

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**Université de BLIDA 1**

**Faculté des Sciences**



**Département de Chimie**

**Projet de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Spécialité : Chimie des Produits Naturels**

**Filière : Chimie**

**Domaine : Science de la matière**

***THÈME***

**Évaluation des propriétés photosensibilisantes de  
la phycocyanine greffée sur le chitosane**

**Présentée par :**

**DRIOUECH Ahlem Ibtissem**

**BOUCHELAGHEM Achouak**

**Membres de jury :**

**Président : Pr. Mohamed ELHATTAB**

**Examinatrice : Mme Fethia BENMERAD**

**Encadrée par :**

**Mme Z. ZEFFOUNI**

**2019 / 2020**

À nos parents, et à toute notre famille ...

Je dédie ce travail à toute la famille Driouech,

À mes très chers parents, leur amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui,

À mes frères, ma source de joie et de bonheur,

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance,

À Nadia , Zehour et mes chers neveux Shahine et Anaïs .

DRIOUECH Ahlem Ibtissem

Je dédie ce travail à toute la famille Bouchelaghem,

À ma très chère maman et à mon cher père qui ont sacrifié pour m'offrir les conditions propices à ma réussite,

À mes frères, qu'ils trouvent en moi la source de leur fierté,

À Mon mari, mon conseiller , qui m'a toujours soutenu et encouragé,

À ma chère fille Ritadj, ma source de vie.

BOUCHELAGHEM Achouak

À nos amies Feriel , Amina , Khadidja , Flora , Nessrin et zahra ...

## Remerciement

Nous remercions Madame ZEFFOUNI .Z pour son encadrement , ces conseils et ses orientations . Sous sa direction nous avons développé nos idées avec un grand soutien.

Nous tenons aussi à exprimer nos remerciements à Monsieur M. ELHATTAB , pour l'intérêt qu'il manifeste à notre travail en ayant accepté d'être un membre du jury .

Nous remercions également Madame BENMARED de nous faire l'honneur de faire partie du jury pour juger notre travail .

Un grand remerciement à tous les enseignants sans distinction qui nous ont formé et guidé pour l'accomplissement de nos études.

Enfin , nous envoyons nos plus vifs remerciements à toute notre familles et nos chères amies .

## Table des matières

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste d'abréviations	
Introduction générale.....	1
Chapitre 1: Spiruline et phycocyanine	
1.1. Les cyanobacteries.....	2
1.2. Historique.....	3
1.3. Définition.....	3
1.4. Taxonomie.....	4
1.5. Distribution géographique.....	5
1.6. La culture.....	5
1.6.1. Les systèmes de culture.....	5
1.6.1.1. Les étangs ouverts.....	6
1.6.1.2. Les photobioréacteurs .....	7
1.6.1.2.1. Les photobioréacteurs à colonne verticale.....	7
1.6.1.2.2. Les photobioréacteurs à assiette plate.....	8
1.6.1.2.3. Les photobioréacteurs tubulaires.....	8
1.6.1.3. Système hybride.....	9
1.6.2. Les paramètres de croissance.....	9
1.6.2.1. La température .....	9
1.6.2.2. Le pH.....	9
1.6.2.3. Milieu de culture.....	9
1.6.3. Récolte de spiruline.....	10
1.6.3.1. Filtration.....	10
1.6.3.2. L'essorage.....	11
1.6.3.3. L'extrusion.....	11
1.6.3.4. Séchage.....	11
1.7. Composition de spiruline.....	11
1.7.1. Protéines.....	12
1.7.2. Lipides.....	12
1.7.3. Glucides.....	12
1.7.4. Vitamines.....	13
1.7.5. Minéraux et oligoéléments.....	13
1.7.6. Pigments.....	13
1.8. Étude phytochimiques de l'extraction de la phycocyanine à partir de la spirulina paltensis .....	13
1.8.1. Définition.....	13
1.8.2. Source de la phycocyanine.....	14
1.8.3. Structure.....	15
1.8.4. Propriété physico-chimique de la phycocyanine.....	15
1.8.4.1. Propriétés spectrales.....	15
1.8.4.2. Stabilité de la phycocyanine.....	16
1.8.5. Propriétés thérapeutiques .....	16
1.8.5.1. Anti inflammatoire .....	16
1.8.5.2. Effet hépatoprotecteur .....	16
1.8.5.3. Effet renoprotecteur.....	16
1.8.6. Activités thérapeutiques de spiruline.....	16

1.8.7. Méthodes d'extraction de la phycocyanine.....	18
1.8.7.1. Extraction par macération.....	18
1.8.7.2. Extraction par congélation décongélation.....	18
1.8.7.3. Extraction par micro-onde .....	19
1.8.7.4. Extraction par homogénéisation à haute pression.....	20
1.8.8. Application de la phycocyanine .....	20
1.8.8.1. Colorants alimentaire .....	21
1.8.8.2. Colorants fluorescent .....	21
1.8.8.3. Application dans la PDT.....	21
1.8.9. Toxicité et surdosage.....	21

## **Chapitre 2 : Photosensibilisation , et la production de l'oxygène singulet**

2.1. Définition .....	22
2.2. Propriétés Photosensibilisateurs.....	22
2.3. Propriétés de l'oxygène singulet .....	23
2.3.1. Structure électronique de l'oxygène singulet.....	23
2.3.2. Désactivation de $^1O_2$ .....	24
2.3.2.1. Désactivation physique .....	24
2.3.2.2. Désactivation chimique .....	24
2.3.3. Mécanisme de production de l'oxygène singulet.....	25
2.3.4. Durée de vie de l'oxygène singulet .....	26
2.4. Types de photosensibilisateurs .....	26
2.4.1. Les photosensibilisateurs naturels.....	26
2.4.2. Colorants organiques et hydrocarbures aromatiques.....	27
2.4.3. Phtalocyanines et tetrapyroles apparentés porphyrine .....	28
2.4.4. Complexe de métaux de transition .....	28
2.4.5. Les semi conducteurs .....	28
2.5. Applications de photosensibilisateurs.....	28
2.5.1. Synthèse de produits chimique fins traitement des eaux usées.....	28
2.5.2. L'utilisation de l'Oxygène singulet .....	29
2.5.2.1. Stérilisation du sang .....	29
2.5.2.2. Thérapie photodynamique du cancer (PDT).....	29
2.5.2.3. Insecticide et herbicide .....	29
2.6. Réactions caractéristiques de l'oxygène singulet.....	30
2.7. Supports pour photosensibilisateurs .....	31

## **Chapitre 3 : Valorisation du pouvoir photosensibilisant de la phycocyanine greffé sur le chitosane**

INTRODUCTION .....	33
3.1. Définition de chitosane .....	33
3.2. La source de chitosane .....	33
3.3. La structure de chitosane .....	33
3.4. Mécanisme De synthèse .....	34
3.5. Propriétés de chitosane.....	35
3.5.1. Le poids moléculaire .....	35
3.5.2. Degré de désacétylation (DDA).....	35
3.5.3. La viscosité .....	35
3.5.4. La solubilité .....	35
3.5.5. La cristallinité .....	36
3.6. Extraction de chitosane .....	36

3.7. Modifications chimiques .....	37
3.8. Mis en forme de la phycocyanine .....	38
3.8.1. Le greffage .....	38
3.8.2. L'encapsulation .....	39
3.8.3. L'adsorption.....	39
Conclusion.....	40
Plan de travail .....	41
Références bibliographiques .....	

## Liste des figures

Figure 1.1 : Schéma de la structure d'une cyanobactérie.....	2
Figure 1.2 : Spiruline vue au microscope.....	3
Figure 1.3 : Forme galénique de la spiruline comestible.....	4
Figure 1.4 : Principales exploitations de micro-algues à travers le monde.....	6
Figure 1.5 : Photobioréacteurs à colonne verticale .....	8
Figure 1.6 : Photobioréacteurs tubulaires .....	8
Figure 1.7 : Biomasse obtenue après l'étape de filtration.....	10
Figure 1.8 : Différentes étapes de l'extrusion.....	11
Figure 1.9 : Solution de phycocyanine.....	14
Figure 1.10: Structure de phycocyanine.....	15
Figure 1.11 : Activité thérapeutique des constituants de la spiruline.....	17
Figure 2.12 : Courbes d'énergie potentielle pour les trois états électroniques bas de l'oxygène moléculaire.....	23
Figure 2.13 : Représentations primitives des états singlets et triplets les plus bas de l'oxygène moléculaire.....	24
Figure 2.14 : Diagramme simplifié de Perrin-Jablonski pour la production d'oxygène singlet par transfert d'énergie à partir d'un photosensibilisateur et équation de production de l'oxygène singlet .....	26
Figure 2.15 : Quelques photosensibilisateurs organiques courants.....	27
Figure 2.16 : Formation du dioxétane-1,2.....	30
Figure 2.17 : formation d'hydroperoxyde.....	30
Figure 2.18 : Formation d'endoperoxydes.....	30
Figure 3.19 : Structure de chitosane .....	34
Figure 3.20 : Mécanisme de synthèse .....	34
Figure 3.21 : Réaction d'acétylation du chitosane par l'anhydride acétique en milieu hydro-alcoolique.....	37
Figure 3.22 : Dépolymérisation du chitosane par désamination nitreuse.....	37
Figure 3.23 : La synthèse du N succinyl chitosane C phycocyanine peptide (NSC CPC).....	38

## Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Taxonomie de l' <i>Arthrospiraplatensis</i> .....	4
Tableau 1.2 : Distribution géographique de <i>Spirulinaplatensis</i> .....	5
Tableau 1.3 : Composition de milieu de culture.....	10
Tableau 1.4 : Composition en acides aminés de <i>Spirulinaplatensis</i> .....	12
Tableau 1.5 : Propriétés spectrales de C-PC .....	15
Tableau 1.6 : condition d'extraction par micro-onde.....	19
Tableau 1.7 : condition d'extraction par homogénéisation à haute pression.....	20
Tableau 2.8 : Quelques exemples de colorants organiques courants et leurs propriétés photophysiques.....	27



## **Liste d'Abbreviations**

**C-PC** : Phycocyanine isolé d'une cyanobactérie

**PS** : Photosensibilisateur

**UV** : Ultra Violet

**PDT** : Thérapie photodynamique des tumeurs

**S.Platensis** : Spiruline platensis

$^1d^+_g$  : Deuxième état excité

$^3d^-_g$  : Etat triplet ( fondamentale)

$^1U_g$  : Première état excité ( état singulet )

$^1O_2$  : Oxygène singulet

**NSC** : N-succinyl de chitosane

**MTG ase** : Microbial transglutamin

**VIH** : Humain Immunodeficiency Virusis

**ROS** :Reactive oxygen species ( les espèces réactive de l'oxygène )

## **Résumé**

Les photosensibilisateurs naturels sont des composés capables d'absorber la lumière UV-VIS pour produire de l'oxygène singulet qui est plus réactif dans son état excité .

Dans notre manuscrit, nous avons étudié les propriétés photosensibilisantes de la phycocyanine extraite à partir d'une microalgue qui est la spiruline, et valoriser ses applications dans le domaine environnementale.

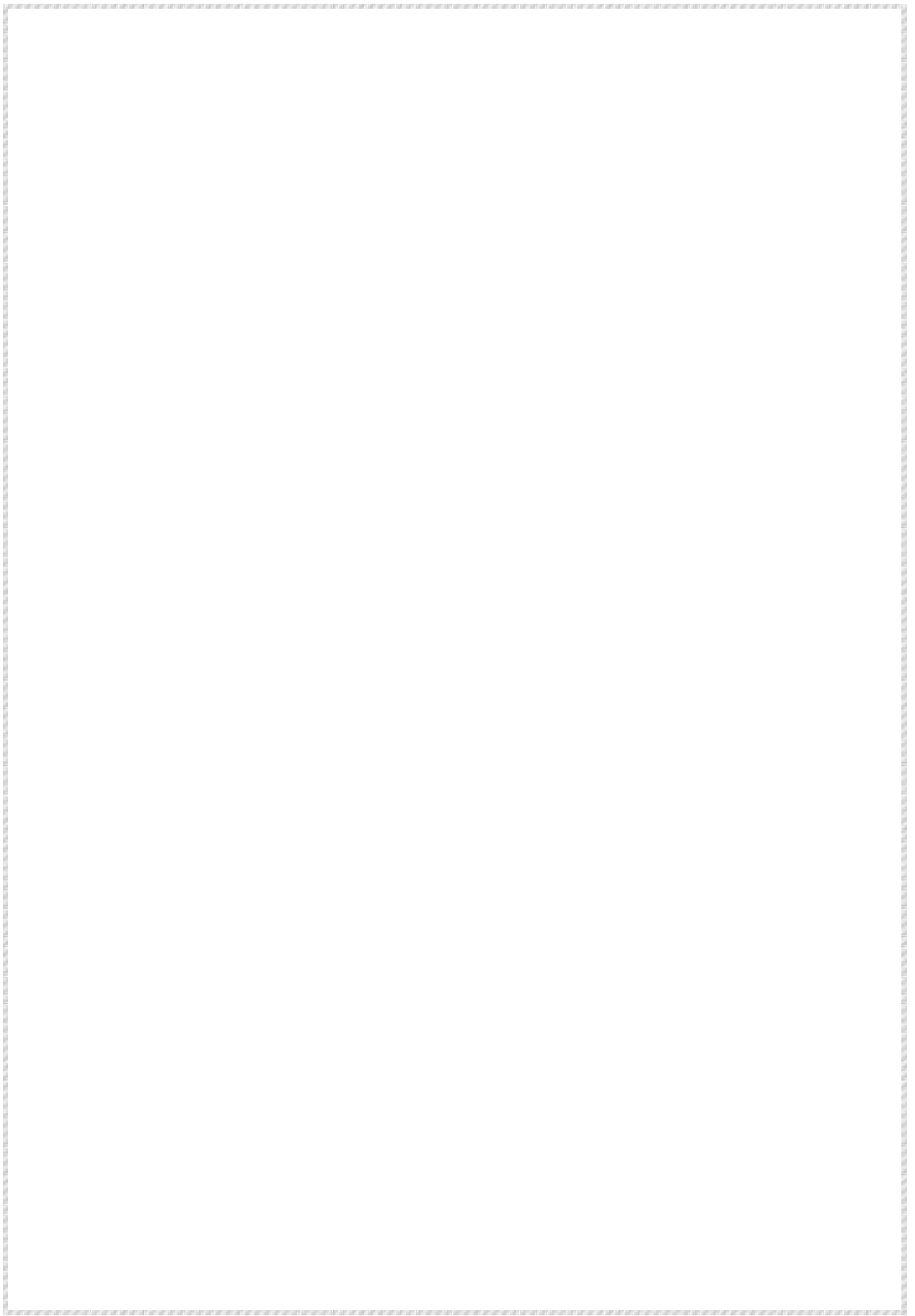
La solubilité de la phycocyanine dans le milieu aqueux présente un inconvénient lors de ses applications dans la dépollution des eaux usées. Afin de remédier à ce problème, une mise en forme de la phycocyanine par greffage sur un support biodégradable comme le chitosane est nécessaire.

الضوئية الطبيعية عبارة عن مركبات قادرة على امتصاص ضوء  
الأكسجين الذي ي

درسنا في مخطوطتنا خاصية الفيكوسيانين كمحسس ضوئي لتحسين تطبيقها في معالجة مياه  
يتم استخراج الفيكوسيانين من الطحالب الدقيقة و هي السبيرولينا .

يعد الفيكوسيانين محسنا ضوئي جيد و لكنه سريع الذوبان في الوسائط المائية  
يثبت على دعامة قابلة للتحلل الحيوي عن طريق اختيار البوليمر الحيوي و هو الشيتوزان .

تحلله



# Introduction Générale

## Introduction Générale

Les photosensibilisateurs ont largement suscité l'intérêt des chercheurs à cause de ses applications dans plusieurs domaines allant de la chimie des polymères au traitement du cancer. Ce sont des molécules capables de générer de l'oxygène singulet plus réactif que l'oxygène triplet en présence de la lumière et de l'air [1]. Il existe plusieurs types de photosensibilisateurs naturels tel que les phycocyanines, les furocomarines ,les flavonoïdes. Il existe d'autre type de photosensibilisateurs synthétiques comme les colorants organiques, les hydrocarbures aromatiques ...

L'étude de la production et la réactivité de l'oxygène singulet est devenue un domaine riche et divers, ayant des applications dans la chimie fine, le traitement des eaux usées [2] et la thérapie photodynamique [3].

Dans ce travail, nous allons étudier un photosensibilisateur qui est la phycocyanine. Ce colorant bleu est extrait à partir des cyanobactéries. La spiruline platensis est considérée comme une excellente source de ce complexe protéique (phycocyanine).

La phycocyanine a des applications dans le domaine pharmaceutique comme un agent antioxydant [4], anti inflammatoire [5] et dans le domaine médicale dans la thérapie photodynamique.

L'application qui nous intéresse dans ce travail est le pouvoir photosensibilisant, mais son utilisation reste limitée en raison de sa forte solubilité dans les milieux aqueux. Pour cela, la phycocyanine a subit à un traitement de mise en forme comme l'encapsulation, le greffage, l'adsorption...ect.

Ce manuscrit se divise en trois chapitres. Le premier chapitre définit la Spiruline platensis, sa culture et sa composition chimique, une étude complète sur la phycocyanine , les différentes méthodes d'extraction et ses applications.

Le deuxième chapitre expliquera le phénomène de la photosensibilisation, et la génération de l'oxygène singulet. Le dernier est la valorisation de la phycocyanine sur des membranes de polymères comme le chitosane .

# **Chapitre 1 :**

# **Spiruline et phycocyanine**

# Chapitre 1 : spiruline et phycocyanine

## 1. La spiruline et phycocyanine

### 1.1. Les Cyanobactéries

Les cyanobactéries existent depuis 3,5 milliards d'années, se sont des bactéries photosynthétiques avec production d'oxygène. Elles vivent avec la fixation de CO<sub>2</sub> car elles contiennent de la chlorophylle A et une protéine .

Les cyanobactéries sont des procaryotes unicellulaires ou pluricellulaires ,de taille de 1 a 10 µm, Gram – et sont généralement filamenteuses déplacées par glissement ,ayant un cycle de reproduction de type asexuce.

La figure 1 montre la structure d'une cyanobactérie. La partie « phycobilisome » est un complexe pigment-protéinique considéré comme un collecteur d'énergie lumineuse de l'appareil photosynthétique .

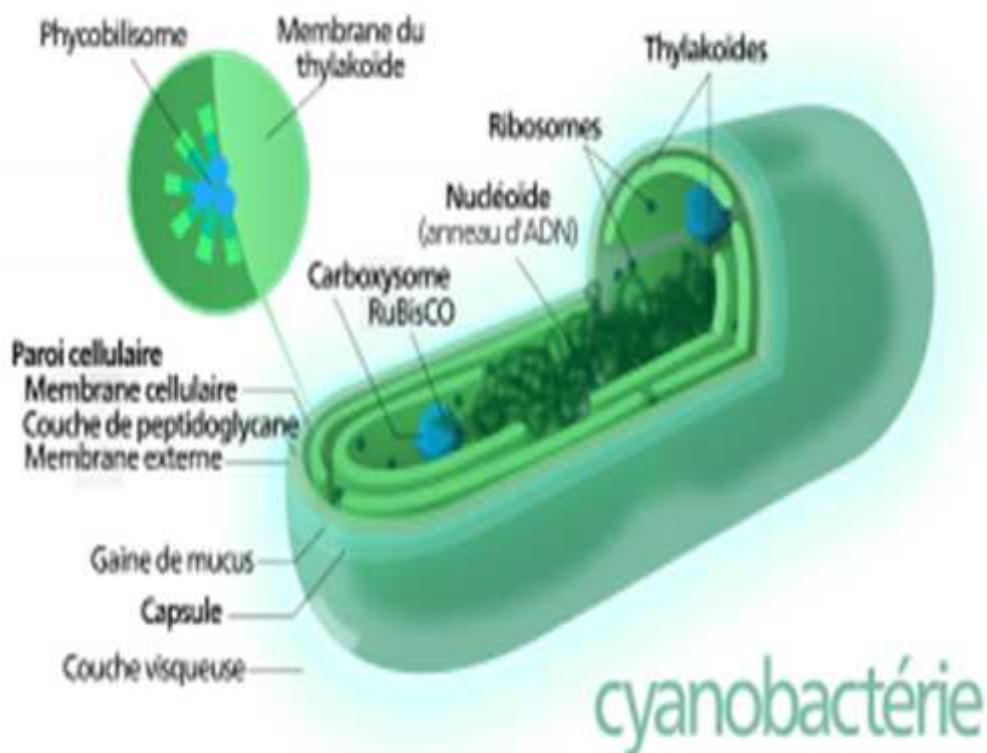


Figure 1.1 : Schéma de la structure d'une cyanobactérie.

# Chapitre 1 : spiruline et phycocyanine

## 1.2. Historique

La spiruline a été découverte par les scientifiques espagnols Hernando Cortez et Conquistadors en 1519 [6]. Cortez a observé que la spiruline est comestible par les Aztèques lors de sa visite au lac Texcoco au Mexique. La spiruline était une source de nourriture pour les Aztèques et autres Méso-Américains jusqu'au XVI<sup>e</sup> siècle. Les Aztèques l'appelaient « Tecuitlatl », c'est-à-dire « excrément du rocher ». La spiruline a été trouvée en abondance au bord du lac par des chercheurs français dans les années 1960, mais il n'y a aucune référence à son utilisation comme source de nourriture de façon quotidienne après le XVI<sup>e</sup> siècle. La première usine de transformation de spiruline, Sosa Texcoco, a été créée en 1969 par les Français. Il est possible que la spiruline ait une origine encore plus ancienne au Tchad où elle serait connue dès le IX<sup>e</sup> siècle sous l'Empire du Kanem. Elle est encore utilisée aujourd'hui, dans la fabrication des gâteaux secs appelés « Dihé », qui est utilisés pour faire des bouillons pour les repas, également vendus dans les marchés. La spiruline est récoltée à partir de petits lacs et dans des étangs autour du lac Tchad [7].

## 1.3. Définition

La spiruline ( *Arthrospiraplatensis* en latin) appartient aux cyanobactéries c'est une algue de couleur bleu-verte photosynthétique, planctonique microscopique, elle est filamenteuse mobile par glissement de taille de 10 à 12  $\mu\text{m}$ , spirale d'où vient son nom commercial. Elle peut prendre trois formes : spirale, ondule ou droite (figure 1.2).

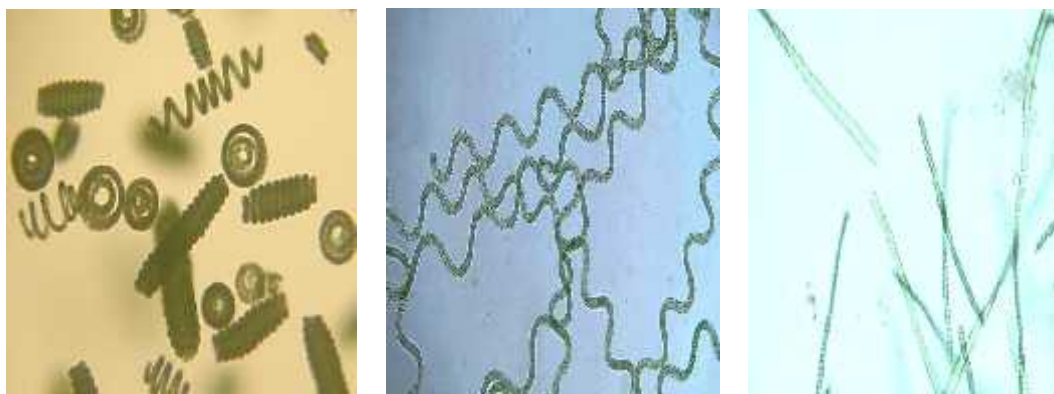


Figure 1.2 : Spiruline vue au microscope .



# Chapitre 1 : spiruline et phycocyanine

La spiruline est consommable depuis des siècles, cette micro-algue est valorisée par ses propriétés nutritionnelles et pharmacologiques [8].

C'est un complément alimentaire de haute qualité existe sous différentes formes galéniques : poudres, pailleté ou comprimés (Figure 1.3). Elle est très riche aux nutriments, 50 à 60 % de leurs masses faites de protéines, 6% de graisses, 15 à 20 % de vitamines et d'autres éléments.



Figure 1.3 : Forme galénique de la spiruline comestible.

Elle est aussi valorisée à cause de ces effets thérapeutiques qui sont très importants. La molécule responsable de ces effets est un pigment ou bien la phycocyanine. Ce pigment a plusieurs activités biologiques (cancer, VIH, anti-inflammatoire ...).

## 1.4. Taxonomie

La Spiruline est connue sous le nom scientifique *Arthrospiraplatensis*, appartient aux cyanobactéries procaryotes.

Le tableau suivant présente la taxonomie de l'*Arthrospiraplatensis* :

Tableau 1.1 : Taxonomie de l'*Arthrospiraplatensis*.

Règne	Bactérie
<b>Sous-règne</b>	Procaryote
<b>Division</b>	Cyanobactérie
<b>Classe</b>	Cyanophycée
<b>Ordre</b>	Oscillatoriales
<b>Famille</b>	Oscillatoriaceae
<b>Genre</b>	<i>Arthrospira</i>
<b>Espèce</b>	<i>Platensis</i>

# Chapitre 1 : spiruline et phycocyanine

## 1.5. Distribution géographique

La Spiruline peut vivre dans les lacs salins des zones tropicaux et semi-tropicaux et aussi dans les eaux chaudes à pH alcalin et riches en nutriments azotés et phosphorés.

Tableau 1.2 : Distribution géographique de *Spirulina platensis* [9, 10].

<b>AFRIQUE</b>	Algérie Soudan Ethiopie Kenya Tunisie Madagascar	Tchad Djibouti Congo Tanzanie Zambie
<b>ASIE</b>	Inde Srilanka Pakistan Thaïlande	
<b>AMERIQUE DU SUD</b>	Pérou Mexique Uruguay Equateur	
<b>AMERIQUE DU NORD</b>	Californie Haïti République Dominicaine	
<b>EUROPE</b>	Hongrie France	

## 1.6. La culture

La composition de spiruline dépend de plusieurs paramètres comme l'origine le climat...ect. Pour une optimisation de la valeur nutritive de la spiruline, la culture de cette dernière dépend des conditions spécifiques telles que la température, le pH et la composition du milieu de culture .

### 1.6.1. Les systèmes de culture

On peut cultiver les algues dans des systèmes ouverts ou fermés [11]. Actuellement, pour commercialiser la spiruline de haute valeur, deux technologies sont

# Chapitre 1 : spiruline et phycocyanine

adaptées : les étangs ouverts et les photobioréacteurs fermés. Il existe une autre technologie qui est une combinaison entre les deux, appelle les systèmes hybrides.

## 1.6.1.1. Les étangs ouverts

On distingue deux classes : les étangs naturels comme les lacs, les lagunes et les étangs. On a aussi les étangs artificiels, les plus utilisés sont les grands étangs peu profonds, les réservoirs et les étangs de chemin de roulement.

Les systèmes ouverts sont faciles à construire, ce qui les rend à faible coût de production [11].

Mais ce type de système a plusieurs inconvénients tels que :

- Mauvaise utilisation de la lumière par la cellule.
- Les pertes par évaporation.
- La contamination par la faune et d'autres hétérotrophes à croissance rapide [10].
- La diffusion de CO<sub>2</sub> dans l'atmosphère.
- Elle demande des hectares de terrain [12].

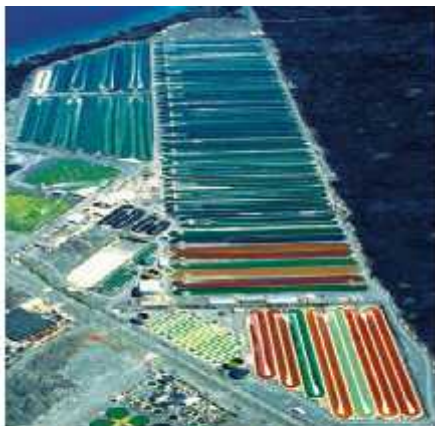


Photo des bassins de production de micro-algues de la société Cyanotech situés sur les côtes Hawaïenne



Photo des bassins de production de micro-algues de la société Earthrise situés sur les côtes Californienne



Photo des bassins de production de micro-algues de la société Alpha Biotech situés sur les côtes normandes

Figure 1.4: Principales exploitations des micro-algues à travers le monde .

## Chapitre 1 : spiruline et phycocyanine

Les algues dans les systèmes ouverts sont cultivées en grandes quantités, mais elles sont facilement contaminées. Pour cette raison on utilise le concept des serres dans la culture des algues pour les protéger ou diminuer la contamination. Si on utilise les serres d'algue avec des conditions optimales et le système environnemental contrôlé, la productivité augmente 10 fois par rapport à des systèmes ouverts. Les serres d'algue augmentent le rendement, réduisent la contamination et gagnent le terrain. Dans les systèmes internes, on peut contrôler les conditions de croissance telle que la température, l'humidité, les dioxydes de carbone grâce à des ventilateurs, le pH du milieu, et des nutriments [13].

### 1.6.1.2. Les photobioréacteurs

Le photobioréacteur est un système fermé qui permet de donner un milieu de culture fermé à l'environnement sans changement de gaz et de contamination avec le milieu externe.

Dans ce type de système, le contrôle des conditions de croissance est plus facile ce qui augmente la productivité de produit. On peut contrôler l'approvisionnement en dioxyde de carbone, l'alimentation en eau, la température optimale, l'intensité lumineuse, le pH et l'aération.

Les photobioréacteurs sont éclairés par deux systèmes de lumière : La lumière naturelle ou la lumière artificielle. La dernière est la plus utilisée, elle est réalisée à l'aide des lampes fluorescentes, qui lui procurent une meilleure utilisation par rapport au système ouvert.

On distingue trois types des photobioréacteurs :

- Les photobioréacteurs à colonne verticale [14].
- Les photobioréacteurs à assiette plate [15].
- Les photobioréacteurs tubulaires [16].

#### 1.6.1.2.1. Les photobioréacteurs à colonne verticale

Les photobioréacteurs à colonne verticale sont les plus utilisés, car ils sont faciles et à faible coût [14]. Il existe différents modèles et échelles de photobioréacteur à colonne verticale, destinés à la culture des algues, et qui sont très efficaces à la culture à grandes échelles [17].

## Chapitre 1 : spiruline et phycocyanine



Figure 1.5 : Photobioréacteur à colonne verticale

### 1.6.1.2.2. Photobioréacteurs à assiette plate

Les photobioréacteurs à assiette plate sont utilisés pour la culture des micro-algues photosynthétiques. Elles sont importantes à cause de leurs grandes surfaces d'éclairage, en utilisant des récipients plats pour la culture [18]. Elles sont construites à partir des matériaux transparents pour profiter au maximum de la lumière solaire, et par conséquent, on aura un rendement élevé pour les espèces photosynthétiques [19].

### 1.6.1.2.3. Les photobioréacteurs tubulaires

Les photobioréacteurs tubulaires sont construits, soit avec des tubes en verre ou en plastique, on trouve des photobioréacteurs tubulaires horizontaux /serpentins [20], verticaux [21], coniques [22] et inclinés [16]. Le problème de ces photobioréacteurs est la température qui est difficile à contrôler, donc ce système est toujours associé à un thermostat.

Ces photobioréacteurs sont très couteux et difficile à utiliser.



Figure 1.6 : Photobioréacteurs tubulaires .

# Chapitre 1 : spiruline et phycocyanine

## 1.6.1.3. Systèmes hybrides

Un système hybride est une combinaison entre les deux systèmes précédents les étangs ouverts et les photobioréacteurs, il a été conçu pour diminuer les inconvénients de chaque système. Les systèmes hybrides sont constitués de boucles tubulaires placés horizontalement dans des bassines d'eau thermostatiques [23]. Ces réacteurs ont un volume de 200 L, l'avantage de ces système est de mieux contrôler les conditions de culture qui permet une productivité élevée et diminue la consommation de l'énergie [12].

## 1.6.2. Les paramètres de croissance

La culture des micro-algues dépend de plusieurs conditions et paramètres, pour obtenir un produit de haute qualité et avec un bon rendement. Les paramètres les plus importants sont la température, pH, et le milieu de culture.

### 1.6.2.1. La température

La température joue un rôle important sur le taux de croissances et la production des pigments et protéines [24].

Avec une température inférieure de 17°C, on n'observe pas une croissance de la spiruline mais aussi l'espèce ne meurt pas.

Avec une température plus de 38°C la croissance est inhibée. La spiruline peut vivre et pousse dans un intervalle de température de 20 à 37 °C, la température optimale pour la culture est de 35°C [25].

### 1.6.2.2. Le pH

Comme la température, le pH aussi a une influence sur la production des pigments et les protéinés. La spiruline vit dans des milieux alcalins entre un pH de 8,5 à 11.

Le pH 9 est la valeur optimale pour la culture de la spiruline [24].

### 1.6.2.3. Milieu de culture

La productivité de la spiruline nécessite des éléments nutritifs, elle vit dans un milieu riche en azote et en carbone. Les éléments nutritifs pour la spiruline sont présentés dans le tableau 3.

# Chapitre 1 : spiruline et phycocyanine

Tableau 1.3 : Composition de milieu de culture [26].

COMPOSITION DU MILIEU (en g/l de solution aqueuse)	
NaHCO <sub>3</sub>	16,8
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
NaNO <sub>3</sub>	2,5
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1
NaCl	1
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub>	0,04
FeSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0,01
EDTA (acide éthylène diaminotétracétique)	0,08

## 1.6.3. Récolte de la spiruline

La récolte se fait le matin parce que le pourcentage de protéines dans la spiruline est plus élevé le matin. Elle passe par plusieurs étapes [27]:

### 1.6.3.1. Filtration

L'eau de culture est récoltée à l'aide des pompes. Après, on fait un tamisage avec une toile très fine ce qui permet de conserver uniquement une "pâte verte", appelée "biomasse".

Il est nécessaire de mélanger la pâte pour la filtrer et pour extraire le maximum d'eau.



Figure 1.7 : Biomasse obtenue après l'étape de filtration

# Chapitre 1 : spiruline et phycocyanine

## 1.6.3.2. L'essorage

L'essorage est une étape très importante dans la production de la Spiruline. Une biomasse mal essorée peut entraîner un mauvais séchage, et par conséquent une Spiruline de moins bonne qualité. Elle subit ensuite une pression de plusieurs centaines de kg afin d'en extraire toute l'eau.

## 1.6.3.3. L'extrusion

Lorsque la biomasse est bien essorée, elle ressemble à une galette molle et compacte. Elle va être roulée sur elle-même, placée dans le pousoir à saucisse en inox adapté et actionné par une manivelle, pour une extrusion en forme de « spaghettis » bâtonné.



Figure 1.8 : Différentes étapes de l'extrusion .

## 1.6.3.4. Séchage

Le séchage dure en moyenne 8 heures à l'air libre, une température maximale de 60°C qui peut être augmenté jusqu'à une température comprise entre 60 à 75°C en période d'été. En période froide, la finition du séchage est souvent remise au lendemain, dans ce cas, les claies sont récupérées aux alentours de 16 heures.

## 1.7. Composition de Spiruline

Les conditions de culture influent sur la composition de la spiruline. Généralement, la spiruline contient 70 % de protéines, 15 à 25 % de glucides, jusqu'à 11% de lipides ainsi que des vitamines, des minéraux de la chlorophylle et des phycobiliprotéines.



# Chapitre 1 : spiruline et phycocyanine

## 1.7.1. Protéines

La quantité de protéines dans l'*Arthrospiraplatensis* varie de 55 à 70 % du poids sec [28].

Tableau 1. 4 : Composition en acides aminés de *Spirulinaplatensis* [28]

Acides aminés	Pourcentage %
Acide Aspartique	0,9
Méthionine*	0,8
Thréonine*	0,5
Isoleucine*	1,3
Sérine	0,6
Leucine*	0,8
Acide Glutamique	1
Tyrosine	3,3
Proline	0,3
Phénylalanine*	2,5
Glycine	0,6
Histidine	4,7
Alanine	1
Lysine*	1,9
Valine*	1,3
Arginine	2,1

\* Acide aminé essentiel

## 1.7.2. Lipides

La teneur des lipides varie de 5,6 à 11 % en poids [29- 32]. Elle peut atteindre une valeur de 14,3 % [28].

On trouve les lipides insaponifiables et les Lipides saponifiables qui représentent 28% des lipides totaux. Ils sont composés de 10,3% de monogalactosyldiacylglycérol (MGDG), de 6,44 % digalactosyldiacylglycérol (DGDG), et de 11,4% de sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG) [30].

## 1.7.3. Glucides

Les glucides constituent 15 à 25 % de la matière sèche des spirulines [26]. Ces glucides constituent la paroi cellulaire des spirulines. L'essentiel des glucides

## Chapitre 1 : spiruline et phycocyanine

assimilables sont des polymères. Tandis que les glucides simples comme le glucose, le fructose, et le saccharose, ainsi que les polyols comme le glycérol, le mannitol et le sorbitol, ne sont présents qu'en très faibles quantités.

### 1.7.4. Vitamines

Il existe 13 vitamines, 4 liposolubles (A, D, E, K) et 9 hydrosolubles (B1, B2, B5, B6, B12, C, PP).

La spiruline contient de nombreuses d'entre elles et spécialement des vitamines B dans des proportions optimales, qui donnent des propriétés biologiques.[28].

### 1.7.5. Minéraux et Oligoéléments

Les oligoéléments ou éléments traces présents dans la spiruline sont le fer, le zinc, le cuivre, le sélénium, l'iode, le fluor, le chrome, le calcium et le magnésium. Les autres éléments en quantité plus significative, sont considérés comme des minéraux [32].

### 1.7.6. Pigments

La spiruline est riche en pigments responsables de sa couleur. Les principaux pigments sont la phycocyanine et la chlorophylle. La phycocyanine est une phycobiliprotéine, seul colorant bleu alimentaire naturel, elle est le pigment le plus abondant de la spiruline et représente plus de 15 % du poids frais et plus de 20 % du poids sec de l'algue [34, 35].

La chlorophylle est présente en proportion de 9-15 g/kg.

Nous intéressons à la phycocyanine qui est en grand quantité dans la spiruline.

## 1.8. Étude phytochimiques de l'extraction de la phycocyanine à partir de la spirulina paltensis

### 1.8.1. Définition

Les cyanobactéries possèdent une large variété de composants colorés incluant les caroténoïdes, les chlorophylles et les phycobiliprotéines. Les phycobiliprotéines, dont fait partie la phycocyanine, sont des chromoprotéines constitués d'une partie protéique et d'un pigment [36]. Ce complexe a prouvé sa fonctionnalité en tant qu'un colorant

## Chapitre 1 : spiruline et phycocyanine

bleu naturel, marqueur fluorescent et agent thérapeutique [37]. Il est utilisé pour ses puissantes propriétés antioxydants et anti-inflammatoires dans les maladies induites par le stress oxydatif et dans les nutraceutiques [38].

La phycocyanine est le constituant principal, alors que l'allophycocyanine fonctionne comme le pigment construisant un pont entre les phycobilisomes et les lamelles photosynthétiques du thylacoïde.

Elle représente l'association de protéine de la famille des phycobiliprotéines et de phycocyanobiline ( pigment hydrosoluble de la photosynthèse )[39] .



Figure 1.9: Solution de phycocyanine

### 1.8.2. Source de phycocyanine

Les cyanobactéries, les plus nommées pour la production de phycocyanine en tant que pigment bleu naturel sont *Arthrospira*, également connue sous le nom de Spiruline, une algue bleu-vert [40]. Le C-PC existe dans de nombreuses espèces d'algues bleu-vert, d'algues rouges, de Cryptophyta et de quelques dinoflagellés. Parmi ces sources de C-PC, *S. Platensis*, *Anabaena* et d'autres algues bleu-vert affichent des teneurs élevées en C-PC[41]. Plus précisément, *Arthrospiraplantensis* et *Arthrospiramaxima* sont les espèces les plus utilisées comme les additifs alimentaires, les aliments diététiques, les cosmétiques, les produits pharmaceutiques et la médecine [42–43]. Pour ces raisons, *Arthrospiraplantensis* est une source prometteuse de C-PC qui représente une opportunité de profit économique.

# Chapitre 1 : spiruline et phycocyanine

## 1.8.3. Structure

La structure de la phycocyanine chez *Spirulina platensis* est formée de l'association de 36 chromophores de phycocyanobiline qui sont liés par un pont thioéther à la partie protéique [44]. La phycocyanine est le pigment le plus abondant de la spiruline représentant plus de 15 %.

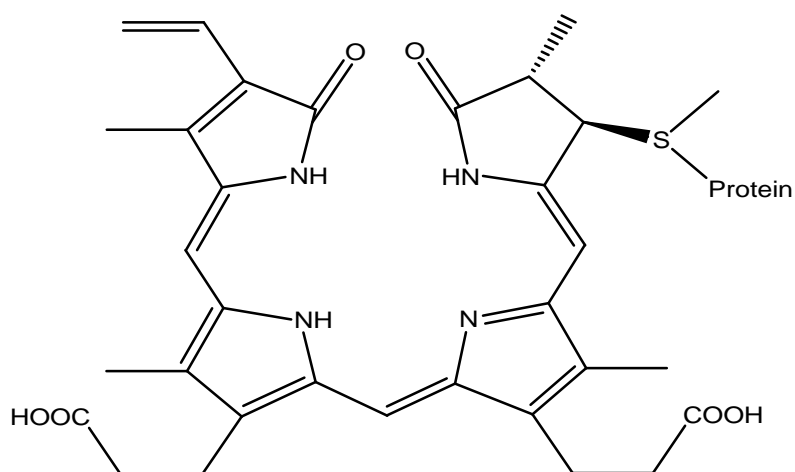


Figure 1.10 : Structure de la phycocyanine .

## 1.8.4. Propriétés physico-chimiques de la phycocyanine

La phycocyanine est le pigment le plus abondant de la spiruline représentant plus de 15 % de son poids [35].

### 1.8.4.1. Propriétés spectrales

Les principales propriétés spectrales de la phycocyanine sont illustrées dans le tableau 1.5 [45,46] .

Tableau 1.5 : Propriétés spectrales de C-PC .

Pigment	Absorbance maximale (nm)	Emission de fluorescence (nm)	Masse moléculaire (KDa)	Absorptivité (L/g.cm)	Absorbance de fluorescence
C-PC	615	647	220	7.0	0.15

## Chapitre 1 : spiruline et phycocyanine

Le spectre d'absorption de la phycocyanine montre une bande d'absorption forte à 615 nm et une seconde plus faible à 360 nm, ces deux bandes sont dues aux propriétés du chromophore biline.

### 1.8.4.2. Stabilité de C-PC

La température et le pH jouent un rôle important dans la stabilité de phycocyanine, des travaux ont montré une stabilité maximale de la phycocyanine avec un pH qui varie de 5.5 à 6 et une température d'incubation entre 47 et 64 °C qui permet d'augmenter la demi vie de la phycocyanine en solution [47].

### 1.8.5. Propriétés thérapeutiques de phycocyanine

#### 1.8.5.1. Anti- inflammatoire

L'effet anti-inflammatoire de *S. platensis* a été prouvé pour la première fois par Ramirez et al. [48]. Romay et al. [49,50] qui ont récemment rapporté les effets anti-inflammatoires du C-PC. Un rapport a montré que l'effet anti-inflammatoire du C-PC dépendait de la dose et qu'il pouvait réduire l'œdème tissulaire inflammatoire dans 12 types de cellules inflammatoires dans un modèle expérimental.

#### 1.8.5.2. Effet hépatoprotecteur

Vadiraja et al. [51] ont étudié les activités pharmacologiques de C-PC sur la toxicité hépatique du rat induite par la R(+) - pulegone et le tétrachlorure de carbone et ont montré que le C-PC pouvait réduire significativement la toxicité hépatique causée par un grand nombre de radicaux libres.

#### 1.8.5.3. Effet Renoprotecteur

C-PC peut inhiber les activités des enzymes antioxydantes dans le rein. C-PC fournit une protection significative contre la perméabilité de la membrane mitochondriale et augmente la production d'ATP. En outre, C-PC peut prévenir l'apparition de la néphropathie diabétique en inhibant la production de superoxyde NADPH dépendante dans les cellules mésangiales rénales en culture [52].

### 1.8.6. Activités thérapeutiques de spiruline

Il existe plusieurs publications et recherches sur la spiruline pour sa valeur nutritive et ces activités thérapeutiques.

## Chapitre 1 : spiruline et phycocyanine

La spiruline est considérée comme un aliment fonctionnel en raison de son large spectre d'effets biologiques, qui ont été démontrés in vitro et in vivo. Parmi ceux-ci, la spiruline aurait des propriétés anti-inflammatoires [53], antihyperlipidémique [54], hypoglycémique [55], antihypertenseur [54], antinéoplasique [56], antiviral [57], antianémique [58] et une activité antioxydant [59]. Tous ces avantages thérapeutiques sont attribués à des substances de la spiruline appelées phycobiliprotéines qui est composé de C-phycocyanine, l'allophycocyanine, la phycoérythrine et la phycoérythrocyanine.

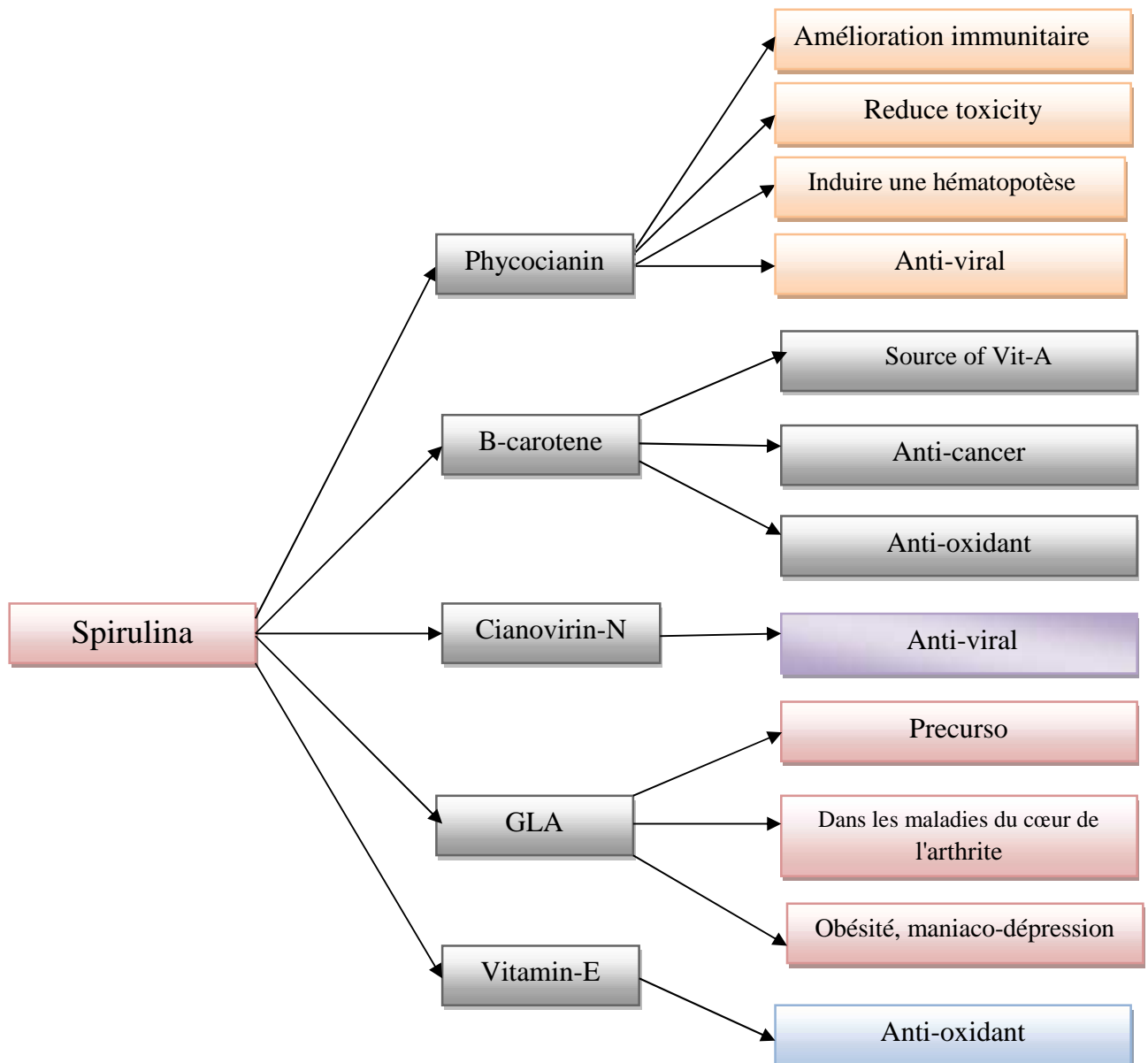


Figure 1.11: Activités thérapeutiques des constituants de la spiruline

# Chapitre 1 : spiruline et phycocyanine

## 1.8.7. Méthodes d'extraction de la phycocyanine

La phycocyanine possède un large spectre de fonction ce qui lui donne une importance commerciale. Sa valeur commerciale dépend de son degré de pureté [60].

Ils existent plusieurs méthodes d'extraction de la phycocyanine telle que les méthodes conventionnelles comme l'extraction par macération ou par congélation-décongélation qui est assez long [61,62]. Ces méthodes demande de la biomasse séchée puis une extraction thermique par des solvants organique ou solutions aqueuses en fonction de la polarité de phycocyanine [63]. D'autre part, il existe des techniques d'extraction vertes qui n'utilisent ni solvants ni produits chimiques nocifs pour l'environnement et qui donnent de meilleurs résultats pour le processus d'extraction. Ils pourraient être classés en général comme: extraction de liquide sous pression, extraction de fluide supercritique, extraction par micro-ondes, ultrasons et homogénéisation à haute pression ... [63].

D'après le travail de Mari Carmen Ruiz Domingues et al. [64], qui ont utilisé les quatre méthodes d'extraction de la phycocyanine, soit par macération, par congélation- décongélation, par micro-onde et par homogénéisation à haute pression.

### 1.8.7.1. Extraction par macération

La macération basse sur le trempage de la biomasse séché sur un solvant (eau, solution tampon de Na phosphate pH = 7 et solution eau tampon Na phosphate pH 7 (1 :1) (v /v)) pour extraire les composés de la biomasse dans le solvant, on utilisant un vortex pour bien mixer, accélérer et faciliter l'extraction.

On obtient le même rendement avec les trois solvants ~151.8 mg/g

### 1.8.7.2-Extraction par congélation décongélation

Dans l'extraction par congélation décongélation la biomasse dans un solvant subi plusieurs cycle de choc entre -22 °C à 20°C.

Ce procédé donne rendement similaires à l'extraction par micro-onde ~ 232.8 mg/g.

## Chapitre 1 : spiruline et phycocyanine

Mais d'après la littérature, l'extraction par congélation décongélation est efficace avec la biomasse humide [65].

### 1.8.7.3. Extraction par micro-onde

L'extraction basse sur le chauffage de la biomasse sèche avec four micro-onde domestique de puissance 1000 W et fréquence 2450 MHz.

Les résultats sont illustrés dans le tableau 1.6 .

Tableau 1.6 : condition d'extraction par micro-onde

Solvant	Puissance (W)	Temps (s)	Rendement mg/g
Eau	100	15	201,9±5,1
		30	215,0±5,5
		60	169,5±6,9
	200	15	192,5±1,3
		30	134,7±2,6
		60	153,0±5,2
	300	15	109,1±12,7
		30	85,7±30,0
		60	37,8±66
Tampon Na Phosphate	100	15	148,9±20
		30	161,5±6,9
		60	1609±8,4
	200	15	170,7±7,5
		30	121,2±24,9
		60	87,5±17,4
	300	15	61,8±25,9
		30	46,8±30,3
		60	53,1±57
Eau/Tampon Na phosphate	100	15	149,1±5,6
		30	165,9±9,3
		60	168,6±12,2
	200	15	143,8±16,9
		30	136,9±1,8
		60	172,9±16,1
	300	15	92,0±8,1
		30	86,9±10,7
		60	44,2±2,2

D'après ces résultats on peut observer que le bon rendement 215,0±5,5 et obtenir avec l'eau à 100W et 30s.



# Chapitre 1 : spiruline et phycocyanine

## 1.8.7.4. Extraction par homogénéisation à haute pression

L' Homogénéisateur GEA NiroSoavi a été utilisé comme système d'homogénéisation à haute pression, le rapport biomasse-solvant est 2/100 pois/ volume. Les résultats et les conditions d'extraction par homogénéisation à haute pression sont illustrés dans le tableau 1.7 suivant :

Tableau 1.7 : condition d'extraction par homogénéisation à haute pression

Solvant	Pression (bar)	Rendement mg/g
Eau	800	218,1±10,1
	1000	224,0±3,3
	1200	252,5±4,1
	1400	149,1±6,1
	1600	224,3±6,4
tampon Na phosphate	800	225,9±0,4
	1000	233,7±5,7
	1200	268,8±6,4
	1400	291,9±6,7
	1600	257,4±7,4
Eau/tampon Na phosphate	800	179,3±1,1
	1000	203,4±6,9
	1200	212,3±9,3
	1400	210,3±1,2
	1600	177,9±5,9

Ces résultats montrent qu'on peut obtenir un très bon rendement 252, 5 mg/g avec ce procédé avec le tampon Na phosphate a 1200 bar.

Selon la comparaison entre ces quatre méthodes vertes sous l'extraction par homogénéisation à haute pression, cette extraction donne un rendement le plus élevés aussi l'extraction par micro-onde donne un bon rendement avec l'eau comme solvant Les méthodes conventionnelle comme la congélation décongélation donne un bon rendement mais ces condition sont exigent mais l'extraction par macération c'est la pire méthode avec un rendement très faible.

## 1.8.8. Application de phycocyanine

La phycocyanine obtenu à partir de *S.platensis* a été largement utilisé comme :

# Chapitre 1 : spiruline et phycocyanine

## 1.8.8.1. Colorants alimentaires

La phycocyanine est un colorant naturel bleu, il a mentionné son utilisation dans des produits alimentaires tels que le chewing-gum, les boissons gazeuses, les boissons alcoolisées, les produits laitiers fermentés, tels que le yaourt [66]. Le seul inconvénient de l'utilisation de ce colorant est la température de stabilité qui ne dépasse pas 64°C, ce qui limite son utilisation dans la préparation de certains produits alimentaires.

## 1.8.8.2. Colorant fluorescent

Les phycobiliprotéines conservent leur couleur pendant le mouvement électrophorétique peut être un avantage supplémentaire pour leur utilisation comme marqueurs protéiques d'intervalle [66], [67].

## 1.8.8.3. Application dans la thérapie photodynamique

La PDT est une méthode qui produit des ROS par absorption et rétention sélectives de substance photosensible dans les tissus tumoraux malins des organismes et par photooxydation de molécules biologiques, entraînant la mort des cellules tumorales.

La C-PC est un matériau photosensible qui peut produire de l'oxygène singulet et d'autres radicaux libres d'oxygène sous excitation d'une longueur d'onde de lumière appropriée [68]. Des chercheurs ont proposé l'utilisation de C-PC dans la tumeur PDT [69] et ils ont confirmé l'effet photosensibilisateur de la sous unité C-PC [70] et son rôle dans la PDT des cellules de cancer du sein [71] et ont montré que ce mécanisme induit la mort des cellules tumorales en améliorant simultanément le système immunitaire et en initiant la voie de transduction du signal apoptotique dans la cellule.

## 1.8.9. Toxicités et surdosages

Il n'existe à ce jour aucun cas de surdose de spiruline documenté dans la littérature scientifique. Des consommateurs de plus de 10 g/jour pendant plusieurs années d'affilé ne rapportent aucuns effets négatifs. En ce qui concerne le risque aigu là non plus aucune donnée ne vient fixer de limite : des consommations anecdotiques de plus de 100 g/jour n'ont semble-t-il eu aucune conséquence particulière [72].

## **Chapitre 2 :**

# **Photosensibilisation et la production de l'oxygène singulet**

### **Chapitre 2 : Photosensibilisation , production de l'oxygène singulet**

#### **2.1. Définitions**

- **La photosensibilisation :** Est un procédé par lequel un changement photochimique ou un processus photophysique a lieu sur une entité (moléculaire) dû à l'absorption initiale d'une radiation par une autre entité (moléculaire) appelée photosensibilisateur .[73]
- **Les Photosensibilisateurs :** Toutes les molécules qui ont la capacité d'absorber la lumière incidente en présence de l'oxygène moléculaire, peuvent générer de l'oxygène singulet .

#### **2.2. Propriétés de photosensibilisateurs**

Il existe plusieurs molécules absorbant les UV – visible, qui ont montré une capacité de générer de l'oxygène singulet. Les photosensibilisateurs doivent présenter les propriétés suivantes:

- 1) Coefficient d'absorption élevé dans la région spectrale de la lumière d'excitation.
- 2) Un état triplet d'énergie appropriée ( $E_T = 95 \text{ kJ/ mol}$  .1) pour permettre un transfert d'énergie efficace vers l'oxygène à l'état fondamental.
- 3) Rendement quantique élevé de l'état du triplet et longue durée de vie de l'état du triplet, car l'efficacité de photosensibilisateur dépend des propriétés photo physiques de son état de triplet excité le plus bas.
- 4) Photostabilité élevée [1].
- 5) la durée de vie de l'état triplet doit être suffisamment longue, pour permettre l'interaction (sensibilisateur-oxygène )

La production de l'oxygène singulet se fait par plusieurs procédés, dans ce chapitre nous nous intéressons à la production photosensibilisante .

### 2.3. Propriétés de l'oxygène singulet

#### 2.3.1. Structure électronique de l'oxygène singulet

Le photosensibilisateur (singulet ou triplet) peut réagir selon deux modes. En présence d'oxygène, il peut réagir par transfert d'énergie pour former de l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) ou par transfert d'électron pour former l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). La formation d'oxygène singulet est favorisée par l'utilisation de photosensibilisateur absorbant dans le domaine du visible (les colorants) et la formation de l'anion superoxyde est favorisée par l'utilisation de photosensibilisateur absorbant dans l'ultraviolet (les phénols ou les amines).

L'oxygène moléculaire a deux états excités singulets de basse altitude. Les configurations électroniques de ces états ne diffèrent que par la structure des orbitales -anti adhérentes [74].

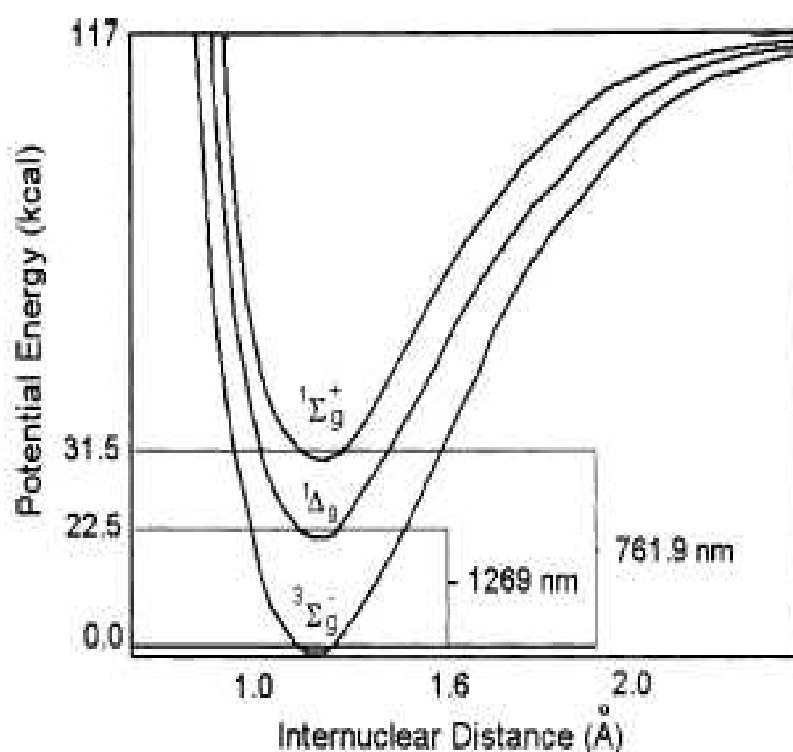


Figure 2.12 : Courbes d'énergie potentielle pour les trois états électroniques bas de l'oxygène moléculaire.

## Chapitre 2 : Photosensibilisation , production de l'oxygène singulet

Dans le premier état excité, les deux spins électroniques sont couplés ce qui abaisse l'énergie de cet état ( $^1 \Sigma_g^+$ ) par rapport au deuxième état excité ( $^1 \Delta_g$ ). Il existe des états excités de l'oxygène d'énergie supérieure mais ces états n'interviennent pas dans la réactivité chimique. Les transitions entre l'état fondamental et les états singulets sont des transitions interdites en ce qui concerne le spin [79].

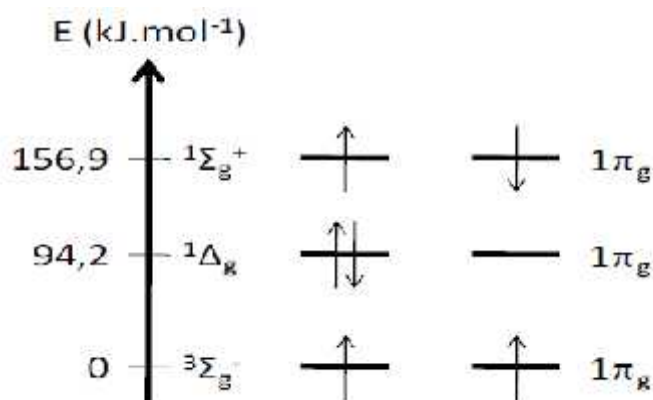


Figure 2.13 : Représentations primitives des états singulets et triplets les plus bas de l'oxygène moléculaire.

### 2.3.2. Désactivation de $^1\text{O}_2$

Une fois que l'oxygène est dans son état excité singulet, il peut être désactivé par d'autres espèces pour revenir à son état fondamental. Cette trempe peut avoir lieu de deux manières principales.

#### 2.3.2.1. Désactivation physique

Dans lequel l'interaction ne conduit qu'à la désactivation de l'oxygène singulet sans consommation d' $\text{O}_2$  ni formation de produit.

#### 2.3.2.2. Désactivation chimique

Où le désactivateur réagit avec l'oxygène singulet pour donner un nouveau produit.

L'oxygène est plus oxydant dans son état excité singulet et donc plus électrophile, réagissant rapidement avec des liaisons carbone / carbone insaturées, des nucléophiles neutres tels que les sulfures et les amines, ainsi qu'avec les anions. Par conséquent, les chimistes organiques ont trouvé une utilité dans l'oxygène singulet comme réactif synthétique polyvalent [75].

## **Chapitre 2 : Photosensibilisation , production de l'oxygène singulet**

L'oxygène singulet peut également réagir avec des oléfines (où l'oxygène singulet est le diénophile) ayant deux substituant allyliques ou plus, provoquant un décalage de double liaison et la formation d'un hydro peroxyde allylique [76].

La formation de dioxétanes est possible via la cycloaddition d'oxygène singulet avec des oléfines riches en électrons . Les dioxétanes, qui sont généralement stables qu'à basse température, subissent une décomposition pour former deux groupes carbonyle [77].

L'oxygène singulet, en raison de sa haute électrophilicité, est capable d'oxyder les phénols, les sulfures et les amines. La réaction de l'oxygène singulet avec le phénol entraîne la formation d'hydroperoxydes qui se déshydratent pour former de la pbenzoquine

L'oxygène singulet peut être généré par transfert d'énergie à partir d'impuretés contenues dans un polymère ou de colorants spécialement ajoutés qui peuvent agir comme photosensibilisateurs. Une fois généré, l'oxygène singulet peut réagir avec le polymère pour former des dioxétanes, des hydroperoxydes et / ou des endoperoxydes, ce qui pourrait entraîner une décomposition supplémentaire et une perte des propriétés du polymère [78].

### **2.3.3. Mécanisme de production de l'oxygène singulet**

La génération photosensibilisée est une méthode simple et contrôlable pour la production de  $^1\text{O}_2$ , elle nécessite que de l'oxygène, de la lumière d'une longueur d'onde, et un photosensibilisateur capable d'absorber et d'utiliser cette énergie pour exciter l'oxygène à son état singulet. L'excitation du sensibilisateur est généralement obtenue via une transition d'un photon ( $h\nu$ ) entre l'état fondamental,  $S_0$ , et un état excité singulet  $S_n$ . La relaxation de l'état  $S_n$  donne l'état de singulet excité le plus bas du sensibilisateur  $S_1$  [1].

Il existe deux type de mécanismes pour que cet état excité réagir :

**Un mécanisme de type I :** Implique un transfert d'électrons entre le sensibilisateur excité et un substrat, produisant des radicaux libres. Ces radicaux peuvent réagir avec l'oxygène pour former une espèce active d'oxygène [1].

**Un mécanisme de type II :** l'oxygène singulet est généré via un processus de transfert d'énergie lors d'une collision du sensibilisateur excité avec de l'oxygène

## Chapitre 2 : Photosensibilisation , production de l'oxygène singulet

triplet. La capacité de génération d'oxygène singulet d'un photosensibilisateur est mesurée par son rendement quantique [1].

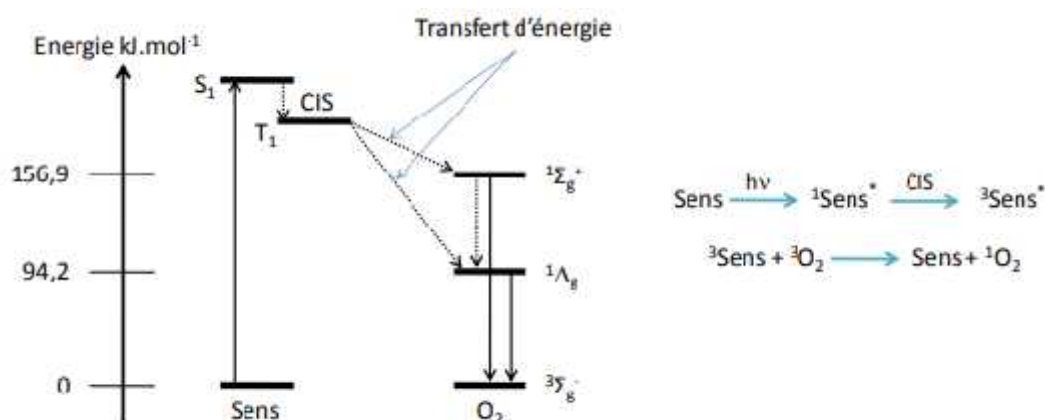


Figure 2.14 : Diagramme simplifié de Perrin-Jablonski pour la production d'oxygène singulet par transfert d'énergie à partir d'un photosensibilisateur et équation de production de l'oxygène singulet [79].

### 2.3.4. Durée de vie de l'oxygène singulet

L'oxygène singulet est une espèce très réactive, mais extrêmement dépendante de son environnement. En phase gazeuse, la durée de vie de l'état <sup>1</sup>Σ<sub>g</sub><sup>+</sup> est de 45 minutes alors que celle de l'état <sup>1</sup>Λ<sub>g</sub> varie entre 7 et 12 secondes. En solution, la durée de vie de l'état <sup>1</sup>Λ<sub>g</sub> est de l'ordre de 10<sup>-12</sup> secondes, tandis qu'elle varie entre 4.10<sup>-6</sup> et 6.10<sup>-2</sup> secondes pour l'état <sup>1</sup>Σ<sub>g</sub><sup>+</sup> [79].

## 2.4. Types de photosensibilisateurs

### 2.4.1. Les photosensibilisateurs naturelles

Il existe des photosensibilisateurs d'origines végétales ou animales, telle que La Phycocyanine, un photosensibilisateur non toxique qui est utilisé en thérapie adjuvant dans la thérapie photodynamique des tumeurs (PDT) [80], la fucoxanthine qui est aussi un photosensibilisateur qui pourrait détruire les cellules cancéreuses via une activité pro-oxydante qui bloque les modèles cellulaires par l'ajout d'antioxydants [81], la furocomarine qui agit soit comme une toxine soit un photosensibilisant [82], il existe aussi des travaux sur les flavonoïdes extraits à partir des racines de *Afromomum Alboviolaceum*, qui sont très bons photosensibilisants. Ils ont confirmé le pouvoir photosensibilisant de flavonoïde avec des tests et réalisées sur les désinfections de l'eau par photosensibilisation, ce travail met en évidence la



## Chapitre 2 : Photosensibilisation , production de l'oxygène singulet

génération de l'oxygène singulet par les substances photosensibilisantes dans la purification de l'eau [83] .

### 2.4.2. Colorants organiques et hydrocarbures aromatiques

Le rose Bengale l'éosine et le bleu de méthylène sont des colorants photosensibilisateurs très efficaces car ils possèdent des états triplés d'énergies proportionner pour la sensibilisation à l'oxygène [84] .

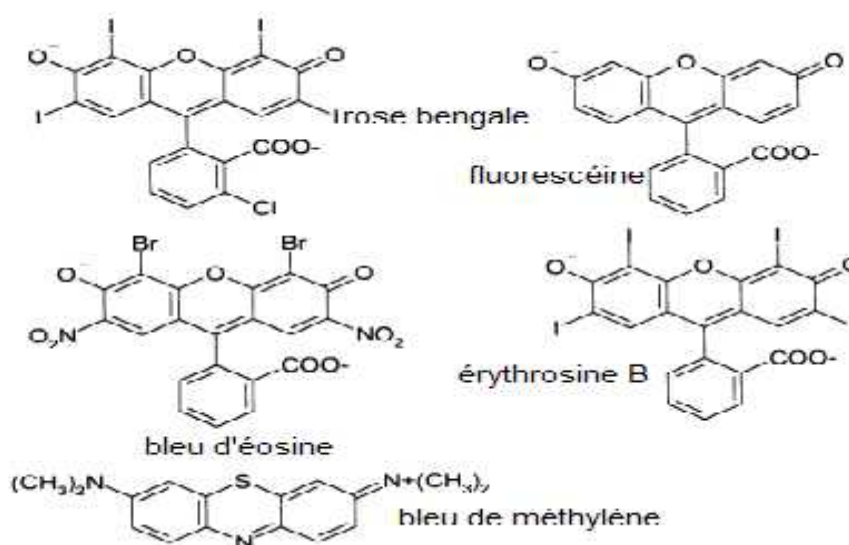


Figure 2. 15 : Quelques photosensibilisateurs organiques courants.

Tableau 2.8 : Quelques exemples de colorants organiques courants et leurs propriétés photophysiques.

Colorant	Energie triplet (Kcal.mol <sup>-1</sup> )
Rose Bengale	42.0
Fluorescéine	47.2
Bleu d'éosine	45.5
Bleu de méthylène	32.0

Les hydrocarbures aromatiques tels que les naphthalènes, les anthracènes et les biphényles ont été étudiés pour leur capacité de photosensibilisation [85].

## **Chapitre 2 : Photosensibilisation , production de l'oxygène singulet**

Les quinones jouent un rôle très important dans les processus biologiques et ces composés ont été étudiés pour leur capacité de photosensibilisation [86].

### **2.4.3. Phtalocyanines et tétrapyrroles apparentés Porphyrines**

L'hématoporphyrine est utilisée dans la production photosensibilisée d'oxygène singulet . Les phtalocyanines diffèrent des porphyrines par la jonction des atomes d'azote avec les unités pyrrole individuelles. La conjugaison étendue, offerte par les anneaux périphériques de benzène, renforce son absorption à des longueurs d'onde plus longues [1] .

### **2.4.4. Complexes de métaux de transition**

Les complexes de métaux de transition du ruthénium (II), par exemple, ont une absorption relativement forte dans les régions UV - vis du spectre[87].

### **2.4.5. Les Semi-conducteurs**

Production d'oxygène singulet à partir de semi-conducteurs photoexcités tels que TiO<sub>2</sub> et ZnO ont reçu peu d'attention par rapport à celle des espèces d'oxygène actif telles que les radicaux hydroxyle et l'anion superoxyde. Ils ont démontré la production d'oxygène singulet photosensibilisé par ces semi-conducteurs [88].

## **2.5. Applications de photosensibilisateurs**

### **2.5.1. Synthèse de produits chimiques fins et traitement des eaux usées**

L'utilisation de l'énergie solaire dans le traitement des eaux usées pourrait être une solution économique à un problème environnemental difficile. Des recherches sur la détoxification et le traitement photosensibilisés des eaux usées industrielles et urbaines utilisant la lumière concentrée directement du soleil sont actuellement en cours au Plataforma Solar de Almeria (PSA, Espagne) [89].

Egalement , les travaux ont commencé au PSA sur le projet «SOLFIN» et au réacteur PROPIS [90] en Allemagne, tous deux consacrés à la synthèse chimique fine photosensibilisée. Par exemple, les travaux du PSA ont démontré la synthèse de 5-hydroxy-5H-furane-2-one à partir de furfural en présence de photosensibilisateurs bleu de méthylène ou rose bengale dans l'éthanol [89].

## **Chapitre 2 : Photosensibilisation , production de l'oxygène singulet**

---

### **2.5.2. L'utilisation de l'oxygène singulet**

#### **2.5.2.1. Stérilisation du sang**

La Croix-Rouge suisse et allemande utilisent le bleu de méthylène comme photosensibilisateur pour la décontamination des unités de plasma fraîchement congelées [91]. Grâce à l'absence de toxicité pour l'homme , le colorant est efficace pour détruire les virus enveloppés extracellulaires.

#### **2.5.2.2. Thérapie photodynamique du cancer (PDT)**

Dans la PDT, la lumière visible, un médicament photosensible (photosensibilisateur) et l'oxygène sont combinés, conduisant à la production d'agents mortels pour inactiver les cellules tumorales. Il est généralement admis que l'oxygène singulet est le principal agent cytotoxique responsable de l'activité photobiologique [92]. La double sélectivité de la PDT provient à la fois de la localisation du sensibilisateur dans la tumeur et de la capacité à limiter l'activation du photosensibilisateur par illumination de la région tumorale uniquement.

Le principe de la photo-thérapie dynamique est basé sur la destruction sélective des cellules tumorales par l'action combinée d'un photosensibilisateur qui est principalement une porphyrine et d'une lumière focalisée de longueur d'onde appropriée (~ 800 nm). Le photosensibilisateur est introduit par voie intraveineuse au sein d'un tissu présentant une tumeur. L'oxygène singulet formé par le photosensibilisateur sous irradiation permet de détruire les cellules cancéreuses [79].

#### **2.5.2.3. Insecticides et herbicides**

Le travail effectué dans la PDT du cancer, les herbicides et les insecticides photodynamiques utilisent les effets toxiques de l'oxygène singulet pour détruire les plantes et les ravageurs indésirables. Les herbicides photodynamiques provoquent l'accumulation indésirable de chlorophylle et d'intermédiaires métaboliques de l'hème les tétrapyrroles, dans les plantes vertes [93]. Les effets insecticides des photosensibilisateurs ont été étudiés par Ben Amor [94] et Rebeiz [95].

### 2.6. Réactions caractéristiques de l'oxygène singlet

L'oxygène singlet permet d'oxygène certains espèces organiques tels que les alcènes, les diènes , quelque hétérocycles ou sulfures , les composés aromatiques . Voici trois principaux types de réactions de l' $^1\text{O}_2$  [79] :

- une cycloaddition [2+2] directe sur une double liaison activée par un donneur d'électron (en général, un hétéroatome), conduisant à la formation de dioxétanes1,2 .

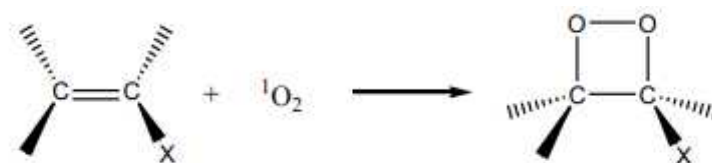


Figure 2.16 : Formation du dioxétane-1,2.

- une addition sur les alcènes possédant un atome d'hydrogène en position allylique, conduisant à la formation d'hydroperoxydes. Cette réaction est appelée réaction « ène » .

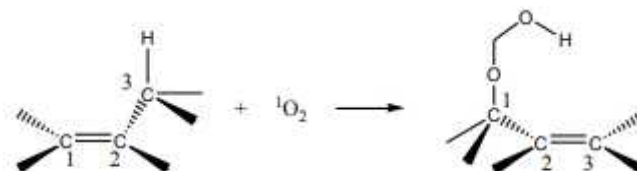


Figure 2.17 : formation d'hydroperoxyde.

- Une cycloaddition [2+4] de type Diels-Alder sur les diènes, conduisant à la formation d'endoperoxydes .

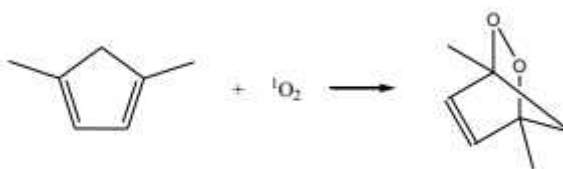


Figure 2.18 : Formation d'endoperoxydes.

### 2.7. Supports pour photosensibilisateurs

Le greffage de photosensibilisateurs sur des supports polymériques ou inorganiques permet de rendre ces photosensibilisateurs insolubles et leur confère de nombreux avantages [79] :

- Séparation aisée du photosensibilisateur des réactifs et des produits en fin de réaction .
- Utilisation de solvants où le photosensibilisateur est peu soluble .
- Application à des réactions gaz/solide
- Augmentation de la stabilité (limitation du photo-blanchiment).

Des photosensibilisateurs ont été greffés sur des supports inorganiques tels que des gels [96] ou nanoparticules de silice [97], sépiolites [98], zéolites[99], nanotubes de carbone[100] ou encore des nanoparticules de dioxyde de titane [101]. Les matériaux polymères sont aussi de bon candidats pour l'immobilisation de photosensibilisateurs qu'ils soient hydrophiles, hydrophobes, amphiphiles, microporeux ou sous forme de microsphères de polymères réticulées. Quelques exemples de substrats polymères sont décrits ci dessous :

- **Polymères hydrophiles** : Hurtgen et al. [102] ont greffé un fullerène (C60) sur des chaînes de polymère bien définies de poly(acétate de vinyle) et de poly(N-vinylpyrrolidone-co-acétate de vinyle) préparées par (cobalt-mediated radical polymerization) afin d'obtenir des matériaux hydrosolubles.
- **Polymères hydrophobes** : Hong et al. [103] ont déposé, sur une surface en cuir du polyuréthane dispersé dans une solution aqueuse dans laquelle un photosensibilisateur (rose Bengale ou de benzophénone) a été ajouté.
- **Copolymères amphiphiles** : L'équipe de Baek [104] a synthétisé par polymérisation (Reversible addition-fragmentation chain-transfer) un copolymère en étoile amphiphile où le photosensibilisateur (porphyrine) est localisé au cœur.
- **Polymères poreux structurés et non structurés** : L'équipe de Nisnevitch [105] a également réalisé des films poreux à partir d'un mélange d'une

## **Chapitre 2 : Photosensibilisation , production de l'oxygène singulet**

solution de polystyrène dans le chloroforme et d'une solution de rose Bengale ou de bleu de méthylène dans le chloroforme .

**Chapitre 3 :**

**Valorisation de pouvoir  
photosensibilisant de la  
phycocyanine greffée sur  
le chitosane**

## **Chapitre 3 : Valorisation de pouvoir photosensibilisante de phycocyanine greffe sur le chitosane**

### **Chapitre 3 : Valorisation de pouvoir photosensibilisante de phycocyanine greffe sur le chitosane**

#### **INTRODUCTION**

Vu les propriétés intéressantes de la phycocyanine, leurs applications restent néanmoins limitées surtout dans le domaine de la dépollution des eaux, car l'ajout de ce photosensibilisateur dans les eaux usées pollue le milieu à cause de sa forte solubilité dans l'eau. Afin de remédier à ce problème, une valorisation de la phycocyanine sur une matrice de polymère devient nécessaire. Dans cette partie nous avons choisie comme matrice un biopolymère «le chitosane ».

#### **3.1. Définition de chitosane**

Le chitosane est un biopolymère et glucosaminoglycane composé de deux sucres courants, la glucosamine et la N-acétylglucosamine, dont la proportion dépend du traitement alcalin. Il est non toxique, inodore, biocompatible et biodégradable.

#### **3.2. La source de le chitosane**

La chitine est couramment trouvée chez les invertébrés, sous forme de coquilles de crustacés ou de cuticules d'insectes, mais également présente dans la grande majorité des champignons, les algues vertes, les parois cellulaires et les levures [106, 107,108]. En général, les coquilles de crustacés sont constituées de 30 à 40% de protéines, de 30 à 50% de carbonate et de phosphate de calcium et de 20 à 30% de chitine, selon J. Kumirska et al. [109], mais ces pourcentages varient selon la source, ou même l'espèce, à partir de laquelle la chitine est isolée.

#### **3.3. Structure de chitosane**

Le chitosane, un produit partiellement désacétylé de chitine, est un copolymère constitué d'unités - (1 4) -2- acétamido-D-glucose et - (1 4) -2-amino-D-glucose, cette dernière étant dépassant généralement 80% [110].



### Chapitre 3 : Valorisation de pouvoir photosensibilisante de phycocyanine greffe sur le chitosane

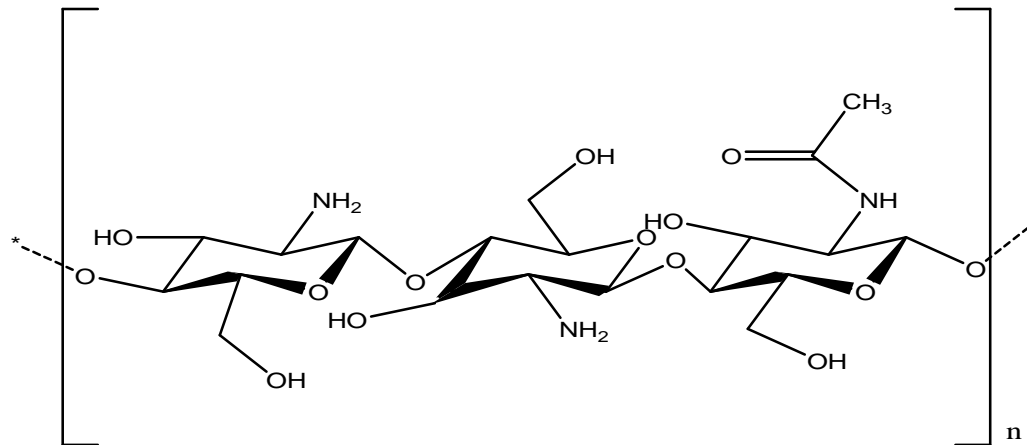


Figure 3.19 : structure de chitosane.

#### 3.4. Mécanisme de synthèse

Le chitosane est obtenu à partir d'une réaction chimique de désacétylation de chitine

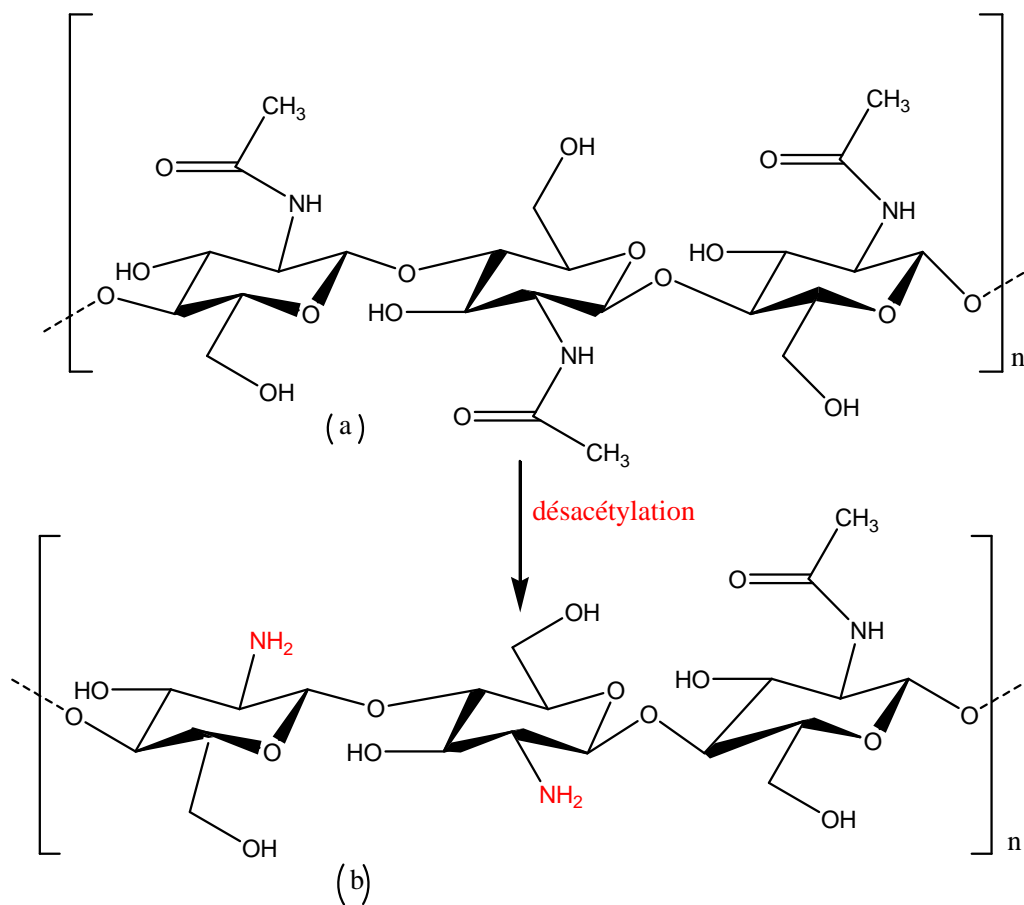


Figure 3.20 : Mécanisme de synthèse.

## **Chapitre 3 : Valorisation de pouvoir photosensibilisante de phycocyanine greffe sur le chitosane**

### **3.5. Propriétés de chitosane**

Les propriétés chimiques et physiques du chitosane dépendent du poids moléculaire (MW), du degré de désacétylation (DDA), du degré de cristallinité, de l'étendue de l'ionisation / du groupe amino libre...

#### **3.5.1. Le poids moléculaire**

Le chitosane est un glucosaminoglycane caractérisé par le nombre d'unités de sucre par molécule de polymère (n), qui définit son poids moléculaire MM [111]. Avec l'augmentation de la MM, la cristallinité de la membrane diminuait. Le processus de désacétylation du chitosane entraîne un changement de MM et selon la source et la procédure de préparation, le poids moléculaire moyen du chitosane peut varier de 50 à 2000 kDa.

#### **3.5.2. Degré de désacétylation (DDA)**

On a démontré que le DDA du chitosane est en corrélation avec sa solubilité en solution acide et la cristallinité de sa membrane. Il est connu que la densité de charge le long de la chaîne augmente avec l'augmentation du DDA, et que la flexibilité de la chaîne des molécules de chitosane peut être manipulée en modifiant le DDA. Le chitosane disponible dans le commerce a un degré de désacétylation allant de 40 à 98%. [112].

#### **3.5.3. La viscosité**

La viscosité de la solution de chitosane augmente avec la concentration et le degré de désacétylation et diminue avec la température. Le chitosane est disponible dans le commerce est une large gamme de viscosité. Il est utilisé comme agent améliorant la viscosité en raison de son poids moléculaire élevé et de sa structure linéaire et non ramifiée. Le chitosane est pseudoplastique car la viscosité diminue en augmentant le taux de cisaillement [113,114].

#### **3.5.4. La solubilité**

Le chitosane est soluble dans les acides faibles mais insoluble au-dessus de pH 7. Il est normalement polydispersé et il a la capacité de se dissoudre dans certains acides

## **Chapitre 3 : Valorisation de pouvoir photosensibilisante de phycocyanine greffe sur le chitosane**

inorganiques et organiques tels que l'acide chlorhydrique, l'acide phosphorique, l'acide lactique, l'acide propionique, l'acide succinique, l'acide acétique, l'acide tartrique, l'acide citrique et l'acide formique après une agitation prolongée. La solubilité dépend du pKa et de la force du solvant acide. L'étude des caractéristiques de dissolution du chitosane a révélé que sa vitesse de dissolution variait selon le type d'acide utilisé. Le chitosane se comporte comme une sphère dans une solution aqueuse d'acide acétique ou comme une bobine aléatoire expansée dans l'urée [115]. L'insolubilité du chitosane est attribuée à la liaison hydrogène intermoléculaire à l'état solide. Le chitosane se dégrade avant de fondre, ce qui est typique pour les polysaccharides avec une liaison hydrogène étendue [116].

### **3.5.5. La cristallinité**

La cristallinité est également un paramètre important car elle permet de contrôler un certain nombre de propriétés comme les propriétés de gonflement dans l'eau [117]. Généralement la cristallinité est déterminée par des mesures de diffraction de rayons X ou par résonance magnétique nucléaire (RMN). En effet, le chitosane est généralement un matériau semi-cristallin [118].

### **3.6. Extraction de chitosane**

Les déchets de l'industrie des crustacés sont une source très importante de chitine. De nombreuses méthodes ont été développées afin de préparer la chitine à partir des exosquelettes. En premier lieu, les coquilles sont broyées à des tailles plus petites et les minéraux, principalement le carbonate de calcium, sont éliminés par extraction avec de l'acide chlorhydrique dilué suivi d'une agitation à température ambiante où le chlorure de calcium est précipité. Les protéines sont éliminées par solubilisation avec de l'hydroxyde de sodium aqueux dilué et dans le procédé, hydrolyse des groupes N-acétyl au hasard dans le squelette du polymère. Une étape de décoloration supplémentaire peut être incorporée pour éliminer la couleur. Le chitosane est obtenu par désacétylation dans 40 à 45% d'hydroxyde de sodium à 120 ° C pendant 1 à 3 heures à l'exclusion de l'oxygène [119].

## Chapitre 3 : Valorisation de pouvoir photosensibilisante de phycocyanine greffe sur le chitosane

### 3.7. Modification chimiques de chitosane

L'**acylation** est plus polyvalente que l'alkylation car elle permet l'introduction de groupements hydrophobes au niveau des résidus amino, alcool ou les deux.

Cette réaction permet d'obtenir un chitosane de Degré d'Acylation supérieur à celui de départ. Pour cela, plusieurs techniques ont été développées, comme des méthodes de réacylation hétérogènes, mais cette réaction est généralement réalisée en milieu homogène. [120].

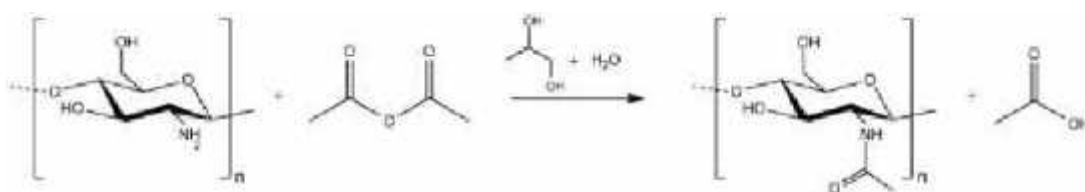


Figure 3.21 : Réaction d'acétylation du chitosane par l'anhydride acétique en milieu hydro-alcoolique.

La **dépolymérisation du chitosane** est effectuée par rupture de la liaison glycosidique. Pour cela, de nombreuses voies sont possibles, parmi lesquelles l'hydrolyse acide (acide chlorhydrique, phosphorique) la dégradation sous ultrasons l'irradiation ou la dépolymérisation enzymatique. [120]

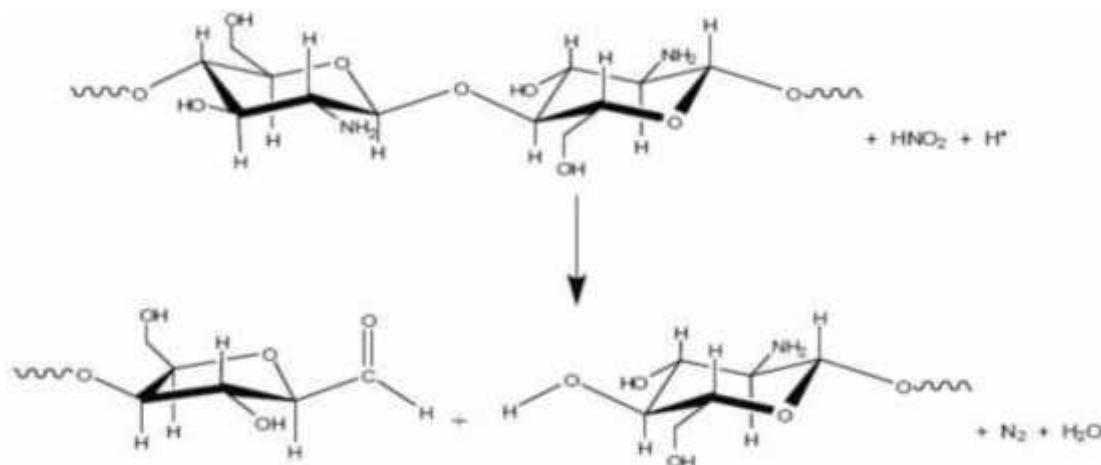


Figure 3.22 : Dépolymérisation du chitosane par désamination nitreuse.

## Chapitre 3 : Valorisation de pouvoir photosensibilisante de phycocyanine greffe sur le chitosane

### 3.8. Mis en forme de la phycocyanine

La fixation de phycocyanine sur une matrice « chitosane » est un nouveau travail donc on a pas assez d'information , mais il existe une recherche qui est proche à notre thème .

#### 3.8.1. Le greffage

Les recherches récentes montrent que la CPC greffé sur NSC (NSC CPC) a été obtenu en faisant réagir la CPC avec NSC via la catalyse de MTGase. En prenant le degré de substitution comme indice, les conditions de réaction ont été optimisées par une expérience à facteur unique [121].

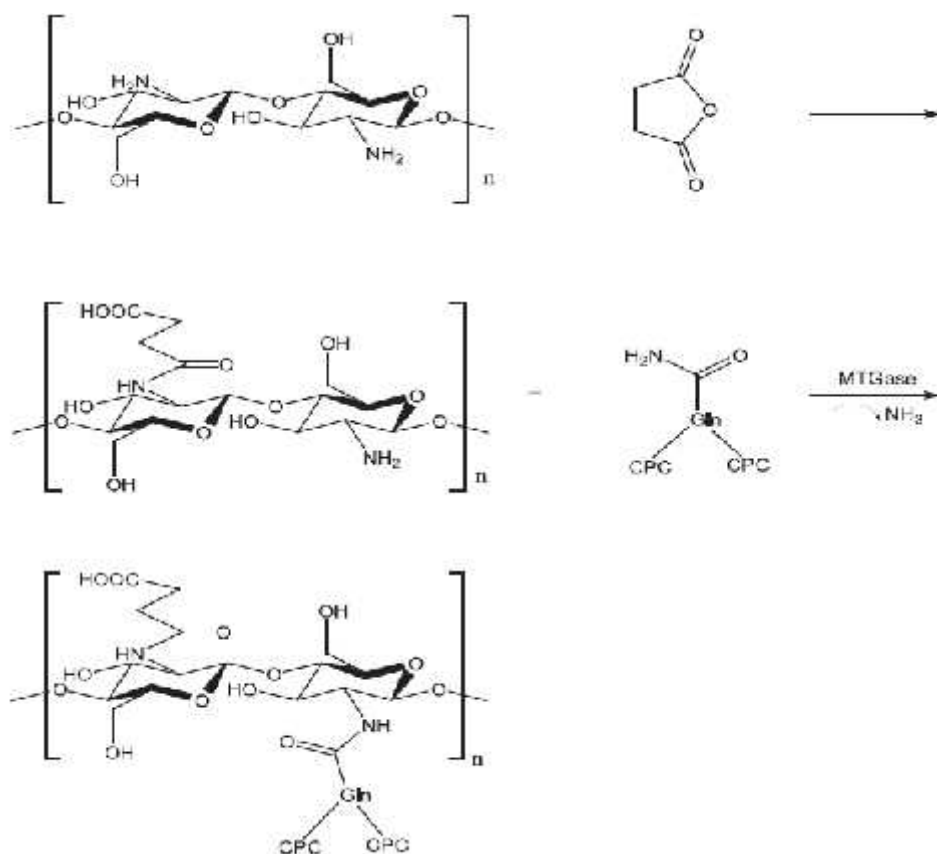


Figure 3.23 : La synthèse du N succinyl chitosane C phycocyanine peptide (NSC CPC).

## **Chapitre 3 : Valorisation de pouvoir photosensibilisante de phycocyanine greffe sur le chitosane**

### **3.8.2. L'encapsulation**

La solution d'alginate a été préparée avec des différentes concentrations en se référant à des recherches antérieures de Yan et al [122]. De la phycocyanine a été ajoutée à l'alginate avec un rapport de 1: 1 (p / p) et ensuite agitée à l'aide d'un agitateur magnétique jusqu'à ce que la solution soit homogène. La suspension homogénéisée a été insérée dans la seringue et injectée dans une solution de CaCl<sub>2</sub> en utilisant une aiguille de calibre et agitée par un agitateur magnétique. Les billes ont été collectées et lavées en utilisant de l'eau distillée pour éliminer les ions Cl. Le CaCl<sub>2</sub> et l'eau distillée ont été collectés pour calculer l'efficacité d'encapsulation et les billes ont été conservées au réfrigérateur [123].

La biomolécule de C-phycocyanine est encapsulée dans une matrice de gel d'alginate de calcium à l'aide d'un dispositif micro-fluidique. La C -phyco-cyanine encapsulée à haut débit monodispersée a été produite avec une taille de gouttelette microencapsulée de 95 à 100 µm et confirmée par microscope électronique à balayage pour sa forme. La méthode microfluidique de microencapsulation est capable de générer une matrice de gel de haute qualité de taille uniforme [124].

### **3.8.3. Les adsorbants**

Deux adsorbants appropriés pour une utilisation dans des lits expansés ont été étudiés pour l'adsorption de C-phycocyanine. Ces adsorbants étaient constitués d'une matrice macroporeuse d'agarose avec un noyau de quartz. L'un des adsorbants, Streamline DEAE® (GE Healthcare) est un échangeur d'anions faible, le groupe fonctionnel étant -O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-N + (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub> NH. L'autre adsorbant, Streamline Q XL® (GE Healthcare) est un échangeur d'anions puissant, avec un ammonium quaternaire comme groupe fonctionnel [125].

## **Conclusion**

La C-PC est un produit naturel important à cause de ces propriétés et ces utilisations dans des différents domaines , elle est utilisée comme un colorant bleu naturel , marqueur fluorescent et agent anti-oxydant , anti-inflamatoire ...

On trouve ce produit en quantité importante dans une cyanobactérie spiruline platensis , pour une bonne extraction on a fait une étude comparative entre différents procédés d'extraction conventionnels et les techniques d'extraction rapide et vertes .

Pour les bons conditions de l'extraction à partir de spiruline, on a choisie l'extaction par micro-onde, une technique repend aux critères de la chimie verte . Elle nous donne un bon rendement de 215,5 mg/g dans une petite duré de 30s en utilisant l'eau comme solvant, non couteux.

On a valorisé la propriété photosensibilisantes de la PC pour faire une application dans le traitement des eaux usées, Pour régler la problématique de la solubilité de PC dans les milieux aqueux et la mise en forme de la phycocyanine, on a utilisé un biopolymère biodégradable tel que le chitosane, qui est un produit naturel extrait à partir des carapaces des crevettes. Enfin, on a réalisé un greffage de la PC sur le chitosane pour la dépollution des eaux usées .

## Plan de travail

À cause de la crise sanitaire de virus covid -19, qui a gravement perturbé le fonctionnement normal des établissements publics dans le monde, nous n'avons pas réalisé la partie expérimentale.

Le plan de travail qui devrait être réaliser est le suivant :

- Extraction de chitosane ;

**Préparation des carapaces (poudre) :** Les carapaces des crustacées sont lavées et conservées pendant deux semaines puis broyées finement.

**Déprotéinisation :** Bouillir les carapaces dans une solution alcaline diluées à chaud (NaOH à 3%) sous agitation pendant 1h à 70 C° (1 :10) (m/V) .

**Déminéralisation :** Excès HCl 1M à T ambiante 15 min, filtrer et rincer à l'eau déminéralisée (eau distillée ). Sécher dans une étuve à 65C° /16h .

**Blanchiment :** Agent oxydant (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou eau de javel) .

**Désacétylation :** -Traitement avec NaOH 50% pendant 3h par chauffage.

- Traitement avec NaOH 50% à 140 C° pendant 4 h .

Dosage de chitosane : 100mg chitosane + 3 mL HCl (0.3M) + 40 mL H<sub>2</sub>O sous agitation 1h .pH <3

On met la solution dans un bécher muni d'un pH mètre et d'un thermomètre , on ajoute HCl, on dose avec de NaOH 0.1M jusqu'à pH =4.5 V =3.4 mL puis jusqu'à pH =8.5 V =8mL

$$DA = \frac{1 - 1.62Q}{1 + 43Q} \quad \text{Avec } Q = \frac{V_{NaOH} * 0.1}{1000 * M_{cs}}$$
$$DAA\% = 100 * \left[ \frac{2.03 * (V_2 - V_1)}{1000 * M_{cs}} \right]$$



$$M_g + 0.0042(V_2 - V_1)$$

- Extraction de phycocyanine :

Dissolution de biomasse dans l'eau , extraction par micro-onde 100W pendant 30s puis centrifuger à 3140g/5min , on prend le surnagant on fait un fractionnement ; précipitation avec solution de sulfate d'ammonium pendant une nuit à 4C° , séparation par une colonne purification par CCM DEAE SAPHAROSE /sephodex

Caractérisation : RMN de proton et carbone , FTIR ,ATR , DRX

Ensuite, on construit des films avec le polymère qui est le chitosane pour greffer le phycocyanine sur ce dernier et appliquer dans le traitement des eaux usées .

## **REFERENCES**

- [1] Maria C. DeRosa, Robert J. Crutchley,(2002) Photosensitized singlet oxygen and its applications, *Coordination Chemistry Reviews* ;233 -234 ;p. 351- 371.
- [2] P. Esser, B. Pohlmann, H.D;(1994) *Synthetic organic photochemistry* ; Scharf, *Angew. Chem*; 106 ,2093.
- [3] W.M. Sharman, G.M. Allen, J.E. VanLier, *Drug Discov. Today* 4;(1999) Photodynamic therapeutics : basic principes and clinical applications; Department of Nuclear Medicine and Radiobiology 507.
- [4] Karkos, P. D., Leong, S. C., Karkos, C. D., et al.; (2011) *Spirulina in Clinical Practice: Evidence-Based Human Applications*; *Evid Based Complement Alternat* .
- [5] Ramirez, D., Ledón, N., González, R.; (2002) Role of histamine in the inhibitory effects of phycocyanin in experimental models of allergic inflammatory response; *Mediators Inflamm* ;11(2) 81-85.
- [6] Diaz Del Castillo, B ; (1928) *La découverte et la conquête du Mexique* ; London:Routledge ; p. 300.
- [7] Abdulqader, G., Barsanti, L., Tredici, M. M. ;(2000)Harvest of *Arthrospiraplatensis* from LakeKossorom (Chad) and its household usage among the Kanembu ; in *Journal ofApplied Phychology*;12 493-498.
- [8] Sébastien Sguer. ; (2008) *spirulinaplatensis* et ses constituants intérêts nutritionnels et activités thérapeutiques ;thèse de Docteur en Pharmacie.
- [9] Fox R.D. ; (1990) *Spiruline, Technique pratique et promesse* ; Aix en provence: Edisud.
- [10] Singh, R. N., & Sharma, Shaishav.; (2012) Development of suitable photobioreactor for algae production e a review; *Renewable and Sustainable Energy Reviews* ;16 2347-2353.
- [11] Ugwu, C. U., Aoyagi, H., & Uchiyama, H.; (2008) Photobioreactors for mass cultivation of algae; *Bioresource Technology*; 99 4021-4028.
- [12] Cuaresma, M., Janseen, M., Vilchez, &Wijffels, R. H.:(2011) Horizontal or Vertical photobioreactrs How to improve microalgae photosynthetic efficiency; *Bioresource Technology*;102 5129-5137.
- [13]Sierra, E., Acien, F. G., Fernandez, J. M., Garcia, C. J., Gonzalez, L., & Molina, E.:(2008) Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae; *Chemical Engineering Journal*; 138 136-147.
- [14] Miron, Asterio Sanchez, Garcia, Marie-Carmen Ceron, Camacho, Francisco Garcia, Grima, Emilio Molina, &Chisti, Yusuf .;(2002) Growth and biochemical

characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: Studies in fed-batch culture; *Enzyme and Microbial Technology*;31(7) 1015-1023.

[15] Hu, Q., Guterman, H., & Richmond.;(1996) A flat inclined modular photobioreactor for outdoor mass cultivation of phototrophs; *Biotechnology and Bioengineering*;51 51-60.

[16] Ugwu, C. U., Ogbonna, J. C., & Tanaka, H.:(2002) Improvement of mass transfer characteristics and productivities of inclined tubular photobioreactors by installation of internal static mixers; *Applied Microbiology Biotechnology*; 58 600-607

[17] Vega-Estrada, J., Montes-Horcasitas, M. C., Domínguez-Bocanegra, A. R., &Canizares-Villanueva, R. O.:(2005) *Haematococcuspluvialis* cultivation in split- ~ cylinder internal-loop airlift photobioreactor under aeration conditions avoiding cell damage; *Applied Microbiology and Biotechnology*; 68 31-35.

[18] Samson, R., &Leduy, A.:(1985) Multistage continuous cultivation of bluegreen alga *Spirulina maxima* in the flat tank photobioreactors; *Chemical Engineering Journal*; 63 105-112.

[19] Hoekema, S., Bijmans, M., Janssen, M., Tramper, J., &Wijffels, R. H.:(2002) A pneumatically agitated flat-panel photobioreactor with gas recirculation: anaerobic photoheterotrophic cultivation of a purple nonsulfurbacterium; *International Journal of Hydrogen Energy*; 27 1331-1338;

[20] Molina, E., Fernandez, J., Acien, F. G., &Chisti, Y.:(2001) Tubular photobioreactor design for algal cultures; *Journal of Biotechnology* ; 92 113-131.

[21] Tredici, M. R., &ChiniZittelli, G.; (1998) Efficiency of sunlight utilization: Tubular versus flat photobioreactors; *Biotechnology and Bioengineering*; 57 187-197.

[22] Lee, Y. K., & Low, C. S.:(1991) Effect of photobioreactor inclination on the biomass productivity of an outdoor algal culture; *Biotechnology and Bioengineering*; 38 995-1000.

[23] Zittelli, G. C., Biondi, N., Rodolfi, L., &Tredici, M. R.:(2013)Photobioreactors for mass production of microalgae,In A. Richmond, & Q. Hu (Eds.), *Handbook of microalgal culture*;Applied phycology and biotechnology; 225-266.

[24]Ogbonda, K. H., Aminigo, R. E., & Abu, G. O.:(2007) Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina*sp;*Bioresource Technology*; 98 2207-2211.

[25] Saeid, A., &Chojnacka, K.:(2015) Toward production of microalgae in photobioreactors under temperate climate; *Chemical Engineering Research and Design*; 93 377-391.

- [26] Fox R.D . ;(1999) Spiruline, Technique pratique et promesse ;Aix en provence: Edisud.
- [27] M GoulamabasseTessineRaza . ;(2018) La spiruline :Activités thérapeutiques son intérêt dans la lutte contre la malnutrition à Madagascar ;Thèse d'état de docteur en pharmacie.
- [28] Babadzhanov A.S., Abdusamatova N., Yusupova F.M., Faizullaeva N., Mezhlumyan L.G. and Malikova M.Kh.:(2004) Chemical composition of *Spirulinaplatensis* cultivated in Uzbekistan ; Chemistry of Natural Compounds; 40 (3) 276-279.
- [29] Ross E., DominyW.:(1990) The nutritional value of dehydrated, blue-green algae (*Spirulinaplatensis*) for poultry; Poultry Science; 69 (5) 794-800.
- [30] Xue C., Hu Y., Saito H., Zhang Z., Li Z., Cai Y., Ou C., Lin H., Imbs A.:(2002) Molecular species composition of glycolipids from *Spirulinaplatensis*; Food Chemistry; 77 9-13.
- [31] Harriman G.R., Smith P.D., Horne M.K., Fox C.H., Koenig S., Lack E.E., Lane H.C.:(1989) Vitamin B12 malabsorption in patients with acquired immunodeficiency syndrome;Archivesof Internal Medicine; 149 (9) 2039-2041.
- [32] Hayashi T. and Hayashi K.:(1996) Calcium Spirulan, an Inhibitor of Enveloped Virus Replication, from a Blue-Green Alga *Spirulinaplatensis*; Journal of Natural Products; 59 83-87.
- [33] Avino P., Carconi P.L., Lepore L., Moauro A.:(2000) Nutritional and environmental properties of algal products used in healthy diet by INAA and ICP-AES; Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry; 244 (1) 247-252.
- [34] Sall M.G, Dankoko B., Badiane M., Ehua E. et Kuakuwin N. ; (1999) Résultatsd'un essai de réhabilitation nutritionnelle avec la Spiruline à Dakar (à propos de 59 cas); 46 (3) 143-146.
- [35] Romay C., Armesto J., Ramirez D., González R., Ledon N. and García I.; (1998) Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoyanin from blue-green algae; Inflammation Research; 47(1) 36-41.
- [36] Romay C., González R., Ledón N., Ramirez D., and Rimbau V. ; (2003) C-Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects; Current Protein and Peptide Science; 4 207-216.
- [37] Manirafasha, E., Ndikubwimana, T., Zeng, X., Lu, Y., & Jing, K.; (2016) Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent; Biochemical Engineering Journal; 109 282–296.

[38] Eriksen, N. T.; (2008) Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine; *Applied Microbiology and Biotechnology*; 80(1) 1–14.

[39] Loic Charpy , Mari José Langlade et Romain Alliod, (2008), La Spiruline peut être un atout pour la santé et le développement en Afrique ; institut de recherche pour le développement Marseille .

[40] Kuddus, M.; Singh, P.; Thomas, G.; Al-Hazimi, A.; (2013) Recent developments in production and biotechnological applications of c-phycocyanin; *BioMed Res* 9–10.

[41] NT Eriksen, (2008) Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine ; *Applied Microbiology and Biotechnology*; vol. 80, no. 1; pp. 1–14 .

[42] Hoseini, S.; Khosravi-Darani, K.; Mozafari, M.; (2013) Nutritional and medical applications of spirulina microalgae; *Mini Rev. Med. Chem* ; 13 1231–1237.

[43] Nuhu, A.A.; (2013) Spirulina (arthrospira): An important source of nutritional and medicinal compounds; *J. Mar. Biol.*

[44] Wang X-Q., Li L-N., Chang W-R. Zhang J-P., Gui L-L., Gua B-J., Liang D-C ;(2001) Structure of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* at 2.2Å resolution: a novel monoclinic crystal form for phycobiliproteins in phycobilisomes. *Acta Crystallographica*; v. 57; p. 784-792.

[45] AN Glazer; (1984) Phycobilisome a macromolecular complex optimized for light energy transfer; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*; *Reviews on Bioenergetics*; vol. 768: no. 1; pp. 29–51.

[46] LJ Yu, YM Li, YL Chen et EX Zhang ; (1999) Études sur la phycobiliprotéine de *Spirulina platensis* pour sa purification et sa capacité à piéger le radical oxygène actif ; *Journal of Oceanography in Taiwan Strait* ; vol. 18 ; non. 2 ; pp. 168-171.

[47] Ratana Chaiklahan , Nattayaporn Chirasuwan Boosya Bunnag ; ( 2012) stability of PC extracted from *Spirulina SP* : Influence of Temperature pH and preservative ; *process bochemistry* ; 47, 659-664 .

[48] D. Ramirez, R. González, N. Merino, S. Rodriguez, and O. Ancheta; (2002) Inhibitory effects of *Spirulina* in zymosan-induced arthritis in mice; *Mediators of Inflammation*; vol. 11, no. 2, pp. 75–79.

[49] C. Romay, R. González, N. Ledón, D. Ramirez, and V. Rimbau; (2003) C-Phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects; *Current Protein and Peptide Science*; vol. 4, no. 3; pp. 207–216.

[50] C. Romay, N. Ledon, and R. Gonzalez; (2000) Effects of phycocyanin extract on prostaglandin E2 levels in mouse ear inflammation test; *Arzneimittel-Forschung*; vol. 50, no. 12; pp. 1106–1109.

[51] BB Vadiraja, NW Gaikwad, et KM Madyastha ; (1998) Effet hépatoprotecteur de la C-phycocyanine: protection du tétrachlorure de carbone et de l'hépatotoxicité induite par la R - (+) - pulegone chez le rat ; *Biochemical and Biophysical Research Communications* ; vol. 249, non. 2, pp. 428-431.

[52] J. Zheng, T. Inoguchi, S. Sasaki et al.; (2013) Phycocyanin and phycocyanobilin from spirulina platensis protect against diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress; *American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology*; vol. 304, no. 2; pp. R110–R120.

[53] Ramirez, D., Ledón, N., González, R.; (2002) Role of histamine in the inhibitory effects of phycocyanin in experimental models of allergic inflammatory response; *Mediators Inflamm* ;11(2) 81-85.

[54] Torres-Duran, P.V., Ferreira-Hermosillo, A., Juarez-Oropeza, M.A.; (2007) Antihyperlipemic and antihypertensive effects of *Spirulina maxima* in an open sample of mexican population; a preliminary report; *Lipids Health Dis* 6 33.

[55] Lima, K., Facchinetti, A., Santos, C.; (1999) Effects of different extracts of *Spirulina* on glycemic parameters in diabetic normal times; III Latin American Symposium of Food Science.

[56] Mittal, A., Suresh Kumar, P.V., Banerjee, S., Rao, A.R., et al.; (1999) Modulatory potential of *Spirulina fusiformis* on carcinogen metabolizing enzymes in Swiss albino mice; *Phytotherapy Research*; 13(2) 111-114.

[57] Lee, J.B., Srisomporn, P., Hayashi, K., et al.; (2001) Effects of structural modification of calcium spirulan, a sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis*, on antiviral activity; *Chem Pharm Bull (Tokyo)*; 49(1) 108-110.

[58] Simsek, N., Karadeniz, A., Kalkan, Y., et al.; (2009) *Spirulina platensis* feeding inhibited the anemia- and leucopenia-induced lead and cadmium in rats; *J Hazard Mater*; 164(2–3) 1304-1309.

[59] Karkos, P. D., Leong, S. C., Karkos, C. D., et al.; (2011) *Spirulina* in Clinical Practice: Evidence-Based Human Applications; Evid Based Complement Alternat .

[60] Chaiklahan, R.; Chirasuwan, N.; Loha, V.; Tia, S.; Bunnag, B.; (2018) Stepwise extraction of high-value chemicals from *arthrospira* (*spirulina*) and an economic feasibility study; *Biotechnol* 20.

[61] Moraes, C.C.; Sala, L.; Cerveira, G.P.; Kalil, S.J.; (2011) C-phycoyanin extraction from *spirulinaplatis* wet biomass, Braz; *J. Chem. Eng* ;28 45–49.

[62] Sarada, R.; Pillai, M.G.; Ravishankar, G.; (1999) Phycocyanin from *spirulina* sp: Influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin; *Process Biochem*; 34 795–801.

[63] Poojary, M.M.; Barba, F.J.; Aliakbarian, B.; Donsi, F.; Pataro, G.; Dias, D.A.; Juliano, P.; (2016) Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds; 14 214.

[64] Mari Carmen Ruiz-Domínguez , Marjorie Jáuregui , Elena Medina , Carolina Jaime and Pedro Cerezal.; (2019) Rapid Green Extractions of C-Phycocyanin from *Arthrospira maxima* for Functional Applications; *applied sciences*.

[65] Soni, B.; Kalavadia, B.; Trivedi, U.; Madamwar, D.; (2006) Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *oscillatoriaquadripunctulata*—isolated from the rocky shores of bet-dwarka, gujarat, india; *Process Biochem*; 41 2017–2023.

[66] R. Prasanna, A. Sood, A. Suresh, S. Nayak, and BD Kaushik; (2007) Potentials and applications of algal pigments in biology and industry; *Acta Botanica Hungarica*; vol. 49; no. 1-2; pp. 131–156

[67] Araoz, R., Lebert, M. and Hader, D. P. ; (1998) Electrophoretic application of phycobiliproteins. –*Electrophoresis*; 19: 215–219.

[68] J.-A. Lui, Y.-Z. Hu, et L.-J. Jiang ; (1997) Action photodynamique des phycobiliprotéines: génération in situ d'espèces réactives de l'oxygène ; *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* ; vol. 1320 ; non. 2 ; pp. 165-174.

[69] NC Morcos, M. Berns, et WL Henry ; (1988) Phycocyanin: l'activation laser, les effets cytotoxiques, et l'absorption dans la plaque d'athérosclérose humaine ; *Lasers in Surgery and Medicine* ; vol. 8, non. 1 ; pp. 10-17.

[70] Y. Tan, B. Huang, YM Ren, et KM Liu ;(2007) étude expérimentale sur l'effet de la sous-unité phycocyanine sur l'infiltration cellulaire et l'effet sensible à la lumière sur les cellules tumorales ; Acta Laser Biology Sinica ; no. 6, pp. 684-688.

[71] B. Li, XM Chu et MH Gao ; (2011) Traitement de la tumeur Hela chez la souris avec la thérapie photodynamique à médiation par la c-phycocyanine et son mécanisme immunitaire sous-tendant l'apoptose ; Journal chinois de médecine et de chirurgie du laser ; vol. 20, non. 1, pp. 1-6, 65.

[72] Falquet J, Hurni JP. ; (2006) Spiruline: aspects nutritionnels ; Flamant vert.

[74] G. Herzberg,(1950) Molecular Spectra and Molecular Structure I:Spectra of Diatomic Molecules, 2nd ed.; VonNostrand; New York.

[75] E.L. Clennan,(2000),photochemistry of organic molecules in isotropic and anisotropic Media , Tetrahedron, 56 ,9151.

[76] H.R. Rawls, P.J. Vansanten, J. Am.(1970),A possible role for singulet oxygen in the initiation of fatty acid autoxidation , Oil Chem. Soc. 47 ,121.

[77] J.W. Hasting, T. Wilson,(1976), Chemical and Biological Generation of Excited States , Photochem. Photobiol. 23,p.461

[78] J.F. Rabek,(1996), Photodegradation of Polymers, Springer-Verlag, New York .

[79] Laurence PERSSONI ;(2013) synthèse de polystyrène greffé Rose Bengale pour l'élaboration de films poreux photo-actifs structurés en nid d'abeille ;thèse de Doctorat en chimie et physico-chimie des polymères .

[80]. CW Zhang, ZM Yin et YPK Ou ;(1995) Exploitation et utilisation de la phycobiliprotéine ; Journal chinois des médicaments marins ; no. 3, pp. 52-53

[81] Laurent PICOT ;(2013) Lutte contre les cancers grace aux pigments de microalgues ; Université d Rochelle .

[82] Marion ROBIN ;(2011) les plantes photosensibilisants ; thèse de Doctorat en pharmacie .

[83] Teddy Makuba SUNDA, Nicolas Kalulu Muzele TABA et Papy Mola MBALA ;(2017) Contribution à l'étude de la désinfection de l'eau par photosensibilisation avec des extraits de plantes ; International Journal of biological and chemical sciences ;11(1): 305-312.

[84] R.W. Redmond, J.N. Gamlin,(1999), A compilation of singlet oxygen yields



from biologically relevant molecules. Photochem. Photobiol. 70,391-445

[85] F. Wilkinson, A.A. Abdel-Shafi, J. Phys ;(1999) Mechanism of Quenching of Triplet States by Molecular Oxygen: Biphenyl Derivatives in Different Solvents ; Chem. Sect. A 103 ,5425

[86] I. Gutierrez, S.G. Bertolotti, M.A. Biasutti, A.T. Soltermann, N.A. Garcí'a, Can. J. Chem. ;(1997) Organic photocatalysts for the oxidation of pollutants and model compounds, 75 ,423.

[87] J.N. Demas, E.W. Harris, R.P. McBride, J. Am. Chem. ;( 1977) Energy transfer from luminescent transition metal complexes to oxygen ;Journal of the American chemical society Soc. 99 ,3547.

[88] Y. Yamamoto, N. Imai, R. Mashima, R. Konaka, M. Inoue, W. Dunlap ;(2000) Methods in Enzymology ; Academic Press, New York ; vol. 319, p. 29.

[89] P. Esser, B. Pohlmann, H.D;(1994) Synthetic organic photochemistry ; Scharf, Angew. Chem; 106 ,2093.

[90] P. Wagler, B. Heller, O. Orther, K.H. Funke, G. ;(1996) Photosensitized singlet oxygen and its applications ; Oehme, Chem.Eng, Technol ; 68 ,823.

[91] W.M. Sharman, G.M. Allen, J.E. VanLier, Drug Discov. Today 4;(1999) Photodynamic therapeutics : basic principles and clinical applications; Department of Nuclear Medicine and Radiobiology 507.

[92] R. Bonnett; (1995) Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy ; Chem. Soc. Rev ; 19.

[93] C.A. Rebeiz, K.N. Reddy, O.B. Nadihalli, J. Velu, J. ;(1990) Organic photochemistry : principles and application ; Photochem.Photobiol; 52 ,1099.

[94] T. Ben Amor, G. Jori;(2000) Sunlight –activated insecticides Insect Biochem; Mol. Biol.; 30 ,915.

- [95] C.A. Rebeiz, L.J. Gut, K. Lee, J.A. Juvik, C.C. Rebeiz, C.E. Bouton, *Crit. Rev.* ;(1995) Photodynamics of porphyrin Insecticides : critical reviews ,*Plant Sci.* 14, 329.
- [96] Latour, V.; Pigot, T.; Mocho, P.; Blanc, S.; Lacombe, S. *Catal. Today* ; (2005) supported photosensitizers as new efficient materials for gas-phase photo oxidation ; 101, (3-4), 359-367.
- [97] Zhang, R. R.; Wu, C. L.; Tong, L. L.; Tang, B.; Xu, Q. H. *Langmuir* ; (2009) Mesoporous silica nanorods intrinsically doped with photosensitizers as a multifunctional drug carrier for combination therapy of cancer ; 25, (17), 10153-10158.
- [98] Arques, A.; Amat, A. M.; Santos-Juanes, L.; Vercher, R. F.; Marin, M. L.; Miranda, M. A. *J. Mol. Catal. A-Chem.* ;(2007) Organic Photocatalysts for the Oxidation of Pollutants and Model Compounds ; 271, (1-2), 221-226.
- [99] Amat, A. M.; Arques, A.; Bossmann, S. H.; Braun, A. M.; Miranda, M. A.; Vercher, R. F. *Catal. Today* ;(2005) Synthesis, loading control and preliminary tests of 2,4,6-triphenylpyrylium supported onto Y-zeolite as solar photocatalyst ;101, (3-4), 383-388.
- [100] Anbarasan, R.; Peng, C. A. *J. Mater. Sci.* ;(2011) Synthesis and crystal structure of the distorted perovskite  $\text{Sr}_{0.97}\text{NbO}_3$  determined by high resolution powder neutron diffraction ; 46, (4), 992-998 .
- [101] Mele, G.; Garcia-Lopez, E.; Palmisano, L.; Dyrda, G.; Slota, R. J. *Phys. Chem. C* (2007) Phthalocyanine-TiO<sub>2</sub> Nanocomposites for Photocatalytic Applications ;111, (17), 6581-6588.
- [102] Hurtgen, M.; Debuigne, A.; Mouithys-Mickalad, A.; Jerome, R.; Jerome, C.; Detrembleur, C. *Chem.-Asian J.* (2010) Synthesis of poly(vinyl alcohol)/C(60) and poly(N-vinylpyrrolidone)/C(60) nanohybrids as potential photodynamic cancer therapy agents ; 5, (4), 859-868.
- [103] Hong, K. H.; Sun, G. J. *Appl. Polym. Sci.* (2010) Synthesis of superabsorbent polymers by irradiation and their applications in agriculture ; 116, (4), 2418-2424.
- [104] Cho, K. Y.; Choi, J. W.; Lee, S. H.; Hwang, S. S.; Baek, K. Y. *Polym. Chem.* (2013) Thermoresponsive amphiphilic star block copolymer photosensitizer: Smart BTEX remover ; 4, (8), 2400-2405.
- [105] Nakonechny, F.; Pinkus, A.; Hai, S.; Yehosha, O.; Nitzan, Y.; Nisnevitch, M. *Photochemistry and Photobiology* (2013) Eradication of Gram-positive and Gram-negative bacteria by photosensitizers immobilized in polystyrene. ; 89, 671-678.
- [106] F. Croisier, C. Jérôme; (2013) Chitosan-based biomaterials for tissue engineering; *Eur. Polym. J* ; 49 ,780–792 .
- [107] R. Berger, T. Christina, A. De Miranda, P. Pessoa, M.A. Barbosa, D. Lima, M. Manuela, E. Pintado, M.P. Saraiva ;(2017) Chitosan produced from Mucorales fungi using agroindustrial by-products and its efficacy to inhibit colleto-trichum species; *Int. J. Biol. Macromol.*

- [108] M. Kannan, M. Nesakumari, K. Rajarathinam;(2010) Production and characterization of mushroom chitosan under solid-state fermentation conditions department of advanced zoology and bio-technology, sri paramakalyani college;Adv. Biol. Res. (Rennes).; 4 ,10–13.
- [109] S. Kumari, P. Rath, A.S. Hari, T.N. Tiwari;(2015) Extraction and characterization of chitin and chitosan from fishery waste by chemical method; Environ. Technol. Innov. 3 ,77–85.
- [110] H.G. Yoon, H.Y. Kim, Y.H. Lim, H.K. Kim, D.H. Shin, B.S. Hong, H.Y. Cho;(2000) Thermostable chitosanase from *Bacillus* sp. strain CK4: Cloning and expression of the gene and characterization of the enzyme; Appl. Environ. Microbiol; 66 ,3727-3734.
- [111] J. Yang, F. Tian, Z. Wang, Q. Wang, Y.J. Zeng, S.Q. Chen ; (2008) Effect of chitosan molecular weight and deacetylation degree on hemostasis ; J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. ; 84 ,131–137.
- [112] P.S. Bakshia, D. Selvakumara, K. Kadirvelub, N.S. Kumara ;(2019) Chitosan as an environment friendly biomaterial \_a review on recent modifications and applications ; International Journal of Biological Macromolecules .
- [113] R.R. Klossner, H.A. Queen, A.J. Coughlin, W.E. Krause.:(2008) Correlation of chitosan's rheological properties and its ability to electrospin; Biomacromolecules ;9, 2947–2953.
- [114] J. Shaji, V. Jain, S. Lodha;(2010) Chitosan: A novel pharmaceutical excipient; Int. J. Pharm.App. Sci. 1 ,11-28.
- [115] R.H. Chen, W.C.Lin, J.H.Lin;(1994) Effects of pH, ionic strength, and type of anion on the rheological properties of chitosan solutions; Acta Polymerica ;45,41-46.
- [116]D. Plackett ;(2011) Biopolymers: New materials for sustainable films and coatings, John Wiley & Sons, New Jersey.
- [117] D. Plackett;(2011) Biopolymers: New materials for sustainable films and coatings, John Wiley & Sons, New Jersey.
- [118] M. Rinaudo;(2006) Chitin and chitosan: Properties and applications ; Prog. Polym. Sci.; vol. 31, no 7, p. 603-63
- [119] P.S. Bakshia, D. Selvakumara, K. Kadirvelub, N.S. Kumara ;(2019) CHITOSAN AS AN ENVIRONMENT FRIENDLY BIOMATERIAL – A REVIEW ON RECENTMODIFICATIONS AND APPLICATIONS ; International Journal of Biological Macromolecules .
- [120] Serpone, N.; Emeline, A. V. ;(2002)suggested terms and definitions in photocatalysis and radiocatalysis ; *Int. J. Photoenergy* ; 4, (3) ; 91-131.

- [121] Wenyan Xu, Yao Xiao, Pengfeng Luo, Lihong Fan ;(2018) Preparation and characterization of C-phycoyanin peptide grafted N-succinyl chitosan by enzyme method International Journal of Biological Macromolecules 113 ,841–848.
- [122] Yan M, Liu B, Jiao X, and Qin S ;(2014) Preparation of phycoyanin microcapsules and its properties ; Food and Bioproducts Processin ; 92, 89–97.
- [123]Hadiyanto ,Meiny Suzery , Deny Setyawan , Dian Majid , Heri Sutanto ;(2017)Encapsulation of phycoyanin-Alginate for hight stability and antioxidant activity ; Earth and Environmental science 55,012030 .
- [ 124] Pradeep, H. N., & Nayak, C. A. ; (2016) Microencapsulation of C-Phycoyanin by Microfluidics ; Recent Advances in Chemical Engineering ; 89–95.
- [125] L.Sala ;F.S.Figueira;G.P.Cerveira;C.C.Moraes ;S.J.Kalil ;(2014) kinetics and adsorption isotherm of C-phycoyanin from spirulina platensis on ion-exchange resins ;Brazilian journal of chemical engineering ;vol.31; no.4.

