Bien que, dans cette étude, le processus UF ait été appliqué à une échelle de laboratoire, le système pourrait facilement être mis à l'échelle, grâce à la modularité des membranes.

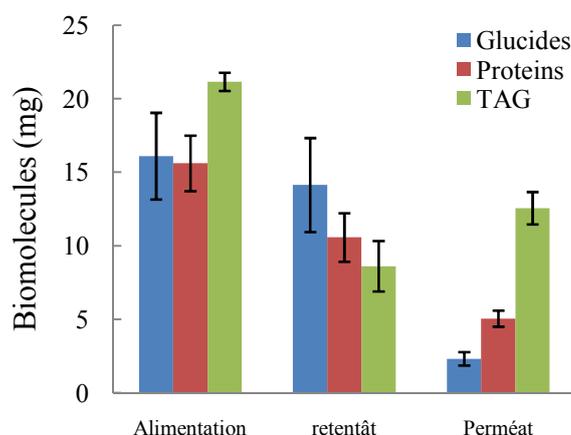


Figure III.13 : Teneur en glucides, protéines et TAGs dans la solution d'alimentation, le retentât et le perméat après l'UF en mode de concentration avec membrane RC de 30 kDa à 25°C

III.4. Conclusion

Dans cette partie, un procédé assisté par membrane a été développé pour récupérer et fractionner des biomolécules à haute valeur ajoutée issues d'un mélange de phytoplanctons du barrage de Hammam Boughrara situé à Tlemcen (nord-ouest de l'Algérie). Avant le procédé d'UF, deux traitements étaient effectués sur une solution de microalgues lyophilisée: le premier consistait à détruire les cellules, obtenant une solution avec des biomolécules, et le second à extraire (par extraction solide-liquide-liquide) les biomolécules lipophiles dans la phase organique et hydrophiles dans la phase aqueuse. La phase aqueuse contenant les composés hydrophiles a ensuite été ultrafiltrée pour un autre fractionnement de biocomposants.

Parmi toutes les techniques utilisées, l'ultrasonication s'est avéré la méthode la plus efficace pour briser la membrane cellulaire à faible consommation d'énergie (288 kJ/kg).

De très grandes quantités de TAG (74%) et de pigments (91%) ont été récupérées en utilisant de l'acétate d'éthyle comme solvant d'extraction.

Une membrane polymère RC (30 kDa) s'est révélée être un matériau approprié pour le fractionnement par UF des biocomposants présents dans la phase aqueuse, en raison qu'elle a moins d'effet de colmatage que les autres matériaux membranaires testés. Au cours du processus UF, des fractions enrichies de protéines et de glucides ont été obtenues dans le retentât (facteur de récupération de 88% et 70% respectivement), tandis que des fractions enrichies de TAG (pureté : 70%) ont été récupérées dans le perméat avec un facteur de récupération de 60%.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Il est bien connu que les microalgues ont un potentiel important dans une grande variété d'applications puisqu'elles pourraient contenir différents composés bioactifs selon l'espèce microalgale.

Afin de promouvoir les ressources naturelles algériennes, l'objectif ultime de ce travail de recherche est une valorisation des microalgues qui se forment naturellement dans les eaux de surface de barrage de Hammam Bouhrara, situé à la Wilaya de Tlemcen (Nord-Ouest de l'Algérie), par l'extraction et l'estimation des biomolécules à haute valeur ajoutée, et éventuellement une évaluation du pouvoir antioxydant des différents extraits; ainsi que pour étudier une approche alternative pour séparer et/ou purifier les principaux constituants, avec une stratégie de bioraffinage adaptée, efficace et écologique.

Le mélange microalgale étudié montre une variété dans son contenu en molécules bioactives importantes, tels que les polyphénols, flavonoïdes ainsi que les pigments, qui ont des propriétés antioxydantes confirmées par leurs pouvoirs antiradicalaires, ainsi que leurs pouvoirs réducteurs en fer; permettant leurs utilisations dans les domaines de la santé et de l'alimentation.

Ces résultats, nous ont permis d'identifier quatre composés phénoliques « Acide Gallique, Catéchine, Syringique et Naringinine » dans l'extrait méthanolique de macération, qui s'est montré plus efficace vis-à-vis des autres extraits obtenus.

Afin de briser la paroi cellulaire des microalgues, l'ultrasonication s'est avérée la méthode la plus efficace en libérant une teneur importante en biomolécules utilisant une faible consommation d'énergie (288 kJ/kg).

Dans ce travail, l'extraction des molécules hydrophobes dans l'acétate d'éthyle, dit solvant alternatif, permettait de récupérer une grande quantité de TAG (74%) et de pigments (91%).

Nous avons pu mettre en évidence une stratégie de fractionnement utilisant un procédé membranaire, en déterminant une membrane polymère RC (30 kDa) qui est un

matériau approprié pour le fractionnement par UF des biocomposants présents dans la phase aqueuse, par ce qu'elle a moins d'effet de colmatage.

Au cours du processus d'UF, des fractions enrichies de protéines et de glucides ont été obtenues dans le retentât (facteur de récupération de 88% et 70% respectivement), tandis que des fractions enrichies de TAG (pureté: 70%) ont été récupérées dans le perméat avec un facteur de récupération de 60%.

Sur la base des résultats obtenus, les perspectives concernant les microalgues en tant que sources de produits naturels sont très prometteuses. Afin d'augmenter le nombre qui est limité des travaux réalisés et présentés dans la littérature sur le bioraffinage des microalgues :

- Des études complémentaires sont nécessaires pour l'isolement et la caractérisation des antioxydants actifs, car il pourrait y avoir un potentiel d'utilisation de tels extraits ou composés bioactifs dans le traitement de diverses maladies liées au stress oxydatif, ou encore dans un large éventail de produits alimentaires.
- Un grand défi sera de trouver une méthode de destruction cellulaire adéquate et rapide, tout en évitant qu'elle soit coûteuse en termes d'énergie.
- Optimisation du rapport Solvant/Eau, afin de récupérer un maximum de molécules hydrophobes.
- Optimiser des conditions de séparation membranaire par une méthode de déshydratation (concentration) de la biomasse récoltée du milieu de culture.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahmed, F., Fanning, K., Netzel, M., Turner, W., Li, Y., & Schenk, P. M. (2014a). Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. *Food Chemistry*, *165*, 300–306. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.05.107>
- Al hattab, M., & Ghaly, A. (2015). Microalgae Oil Extraction Pre-treatment Methods : Critical Review and Comparative Analysis Fundamentals of Renewable Energy and Applications, *5*(4). <https://doi.org/10.4172/20904541.1000172>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.072>
- Ardestani, A., & Yazdanparast, R. (2007). Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on in vitro protein glycoxidation, *45*, 2402–2411. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.06.020>
- Barros, A. I., Gonçalves, A. L., Simões, M., & Pires, J. C. M. (2015). Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *41*, 1489–1500. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.037>
- Bazzarelli, F., Piacentini, E., Poerio, T., Mazzei, R., Cassano, A., & Giorno, L. (2016). Advances in membrane operations for water purification and biophenols recovery/valorization from OMWWs. *Journal of Membrane Science*, *497*, 402–409. <https://doi.org/10.1016/J.MEMSCI.2015.09.049>
- Bleakley, S., & Hayes, M. (2017). Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. *Foods*, 1–34. <https://doi.org/10.3390/foods6050033>
- Borowitzka, M. A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. *Progress in Industrial Microbiology*, *35*, 313–321. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(99\)80123-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(99)80123-4)
- Bourkhiss, M., Hnach, M., Paolini, J., Costa, J., Farah, A., & Satrani, B. (2010). Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *tetraclinis articulata* (vahl) masters du maroc. *Bulletin de La Société Royale Des Sciences de Liège*, *79*, 141–154.
- Bouزيد-Lagha, S., & Djelita, et B. (2012). Etude du phénomène d'eutrophisation dans le Barrage de Hammam Boughrara (Wilaya de Tlemcen, Algérie). *Hydrological Sciences Journal*, *57*(1), 186–201. <https://doi.org/10.1080/02626667.2011.634417>
- Bulut, O., Akin, D., Sönmez, Ç., Öktem, A., Yücel, M., & Öktem, H. A. (2019). Phenolic compounds, carotenoids, and antioxidant capacities of a thermo-tolerant *Scenedesmus* sp. (Chlorophyta) extracted with different solvents. *Journal of Applied Phycology*, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1726-5>

- Caballero, M. A., Jallet, D., Shi, L., Rithner, C., Zhang, Y., & Peers, G. (2016). Quantification of chrysolaminarin from the model diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal Research*, 20, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.10.008>
- Cadoret, J.-P., & Bernard, O. (2008). La production de biocarburant lipidique avec des microalgues : promesses et défis. *Journal de La Société de Biologie*, 202(3), 201–211. <https://doi.org/10.1051/jbio:2008022>
- Carvalho, A. P., Meireles, L. A., & Malcata, F. X. (2006, December 1). Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology Progress*. American Chemical Society (ACS). <https://doi.org/10.1021/bp060065r>
- 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(1), 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>
- Chen, C., Pearson, A. M., & Gray, J. I. (1992). Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. *Food Chemistry*, 43(3), 177–183. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(92\)90170-7](https://doi.org/10.1016/0308-8146(92)90170-7)
- Chew, Y. L., Lim, Y. Y., Omar, M., & Khoo, K. S. (2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT - Food Science and Technology*, 41(6), 1067–1072. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2007.06.013>
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- Clavijo Rivera, E., Montalescot, V., Viau, M., Drouin, D., Bourseau, P., Frappart, M., ... Couallier, E. (2018). Mechanical cell disruption of *Parachlorella kessleri* microalgae: Impact on lipid fraction composition. *Bioresource Technology*, 256, 77–85. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.01.148>
- Conidi, C., Mazzei, R., Cassano, A., & Giorno, L. (2014). Integrated membrane system for the production of phytotherapies from olive mill wastewaters. *Journal of Membrane Science*, 454, 322–329. <https://doi.org/10.1016/J.MEMSCI.2013.12.021>
- Cox, S., Abu-ghannam, N., & Gupta, S. (2010). Antioxidant and antimicrobial activity from six species of edible Irish seaweeds. *International Food Research Journal*, 205–220. <https://doi.org/10.21427/D7HC92>
- Denis, C., Massé, A., Fleurence, J., & Jaouen, P. (2009). Concentration and pre-purification with ultrafiltration of a R-phycoerythrin solution extracted from macro-algae *Grateloupia turuturu*: Process definition and up-scaling. *Separation and Purification Technology*, 69(1), 37–42. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2009.06.017>
- Dixon, C., & Wilken, L. R. (2018). Green microalgae biomolecule separations and recovery. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0199-3>

- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker, R. B. (2010). Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin–Ciocalteu Reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(14), 8139–8144. <https://doi.org/10.1021/jf1005935>
- Farasat, M., Khavari-Nejad, R. A., Nabavi, S. M. B., & Namjooyan, F. (2014). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoid contents of some edible green seaweeds from northern coasts of the Persian gulf. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *13*(1), 163–170. <https://doi.org/10.5812/jjnpp.7736>
- Fasaai, F., Bitter, J. H., Slegers, P. M., & van Boxtel, A. J. B. (2018). Techno-economic evaluation of microalgae harvesting and dewatering systems. *Algal Research*, *31*, 347–362. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2017.11.038>
- Frey, D., Amini-Hajibashi, A., Sengupta, D., Shaikh, F., Dickinson, S., Mientus, M., ... El-Halwagi, M. M. (2016). A review of biodiesel production from microalgae. *Clean Technologies and Environmental Policy*, *19*(3), 637–668. <https://doi.org/10.1007/s10098-016-1309-6>
- Gerardo, M. L., Van Den Hende, S., Vervaeren, H., Coward, T., & Skill, S. C. (2015). Harvesting of microalgae within a biorefinery approach: A review of the developments and case studies from pilot-plants. *Algal Research*, *11*, 248–262. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2015.06.019>
- Gilbert-López, B., Mendiola, J. A., Fontecha, J., van den Broek, L. A. M., Sijtsma, L., Cifuentes, A., ... Ibáñez, E. (2015). Downstream processing of *Isochrysis galbana*: a step towards microalgal biorefinery. *Green Chemistry*, *17*(9), 4599–4609. <https://doi.org/10.1039/C5GC01256B>
- Giorno, F., Mazzei, R., & Giorno, L. (2013). Purification of triacylglycerols for biodiesel production from *Nannochloropsis* microalgae by membrane technology. *Bioresource Technology*, *140*, 172–178. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2013.04.073>
- Goh, S.-H., Md Yusoff, F., & Loh, S. (2010). A Comparison of the Antioxidant Properties and Total Phenolic Content in a Diatom. *Journal of Agricultural Science*, *2*(3). <https://doi.org/10.5539/jas.v2n3p123>
- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., & De Cooman, L. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology*, *24*(6), 1477–1486. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9804-6>
- Grimi, N., Dubois, A., Marchal, L., Jubeau, S., Lebovka, N. I., & Vorobiev, E. (2014). Selective extraction from microalgae *Nannochloropsis* sp. using different methods of cell disruption. *Bioresource Technology*, *153*, 254–259. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.011>
- Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *12*(4), 600–609. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2011.07.004>

- Halim, R., Danquah, M. K., & Webley, P. A. (2012). Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances*, 30(3), 709–732. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2012.01.001>
- Halim, R., Gladman, B., Danquah, M. K., & Webley, P. A. (2011). Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102(1), 178–185. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.06.136>
- Hariskos, I., & Posten, C. (2014). Biorefinery of microalgae - opportunities and constraints for different production scenarios. *Biotechnology Journal*, 9(6), 739–752. <https://doi.org/10.1002/biot.201300142>
- Hemwimon, S., Pavasant, P., & Shotipruk, A. (2007). Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Separation and Purification Technology*, 54(1), 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2006.08.014>
- Ho, S.-H., Huang, S.-W., Chen, C.-Y., & Hasunuma, T. (2013). Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresource Technology*, 135, 191–198. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.10.015>
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008, May). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *Plant Journal*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>
- Hwang, E.-S., & Thi, N. Do. (2014). Effects of Extraction and Processing Methods on Antioxidant Compound Contents and Radical Scavenging Activities of Laver (*Porphyra tenera*). *Preventive Nutrition and Food Science*, 19(1), 40–48. <https://doi.org/10.3746/pnf.2014.19.1.040>
- Jeffrey, S. W., Mantoura, R. F. C., Wright, S. W., International Council of Scientific Unions. Scientific Committee on Oceanic Research., & Unesco. (1997). *Phytoplankton pigments in oceanography : guidelines to modern methods*. UNESCO Pub.
- John, R. P., Anisha, G. ., Nampoothiri, K. M., & Ashok, P. (2011). Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*, 102(1), 186–193. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.06.139>
- Kadri, A., Zarai, Z., Békir, A., Gharsallah, N., Damak, M., & Gdoura, R. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, 10(19), 3908–3914. <https://doi.org/10.4314/ajb.v10i19>.
- Kapoore, R., Butler, T., Pandhal, J., Vaidyanathan, S., Kapoore, R. V., Butler, T. O., ... Vaidyanathan, S. (2018). Microwave-Assisted Extraction for Microalgae: From Biofuels to Biorefinery. *Biology*, 7(1), 18. <https://doi.org/10.3390/biology7010018>
- Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>

- Kherraf, A., Tehami, W., Boufeldja, W., Yahla, I., Dra, G. A., Mansour, I. F. Z., & Benali, M. (2017). Determination of the nutritional and functional metabolites of *Nanochloropsis gaditana* produced in Algeria and evaluation of its antioxidant activity. *South Asian Journal of Experimental Biology*, (7), 17–20. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20183123793>
- Kris-Etherton, P., Taylor, D. S., Yu-Poth, S., Huth, P., Moriarty, K., Fishell, V., ... Etherton, T. D. (2000). Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(1), 179S–188S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.1.179S>
- Larrauri, A., & Saura-calixto, F. (1998). A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 270, 270–276.
- Lawrenz, E., Fedewa, E. J., & Richardson, T. L. (2011). Extraction protocols for the quantification of phycobilins in aqueous phytoplankton extracts. *Journal of Applied Phycology*, 23(5), 865–871. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9600-0>
- Lee, S. Y., Cho, J. M., Chang, Y. K., & Oh, Y.-K. (2017). Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. *Bioresource Technology*, 244(Pt 2), 1317–1328. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.038>
- Li, B., Lu, F., Wei, X., & Zhao, R. (2008). Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 13(8), 1671–1695. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18794778>
- Li, H.-B., Cheng, K.-W., Wong, C.-C., Fan, K.-W., Chen, F., & Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102(3), 771–776. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2006.06.022>
- Lichtenthaler, H. K., & Claus, B. (2001). Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1–8.
- Liu, J. C., Chen, Y. M., & Ju, Y. H. (1999). Separation of algal cells from water by column flotation. *Separation Science and Technology*, 34(11), 2259–2272. <https://doi.org/10.1081/SS-100100771>
- López, A., Rico, M., Rivero, A., & Suárez de Tangil, M. (2011). The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry*, 125(3), 1104–1109. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.09.101>
- Maadane, A., Merghoub, N., Ainane, T., El Arroussi, H., Benhima, R., Amzazi, S., ... Wahby, I. (2015). Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. *Journal of Biotechnology*, 215, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.400>
- Mallia, A. K., Frovenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Olson, B. J., Klenk, D. C., & Company, P. C. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid[®]. *Analytical Biochemistry*, 85, 76–85.

- Marxen, K., Vanselow, K. H., Lippemeier, S., Hintze, R., Ruser, A., & Hansen, U. (2007). Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of Some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements. *Sensors*, 2080–2095.
- Molina Grima, E., Belarbi, E. H., Acien Fernández, F. G., Robles Medina, A., & Chisti, Y. (2003, January). Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics. *Biotechnology Advances*. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00050-2)
- Monte, J., Sá, M., Galinha, C. F., Costa, L., Hoekstra, H., Brazinha, C., & Crespo, J. G. (2018). Harvesting of *Dunaliella salina* by membrane filtration at pilot scale. *Separation and Purification Technology*, 190, 252–260. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2017.08.019>
- Nabout, J. C., da Silva Rocha, B., Carneiro, F. M., & Sant'Anna, C. L. (2013). How many species of Cyanobacteria are there? Using a discovery curve to predict the species number. *Biodiversity and Conservation*, 22(12), 2907–2918. <https://doi.org/10.1007/s10531-013-0561-x>
- Nurra, C., Clavero, E., Salvadó, J., & Torras, C. (2014). Vibrating membrane filtration as improved technology for microalgae dewatering. *Bioresource Technology*, 157, 247–253. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.01.115>
- Olaizola, M. (2003). Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*, 20(4–6), 459–466. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(03\)00076-5](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(03)00076-5)
- Oquet, M. P., Erez, J. P., Aragoz, M. C. Z. A., Imonetti, P. S., Ardana, C. G., Erat, Y. L., ... Itjavila, M. T. M. (2008). Toxicity and Antioxidant Activity in Vitro and in Vivo of Two *Fucus vesiculosus* Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7773–7780. <https://doi.org/10.1021/jf8007053>
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307–315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>
- Patel, A. K., Laroche, C., Marcati, A., Ursu, A. V., Jubeau, S., Marchal, L., ... Michaud, P. (2013). Separation and fractionation of exopolysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Bioresource Technology*, 145, 345–350. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.12.038>
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., De-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011, January). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>
- Prat, D., Hayler, J., & Wells, A. (2014). A survey of solvent selection guides. *Green Chemistry*, 16(10), 4546–4551. <https://doi.org/10.1039/c4gc01149j>

- Pugh, N., Ross, S., ElSohly, H., ElSohly, M., & Pasco, D. (2001). Isolation of Three High Molecular Weight Polysaccharide Preparations with Potent Immunostimulatory Activity from *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Planta Medica*, 67(8), 737–742. <https://doi.org/10.1055/s-2001-18358>
- Pulz, O., & Gross, W. (2004, November 6). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>
- Rios, S. D., Clavero, E., Salvadó, J., Farriol, X., & Torras, C. (2011). Dynamic Microfiltration in Microalgae Harvesting for Biodiesel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50(4), 2455–2460. <https://doi.org/10.1021/ie101070q>
- Ríos, S. D., Salvadó, J., Farriol, X., & Torras, C. (2012). Antifouling microfiltration strategies to harvest microalgae for biofuel. *Bioresource Technology*, 119, 406–418. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.05.044>
- Rossi, N., Derouiniot-Chaplain, M., Jaouen, P., Legentilhomme, P., & Petit, I. (2008). *Arthrospira platensis* harvesting with membranes: Fouling phenomenon with limiting and critical flux. *Bioresource Technology*, 99(14), 6162–6167. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2007.12.023>
- S.M., S. (2012). Microalgal Biotechnology: Prospects and Applications. In *Plant Science*. InTech. <https://doi.org/10.5772/53694>
- Sadi, M. (2012). Les micro algues: un défi prometteur pour des biocarburants propres. *Revue Des Energies Renouvelables SIENR'12 Ghardaïa*, 195–202.
- Safafar, H., van Wagenen, J., Møller, P., Jacobsen, C., Safafar, H., Van Wagenen, J., ... Jacobsen, C. (2015). Carotenoids, Phenolic Compounds and Tocopherols Contribute to the Antioxidative Properties of Some Microalgae Species Grown on Industrial Wastewater. *Marine Drugs*, 13(12), 7339–7356. <https://doi.org/10.3390/md13127069>
- Safi, C., Liu, D. Z., Yap, B. H. J., Martin, G. J. O., Vaca-Garcia, C., & Pontalier, P.-Y. (2014). A two-stage ultrafiltration process for separating multiple components of *Tetraselmis suecica* after cell disruption. *Journal of Applied Phycology*, 26(6), 2379–2387. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0271-0>
- Safi, C., Olivieri, G., Campos, R. P., Engelen-Smit, N., Mulder, W. J., van den Broek, L. A. M., & Sijtsma, L. (2017). Biorefinery of microalgal soluble proteins by sequential processing and membrane filtration. *Bioresource Technology*, 225, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.068>
- Safi, C., Ursu, A. V., Laroche, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. *Algal Research*, 3, 61–65. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2013.12.004>
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>

- Sahoo, D., & Kumar, S. (2015). Xanthophyceae, Euglenophyceae and Dinophyceae. In *The Algae World* (pp. 259–305). Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7321-8_9
- Sahoo, D., & Seckbach, J. (2015). *The Algae World*. (D. Sahoo & J. Seckbach, Eds.), *The Algae World* (Vol. 26). Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-7321-8>
- Santi M., M., Chakraborty, D., & Dey, S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling & Behavior*, 5(4), 359–368. <https://doi.org/10.4161/psb.5.4.10871>
- Santos, J. P., Torres, P. B., dos Santos, D. Y. A. C., Motta, L. B., & Chow, F. (2019). Seasonal effects on antioxidant and anti-HIV activities of Brazilian seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 31(2), 1333–1341. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1615-y>
- Shetty, V., & Sibi, G. (2015). Relationship Between Total Phenolics Content and Antioxidant Activities of Microalgae Under Autotrophic, Heterotrophic and Mixotrophic Growth. *Journal of Food Resource Science*, 4(1), 1–9. <https://doi.org/10.3923/jfrs.2015.1.9>
- Show, K. Y., & Lee, D. J. (2014). Algal Biomass Harvesting. In *Biofuels from Algae* (pp. 85–110). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59558-4.00005-X>
- 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/>
- Siaut, M., Cuiiné, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., ... Peltier, G. (2011). Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnology*, 11(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-7>
- Singh, G., & Patidar, S. K. (2018). Microalgae harvesting techniques: A review. *Journal of Environmental Management*, 217, 499–508. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.010>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, 299(1974), 152–178.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96. <https://doi.org/10.1263/JBB.101.87>
- Strathmann, H., Giorno, L., & Drioli, E. (2011). *Introduction to membrane science and technology* (Wiley-VCH). Weinheim.
- Suarez Garcia, E., Suarez Ruiz, C. A., Tilaye, T., Eppink, M. H. M., Wijffels, R. H., & van den Berg, C. (2018). Fractionation of proteins and carbohydrates from crude microalgae extracts using an ionic liquid based-aqueous two phase system. *Separation and Purification Technology*, 204, 56–65. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2018.04.043>

- Sudhakar, M. P., Kumar, B. R., Mathimani, T., & Arunkumar, K. (2019). A review on bioenergy and bioactive compounds from microalgae and macroalgae-sustainable energy perspective. *Journal of Cleaner Production*, 228, 1320–1333. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2019.04.287>
- Taleb, A., Kandilian, R., Touchard, R., Montalescot, V., Rinaldi, T., Taha, S., ... Pruvost, J. (2016). Screening of freshwater and seawater microalgae strains in fully controlled photobioreactors for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 218, 480–490. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.06.086>
- Tapan, S., Nilu, H., Kausik, C., & Sanka, N. S. (2015). Evaluation of antioxidant activities of algae and effect of solvent extraction system. *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 1273–1278. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(3\).1273-78](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(3).1273-78)
- Trivedi, J., Aila, M., Bangwal, D. P., Kaul, S., & Garg, M. O. (2015, July 1). Algae based biorefinery - How to make sense? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.03.052>
- Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M. K., Forde, G. M., & Hoadley, A. (2010, January 12). Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*. American Institute of Physics. <https://doi.org/10.1063/1.3294480>
- Uma, R., Sivasubramanian, V., & Utlm, S. D. (2011). Evaluation of in vitro antioxidant activities and antiproliferative activity of green microalgae, *Desmococcus olivaceus* and *Chlorococcum humicola*. *Jalgalbiomass.com*, 2(3), 82–93. Retrieved from <http://www.jalgalbiomass.com/paper8vol2no3.pdf>
- Unterlander, N., Champagne, P., & Plaxton, W. C. (2017). Lyophilization pretreatment facilitates extraction of soluble proteins and active enzymes from the oil-accumulating microalga *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, 25, 439–444. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2017.06.010>
- Vandamme, D., Foubert, I., Fraeye, I., Meesschaert, B., & Muylaert, K. (2012). Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: Role of magnesium and calcium and practical implications. *Bioresource Technology*, 105, 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.105>
- Ventura, S. P. ., Nobre, B. P., Ertekin, F., Hayes, M., García-Vaquero, M., Vieira, F., ... Palavra, A. M. F. (2017). Extraction of value-added compounds from microalgae. *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*, 461–483. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00019-4>
- Wang, T., Jónsdóttir, R., & Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, 116(1), 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.041>
- Wehr, John, Sheath, R., & Kociolek, J. P. (2015). *Freshwater Algae of North America : Ecology and Classification* (Vol. 132). Elsevier.

- Wijffels, R. H., & Barbosa, M. J. (2010). An outlook on microalgal biofuels. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5993), 796–799. <https://doi.org/10.1126/science.1189003>
- Williams, P. J. le B., & Laurens, L. M. L. (2010). Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy & Environmental Science*, 3(5), 554. <https://doi.org/10.1039/b924978h>
- Yara-Varón, E., Fabiano-Tixier, A. S., Balcells, M., Canela-Garayoa, R., Bily, A., & Chemat, F. (2016). Is it possible to substitute hexane with green solvents for extraction of carotenoids? A theoretical versus experimental solubility study. *RSC Advances*, 6(33), 27750–27759. <https://doi.org/10.1039/C6RA03016E>
- Zhang, Y., & Fu, Q. (2018). Algal fouling of microfiltration and ultrafiltration membranes and control strategies: A review. *Separation and Purification Technology*, 203, 193–208. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2018.04.040>
- Zheng, H., Yin, J., Gao, Z., Huang, H., Ji, X., & Dou, C. (2011). Disruption of *Chlorella vulgaris* Cells for the Release of Biodiesel-Producing Lipids: A Comparison of Grinding, Ultrasonication, Bead Milling, Enzymatic Lysis, and Microwaves. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(7), 1215–1224. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9207-1>
- Zhu, L. (2014). The combined production of ethanol and biogas from microalgal residuals to sustain microalgal biodiesel: A theoretical evaluation. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 8(1), 7–15. <https://doi.org/10.1002/bbb.1442>

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Article :

- **Djamai, W., Mazzei, R., Bazzarelli, F., Dahmani, B., & Giorno, L. (2019)** Membrane-assisted biorefinery of microalgae to obtain enriched fractions of bioderived molecules. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. <https://doi.org/10.1002/bbb.2006>

Communications :

1. **W. Djamai, B. Dahmani, O. Djellouli.** *Determination of the antioxidant capacity of olive oil from different regions of Algeria.* **International Biotechnology Congress at the Service of the Company 'BioSeS 2015'**, 22-24 October 2015. Fes, Morocco.
2. **W. DJAMAI, B. DAHMANI & K. BELBACHIR.** *Chromatographic separation of pigment extracted from microalgae.* **The International Days of Biotechnology (JIB 2017)**, 18-22 Décembre 2017. Hammamet, Tunisie.
3. **Wissam DJAMAI, Benamar DAHMANI, Kawther BELBACHIR, Khalida BENAISSA1 & Hamdi Makhlouf.** *Determination of antioxidative potential of different extract of freshwater microalgae.* **International Workshop on the Sciences of Agriculture, Agri-food and Nutrition.** 13-14 November 2018. Tlemcen, Algeria.
4. **W. Djamai, R. Mazzei, F. Bazzarelli, B. Dahmani, L. Giorno.** *Development of membrane assisted process to recover and fractionate bio-derived molecules from microalgae.* **ITM Seminar Days 2018.** 19-20 December 2018. Cosenza, Italie.

Membrane-assisted biorefinery of microalgae to obtain enriched fractions of bioderived molecules

Wissam Djamaï, Institute on Membrane Technology, National Research Council of Italy, CNR-ITM, Via P. Bucci 17c, 87036, Rende, CS, Italy; Spectrochemistry and Structural Pharmacology laboratory, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Tlemcen, PB 119, Tlemcen 13000, Algeria
Rosalinda Mazzei  and **Fabio Bazzarelli**, Institute on Membrane Technology, National Research Council of Italy, CNR-ITM, Via P. Bucci 17c, 87036, Rende, CS, Italy
Benamar Dahmani, Spectrochemistry and Structural Pharmacology laboratory, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Tlemcen, PB 119, Tlemcen 13000, Algeria
Lidietta Giorno, Institute on Membrane Technology, National Research Council of Italy, CNR-ITM, Via P. Bucci 17c, 87036, Rende, CS, Italy

Received December 18, 2018; revised February 25, 2019; accepted March 05, 2019

View online at Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com);

DOI: 10.1002/bbb.2006; *Biofuels, Bioprod. Bioref.* (2019)



Abstract: Microalgae represent an important source of valuable bioproducts (such as food, nutraceuticals, antioxidants, and pigments) and biofuel. They grow spontaneously in surface water and represent a contaminant that has to be separated. There is thus an urgent need to develop technologies to harvest and refine them. Depending on the microalgae species, different biocompounds can be found and appropriate separation and purification methods must be refined and selected. In this work, microalgae harvested in the Hammam Boughrara dam, situated in Tlemcen (north-west of Algeria), were used as source to recover and fractionate bio-derived molecules using membrane-assisted processes. This study identified a suitable strategy to fractionate biomolecules using ultrafiltration (UF) membranes. To maintain a stable permeate flux it was necessary to decrease the complexity of the solution prior to UF. This was achieved by separating triacylglycerols (TAGs) and pigments, after breaking cells, by solid-liquid-liquid extraction with a green solvent. The UF of the remaining aqueous phase permitted a recovery factor of 70% of the proteins and more than 35% of the carbohydrates in the retentate. The TAGs that were not recovered in the green solvent, and remained in the aqueous phase, were separated in the permeate with a purity of about 70% and a recovery factor of about 60%. © 2019 Society of Chemical Industry and John Wiley & Sons, Ltd

Supporting information may be found in the online version of this article.

Key words: microalgae; biorefinery; green solvent; ultrafiltration; TAGs; nutraceuticals; bioproducts

Correspondence to: Rosalinda Mazzei, Institute on Membrane Technology, National Research Council of Italy, CNR-ITM, Via P. Bucci 17c, 87036, Rende, CS, Italy. E-mail: r.mazzei@itm.cnr.it; or Wissam Djamaï, Spectrochemistry and Structural Pharmacology laboratory, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Tlemcen, PB 119, Tlemcen 13000, Algeria. E-mail: wissamdjamaï@gmail.com



ملخص

تعد الطحالب الدقيقة مصدرًا مهمًا للمنتجات الحيوية (مثلًا المواد الغذائية، المغذيات، مضادات الأكسدة والأصبغ) والوقود الحيوي. ومن ثم أصبح الإقدام على تطوير تقنيات فصل وتنقية مناسبة أمرًا حتميًا. في هذا العمل، تم استخدام الطحالب الدقيقة التي تم تجميعها من سد حمام بوغراة، الواقع في ولاية تلمسان (شمال غرب الجزائر)، كمورد لاستخلاص جزيئات نشطة بيولوجيًا. تحقيقًا لهذه الغاية، تم إجراء تقييم للمركبات النشطة بيولوجيًا بالإضافة إلى نشاط مضادات الأكسدة، من ناحية أخرى، تم إجراء فصل وتنقية للمركبات الرئيسية لهذه الكتلة الحيوية باستخدام طريقة الترشيع العشوائي.

يُظهر مزيج الطحالب المجهرية المدروسة مجموعة متنوعة من جزيئات مضادات الأكسدة الطبيعية مثل البوليفينول والفلافونويدات وكذلك الأصبغ. بالإضافة إلى ذلك، خواص مضادات الأكسدة، التي أكدها تحديد عامل الارتباط مما يدل على مساهمة قوية من البوليفينول بواسطة قوة اختبار كسح الراديكالية (لتنشيط الجذور الألكيلية الحرة) (DPPH)؛ وقدرة جيدة من الكاروتينات والفلافونويد، التي تحتوي عليها المستخلصات، لمنع بيروكسيد β -كاروتين. وكذلك مع قدرة الإرجاع ملاحظة بشكل جيد للمجموعات الجزيئية الثلاث التي تمت دراستها (البوليفينول والفلافونويد والكاروتينات). كما سمحت النتائج التي تم الحصول عليها بتحديد أربع مركبات فينولية "حمض الغاليك، الكاتشين، حمض السيرنجيك و جزيئة النارانجين" في المستخلص الميثانولي الذي يكشف عن عامل مضاد للأكسدة أكثر فعالية مقارنة بالمستخلصات الأخرى المدروسة.

من ناحية أخرى، تم تطوير إستراتيجية مناسبة لفصل الجزيئات الحيوية باستخدام الترشيع الفائق (UF) بعد اختيار طريقة فعالة لكسر الخلية. للحفاظ على تدفق نفاذية مستقرة، كان من الضروري فصل الدهون الثلاثية (TAGs) والأصبغ بعد كسر الخلايا عن طريق استخراجهم باستعمال مذيب بديل سمح الترشيع العشوائي (UF) للمحلول المائي المتبقّي بالحصول على عامل الاسترداد بنسبة 70٪ من البروتينات وأكثر من 85٪ من الكربوهيدرات. تم فصل الدهون الغير مستخلصة في المذيبات البديلة، المتبقية في المستخلص المائي مع نفاوة حوالي 70٪ وعامل استرداد حوالي 60٪.

الكلمات الرئيسية: الطحالب، النشاط المضاد للأكسدة؛ معامل تكرير أحيائية؛ المذيبات البديلة؛ الترشيع الفائق، المغذيات، المنتجات الحيوية، حمام بوغراة.

Résumé

Les microalgues représentent une source importante de bioproduits (tels que les aliments, les nutraceutiques, les antioxydants et les pigments) et de biocarburants. Il est donc avantageux de développer des technologies pour séparation et de purification appropriées qui doivent être affinées et sélectionnées. Dans ce travail, les microalgues récoltées dans le barrage de Hammam Boughrara, situé à la Wilaya de Tlemcen (nord-ouest de l'Algérie), ont été utilisées comme ressource pour récupérer et fractionner des composés bioactifs. Pour ce faire, une évaluation des composés bioactifs en plus de l'activité antioxydante a été réalisée, d'autre part, une séparation/purification des principaux composés de cette biomasse a été effectuée à l'aide de procédé assisté par membrane.

Le mélange microalgale étudié montre une variété de molécule antioxydantes naturels tels que des teneurs en polyphénols, flavonoïdes ainsi qu'en pigments importantes. Ainsi qu'il possède de modestes propriétés antioxydantes, confirmé par la détermination du facteur de corrélation indiquant une forte contribution des polyphénols par un pouvoir antiradicalaire (le piégeage du radical libre DPPH•); et une bonne capacité des caroténoïdes et des flavonoïdes, contenant les extraits, à l'inhibition de la peroxydation du β -carotène; ainsi qu'avec un pouvoir réducteur bien remarquable des trois groupement moléculaire étudiés (polyphénols, flavonoïdes et caroténoïdes). Les résultats obtenus ont permis aussi l'identification quatre composés phénoliques « Acide Gallique, Catéchine, Syringique et Naringinine » dans l'extrait méthanolique qui révèle un agent antioxydant plus efficace vis-à-vis les autres extraits étudiés.

D'autre part, une stratégie appropriée pour fractionner les biomolécules en ultrafiltration (UF) a été développée après la sélection d'une méthode de destruction cellulaire efficace. Afin de maintenir un flux de perméat stable, il était nécessaire de réduire la complexité de la solution avant l'ultrafiltration. Ceci a été réalisé en séparant les triglycérides (TAGs) et les pigments, après rupture des cellules, par extraction solide-liquide-liquide avec un solvant alternative. L'UF de la phase aqueuse restante permettait un facteur de récupération de 70% des protéines et plus de 85% des glucides dans le retentat. Les TAGs non récupérés dans le solvant alternative, restant dans la phase aqueuse ont été séparés dans le perméat avec une pureté d'environ 70% et un facteur de récupération d'environ 60%.

Mots clés : Microalgues; activité antioxydante; bioraffinerie; solvant alternatif; ultrafiltration; les nutraceutiques; bioproduits; Hammam Boughrara.

Abstract

Microalgae represent an important source of valuable bioproducts (such as food, nutraceuticals, antioxidants, and pigments) and biofuel. There is thus an urgent need to develop an appropriate separation and purification technologies. In this work, microalgae harvested in the Hammam Boughrara dam, situated in Tlemcen (north-west of Algeria), were used as source to recover and fractionate bio-derived molecules using membrane-assisted processes. Thus, an evaluation of the bioactive compounds in addition to the antioxidant activity was performed, on the other hand, a separation/purification of the main compounds of this biomass was carried out using membrane-assisted method.

The microalgal mixture studied shows a variety of natural antioxidant molecules such as polyphenol, flavonoids as well as pigments. In addition, modest antioxidant properties, confirmed by the determination of the correlation factor indicating a strong contribution of polyphenols by an antiradical power (Test of DPPH•); and a good ability of carotenoids and flavonoids, containing the extracts, to inhibit the peroxidation of β -carotene; as well as with a very significant reducing power of the three molecular groups studied (polyphenols, flavonoids and carotenoids). The results obtained also allowed the identification of four phenolic compounds "Gallic Acid, Catechin, Syringic and Naringinine" in the methanolic extract which reveals more effective antioxidant agent compared to the other extracts studied.

On the other hand, an appropriate strategy to fractionate biomolecules using ultrafiltration (UF) has been developed after the selection of an effective cell disruption method. To maintain a stable permeate flux it was necessary to decrease the complexity of the solution prior to UF. This was achieved by separating triglycerides (TAGs) and pigments after cell disruption by solid-liquid-liquid extraction with a green solvent. The UF of the remaining aqueous phase allowed a recovery factor of 70% of the proteins and more than 85% of the carbohydrates in the retentate. TAGs not recovered in the alternative solvent, remaining in the aqueous phase were separated in the permeate with a purity of about 70% and a recovery factor of about 60%.

Key words: Microalgae; antioxidant activity; biorefinery; Green solvent; ultrafiltration; nutraceuticals; bioproducts; Hammam Boughrara.