

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ de BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie de procédé



**MÉMOIRE DE MASTER PROFESSIONNEL**

EN GÉNIES DE PROCÈDES

**Spécialité : Pharmacie Industrielle**

**Etude de la Biodégradation du  
Diclofenac Sodique par une Mixture des  
Microalgues**

Présenté par :

**Ouhalima Cherifa**

Encadre par :

**M<sup>me</sup> Ait Mesbah.Z**

**M<sup>r</sup> Hamitouche.A**

**2016/2017**

## ملخص

ديكلوفيناك الصوديوم هو دواء مضاد للالتهابات الغير ستيرويدي، وكملوث، يمثل خطرا على الصحة والبيئة. تم اختيار مجموعات مختلطة من الطحالب الدقيقة لاختبار قدرتها على تحلل ديكلوفيناك بواسطة الطحالب خلال زراعتها في النظام الهوائي.

أجريت التجارب لدراسة إمكانية التحلل الحيوي لديكلوفيناك باستخدام خليط من الطحالب الدقيقة تعتبر كعوامل: تركيز مصدر الازوت ( 0 إلى 2 غ/لتر) ، ودرجة الحموضة ( 6 إلى 8)، والتركيز الأولي ل ديكلوفيناك الصوديوم ( 10 إلى 30 ملغم / لتر)، وتم تقييم الدلالة الإحصائية للنموذج باستخدام تحليل التباين باستخدام مينيتاب 16. تم تطوير النماذج التنبؤية على أساس الانحدار الخطي لتحديد أهمية آثار هذه المتغيرات وتفاعلاتها على نمو هذه الطحالب الدقيقة وعلى معدل التخلص من الملوثات.

**كلمات البحث:** الطحالب الدقيقة، المعالجة الحيوية، ديكلوفيناك، مياه الصرف الصحي الصيدلانية، النظام الهوائي.

## Résumé

Le Diclofenac sodique DFS est un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien et, en tant que polluant, il représente un risque persistant de résidu pour la santé et l'environnement. Pour ce, une culture mixte de microalgues a été sélectionnée pour tester sa capacité à biodégrader le diclofénac en se basant sur le plan d'expériences factoriel complet à deux niveaux. La biodégradation est évaluée pendant la culture dans le système de lot aérobie

en utilisant un mélange de microalgues impliquant les facteurs, la concentration de la source d'azote, ( $\text{NH}_4$ ,  $2\text{SO}_4$  de 0 à 2 g / L), le pH (de 6 à 8) et la concentration initiale du DFS (de 10 à 30 mg / L). La signification statistique du modèle a été évaluée par le plan d'expériences à l'aide de Minitab 16. Les modèles prédictifs basés sur la régression linéaire ont permis de déterminer les conditions optimums permettant d'atteindre une biodégradation totale du Diclofenac.

**Mots-clés:** microalgues, biotraitement , diclofénac, eaux usées pharmaceutique, système batch .

## Abstract

Diclofenac Sodium DFS is a non-steroidal anti-inflammatory drug and, as pollutant, it represents a persistent residue hazard to health and to the environment. To this end, a mixed culture of microalgae was selected to test its ability to biodegrade diclofenac based on the complete two-level factor design. Biodegradation is evaluated during cultivation in the aerobic lot system using a mixture of microalgae involving factors, concentration of nitrogen source ( $\text{NH}_4$ ,  $2\text{SO}_4$  0-2 g / L), pH (from 6 to 8) and the initial DFS concentration (10 to 30 mg / L). The statistical significance of the model was evaluated by the experimental design using Minitab 16. Predictive models based on linear regression were used to determine the optimum conditions for achieving total biodegradation of Diclofenac.

**Keywords:** microalgae, biotreatment, batch system, diclofenac, pharmaceutical wastewater.

## **Remerciement**

Je tiens profondément à remercier tout d'abord ALLAH seigneur de l'univers, qui a prescrit que ce travail voit la lumière. Et qui m'a donné le savoir, la volonté, la force et le courage pendant toute la période de ma vie et de mes études.

Je remercie du fond du cœur mes chers parents de tout ce qu'ils ont fait pour moi.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma promotrice Mme Z .Ait mesbah et mon promoteur Mr A. Hamitouche , qui m'ont apportés leurs aide,soutien et assistance tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Je tiens également à remercier tous ceux qui m'ont aidé à réaliser ce travail de près ou de loin,

Mes sincères remerciements vont également à tous les membres du département de génie des procédés, le chef de département Mr A. cheknan et chef de option de pharmacie industrielle Mme A .hajzain

Je remercie toute l'équipe du CRAPC

## Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction .....	1
Chapitre I : Revue bibliographique	
I.1 Diclofénac de sodium.....	3
I.1.1. Généralités .....	3
I.1.2. Disposition dans le corps.....	4
I.1.3.Données de toxicité.....	4
I.1.3.1 Toxicité du diclofénac de sodium .....	4
I.1.3.1. Toxicité aiguë .....	4
I.1.3.2. Toxicité chronique .....	5
I.1.4. Le Diclofenac Sodique et l'environnement .....	5
I.1.4.1. Réglementation relative à l'évaluation des risques liés à la présence de résidus de médicaments dans l'environnement.....	5
I.1.4.2. Produits pharmaceutiques et Eau potable.....	5
I.1.4.3. Devenir et présence dans l'environnement .....	6
I.1.4.3.1 Le Diclofénac dans les compartiments aquatiques .....	6
I.1.4.3.2. Comportement dans l'environnement .....	6
I.1.4.3.1.1 Dans le milieu aquatique .....	7

I .2 .1 Définition et origine des micro-algues.....	7
I.2.2. Caractéristiques.....	8
I.2.3 Classification.....	9
I.2.4 Les applications des microalgues.....	9
I.2.4.1. Domaine alimentaire .....	10
I.2.4.2. Domaine pharmaceutique .....	10
I.2.4.3. Domaine cosmétique.....	10
I.2.4.4 .Domaine énergétique .....	10
I.2.4.5. Domaine environnemental .....	11
I.2.4.5.1. Traitement des eaux usées .....	11
I .3.1. Élimination du diclofenac sodique dans les stations d'épuration classiques.....	12
I.3.2 Elimination du diclofénac par les nouveaux procédés .....	14
I .3.2 .1/ Élimination du diclofénac par ozonation.....	14
I.3.2.2.Élimination du diclofénac par rayonnements UV.....	14
I.3.3.3. Élimination du diclofénac par le charbon actif.....	14
I.3.4 La biodégradation du diclofénac de sodium .....	14
 Chapitre II : méthodes et matériels	
II.1. MATERIELS .....	18
II.1.1.Matières premières .....	18
II.1.2. Réactifs et verrerie .....	18
II.1.3. Équipements.....	18
II.2. METHODES.....	18
II.2.1. Méthodologie de travail.....	18

II.2.2. Méthode d'analyse de la densité optique des micro-algues.....	19
II.2.3. Méthode de Calcul du Rendement R%.....	19
II.2.4. Méthode de détermination du taux de croissance des microalgues.....	21
Chapitre III : résultats et discussions	
III.1. Analyse du diclofénac par HPLC.....	22
III.1.1. La courbe d'étalonnage .....	23
III.1.2. confirmation de la concentration du clofenal 75mg/3ml.....	23
III .2 . Identification des micro-algues .....	26
III.2.1. Méthode d'isolement.....	26
III.2.1.1. Prélèvement (échantillonnage) .....	26
III.2.1.2. Ensemencement .....	27
III.2.1.4. Purification.....	27
III.2.1.5. La culture .....	28
III.3. La méthodologie des plans d'expériences .....	31
III.3.1. Introduction aux plans d'expériences.....	31
III.3.2. Terminologie.....	31
III.3.3. Facteur .....	31
III.3.4. Effet d'un facteur .....	31
III.3.5. La réponse .....	32
III.3.6. Plans factoriels complets à deux niveaux .....	32
III. 3.7. Détermination de l'équation du modèle.....	33
III.3.8. Avantage et inconvénient.....	33
III.3.9. Planification des essais de biodégradation.....	33

III.3.10. Analyse des résultats.....	34
III.3.10.1. Modèle général.....	34
III.10.2. Graphiques des contours de R%.....	38
Conclusion générale.....	40

## Liste des figures

Figure I.1: la formule développée du diclofénac .....	4
Figure I-2:les différentes caractéristiques des microalgues.....	7
Chapitre II : méthode et matériels	
Figure II .1: une boîte de CLOFENAL.....	20
Figure II .2 : Micro-algues .....	20
Figure II. 3: Le dispositif expérimental.....	22
Chapitre III : Résultats et discussions	
Figure III. 1 : Courbe d'étalonnage du Diclofenac sodique.....	22
Figure II .2 : image microscopie des micro-algues 1.....	25
Figure III.3 : image microscopie des micro-algues 2.....	26
Figure III .4 : schéma générale de l'isolement et identification des microalgues.....	27
Figure III.5: Des effets du diagramme de Pareto .....	35
Figure III .6 : Variation de rendement théorique et expérimental de la biodégradatio...	36
Figure III. 7 : Évolution de la concentration de l'azote en fonction de Ph.....	37
Figure III.8 : Évolution de la concentration du DFS en fonction de Ph.....	38
Figure III.9 : Évolution de la concentration du DFS en fonction de la Ci de l'azote.....	39

## Liste des tableaux

Tableau I.1 : Rendements d'élimination complémentaire(%) de la filière eau par Traitement tertiaire.....	13
Tableau III.1 Les concentrations de la gamme .....	21
Tableau III.2: les concentrations calcule.....	22
Tableau III.3 : Valeur de l'Erreur absolue.....	23
Tableau III.4 : Valeur de l'Erreur relative.....	25
Tableau III.5 : calcul de CV%.....	25
Tableau III.6 : Les paramètres étudiés et leurs niveaux.....	42
Tableau III.6 : Les paramètres étudiés et leurs niveaux.....	33
Tableau III.8 : Réponses des essais expérimentaux et réponses calculées.....	34

## Liste des Abréviations

**C** : concentration

**CV** : coefficient de variation

**DFS** : diclofénac sodique

**HPLC** : La chromatographie liquide à haute performance

**µg** : microgramme

**Mg** : milligramme

**mL** : millilitre

**L** : litre

**R<sup>2</sup>** : coefficient de corrélation

**R%** : le rendement de biodégradation

**Rpm** : rotation par minute

**V** : Volume (L)

**Vi**: Valeur réelle du paramètre « i »

**ΔVi**: Représente l'écart moyen entre les deux niveaux du paramètre « i »

**Xi** : coordonnées réduites notées

## Bibliographique

- [1] Manisha V.Ultrasonics <<Dégradation du diclofénac sodium en utilisant des processus combinés basés sur la cavitation hydrodynamique et la photocatalyse hétérogène >>. (May 2014),[ Pages 1035–1043]
- [2] les entreprises du médicament. Organisation consultée en 2011
- [3]PHARMACOPÉE EUROPÉENNE. 6ème EDITION. Diclofénac sodique (1002).(2008)
- [4]Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, London: Pharmaceutical (al Press. Electronic version, 2005
- [5] Andreozzi, R., Raffaele, M. and Nicklas, p.<<Produits pharmaceutiques dans les effluents STP et leur photodégradation solaire dans le milieu aquatique. Chemosphere>>, 50(2003), pages 1319- 1330..
- [6] Ferrari B., Mons R., Vollat B., Frayssé B., Paxeus N., Lo Giudice R., Pollio A., Garric J. Évaluation des risques environnementaux de six produits pharmaceutiques humains 23: 1344-1354. (2004)
- [7] INERIS, 2011. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France Diclofenac, 57 p. En ligne : <http://www.ineris.fr/substances/2009>.
- [8] Manisha V Bagal, Parag R. Gogate.<<Dégradation du diclofénac sodium en utilisant des processus combinés basés sur la cavitation hydrodynamique et la photo-catalyse hétérogène>> , India (October 2013)

[9]Togola, A., Amalric, L., & Bristeau, S. <<Les substances pharmaceutiques dans les eaux superficielles et souterraines du bassin Loire-Bretagne.>>. BRGM/RP 55578-FR.. (2008).

[10] Rayen FILALI , Estimation et commande robustes de culture de micro algues pour la valorisation biologique de CO<sub>2</sub> , Ecole Doctorale « Sciences et Technologies de l'Information des Télécommunications et des Systèmes » THÈSE DE DOCTORAT (paris) (2012)

[11]Schlüsener, M., Löffler, D. & Ternes, T. List of the relevant PPs. In Project Européen KNAPPE, Deliverable D11,63 p. European Commission, 6th Framework Program(2008).

[12] Fent, K. ,.<<Écotoxicologie des produits pharmaceutiques humains. Toxicologie aquatique >>, 76, pp. 122-59. (2006)

[13] Garric, J. et Ferrari, B. Les substances pharmaceutiques dans les milieux aquatiques Niveaux d'exposition et effet biologique : Revue des sciences de l'eau, 18/3, pp.307-30

[14] santos.L'occurrence, le sort et l'élimination des résidus pharmaceutiques dans les milieux aquatiques: un examen des données de recherche récentes. 131, pp.5-17. (2003)

[15] Katarzyna Styszko , Katarzyna Nosek Monika Motak , Kai Bester .<<preliminaire des minéraux d'argile pour l'élimination des produits pharmaceutiques, du bisphénol A et du triclosan dans les solutions aqueuses acides et neutres >>

[16]L'Institut national de l'environnement industriel et des risques INERIS, Données technico-economiques sur les substances chimiques en France 57 p. En ligne2011.

<http://www.ineris.fr/substances/fr/substance/2909>

[17] Ternes, T.A. << Enlèvement des produits pharmaceutiques pendant le traitement de l'eau potable. Science et technologie de l'environnement >>, 36, pp.3855-63. (2002)

[18] Casellas, C. Résidus de médicaments dans les eaux destinées à la consommation humaine (2010). AFSSA. En ligne

[http://www.cpepesc.org/IMG/pdf/EAUX-RaMedicamentsEauxMethodo\\_1\\_pdf](http://www.cpepesc.org/IMG/pdf/EAUX-RaMedicamentsEauxMethodo_1_pdf)

[19] Kirhensteine, Soutien technique pour l'évaluation d'impact de l'examen des substances prioritaires dans le cadre de la directive 2000/60 / CE Évaluation de la substance. Commission européenne (DG Environnement Unit D1.). (2011). En ligne

[http://circa.europa.eu/public/irc/env/wfd/library?l=/framework\\_directive/thematic\\_documents/priority\\_substances/supporting\\_substances/substances\\_impacts/diclofenac\\_EN\\_1.0\\_&a=d](http://circa.europa.eu/public/irc/env/wfd/library?l=/framework_directive/thematic_documents/priority_substances/supporting_substances/substances_impacts/diclofenac_EN_1.0_&a=d)

[20] Kümmerer, I. <<Stratégies pour réduire l'entrée dans l'environnement .Chapitre 25. >>. pp. 411-418.( 2008)

[21] NMRErnest Marco-Urrea, Miriam Pérez-Trujillo, Carles Cruz-Morató, Gloria Caminal, Teresa Vicent<<Dégradation du médicament diclofenac de sodium par des pastilles Trametes versicolor et identification de certains intermédiaires>> 08193 Bellaterra, Spain

[22] V.S. Bessa, I.S. Moreira , M.E. Tiritan , P.M.L. Castro ,<< Enrichissement des souches bactériennes pour la biodégradation du diclofénac et de la carbamazépine provenant des boues activées >> .(6 February 2017)

[23] Schwaiger J., Ferling H., Mallow U., Wintermayr H., Negele R.D. <<Effets toxiques du médicament anti-inflammatoire non stéroïdien diclofenac>>. [ 141-150.] (2004)

- [25] Webb S.F., <<Une perspective basée sur les données sur l'évaluation des risques environnementaux des produits pharmaceutiques >>. pp. 319-343.]( 2001)
- [25] Daniel Proulx a , Paul Lessard a b & Joël De La Noüe<< Traitement tertiaire d'un effluent domestique secondaire par culture intensive de la cyanobactérie *Phormidium* >> Canada , G1K 7P4.
- [26] Shufan Yang , Faisal I. Hai , Long D. Nghiem , Luong N. Nguyen , Felicity Roddick ,William E. Price .<<L'élimination du bisphénol A et du diclofénac par un nouveau bioréacteur à membrane fongique fonctionnant dans des conditions non stériles >>. (January 2013)
- [27]N. Abdel-Raouf , A.A. Al-Homaidan , I.B.M. Ibraheem <<Traitement des eaux usées et des micro-algues >>, Riyadh, Saudi Arabia( April 2012)
- [28] J. Goupy; revue de statistique appliquée; Tome 38 ; 4; (1990) ; 5-44.
- [29] G. « plans d'expérience, de l'expérience à l'assurance de qualité »Sado, M. CH. Sado ; ;4 ième Edition Afnor ; (2000).
- [30] Introduction aux plans d'expériences .J. Goupy, L. Creighton, 3 ième Ed, Dunod ;(2006).
- [31] Les plans d'expériences.J.GOUPY ; Revue MODULAD ; (2006).
- [32]: Principes d'expérimentation : Planification des expériences et analyse de leurs résultats .P.DAGNELIE ; Edition LES PRESSES AGRONOMIQUES DE GRENOBLE ; A.S.B.L .(2003)
- [33] Marcondes M. Pacheco, Michele Hoeltza, Maria S. A. Moraes & Rosana C. S. <<Microalgues: techniques de culture et épuration des eaux usées >> (Brazil 2015)

[34] Kumar, K., Dasgupta, C.N., Nayak, B., Lindblad, P., Das, D. <<Développement de photobioréacteurs appropriés pour la séquestration du CO2 abordant le réchauffement climatique à l'aide d'algues vertes et de cyanobactéries. Bioressources Technologie >>, 102 (8), pp. 4945-53. (2011)

[35] Marlène MORLAIX et Patrick LASSUS. << influence de l'azote et du phosphore sur la croissance et la toxicité de PROROCENTRUM LIMA (EHRENBERG) DOSGE >> . France (1992)

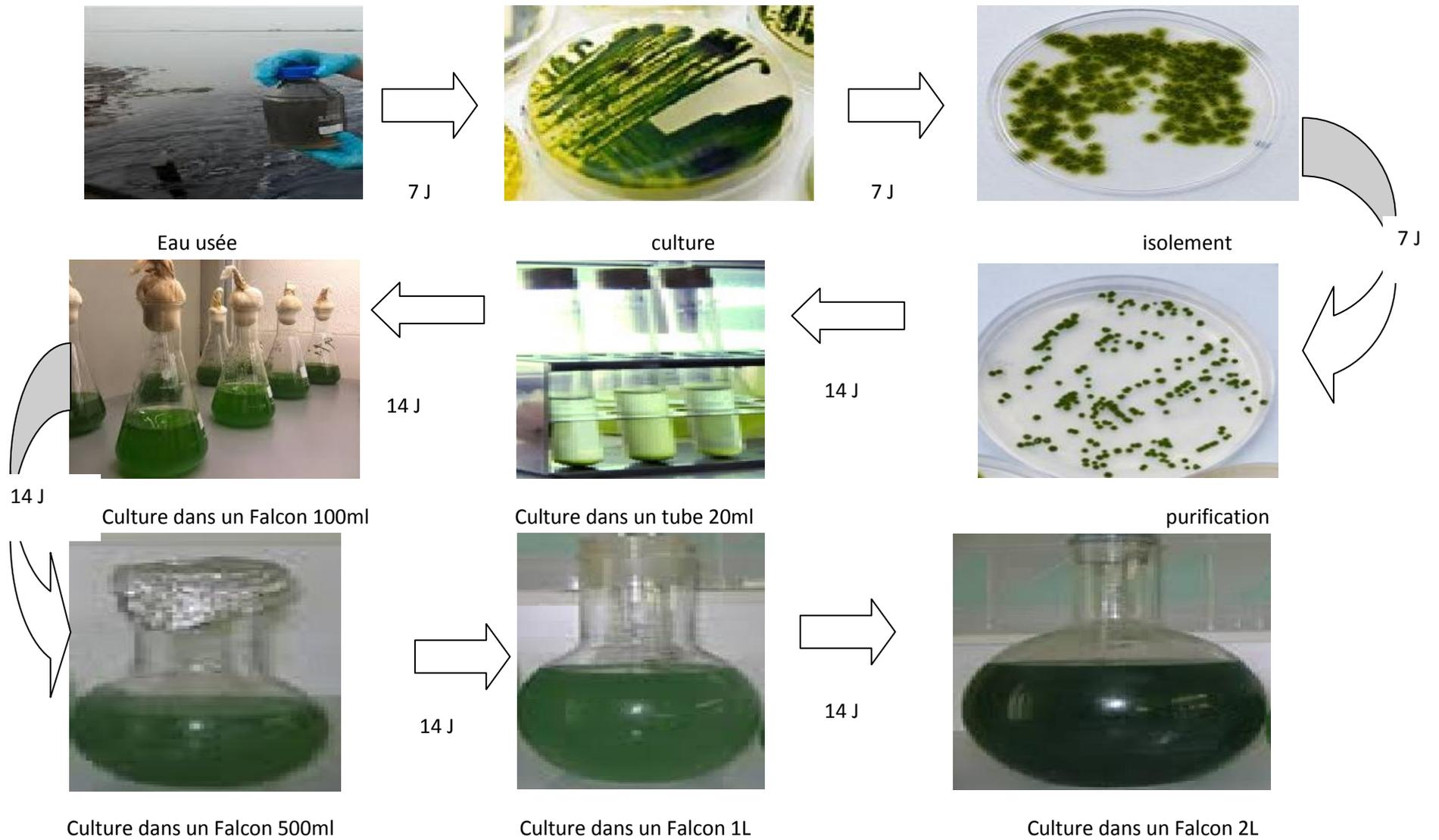


Figure III.4 : Schéma générale de l'isolement et identification des micro-algues

## INTRODUCTION

Les sociétés développées ont pris progressivement conscience des impacts immédiats ou différés que les activités humaines, au sens le plus large, exercent sur la qualité de l'environnement. Nous sommes de plus en plus nombreux à nous soucier de préserver la qualité de ce qui nous entoure, et notamment de l'eau. Or, utiliser l'eau, c'est accepter de la polluer. Toute activité, qu'elle que soit domestique, agricole ou encore industrielle, engendre des rejets polluants indésirables. Il faut donc continuellement chercher à protéger cette ressource.

En ce qui concerne les activités industrielles, les règlements en matière de rejet d'eaux usées sont sévères et obligent les industriels à traiter leurs effluents. La réutilisation dans les procédés industriels des eaux retraitées est un aspect qui est de plus en plus pris en compte par les industriels dans le cadre de la gestion améliorée de l'eau et du développement durable. Le traitement des effluents et des eaux usées est progressivement devenu une priorité pour de nombreuses industries.

Il existe un certain nombre de techniques de dépollution des eaux polluées produites par les filières industrielles. En général, différentes combinaisons de procédés permettent de traiter efficacement les contaminations industrielles. Cependant, ces procédés ont un coût de plus en plus élevé. Il y a donc un intérêt croissant à développer des méthodes efficaces et peu onéreuses de traitement et de dépollution. De nombreux travaux scientifiques transdisciplinaires ont été conduits depuis une vingtaine d'années et publiés dans la littérature.

Au cours de ces dernières années, la présence de micropolluants émergents tels que les produits pharmaceutiques dans l'environnement ont reçu beaucoup d'attention par les chercheurs car ils sont toxiques et ces des perturbateurs endocriniennes. Cependant, l'effet réel de ces micropolluants dépend à la fois de la concentration mais aussi des autres facteurs physico-chimiques tels que le temps d'exposition, la persistance, la bioabsorption, la bioaccumulation et la biotransformation.

Les produits pharmaceutiques (PPs) constituent un nouveau sujet de préoccupation dans le domaine de l'eau. En effet grâce au progrès de l'analyse physico-chimique, la présence de trace de substances médicamenteuses et leurs dérivés ou métabolites a été

largement établie à l'échelle mondiale dans les différents compartiments aquatiques dans les eaux superficielles et souterraines, dans les eaux résiduaires et dans les sols.

Le diclofénac (DCF) est un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien utilisé en médecine humaine comme composé analgésique, antiarthritique et antirhumatismal. Ce médicament est xénobiotique et présente une persistance relative surtout dans le milieu aquatique.

Les microalgues sont des micro-organismes photosynthétiques qui présentent une grande diversité morphologique et des caractéristiques biochimiques intéressantes qui leur confèrent un grand nombre d'applications.

L'objectif de ce mémoire porte sur l'utilisation des micro-algues pour la biodégradation des eaux usées chargées en (DCF) en mode Batch. Nous avons suivi pour cela, le plan suivant :

La 1<sup>er</sup> partie présente une synthèse des connaissances actuelles sur le diclofenac et sa toxicité, son devenir dans l'environnement et son élimination par différents procédés) et les microalgues (origine, caractéristique, classification et applications) ;

La 2<sup>eme</sup> présente le protocole expérimentale, les matériaux et les équipements utilisés ;

La 3<sup>eme</sup> partie résume les résultats expérimentaux et leur discussion par rapport à la littérature.

Cette étude sera clôturée par une conclusion et des perspectives.

## CHPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### I .1.Le Diclofénac de Sodium (DFS)

#### I.1.1. Généralités

Le diclofénac de sodium (DFS) est un anti-inflammatoire non stéroïdien utilisé en médecine humaine comme analgésique, antiarthritique et antirhumatismal. Il appartenant à la famille des acides aryl-alcanoïques ; Le terme non stéroïdien est utilisé pour le distinguer des glucocorticoïdes qui ont une semblable action anti-inflammatoire [1].

Selon LEEM (2011), il existe environ 41 spécialités pharmaceutiques contenant le diclofénac comme principe actif (INERIS 2012), sous différentes formes d'administration, cutanée (gel, .....), orale (comprimé, ...), injectable [2].

#### I.1. 2. Caractéristiques physico-chimiques du diclofénac de sodium

##### 1. Aspect :

- Poudre cristalline ;
- Blanche ou faiblement jaunâtre ;
- Faiblement hygroscopique.

##### 2. Solubilité :

- Assez soluble dans l'eau ;
- Facilement soluble dans le méthanol ;
- Soluble dans l'éthanol à 96 pour cent ;
- Peu soluble dans l'acétone[3].

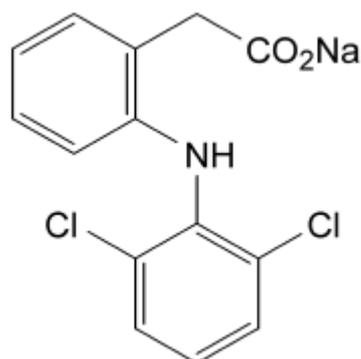


Figure I.1: Formule développée du diclofénac Sodique

### **I.1.3. Disposition dans le corps**

Bien absorbé après administration orale, mais subit un métabolisme important de premier passage. Jusqu'à environ 70% d'une dose est excrétée dans l'urine en 3 jours, y compris 20 à 40% en tant que conjugués glucuronide et sulfate du métabolite majeur 4'-hydroxydiclofenac (actif) et jusqu'à environ 15% comme conjugués de diclofénac inchangé. [4]

### **I.1.4. Toxicité du diclofénac sodique**

#### **I.1.4.1. Toxicité aiguë**

Les données de toxicité varient pour chaque composé. Le diclofénac semble être le composé ayant la plus haute toxicité aiguë[6].

#### **I.1.4.2. Toxicité chronique**

Une des premières études sur le poisson, en a été appliquée à la truite, en exposant les organismes par l'eau au diclofénac. Cette étude a montré qu'au-dessus de 1 µg/L, quatre semaines d'exposition entraînent les premières altérations histopathologiques (au niveau des reins et des branchies) allant jusqu'à une dégradation de la fonctionnalité de ces organes. Aussi, les effets toxiques du diclofénac (toxicité cellulaire, génotoxicité, effets œstrogènes) sur la faune aquatique ont été mis en avant pour des teneurs inférieures à 1 µg/l.

### **I.1.5. Le diclofenac sodique et l'environnement**

L'industrie pharmaceutique fabrique ses médicaments dans le respect des règles des bonnes de fabrication BPF ; Parmi les exigences figure la norme ISO 14000 relative à l'environnement.

#### **I.1.5.1. Réglementation relative à l'évaluation des risques liés à la présence de résidus de médicaments dans l'environnement**

Plusieurs directives et réglementations ont été dictées en matière de protection de l'environnement [7]:

Les principaux textes réglementaires sont concernant le diclofenac présentés ci-après.  
Conditions d'autorisation de mise sur le marché des produits pharmaceutiques

Les principaux textes réglementaires concernant les conditions d'autorisation de mise sur le marché des produits pharmaceutiques à usage humain et à usage vétérinaire sont :

- Le règlement CE n°726/2004 du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004 établissant des procédures communautaires pour l'autorisation et la surveillance en ce qui concerne les médicaments à usage humain et à usage vétérinaire et instituant l'Agence Européenne des Médicaments (EMA). A noter que le dernier acte modificatif est le règlement CE n°470/2009 du Parlement européen et du conseil du 6 mai 2009 établissant des procédures communautaires pour la fixation des limites de résidus des substances pharmacologiquement actives dans les aliments d'origine animale [7].
- Les directives 2001/83/CE et 2001/82/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 novembre 2001 instituant respectivement un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain et aux médicaments à usage vétérinaire. Ces directives ont été modifiées par la directive 2009/53/CE du Parlement européen et du conseil du 18 juin 2009 en ce qui concerne les modifications des termes d'une autorisation de mise sur le marché de médicaments.

Selon les deux directives 2001/83/CE et 2001/82/CE, une évaluation du risque environnemental est nécessaire pour toutes les demandes d'autorisation de mise sur le marché pour les médicaments à usage humain et vétérinaire. Une procédure d'évaluation du risque environnemental a été développée par l'Agence Européenne des Médicaments pour les nouveaux médicaments mis sur le marché communautaire. Il existe deux guides d'application pour les pharmaceutiques : un à usage humain<sup>3</sup> (prenant effet au 1er décembre 2006) et un usage vétérinaire<sup>4</sup> (prenant effet au 1er décembre 2007 et révisé au 1er mars 2009) [7].

#### **I.1.5.2. Produits pharmaceutiques et Directive Cadre sur l'Eau**

Le diclofenac n'est pas mentionné dans la liste des substances prioritaires de la Directive Cadre sur l'Eau (**Directive 2000/60 du 23 octobre 2000**) et il n'a pas été retenu en 2008 parmi les substances soumises à révision pour leur possible identification comme substance

prioritaire ou comme substance dangereuse prioritaire (Annexe III – Directive 2008/105/EC du Parlement européen et du Conseil établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau). De la même façon, le diclofenac n'est pas mentionné dans l'arrêté du 08/07/10 établissant la liste des substances prioritaires et fixant les modalités et délais de réduction progressive et d'élimination des déversements, écoulements, rejets directs ou indirects respectivement des substances prioritaires et des substances dangereuses visées à l'article R. 212-9 du code de l'environnement. [7]

La Commission Européenne, en janvier 2012, a proposé d'ajouter quinze substances chimiques à la liste des trente-trois polluants qui sont surveillés et contrôlés dans les eaux de surface de l'Union Européenne. Il s'agit d'une nouvelle mesure visant à améliorer la qualité des eaux des rivières, lacs et eaux côtières. Parmi ces quinze substances figurent des substances pharmaceutiques dont le diclofenac (Commission Européenne, 2012). [7]

### **I.1.5.3. Présence du diclofenac sodique dans l'environnement**

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) se révèlent être les contaminants environnementaux les plus fréquemment mentionnés en raison du taux de consommation élevé de ces médicaments. Le Diclofénac est largement détecté dans les échantillons d'eaux usées, en raison de sa faible biodégradation et sa nature non volatile et polaire [7, 8, 9]

Le diclofénac, a été fréquemment détecté dans les stations d'épuration municipales, Et démontré qu'il est potentiellement un risque pour la société humaine et l'environnement, même à des niveaux de traces. En raison de la nature non volatile polaire, la distribution du diclofénac dans l'environnement a eu lieu principalement par la migration du milieu aquatique et l'accumulation de la chaîne alimentaire [1].

## **I.2. Les micro-algues**

### **I.2.1. Définition et origine des micro-algues**

Les algues sont des organismes photosynthétiques qui se développent dans des habitats variés, majoritairement des environnements aquatiques, et qui sont capables de convertir l'énergie lumineuse et une source de carbone, le dioxyde de carbone ou « CO<sub>2</sub> », en un ensemble de matières organiques ou « biomasse » [10].

On distingue deux catégories principales d'algues :

- 1) Les « macro-algues »
- 2) Les « micro-algues ».

Les microalgues ont une taille de l'ordre du micromètre et sont considérées comme des algues unicellulaires qui se développent en suspension principalement dans des solutions aqueuses [10].

La première culture unie algale a été réalisée par Beijerinck en 1890[10] avec l'espèce *Chlorella vulgaris*. Ces micro-usines photosynthétiques présentent des caractéristiques similaires aux plantes terrestres, mais leur structure morphologique, permettant une meilleure accessibilité de l'eau, du dioxyde de carbone et des autres nutriments, leur permet d'avoir une efficacité photosynthétique supérieure.

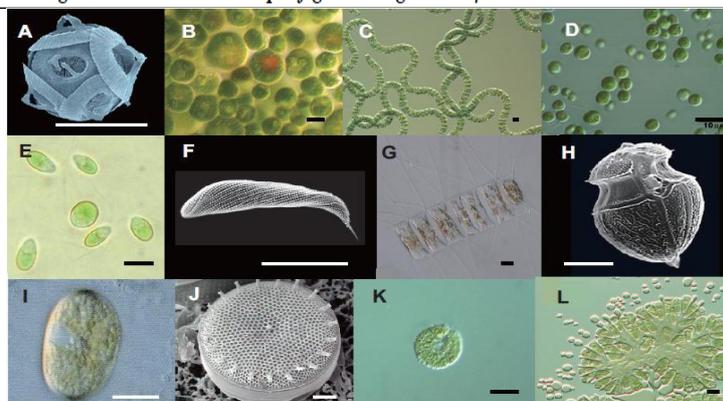
Leurs capacités d'adaptation et de survie sont telles qu'elles sont aptes à coloniser tout type de milieux. On les trouve aussi bien dans les eaux thermales, les glaces, les eaux acides ou encore hyper salées ainsi que les grottes ; elles peuvent s'associer, sous forme de symbioses, avec tout type d'organisme vivant et même les parasites et peuvent se développer sur des surfaces rigides (murs, troncs d'arbres...) ou structures immergées ; Certaines espèces peuvent supporter des températures très faibles ou paradoxalement extrêmes. Cette faculté d'adaptation est le résultat de leurs propriétés morphologiques ainsi que de leur capacité de synthèse de différentes variétés de métabolites secondaires [10].

### **I.2.2. Caractéristiques**

Ces microorganismes synthétisent, par le biais de la photosynthèse, de l'oxygène ainsi que des métabolites organiques tels que les glucides, les lipides et les protéines. Du point de vue structure cellulaire, la micro-algue présente un noyau et une membrane plasmique contenant des organites essentiels à son fonctionnement tels que les chloroplastes, les oléoplastes et les mitochondries [10].

*A : Gephyrocapsa*                      *E : Dunaliella tertiolecta*                      *J : Bacillariophyceae*  
*B : Haematococcus lacustris*                      *F : Chaetoceros calcitrans*                      *K : Raphidophyceae*  
*C : Spirulina platensis*                      *H : Dinophysis acuminata*                      *L : Botryococcus*  
*D : Chlorella vulgaris*                      *I : Alexandrium*

La longueur du trait dans chaque figure est égale à 10µm.



**Figure I.2: Les différentes caractéristiques**

Elle contient trois principaux types de pigments qui sont les chlorophylles, les caroténoïdes et les phycobiliprotéines. Les microalgues présentent des formes variables, souvent sphériques (porphyridium) ou en forme de croissant (clostridium), de spirale (Arthrospira), de gouttelette (chlamydomonas) ou encore de forme étoilée (Staurastrum) [10]. Du point de vue nutrition, les microalgues sont majoritairement « photo autotrophes » mais elles peuvent être également « hétérotrophes » ou « mixotrophes ». Un métabolisme autotrophe se traduit par l'utilisation d'une source de carbone inorganique comme le dioxyde de carbone ou le bicarbonate tandis que le métabolisme hétérotrophe est caractérisé par une consommation de carbone organique comme source de carbone pour leur développement; les mixotrophes utilisent les deux types de source de carbone [10].

### **I.2.3. Classification**

Les micro-algues sont classées selon leurs propriétés morphologiques, la nature de leur cycle de vie, la nature chimique des produits photosynthétiques de réserve (Produit d'accumulation intracellulaire) ou d'après l'organisation de leurs membranes photosynthétiques ou leur pigmentation. On dénombre plus de 30 000 espèces dont une cinquantaine est étudiée d'une manière détaillée dans les laboratoires de recherche et une dizaine seulement est exploitée au niveau industriel et commercial [10].

On distingue principalement deux grands groupes de microalgues :

- Les procaryotes : Ce sont des organismes unicellulaires qui sont dépourvus de noyau et présentent rarement des organites cellulaires.
- Les eucaryotes : Ce sont des organismes uni ou pluricellulaires qui présentent une structure complexe contenant un noyau entouré d'une membrane ainsi que plusieurs organites intracellulaires [10].

#### **I.2.4. Les applications des microalgues**

Au vue de leur biodiversité et leurs propriétés biochimiques, les micro-algues se révèlent très prometteuses pour de nombreuses applications dans des domaines variés tels que l'industrie pharmaceutique, l'agro-alimentaire, l'environnement et les énergies renouvelables [10].

##### **I.2.4.1. Domaine alimentaire**

Les micro-algues constituent un réel apport nutritif. Elles sont utilisées dans l'alimentation humaine, animale et dans l'aquaculture. La biomasse peut être produite sous forme de poudre, tablettes, capsules ou pastilles....

Au niveau de l'alimentation humaine, deux espèces de microalgues, dominent le marché mondial à savoir Chlorella et Spirulina.

L'apport de la biomasse micro algale peut se traduire par un effet général immuno-modulateur. La biomasse peut également être source d'aliments fonctionnels « alicaments », ainsi, le marché des aliments fonctionnels représente un des marchés les plus dynamiques de l'industrie alimentaire. Plusieurs pays, dont l'Allemagne, la France, le Japon, la Chine et la Thaïlande, ont ainsi commencé à orienter leur secteur alimentaire vers le marché des aliments fonctionnels issus des micros algues et des cyanobactéries comme sources de protéines et de vitamines.

##### **I.2.4.2. Domaine pharmaceutique**

Au vu de leur grande diversité biochimique, les micro-algues représentent une source intéressante de molécules bioactives et de toxines utilisables dans le développement de nouveaux médicaments.

##### **I.2.4.3. Domaine cosmétique**

Plusieurs espèces de micro algues sont exploitées industriellement dans le domaine cosmétique, principalement les deux espèces *Arthrospira* et *Chlorella*. Des extraits d'algues, ayant une activité anti oxydante, sont exploités sur le marché dans la fabrication des produits de soin capillaire, du visage et la peau, les crèmes solaires.

#### **I.2.4.4. Domaine énergétique**

La valorisation de la biomasse algale peut se traduire par la production de bioénergie sous forme d'électricité et/ou de chaleur par combustion directe, ou sous forme de bio méthane après méthanisation ou sous forme de biocarburant ou d'hydrogène. Cependant, cette valorisation ne sera concurrentielle qu'avec une forte productivité de biomasse, une possibilité de récolte mécanique simple et un coût de production plus réduit que les procédés mettant en œuvre d'autres types de biomasse.

#### **I.2.4.5. Domaine environnemental**

Les principales applications environnementales sont le traitement des eaux usées et bien sûr la consommation de CO<sub>2</sub> comme méthode d'abattement de ce gaz à effet de serre.

##### **I.2.4.5.1. Traitement des eaux usées**

Au vue de leur capacité d'assimilation de nombreux nutriments nécessaires à leur croissance, les micro-algues représentent une solution intéressante pour éliminer ces éléments ; elles sont également capables de fixer certains métaux lourds. Elles représentent ainsi les principaux éléments biologiques de certains systèmes de traitement des eaux municipales et industrielles (essentiellement pour le traitement tertiaire). Grâce à l'absorption de l'azote et du phosphore, elles contribuent à réduire le phénomène d'eutrophisation de certains milieux aquatiques.

### **I.3. Élimination du diclofenac sodique par les différents procédés**

#### **I.3.1. Élimination du diclofenac sodique dans les stations d'épuration classiques**

L'élimination de résidus pharmaceutiques dans les STEP et dans les usines de production d'eau potable est étudiée dans le cadre du projet KNAPPE [11]. L'influence de la configuration du réacteur, le temps de séjour des boues (SRT), le temps de séjour hydraulique (HRT), la température (saison) et la concentration des substances pharmaceutiques spécifiques dans les eaux usées en entrée et sortie de station d'épuration sont les paramètres recensés pour la comparaison des différentes technologies.

La biodégradation est un processus d'élimination très important dans le traitement des eaux usées. Il peut avoir lieu dans les zones de traitement des boues activées en aérobie et en anaérobie, ou pendant la digestion des boues d'épuration en anaérobie [12].

Le diclofénac est plus faiblement éliminé dans les STEP et d'autres AINS, avec des taux d'élimination variables, à savoir entre 17% et 70% [13] obtient un taux d'élimination de seulement 17%, en démontrant une haute persistance du diclofénac après la STEP. D'autres auteurs rapportent un même taux d'élimination en STEP [14].

### **I.3.2. Élimination du diclofénac par les nouveaux procédés**

Certaines technologies de pointe ont été évaluées en ce qui concerne leur capacité à diminuer la décharge xénobiotique dans les masses d'eau, par exemple, les procédés oxydatifs, le charbon actif ou la filtration sur membrane. Généralement, le coût élevé de ces méthodes est le principal inconvénient qui limite leur utilisation à grande échelle. Il est nécessaire de trouver des adsorbants économiques, sélectifs, peu coûteux et écologiques à faible coût pour le traitement de l'eau. Les adsorbants chimiques inorganiques, comme les minéraux argileux, sont des adsorbants peu coûteux, sont largement utilisés pour éliminer les polluants inorganiques et organiques des solutions aqueuses. Ils ont donc été largement étudiés, dans le but de fournir une alternative au charbon actif dans le Traitement des eaux de surface et souterraines et des effluents industriels [15].

L'étude de l'efficacité d'élimination du diclofénac sodique dans les STEP avec les différents traitements tertiaires [16] a révélé les résultats mentionnés le tableau suivant :

**Tableau I.1 : Rendements d'élimination complémentaire de la filière eau par Traitement tertiaire [16]**

Traitements classiques			Traitement Avancé	
Filtration sur sable	Décantation rapide	Osmose inverse	Ozonation	Adsorption charbon actif
30-70%	30-70%	>70%	70% <	70% <

Il est mis en évidence que les procédés avancés permettent une meilleure élimination des substances pharmaceutiques dans les STEP mais sans pour autant les éliminer complètement.

### **I.3.2.1. Élimination du diclofénac par ozonation**

Le diclofénac est efficacement éliminé par ozonation, avec des concentrations d'ozone supérieures à 0,5 m [16] ; le taux d'élimination peut atteindre les 90% [17].

Le couplage ozone-peroxyde d'hydrogène comporte une meilleure efficacité d'élimination du diclofénac [16]. Son oxydation dans ce cas peut induire la formation de sous-produits. Des études plus approfondies concernant la formation de métabolites toxiques seraient nécessaires [18].

### **I.3.2.2.Élimination du diclofénac par rayonnements UV**

Lors de la désinfection de l'eau par rayonnements UV, il se forme des produits secondaires induits par les réactions mis en jeu mais ils sont très faibles, voir nuls. Les composés plus photosensibles se dégradent plus facilement; L'efficacité de ce traitement peut atteindre 59.4% pour le diclofénac [18, 19].

### **I.3.3.3. Élimination du diclofénac par le charbon actif**

Le charbon actif est un procédé qui est capable d'éliminer un grand nombre de micropolluants, dont des produits pharmaceutiques [20] grâce à son grand pouvoir adsorbant et sa porosité. En grain, le charbon actif favorise le développement d'une biomasse bactérienne qui participe à la dégradation des substances organiques. De cette manière, le charbon actif élimine les résidus de médicaments par adsorption et par biodégradation. L'efficacité de ce procédé pour le diclofénac est assez conséquente, avec un rendement supérieur à 80% (sur charbon en poudre) [16].

### **I.3.4. La biodégradation du diclofénac de sodium (Boues activée)**

Les essais d'élimination utilisant un système de boues activées et des bioréacteurs à membrane ont révélé une très faible dégradabilité du diclofénac par rapport à d'autres produits pharmaceutiques. [21].

Le diclofénac a été souligné comme marqueurs importants pour la pollution de l'environnement par les produits pharmaceutiques. Cette étude fait état de l'isolement des souches bactériennes capables de dégrader ces micropolluants des boues activées d'une station d'épuration des eaux usées municipales (ETAR). Après des enrichissements sélectifs, une

souche capable de dégrader le diclofénac a été isolées. La souche a été identifiée pu biodégrader 35% de 10 mg /L 1 de diclofenac comme seule source de carbone [22].

Un enrichissement des boues activées avec des souches bactériennes pour la biodégradation de micropolluants pharmaceutiques a été étudié. Un enrichissement sélectif de souches bactériennes a été utilisé pour dégrader le diclofenac 1-500µg/l dans les stations d'épuration des eaux usées municipales (ETAR). Plus de 90% a été observé avec une alimentation périodique avec l'acétate comme source supplémentaire de carbone [23].

### **1.3.5. Les microalgues et diclofénac**

La biotechnologie solaire par microalgues et cyanobactéries offre une alternative valable aux traitements tertiaires conventionnels et présente plusieurs avantages:

- ✓ Elle repose sur les principes des écosystèmes naturels et est donc sans danger pour l'environnement;
- ✓ Elle ne cause aucune pollution secondaire si la biomasse produite est réutilisée ;
- ✓ Elle permet un recyclage efficace des nutriments (inorganiques azotés et phosphorés) contenus dans les effluents, car les microalgues sont des agents épurateurs très performants, elles produisent de l'oxygène, éliminent les substances xenobiotiques et même les métaux et utilisent efficacement les nutriments pour leur croissance [25].

### **1.3.6. Les Champignon et diclofénac**

Une élimination significative du diclofénac de concentration de 345 µg/L. (env. 60%) de la phase aqueuse par le champignon vivant s'est produite après 24 heures d'incubation. L'élimination complète n'a été obtenue qu'après en moins de 120 h.

La performance comparative du champignon vivant et inactivé a confirmé la biodégradation comme principal mécanisme dans l'élimination globale du composé de la phase aqueuse. De plus, l'extraction du diclofénac résiduel à partir du champignon vivant à différents moments d'incubation jusqu'à 168 h a confirmé que les TrOC biopolysorbés continueraient d'être progressivement biodégradés. [26]

### **1.3.7. Dégradation du diclofénac sodium en utilisant des processus combinés basés sur une cavitation hydrodynamique et une photocatalyse hétérogène**

L'élimination complète des polluants de concentration de 20 ppm des cours d'eau nécessite des traitements supplémentaires et appropriés aux schémas d'oxydation biologiques conventionnels. Récemment, de nombreux chercheurs ont observé une dégradation du diclofénac sodique à l'aide de procédés d'oxydation avancés [9].

Il s'agit de la cavitation hydrodynamique qui est une source d'efficacité énergétique équivalente au traitement à ultrasons et qui peut être utilisée pour la destruction de polluants organiques [9].

Les études réalisées sur la dégradation du diclofénac sodique de concentration de 20 ppm avec un rendement de 95% à l'aide de cavitation hydrodynamique combinée au procédé de photocatalyse hétérogène ont établi un effet synergique par rapport aux processus individuels dans les conditions d'exploitation optimisées [9].

## CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

### II.1. Matériels

#### II.1.1. Matières premières

Pour réaliser notre étude nous avons utilisé les matières suivantes :

- ✓ **Clofenal** : Solution injectable à 75 mg / 3ml (SAIDAL)



Figure II .1: Boite de CLOFENAL pharmaceutique

- ✓ **Micro-algue**

C'est une mixture isolé et purifié d'une eau usée de SEBKHA SOUK AHERAS

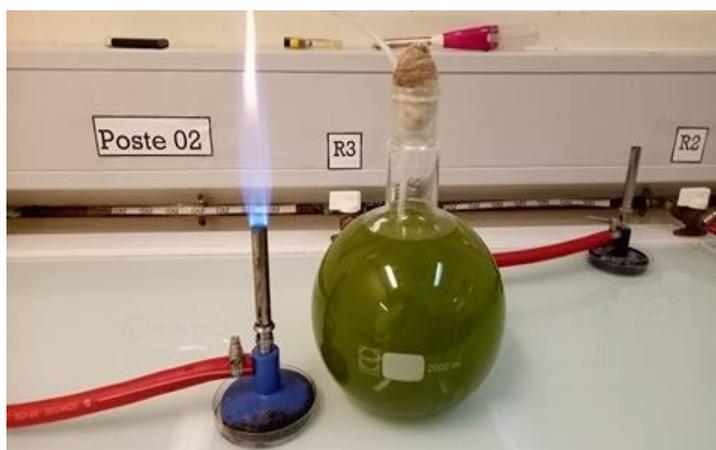


Figure II .2 : Micro-algues

### **II.1.2. Réactifs et verrerie**

Les réactifs et la verrerie qui a été utilisée pour le bon déroulement de notre travail est comme suit :

- ✓ Solution de NaOH (1M);
- ✓ Solution de NaCl (5%);
- ✓ Solution de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;
- ✓ Flacon de 500ml;
- ✓ Filtre seringue (0,2  $\mu\text{m}$ ) ;
- ✓ Seringue ;
- ✓ Ballon de 2 l ;
- ✓ Milieu MBB ;

### **II.1.3. Équipements**

Pour effectuer notre étude, nous avons utilisé les appareils suivants :

- ✓ pH mètre marque PHM220 LAB pH mètre ;
- ✓ Spectrophotomètre SPECORD 210 ;
- ✓ Chromatographe HPLC (type HP séries 1100) équipé d'un détecteur UV ;
- ✓ Centrifugeuse Nahita model 2698 ;

## **II.2. Méthodes et techniques expérimentales**

### **II.2.1. Méthodologie de travail**

Selon la matrice d'essai, les expériences de biodégradation du diclofenac de sodium (solution injectable) ont été effectuées à différentes valeurs de pH, de la concentration de la source d'azote et de la concentration initiale du polluant.

Les expériences de biodégradation sont réalisées en introduisant dans des flacons en verre de 500 mL contenant un volume de milieu de culture MBB de 100 mL, auquel est rajoutée une quantité précise du sulfate d'ammonium. Par la suite, le pH du milieu est réglé avec une solution de HCl (1 M) ou de NaOH (1 M) selon les conditions de la matrice des plans

d'expérience, les flacons sont placés dans un autoclave est réglé à une température égal à 120 °C pendant 20 minutes.

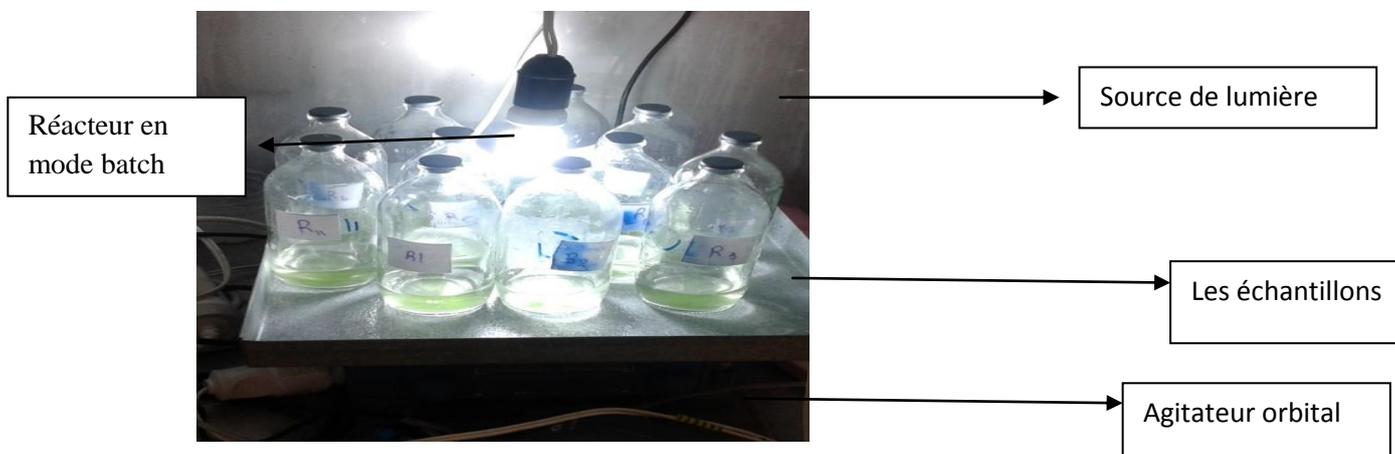
Après autoclavage du milieu et dans un milieu stérile, un volume précis de la solution injectable de Clofenal est ajouté selon la matrice d'essai.

Afin de vérifier la concentration initiale du diclofénac, Un prélèvement suivi d'une analyse par HPLC sont réalisé, dans le but de confirmer la valeur de la concentration initiale de source de carbone avant injection de la micro-algue.

A « t » égal à zéro, un volume de la solution des micro-algues est injecté dans tous les flacons, a ce temps un deuxième prélèvement est effectué pour calculer : la densité initial des des micro-algues et la concentration du diclofénac.

Les flacons sont placés dans une étuve bactériologique sous agitation et une source de lumière selon le dispositif expérimental présenté dans la figure II .3.

Le dispositif expérimental est représenté dans la figure II.3



**Figure II. 3: Dispositif expérimental**

Après dosage de la concentration des micro-algues à 600 nm en utilisant un UV-Visible, la solution est centrifugée à 3000 tr/min pendant 15 minutes, le surnageant est filtré par un filtre seringue de 0,2  $\mu\text{m}$  puis analysé par HPLC.

### **II.2.2. Méthode d'analyse de la densité optique des micro-algues**

La densité optique des micro-algues a été analysé par UV-Visible de marque SPECORD 210à 600 nm.

### **II.2.3. Méthode de Calcul du Rendement R%**

Les rendements de biodégradation du Diclofénac de sodium (R%) est calculé à partir de la relation:

$$R\% = \left( \frac{C_0 - C_t}{C_0} \right) \times 100$$

C<sub>0</sub>: Concentration initiale du Diclofénac de sodium (mg/L);

C<sub>t</sub>: Concentration du diclofénac dans le surnageant à l'instant t (mg/L);

### **II.2.4. Méthode de détermination du taux de croissance des microalgues**

Le taux de croissance ( $\mu$ ) exprime la vitesse de multiplication des microorganismes ; c'est le nombre de divisions effectuées par unité de temps.

$$\mu = \frac{(\ln D_{o2} - \ln D_{o1})}{t_2 - t_1}$$

$\mu$  : le taux ;

D<sub>o1</sub> :densité optique des microalgues à temps 1 ;

D<sub>o2</sub> : la densité optique des microalgues à temps 2 ;

t : le temps ;

## CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

### III.1. Analyse du diclofénac par HPLC

#### III.1.1. La courbe d'étalonnage

Afin de réaliser la courbe d'étalonnage du diclofénac de sodium, un étalon a été récupéré afin de réaliser des analyses par HPLC, de marque HP 1100, en utilisant les conditions chromatographiquesci-dessous :

- ✓ Colonne : ECLIPSE® XDB- C18 ;
- ✓ Phase mobile : Mélange entre Acétonitrile et acide acétique (0,1 M) ;
- ✓ Débit de la phase mobile : 1 mL / min ;
- ✓ Détecteur : UV ( $\lambda = 275$  nm) ,

La concentration de la gamme du diclofénac de sodium varie entre 1 mg/L à 30 mg/L.

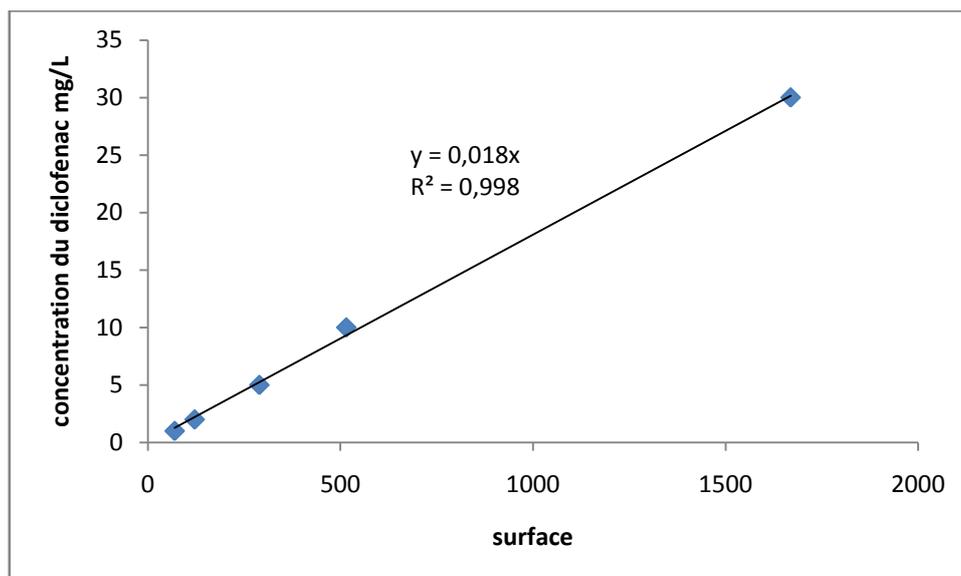
**Tableau III .1 : Les concentrations de la gamme**

Surface	Concentration mg/L
69,55	1
121,48	2
289,42	5
515,16	10
1668,94	30

La figure III.1, montre que la courbe d'étalonnage est une droite qui passe par l'origine. L'équation est comme suit :

$$[\text{diclo}]_i = 0,0181 S$$

Le coefficient de régression ( $R^2$ ) est égal à 0,9988



**Figure III. 1 : Courbe d'étalonnage**

### **III.1.2. Confirmation de la concentration du clofenal 75mg/3ml**

Après avoir acheté différents échantillons du médicament clofenal 75mg/3mL de différentes pharmacies (Blida, Koléa, Bab el oued, Alger centre, Babezzouar, Baba hasen, Rouiba, Réghaia, Tipaza) cinq prélèvements de la solution injectable ont été effectués afin de préparer une concentration constante dans la gamme de concentration de la linéarisation de la courbe d'étalonnage qui est 10 mg/L, et ce dans les mêmes conditions afin de confirmer la concentration de solution injectable

**Tableau III.2: les concentrations calculées**

Lot	C <sub>théo</sub> (mg/L)	C <sub>exp</sub> moyenne (mg/L)	C <sub>théo</sub> du médicament mg/3mL	C <sub>exp</sub> moyenne médicament mg/3mL
01	10	10,66	75	79,95
02	10	9,62	75	72,14
03	10	10,00	75	75,00
04	10	9,42	75	70,66
05	10	10,15	75	76,13
06	10	10,01	75	75,10
07	10	10,38	75	77,78

08	10	10,42	75	78,14
09	10	10,02	75	75,15

Les résultats sur tableau III.2 montrent clairement une faible différence concentration entre les concentrations théoriques  $C_{théo}$  et les concentrations expérimentales  $C_{exp}$ . Cette différence nous incite à faire appel aux paramètres statistiques comme l'erreur et l'écart-type.

- **Calcul d'erreurs**

Selon le sens général du mot, une erreur est toujours en relation avec quelque chose de juste ou de vrai, ou qui est considéré comme tel.

1. **L'erreur absolue:** Par définition l'erreur absolue d'une grandeur mesurée est l'écart qui sépare la valeur expérimentale de la valeur que l'on a de bonne raison de considérer comme vraie.

$$\Delta C = |C - C_0|$$

III.1

**Tableau III.3 : Valeur de l'Erreur absolue**

$C_{exp}$ moyenne médicament mg/3mL	Erreur absolue
79,95	4,95
72,14	2,86
75,00	0,00
70,66	4,34
76,13	1,13
75,10	0,10
77,78	2,78
78,14	3,14
75,15	0,15

Les résultats sur le tableau III.3 indique la proximité entre la mesure et la valeur réelle de la concentration du diclofenac et que la proximité est très proche donc les valeurs sont exactes.

- 2. L'erreur relative :** Par définition l'erreur relative est le quotient de l'erreur absolue à la valeur vraie, L'erreur relative n'a pas d'unité ; elle nous indique la qualité (l'exactitude) du résultat obtenu. Elle s'exprime généralement en % (pour cent).

$$\text{Erreur relative} = \frac{\Delta C}{C_0} \times 100 \text{ III.2}$$

**Tableau III.4: Erreur relative**

$C_{\text{exp}}$ moyenne médicament mg/3mL	Erreur relative%
79,95	6,60
72,14	3,81
75,00	0,00
70,66	5,79
76,13	1,51
75,10	0,14
77,78	3,71
78,14	4,19
75,15	0,20

Les résultats sur le tableau III .4 indique que les valeurs d'erreur relative est inférieur à 7%.

- 3. Écart type :** La précision est intrinsèquement liée à l'écart type des mesures répétées.

Écart type =2,16

L'écart type est faible les concentrations sont très resserrés. En effet la majorité des données est comprise entre 72 ,83 et 77,17mg/3mL.

- 4. Coefficient de variation :**Le coefficient de variation (CV) est le rapport de l'écart-type à la moyenne. Plus la valeur du coefficient de variation est faible, plus l'estimation est précise.

**Tableau III.5 : calcul de CV%**

moyen	75,56
Écart type	2,16
CV%	2,85

La valeur de coefficient de variation est faibles ( $CV < 5\%$ ) ce qui démontre la précision de la méthode.

## **III .2 . Identification des micro-algues**

La pollution en Algérie et dans le monde entier a fait l'objet de nombreuses études et publications. Les pays industrialisés ainsi que les pays en voie de développement sont touchés par les différentes formes de pollution d'origine industrielle, automobile, agricole et domestique.

Les organismes et les communautés qui occupent les milieux aquatiques se comportent en «observatoires permanents» de l'environnement dont ils amplifient, cumulent ou mémorisent les perturbations. Beaucoup de micro-algues ont la capacité de survivre dans des eaux polluées, cette propriété les rend comme des bio-indicatrices de la pollution des eaux.

Cette partie est très importante pour la suite de notre travail, qui est l'utilisation des micro-algues dans la biodégradation du diclofenac sodique.

### **III.2.1. Méthode d'isolement**

L'une des principales causes d'échec d'isolement des micro-organismes est la mauvaise qualité du prélèvement et/ou du transport.

#### **III.2.1.1.Prélèvement (échantillonnage)**

- ✓ Lieu de prélèvement

Les prélèvements ont été effectués à partir des eaux usées au niveau SEBKHA SOUKAHRAS

- ✓ Technique de prélèvement

- Portez des gants stériles

- Sortir le flacon stérile de son emballage et le plonger dans l'eau jusqu'au remplissage totale de la bouteille.

- ✓ Transport des échantillons

Le transport des échantillons au laboratoire a été effectué dans un sac isotherme qui permet de maintenir la température des prélèvements.

### **III.2.1.2. Ensemencement**

- ✓ Le milieu de la culture

Le milieu de la culture MBB contient des nutriments divisé en trois solutions A, B, C à des volumes précis (5 mL, 5 mL, 0,5 mL, respectivement). Les solutions de ces éléments nutritives de milieu de culture sont préparées dans un volume de 500mL :

#### **La solution A :**

- ✓ 1g de  $\text{CaCl}_2$
- ✓ 3.75 g de  $\text{MgSO}_4$
- ✓ 1g de Fe –EDTA

#### **La solution B :**

- ✓ 3.75 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- ✓ 8.75 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- ✓ 1g de NaCl

#### **La Solution C**

- ✓ 1.2g  $\text{H}_3\text{BO}_3$
- ✓ 0.9 g  $\text{MnCl}_2$
- ✓ 0.11g  $\text{ZnSO}_4$
- ✓ 0.04 g  $\text{CuSO}_4$
- ✓ 0.045 g  $\text{CONO}_3$
- ✓ 0.215 g  $\text{VOSO}_4$

Pour obtenir le milieu solide, il faut juste ajouter une quantité d'agar agar au milieu liquide.

Après chaque préparation de milieu soit liquide ou solide, il faut autoclavage du milieu.

Après avoir fait couler les boites de pétri dans une zone stérile et les laisser refroidir, nous avons fait un ensemencement de l'eau avec une pipette pasteur puis incubé les boites de pétri dans une étuve bactériologique lumineuse à 30 °C pendant 7 jours.

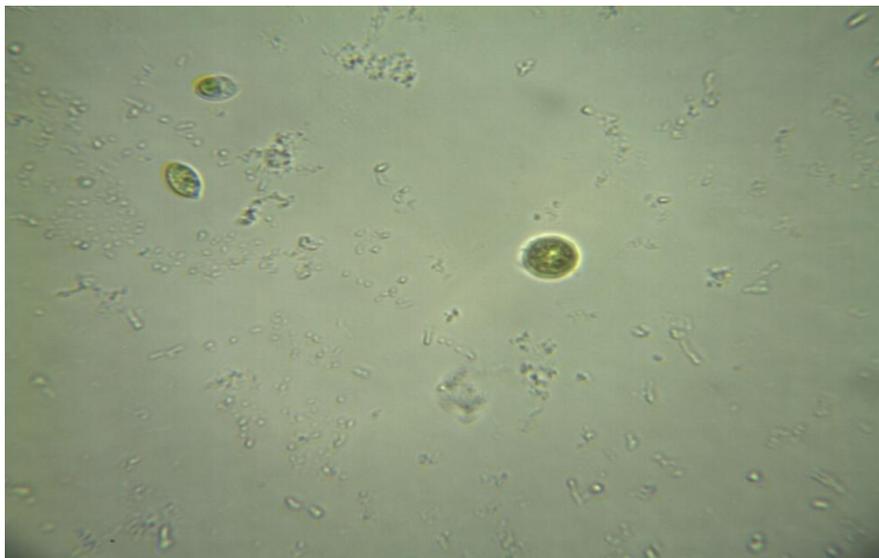
### **III.2.1.3. Isolement**

Cette étape consiste à séparer les divers micro-organismes d'un mélange. En sélectionnant précisément une colonie micro-algal afin de les ensemençer dans des nouvelles boites de pétri

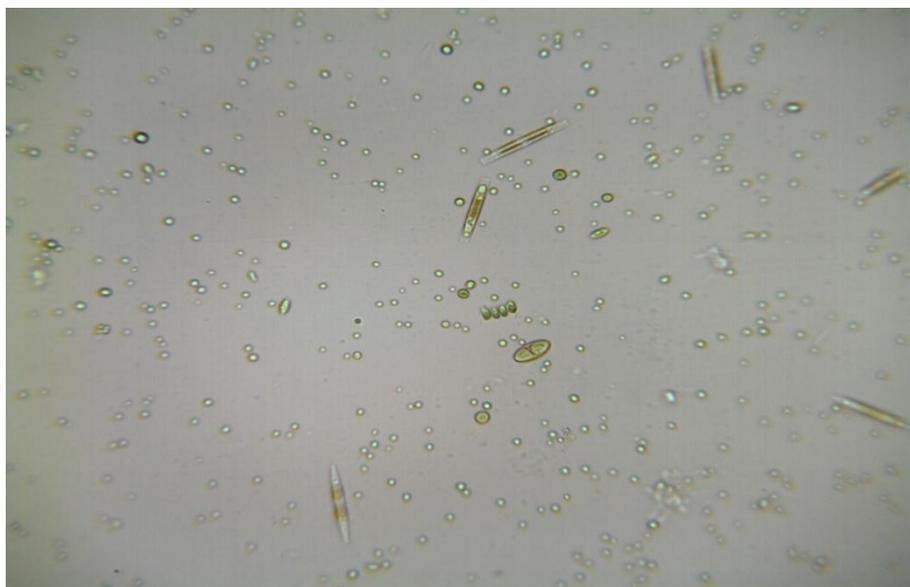
grâce à une pipette pasteur, on les met dans la armoire thermorégulatrice à 30 °C pendant 7 jours.

#### **III.2.1.4. Purification**

Pour assurer la réussite de l'étape de l'isolement on refait les ensemencements plusieurs fois, afin de vérifier si nous avons des contaminations ou non.



**Figure III .2 : Image microscopie des micro-algues1**



**Figure III. 3 : Image microscopique des micro-algues 2**

Les images microscopiques montrent que nous avons une diversité de micro-algues tel que la Chlorellasp, Chlamydomonas sp, euglenaacus, spiruline sp,

### **III.2.1.5. La culture**

A l'aide d'une pipette pasteur, une colonie micro-algue est mise dans un tube à essai de volume de 20mL qui contient un milieu de culture MBB liquide, les tubes sont placés dans une étuve bactériologique sous agitation et avec une source de lumière.

Cette étape consiste à cultiver les micro-algues, après chaque 14 jours, nous augmentons le volume de la solution de culture d'un tube de 20ml à des flacons de 100 ml après des flacons de 500ml ensuite des ballons de 1l puis des ballons 2l.

## Schema

### **III.3.La méthodologie des plans d'expériences**

#### **III.3.1. Introduction aux plans d'expériences**

Si l'expérimentation est aussi ancienne que la science, la planification expérimentale, destinée à optimiser le processus d'obtention des données, ne date cependant que du XXe siècle. Cette nouvelle méthodologie, développée au cours de ces dernières années constitue un outil sûr de portée universelle, pratique et souvent indispensable, permettant de trouver les conditions optimales lors du traitement des données. Leur utilisation permet d'obtenir un maximum d'informations avec un minimum d'expériences.

Les plans d'expériences sont d'ailleurs à la base des protocoles industriels modernes. Les expérimentateurs ont constaté que la méthode des plans d'expériences est plus efficace que les démarches habituelles de conduite des essais. Ainsi, elle apporte à l'expérimentateur un puissant outil de réflexion et d'analyse lui permettant de mener ses expériences avec sûreté et précision. [28].

#### **III.3.2. Terminologie**

La grandeur d'intérêt, qui est généralement notée  $y$ , porte le nom de réponse. Les variables qui peuvent modifier la réponse sont appelées facteurs. On parle donc des facteurs qui influent une réponse. Les termes facteur et réponse sont universellement employés dans le domaine des plans d'expériences.

#### **III.3.3. Facteur**

Les variables que l'on désire étudier sont appelées facteurs. En général un facteur varie entre deux bornes : la borne inférieure et la borne supérieure. Dans le langage des plans, on dit que le facteur varie entre le niveau bas (borne inférieure que l'on note plus souvent par -1) et le niveau haut (borne supérieure que l'on note le plus souvent par +1). L'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, s'appelle le

domaine de variation (figure VI-1). Un facteur peut prendre plusieurs niveaux à l'intérieur de son domaine de variation [29].

#### **III.3.4. Effet d'un facteur**

L'effet d'un facteur A sur la réponse y s'obtient en comparant les valeurs prises par Y quand A passe du niveau -1 au niveau +1.

#### **III.3.5. La réponse**

Les grandeurs qui intéressent l'expérimentateur et qui sont mesurées à chaque expérience sont appelées réponses. Le choix de la réponse ne relève pas de la théorie des plans d'expériences. Ce n'est qu'après une analyse minutieuse des phénomènes, des enjeux, des objectifs et des contraintes de l'étude que l'on peut définir la ou les bonnes réponses [30].

#### **III.3.6. Plans factoriels complets à deux niveaux**

Les plans factoriels à deux niveaux représentent l'ensemble de toutes les combinaisons de k facteurs de niveaux limités à deux (niveau supérieur +1 et niveau inférieur -1). Ce sont des plans qui se basent généralement sur des modèles mathématiques linéaires de premier degré par rapport à chaque facteur. Ils peuvent être utilisés indistinctement pour les variables continues et pour les variables discrètes [3,4]. Le nombre N de combinaisons possibles (nombre d'essais) sur les deux niveaux est :  $N = 2^k$  [30].

#### **III. 3.7. Détermination de l'équation du modèle**

Pour déterminer les coefficients de l'équation du modèle, il suffit de modifier la matrice des expériences en introduisant la variable fictive  $x_0$  et les différentes interactions possibles des facteurs [31].

#### **III.3.8. Avantage et inconvénient**

Les plans factoriels complets ont l'avantage de conduire, par l'analyse de la variance, à des compositions et à des interprétations simples, en termes d'effets principaux et d'interactions. Ils ont cependant l'inconvénient d'introduire rapidement, pour plus de deux facteurs, des nombres très élevés d'essais [32].

#### **III.3.9. Planification des essais de biodégradation**

Dans le but de voir le pouvoir dépolluant des micro-algues en utilisant le diclofénac comme source de carbone, nous avons étudié l'influence de trois paramètres à savoir les concentrations initiales de la source d'azote et du polluant (DFS) ainsi que le pH, en maintenant constant la température et la vitesse d'agitation à 30°C et à 160 ppm, respectivement.

Dans la théorie des plans d'expériences, les coordonnées réduites notées  $X_i$ , sont représentées de la même manière quel que soit le paramètre étudié. Elles sont définies et calculées à l'aide de la relation (III.3) :

$$X_i = \frac{V_i - \bar{V}_i}{\Delta V_i} \quad \text{III.3}$$

Où :

$V_i$ : Valeur réelle du paramètre « i ».

$\bar{V}_i$ : Représente la valeur réelle moyenne des deux bornes du paramètres « i », elle est donnée par la relation (III.4) :

$$\bar{V}_i = \frac{V_{i \text{ Sup}} + V_{i \text{ Inf}}}{2} \quad \text{III.4}$$

$\Delta V_i$ : Représente l'écart moyen entre les deux niveaux du paramètre « i », elle est défini par la relation (III.5) :

$$\Delta V_i = \frac{V_{i \text{ Sup}} - V_{i \text{ Inf}}}{2} \quad \text{III.5}$$

➤ Les calculs des coordonnées réduites

✓  $X_1$ : pH

$$V_i = \frac{(8+6)}{2} = 7, \Delta v_i = \frac{(8-6)}{2} = 1$$

$$X_i = \frac{6-7}{1} = -1, x_i = \frac{8-7}{1} = 1, X_i = \frac{7-7}{1} = 0$$

5.  $X_2$  : Ci azote

$$V_i = \frac{(2+0)}{2} = 1, \Delta v_i = \frac{(2-0)}{2} = 1$$

$$X_i = \frac{2-1}{1} = 1, X_i = \frac{0-1}{1} = -1, X_i = \frac{1-1}{1} = 0$$

6.  $X_3$ : Ci diclofénac

$$V_i = \frac{(30+10)}{2} = 20, \Delta v_i = \frac{(30-10)}{2} = 10$$

$$X_i = \frac{30-20}{10} = 1, X_i = \frac{10-20}{10} = -1, X_i = \frac{10-20}{10} = 0$$

Les conditions opératoires des essais expérimentaux sont rassemblées dans le Tableau III.6:

**Tableau III.6 : Les paramètres étudiés et leurs niveaux.**

Paramètres	$X_i$	-1	0	+1
pH	X1	6	7	8
La concentration de la source d'azote (g/L)	X2	0	1	2
La concentration initiale du Diclofénac de sodium (mg/L)	X3	10	20	30

Dans le but de réaliser nos essais expérimentaux en se limitant ici à trois facteurs, la matrice d'expériences factorielle complète est formée des 11 combinaisons. Nous ajouterons ensuite une colonne pour reporter les résultats expérimentaux (Tableau III.7)

**Tableau III.7: Essai de biodégradation programmée selon le plan factoriel 2<sup>3</sup>.**

N	pH	Ci azote	Ci DFC	R%
1	-1	-1	-1	100
2	1	-1	-1	100
3	-1	1	-1	96,10
4	1	1	-1	96,16
5	-1	-1	1	100
6	1	-1	1	100
7	-1	1	1	97,56
8	1	1	1	98,71
9	0	0	0	97,51
10	0	0	0	97,51
11	0	0	0	97,51

### III.3.10. Analyse des résultats

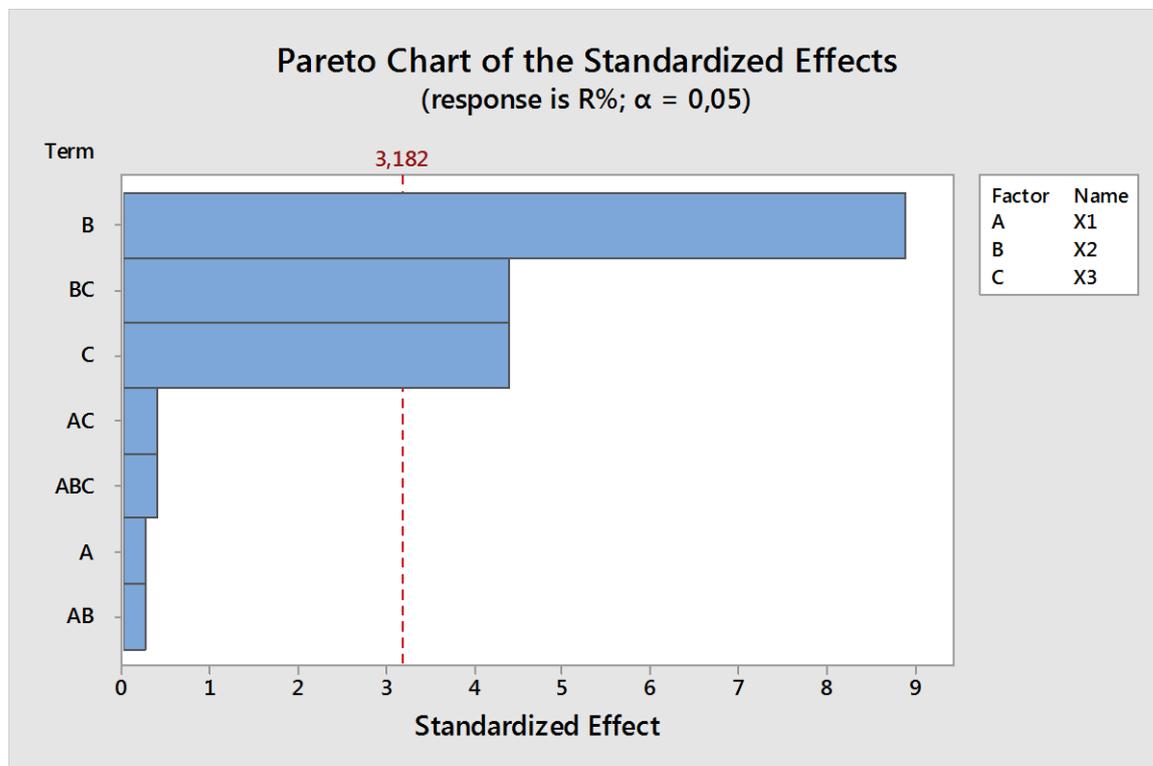
#### III.3.10.1. Modèle général

Pour étudier l'influence des trois paramètres considérés, les résultats de la matrice précédente sont analysés en utilisant le programme statistique, Minitab V16, fonctionnant sous Windows7 pour la recherche de l'équation du modèle qui approche mieux le procédé d'élimination du DFS dans un réacteur batch. L'équation mathématique obtenue est :

$$R\% = 96,434 + 0,115 X_1 - 3,970 X_2 - 1,963 X_3 + 0,115 X_1 * X_2 + 0,172 X_1 * X_3 - 1,963 X_2 * X_3 + 0,172 X_1 * X_2 * X_3 \text{ III.6}$$

D'après l'importance des coefficients de polynôme, l'effet de concentration d'azote sur la biodégradation est le plus élevé suivi de l'effet de la concentration en DFS et enfin l'interaction entre ces deux effets. Les coefficients ayant des signes positifs contribuent à l'augmentation de rendement R% et les coefficients à signes négatifs la réduisent.

Le diagramme de Pareto confirme les signes de équation obtenu par la méthode, dans ce diagramme Minitab affiche la valeur absolue des effets du diagramme de Pareto, tous les effets allant au-delà de la ligne de référence sont significatifs pour un niveau par défaut de 0,05.



**Figure III.5 : Des effets du diagramme de Pareto**

Selon ce test de pareto, nous observons que la concentration de la source d'azote, DFS et interaction entre ces deux effets influe sur le rendement de biodégradation, ce test indique que le pH n'a aucune influence ainsi que plus leurs interactions.

La valeur de  $R^2$  est égale 97,64% indique que le modèle de régression est significatif à 97,64% du degré de confiance 95%, c'est-à-dire, le modèle permet de retrouver 97,64 % des réponses mesurées, cela permet d'estimer que le modèle est significatif et adéquat.

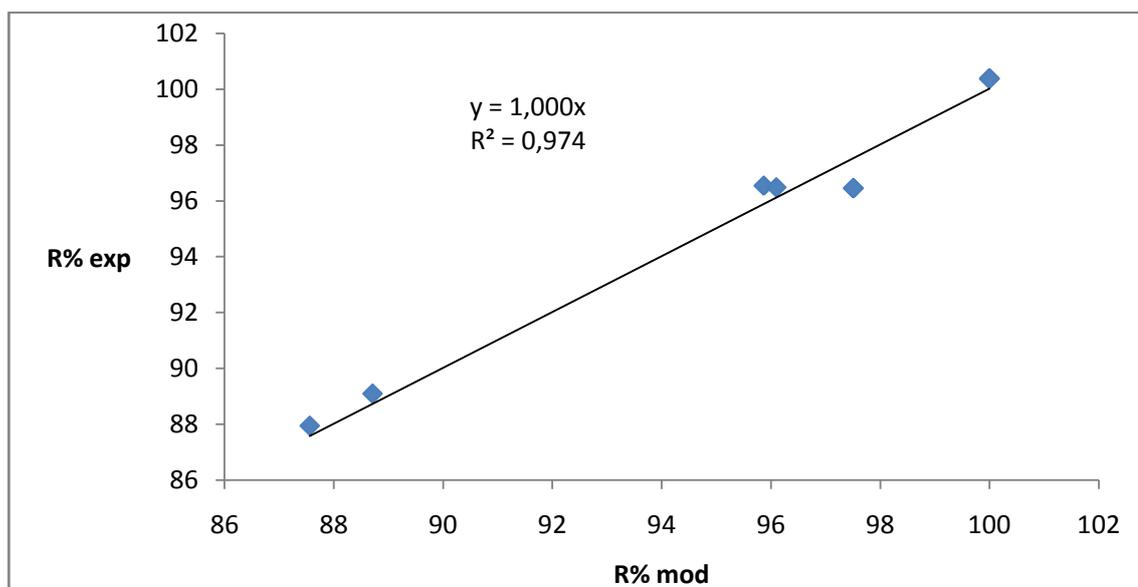
Nous commençons donc d'étudier le phénomène de biodégradation à l'aide du modèle mathématique le plus simple possible. Mais avant cette étude il est nécessaire de juger de manière plus précise les résultats des expériences réalisées, c'est-à-dire nous comparons les résultats expérimentaux ( $R\%_{exp}$ ) par rapport aux résultats calculés par le modèle ( $R\%_{mod}$ ). Cette comparaison est en fonction de la qualité d'ajustement réalisée.

Pour déterminer les réponses de modèle ( $R\%_{mod}$ ) nous remplaçons les coefficients de la matrice déterminée par la méthode dans l'équation III.6. Les résultats sont regroupés dans le tableau III.8.

**Tableau III.8 : Réponses des essais expérimentaux et réponses calculées.**

N	R%	R%mod
1	100	100
2	100	100
3	96,1	96,4
4	95,87	95,77
5	100	100
6	100	100
7	87,56	87,46
8	88,71	88,61
9	97,51	97,61
10	97,51	97,51
11	97,51	97,51

La comparaison de la colonne Yexp avec la colonne Ymod peut être présentée par la figure III.5.



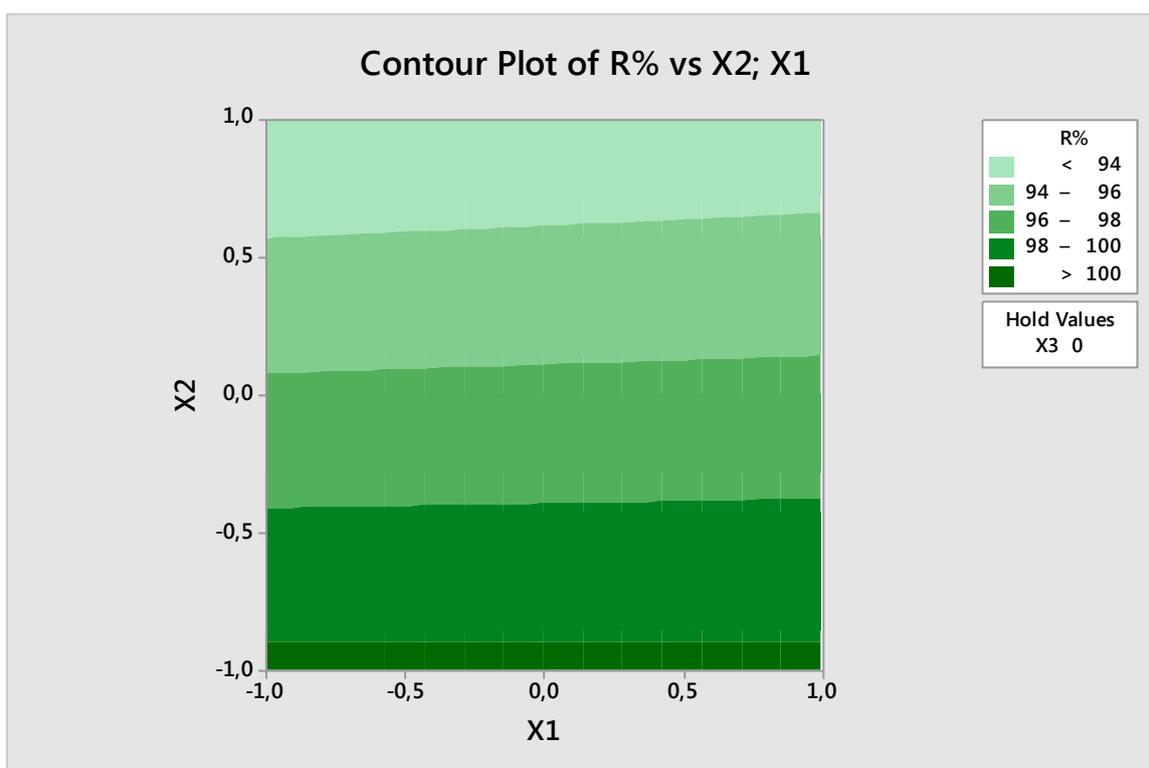
**Figure III .6 : Variation de rendement théorique et expérimental de la biodégradation**

Nous remarquons que le coefficient de corrélation linéaire est égal à 0,974 ce qui confirme que l'ajustement est de très bonne qualité. De manière générale nous pouvons dire que les réponses expérimentales obtenues sont très proches aux celles de modèle.

### III.10.2. Graphiques des iso-rendements

Les courbes de réponses « iso-rendement », sont tracées à partir du modèle, en faisant varier à chaque fois deux variable en maintenant les rendements constants.

Dans le but de mieux comprendre l'évolution de la concentration de l'azote en fonction du pH.



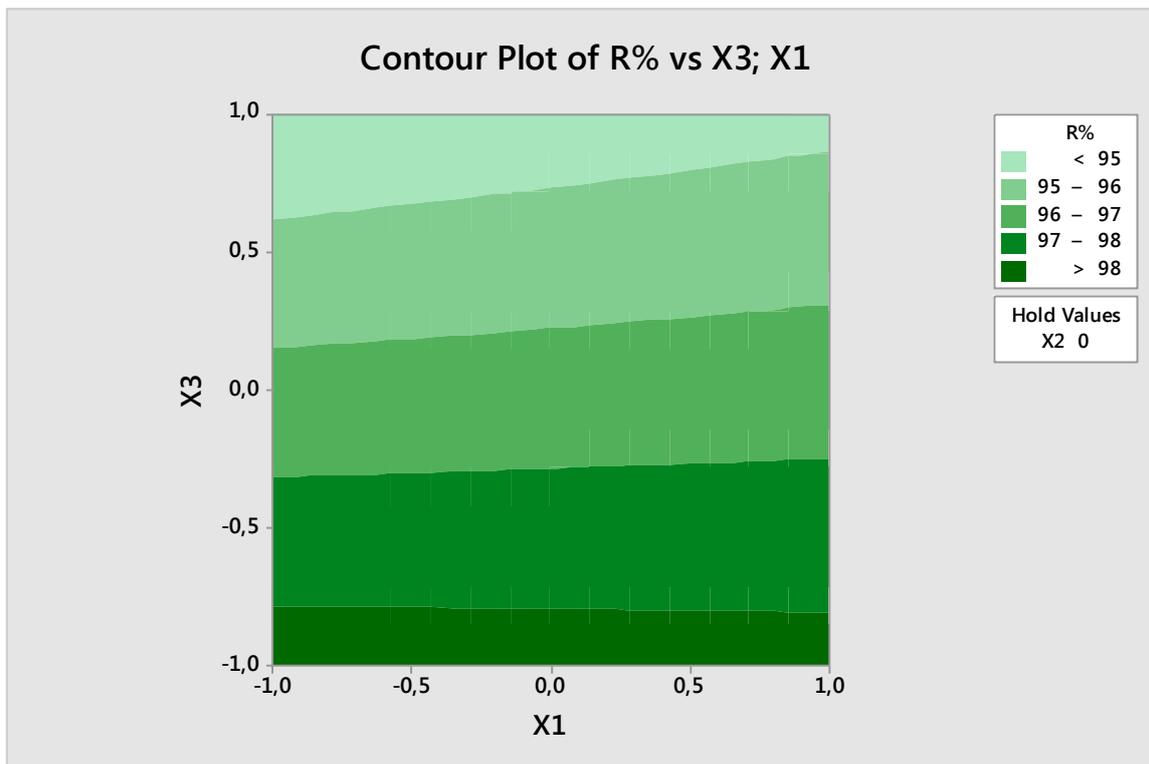
**Figure III. 7 : Évolution de la concentration de l'azote en fonction de pH**

Pour ce premier cas, la variation de la concentration de l'azote en fonction du pH, montre que le rendement de biodégradation croit avec la diminution de la concentration de l'azote. Par contre, le rendement est plus ou moins constant avec la variation du pH quel que soit la valeur de la concentration de la source d'azote, ce qui montre que pour une meilleure élimination de notre polluant il faut traiter ce dernier en présence de faible concentration de source d'azote et quel que soit la valeur du pH dans notre domaine d'étude.

Ce comportement du pH initial de la solution est en accord avec la littérature car chaque micro-algue a un pH particulier. Avec un pH optimal, la micro-algue aura plus de facilité à se

reproduire et la culture sera plus rentable. La croissance algale est favorisée pour un pH proche de la neutralité [10]. Alors le choix de notre domaine de pH est adéquat pour l'étude du comportement de notre mixture algale.

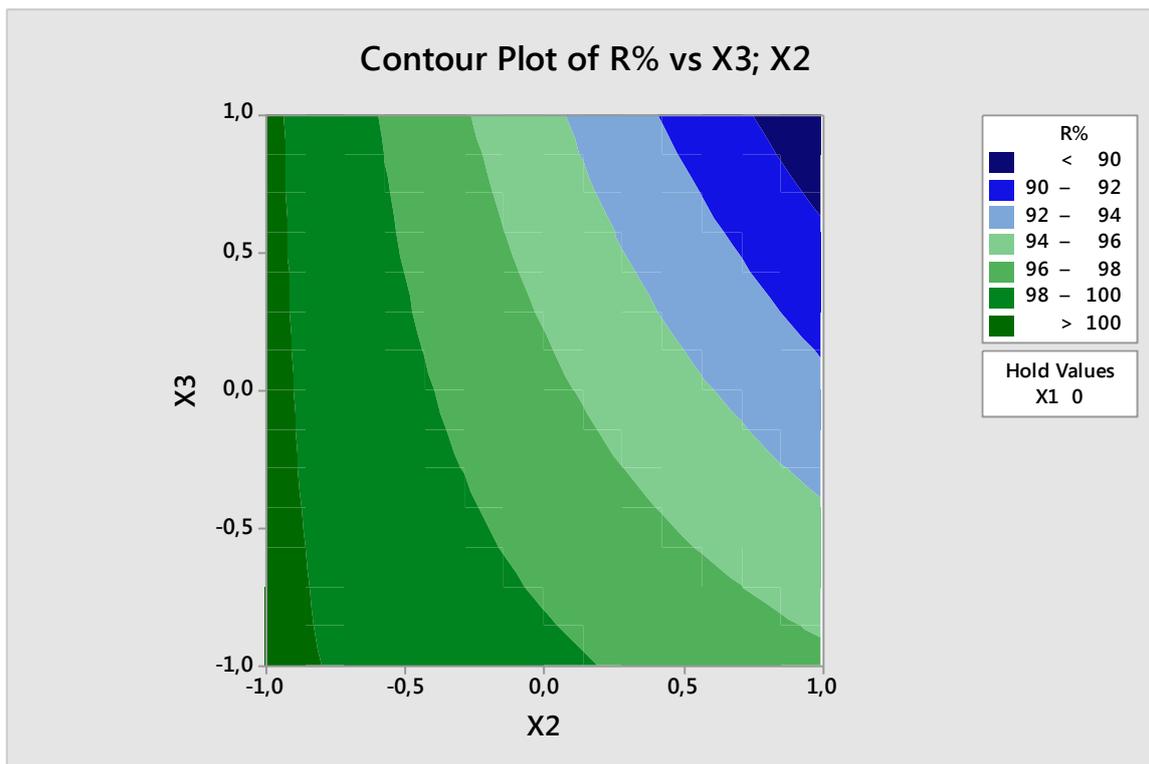
L'évolution de la concentration du DFS en fonction du pH est décrite par les courbes iso-rendements portées sur la figure III.7.



**Figure III.8 : Évolution de la concentration du DFS en fonction de pH  
Évolution de rendement.**

La variation de la concentration du DFS en fonction du pH, montre que le rendement de biodégradation croît avec la diminution de la concentration du DFS, il atteint une élimination totale de ce dernier dans les différents niveaux du pH pour les plus faibles concentrations du diclofenac sodique. Aussi, pour des concentrations supérieures à 15 mg/L de diclofénac et pour des valeurs constantes de la source de carbone, le rendement augmente avec la hausse de la valeur du pH, mais pour des concentrations inférieures à 15 mg/L le rendement est plus ou moins constant avec la hausse du pH.

L'évolution de la concentration du DFS en fonction de la concentration de l'azote est décrite par la courbe iso-rendements portées sur la figure III. 8.



**Figure III.9 : Courbe iso-rendement - Évolution de la concentration du DFS en fonction la concentration de la source d'azote**

Nous remarquons d'après la figure 8, variation de la concentration du DFS en fonction de la concentration de l'azote, que le rendement de biodégradation croit avec la diminution de la concentration de l'azote dans les différents niveaux de la concentration du DFS, la même observation est relevée avec les différents niveaux de la concentration de la source d'azote. Nous constatons alors que nous pouvons avoir une élimination totale de notre polluants mais pour des faibles concentrations de la source d'azote.

D'après la littérature, la source d'azote influe sur biodégradation, mais puisqu'il s'agit d'une biodégradation d'un composé organique ou sa structure contient de l'azote, tout augmentation de la concentration peut avoir un effet négative sur le rendement de biodégradation. Sans oublier, qu'il faut une quantité minimale d'azote initiale pour ne pas limiter la croissance micro-algale, sans dépasser une quantité maximale pour ne pas l'inhiber [34]. Les travaux de recherche Patrick LASSUS 1992 montre clairement que L'azote à une influence positive sur la croissance de leur micro-algue jusqu'à une valeur seuil , Au-delà de cette valeur, le taux de division diminue [35].

### III. 11. Conclusion

Nous pouvons conclure que pour le système étudié, le rendement maximal obtenu est 100 %, avec les concentrations de DFS variant de 10 à 30 mg/L, un domaine de pH de 6 à 8 et en absence de concentration initiale d'azote.

Il ressort de cette étude que la biodégradation du DFS par les micro-algues dépend de la concentration initiale du DFS et la concentration initiale de l'azote et interaction entre ces deux facteurs. Ainsi, une augmentation de la concentration de l'azote diminue le rendement de biodégradation.

Concernant la modélisation de la densité optique et le taux de croissance des microalgues, le plan factoriel complet à deux niveaux ( $2^3$ ) n'est pas adaptable, pour une bonne modélisation, donc il est préconisé d'essayer de changer le type du plan d'expérience.

## Conclusion générale

Le travail réalisé au cours de ce mémoire, s'inscrit dans le cadre général de la dépollution des eaux usées d'origine pharmaceutique. Il a eu pour objectif l'élimination d'un principe actif, le diclofénac sodique, en faisant appel à la biodégradation par une mixture de micro-algues.

L'analyse du diclofénac a été réalisée à l'aide de la chromatographie en phase liquide HPLC, la courbe d'étalonnage obtenue est une droite linéaire avec un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) égal à 0,9988.

Les valeurs des coefficients de variation pour les différentes concentrations sont faibles ( $CV < 5\%$ ), ce qui démontre la bonne précision de la méthode.

L'isolement, la purification et l'identification des micro-algues ont été réalisés, la mixture retenue pour notre étude est composée de *Chlorella* sp, *Chlamydomonas* sp, *euglena* acus, *spiruline* sp.

Une étude paramétrique se basant sur la méthode des plans d'expériences, un plan factoriel complet à deux niveaux ( $2^3$ ) a été réalisé dans le but de voir l'effet du pH, la concentration de la source d'azote et de carbone. Cette technique nous a permis d'établir un modèle mathématique qui relie le rendement de biodégradation du diclofénac sodique aux différents paramètres considérés.

D'autre part cette méthode nous a permis de définir les conditions opératoires de biodégradation conduisant au meilleur rendement. Dans le cas considéré le rendement maximal est de 100%, pour un pH variant entre 6 et 8, en absence de la source d'azote et quel que soit la concentration initiale du diclofénac sodique.

En outre, L'influence de divers paramètres a été étudiée en vue d'améliorer et de confirmer les résultats obtenus par la méthode des plans d'expériences et ainsi de mieux comprendre le processus de biodégradation. Toutes ces expériences ont permis d'aboutir à :

- ✓ La présence de la concentration initiale de la source d'azote influe négativement sur la biodégradation.
- ✓ L'intervalle de variation du pH n'influe pas sur le rendement de biodégradation, ce qui montre que nous sommes dans les conditions idéales de croissance des micro-algues.

Comme perspective, il serait intéressant d'appliquer cette étude à un effluent réel, afin de vérifier le pouvoir dépolluant des micro-algues dans ce milieu plus complexe et d'évaluer ainsi le coût du traitement.