

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MER ET DE L'AQUACULTURE

N°...../SNV/2017

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Bensoula Naima et Brahim Nour El Houda

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER

En Hydrobiologie Marine et Continentale

Spécialité: EXPLOITATION ET PROTECTION DES
RESSOURCES MARINES VIVANTES

THÈME

**Effet de la salinité et de l'azote sur la croissance et
la composition biochimique d'une souche
microalgale marine « *Nannochloropsis gaditana* ».**

Soutenu publiquement le 03/07/2017

DEVANT LE JURY

Président	Dr. GHOMARI Sidi Mohamed	MCA	U. Mostaganem
Encadreur	Mme. BENZIDANE Dehiba	MAA	U. Mostaganem
Examineurs	M. BELBACHIR Noredine	MAA	U. Mostaganem

ANNEE 2016 /2017

Remerciements

Avant toute chose, nous tenons à remercier Dieu le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement de **Mme. BENZIDANE Dehiba** : Un remerciement particulier et sincère pour tous vos efforts fournis, vous avez toujours été présent. Que ce travail soit un témoignage de notre gratitude et notre profond respect.

Ma gratitude revient à **Dr. GHOMARI Sidi Mohamed**, d'avoir accepté de présider mon jury. Sensible à l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail, je vous prie de croire en mon éternel respect et ma sincère gratitude.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à **M. BELBACHIR Noredine**, pour sa gentillesse, sa disponibilité, son enseignement et de m'avoir fait l'honneur de participer au jury de cette soutenance.

Nos profonds remerciements vont également à tous nos professeurs pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.

Nos sincères remerciements s'adresse à toutes les personnes qui nous ont aidés et soutenu de près ou de loin principalement au responsable des laboratoires **M. SOUANE A.** et la technicienne du laboratoire de Biochimie « 2 » **Mme. MOKHTARIA.**

Dédicace

Je dédie ce mémoire de fin d'étude,

A ma mère

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour ma formation.

A Mon père

Mon exemple éternel que dieu te garde dans son vaste paradis.

A Mes chères sœurs et mon frère, sans vos encouragements ce travail n'aurait vu le jour.

A tous les membres de ma famille

A ma binôme Brahim Hour el houda et mes chères amies, Asmaa, Sarah, nourhane, Salima je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs sur qui je peux compter.

Je dédie ce travail pour vous en espérant la réussite et le succès.

NAIMA

Dédicace

Je dédie ce modeste travail...

A Mes parents :

Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

A Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

A Mes frères et sœurs Aymen, Adem, Ilyas, Kawter, Rajaa et ma ma cousine Hafssa, qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

A Mon fiancé Khir eddine pour sont soutien.

A mon binôme Naïma Et tous mes amis Asma, Nourhana, Salima, Sarah

NOUR EL HOUDA

Résumé

Les microalgues sont une source importante en biomasse, ce sont des microorganismes photosynthétiques qui attirent l'attention des scientifiques et des industriels en raison de leurs nombreuses potentialités. La principale concerne la production des métabolites d'intérêt thérapeutique ou industriel tels les acides gras polyinsaturés à grande chaîne (AGPI), les pigments, les polysaccharides, les vitamines. Mais les microalgues peuvent aussi être utilisées pour produire de l'énergie sans dégagement de gaz à effet de serre (production de biodiesel)

Le but de ce travail était d'évaluer l'influence de la culture en deux étapes sur la productivité en biomasse et en lipides chez la souche de microalgues *Nannochloropsis gaditana*. La première étape consistait à favoriser une productivité maximale de biomasse via une culture dans un milieu de culture Guillard f/2. La seconde à permettre une accumulation maximale en lipide via un stress osmotique (NaCl) et par carence en azote.

Le suivi de la croissance a été effectué par mesure de la densité optique au spectrophotomètre et par dénombrement des cellules à l'aide de la cellule de Malassez. Des dosages du taux de chlorophylle « a » et de la teneur en lipide ont été effectués.

En regard de nos résultats, on peut conclure que les conditions de carence en azote sont en effet efficaces pour stimuler la production de lipides. Nous avons aussi constaté que l'augmentation soudaine du taux de salinité (choc osmotique) favorise également la production de lipides.

Mots clé :

Microalgue, biodiesel, *Nannochloropsis gaditana*, azote, choc osmotique.

SOMMAIRE

	Page
Liste de figure	
Liste du tableau	
Liste des abréviations	
I/ Introduction.....	1
II/ Synthèse bibliographique.....	3
1. Généralités sur les microalgues.....	3
1.1. Définition et caractéristiques.....	3
1.2. Mode de reproduction	4
1.2.1. Reproduction asexuée	4
1.2.2. Reproduction sexuée.....	4
1.3. Mode de culture.....	4
1.3.1. Culture batch.....	4
1.3.2. Culture continu.....	5
1.4. La photosynthèse et pigments	6
1.4.1. Chlorophylles.....	6
1.4.2. Caroténoïdes.....	6
1.5. Mécanismes de lipogenèse chez les microalgues	7
2. Facteurs influents sur la croissance des microalgues	8
2.1. Lumière.....	8
2.2. Température.....	9
2.3. pH.....	9
2.4. La salinité.....	9
2.5. Les besoins nutritifs.....	9
2.5.1. Carbone.....	9
2.5.2. Azote.....	10
2.5.3. Phosphore.....	10
2.5.4. Métaux traces et vitamine.....	10
3. Les facteurs permettant d'augmenter la synthèse lipidique des	

microalgues	10
4. Applications des microalgues	11
4.1. Domaine alimentaire.....	11
4.2. Domaine pharmaceutique	12
4.3. Domaine cosmétique	12
4.4. Domaine énergétique	12
4.4.1. Production de bio-méthane	12
4.4.2. Production de biocarburant	12
4.5. Domaine environnemental	13
5. Généralité sur l'espèce étudié <i>Nannochloropsis sp</i>.....	13
5.1. Définition.....	13
5.2. Structure.....	14
5.3. La paroi	14
III/ Matériel et méthode.....	15
1. Matériel biologique.....	15
2. Préparation la chambre de culture	15
3. Milieu de culture.....	15
3.1. Echantillonnage de l'eau de mer.....	15
3.2. Préparation de l'eau de mer	15
3.3. Préparation du milieu Guillard f/2.....	16
4. Conditions de travail	17
5. Préparation de la culture mère	18
6. Influence de la salinité et de la carence en azote.....	19
7. Suivie de la croissance cellulaire	20
7.1. La densité optique	20
7.2. Le comptage des cellules (Malassez)	20
7.3. Dosage des pigments	21
7.4. Quantification des lipides	22
8. Analyse des résultats.....	24
IV/ Résultats	25
1. La morphologie de <i>Nannochloropsis gaditana</i>.....	25
2. Etude de la carence en azote à différentes salinités	25

2.1. Carence en azote a 15% de NaCl.....	25
2.2. La coloration de la culture.....	25
2.2.1. Dénombrement des cellules.....	27
2.2.2. Densité optique.....	27
2.2.3. Concentration en chlorophylle « a ».....	28
2.3. Carence en azote a 34,6 % de NaCl.....	29
2.3.1. Dénombrement des cellules	29
2.3.2. Densité optique.....	29
2.3.3. Concentration en chlorophylle « a ».....	30
2.4. Carence en azote a 55 % de NaCl.....	31
2.4.1. Dénombrement des cellules.....	31
2.4.2. Densité optique.....	31
2.4.3. Concentration en chlorophylle« a ».....	32
3. La teneur en lipide.....	33
V/ Discussion.....	34
VI/ Conclusion.....	36
VII/ Références Bibliographiques.....	37

Liste des figures

	Page
Figure 1. Différentes formes de microalgues.....	3
Figure 2. Structure d'une algue verte unicellulaire (Chlorelle).....	3
Figure 3. Mode de reproduction asexuée et sexuée.....	4
Figure 4. Courbe de croissance théorique de microalgues (Richmond, 2004).....	5
Figure 5. Photosynthèse chez les microalgues.....	7
Figure 6. Activité photosynthétique en fonction de l'intensité lumineuse (Masojidek <i>et al.</i> , 2004).....	8
Figure 7. <i>Nannochloropsis gaditana</i>	13
Figure 8. La chambre de culture.....	15
Figure 9. La plage de salamandre.....	16
Figure 10. Autoclavage.....	17
Figure 11. Les conditions de travail avec bac Benzen.....	18
Figure 12. composants de milieu de culture Guillard f/2.....	18
Figure 13. Préparation de la culture mer (pré-culture).....	18
Figure 14. Spectrophotomètre.....	20
Figure 15. Cellule de Malassez.....	20
Figure 16. Vue d'une coupe de la gravure d'une cellule de Malassez.....	21
Figure 17. Centrifugeuse.....	21
Figure 18. Les étapes de l'extraction de la chlorophylle « a ».....	22
Figure 19. Les étapes de l'extraction des lipides	23
Figure 20. La pesé des ballons avant et après les lipides par la balance a précision.....	23
Figure 21. Rotavapor.....	24
Figure 22. Observation microscopique des cellules de <i>Nannochloropsis gaditana</i>	25
Figure 23. Effet de la carence en azote à 15%, 34.6% et 55% de NaCl sur la coloration de la culture.....	26
Figure 24. Effet de la carence en azote à 15% de NaCl sur le nombre de cellule de <i>Nannochloropsis gaditana</i>	27

Figure 25 .Effet de la carence en azote à 15% de NaCl sur la densité de <i>Nannocloropsis gaditana</i>	28
Figure 26. Effet de la carence en azote à 15% de NaCl sur le taux de chlorophylle « a » chez <i>Nannocloropsis gaditana</i>	28
Figure 27. Effet de la carence en azote à 34.6% de NaCl sur le nombre de cellule de <i>Nannocloropsis gaditana</i>	29
Figure 28. Effet de la carence en azote à 34.6% de NaCl sur la densité de <i>Nannocloropsis gaditana</i>	30
Figure 29. Effet de la carence en azote à 34.6% de NaCl sur le taux de chlorophylle « a » chez <i>Nannocloropsis gaditana</i>	30
Figure 30. Effet de la carence en azote à 55% de NaCl sur le nombre de cellule de <i>Nannocloropsis gaditana</i>	31
Figure 31.Effet de la carence en azote à 55% de NaCl sur la densité de <i>Nannocloropsis gaditana</i>	32
Figure 32. Effet de la carence en azote à 55% de NaCl sur le taux de chlorophylle « a » chez <i>Nannocloropsis gaditana</i>	32
Figure 33. Effet de la salinité sur le taux de lipide chez <i>Nannocloropsis gaditana</i>	33

Liste des tableaux

	Page
Tableau 1. Composition du milieu de culture de Guillard and Ryther (1963).....	17
Tableau 2. Les concentrations en azote et en sel pour chaque expérience.....	19

Liste des abréviations

% : Pour cent

~ : Micro

~g/ml : Micro gramme par millilitre

AGPT : Acide gras poly insaturé

C° : Degré Celsius

cm : Centimètre

CoCl₂ : Chlorure de cobalt

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

FeCl₃ : Chlorure de fer III

g : Gramme

g/l : Gramme par litre

h : Heure

J : Jour

M : Mole

Min : Minute

ml : Millilitre

Mm : Millimètre

MnCl₂ : Manganese II chloride tetrahydrate

N. gaditana : *Nannochloropsis gaditana*

Na₂MoO₄ : Molybdate de sodium

NaCl : Chlorure de sodium

NaH₂PO₄ : Phosphate de Mono sodium

NaNO₃ : Nitrate de sodium

nm : Nanomètre

Tpm : Toure par minute

W : Wat

ZnSO₄ : Le sulfate de zinc

Introduction

Introduction

Actuellement, le problème du réchauffement climatique ainsi que les craintes de l'épuisement des ressources pétrolières sont des préoccupations majeures mondiales. Le changement climatique est en partie attribué à l'accumulation des gaz à effet de serre due principalement aux émissions de gaz comme le gaz carbonique (CO₂), associées à l'utilisation des combustibles fossiles qui représentent aujourd'hui 88% de la consommation énergétique mondiale (Rodolfi *et al.*, 2009).

Face à cet avenir annoncé et à la dépendance de la société actuelle aux combustibles fossiles, des efforts de recherches ont été lancés dans le domaine des énergies renouvelables afin notamment de développer des biocarburants alternatifs et renouvelables ayant le potentiel de remplacer tout ou partie les combustibles fossiles. Initialement, il a été envisagé de produire des biocombustibles (bioéthanol et dérivés chimiques des huiles) à partir de ressources agricoles. Toutefois, l'application au domaine de l'énergie amène à une production massive au détriment de l'alimentation humaine. Ceci a mené à lancer des recherches pour développer des carburants dits de deuxième génération (biomasse ligno-cellulosique) et de troisième génération faisant appel à l'usage des microalgues.

Les microalgues sont des microorganismes photosynthétiques qui attirent l'attention des scientifiques et des industriels en raison de leurs nombreuses potentialités. La principale concerne la production des métabolites d'intérêt thérapeutique ou industriel tels les acides gras polyinsaturés à grande chaîne (AGPI), les pigments, les polysaccharides, les vitamines ou divers composés biologiquement actifs. Mais les microalgues peuvent aussi être utilisées pour la protection de l'environnement en utilisant leur capacité à fixer le dioxyde de carbone et certains métaux lourds lors de leur croissance (traitement des eaux usées, réduction des gaz à effet de serre) et à produire de l'énergie sans dégagement de gaz à effet de serre (production de biofuel) (Benzidane *et al.*, 2017).

Pour croître, les microalgues ont de nombreux besoins, les facteurs physiques les plus importants sont une source d'énergie, généralement la lumière et une température optimale. Et les facteurs chimiques sont la concentration disponible en dioxyde de carbone et un apport en macronutriment (azote et phosphate) et en oligo-éléments (Wolfgang, 1994). Les microalgues ont la capacité de pouvoir réagir à un changement de leur environnement en modifiant leurs voies métaboliques. En effet, des conditions de carence en azote sont connues pour stimuler la

synthèse de lipides (Cadoret et Bernard, 2008). Ces conditions de carence ne doivent toutefois pas être maintenues trop longtemps puisqu'elles peuvent éventuellement entraîner une consommation des lipides synthétisés.

Notre travail a donc pour objectif d'optimiser la composition du milieu de culture en variant les concentrations en azote à différentes salinités, dans le but de produire d'importante quantité de microalgues et donc de métabolites, plus particulièrement les lipides. Pour ce faire, nous avons tout d'abord déterminé les meilleures conditions afin de favoriser la productivité en biomasse. Ensuite, nous avons mis en place un système de culture en deux étapes: une première étape pour favoriser la croissance de la biomasse algale, afin d'avoir une bonne concentration en cellule ; et une seconde étape consistant à stimuler la production de lipides, via le changement de la composition en azote et en NaCl, en induisant un stress aux cellules algales.

Synthèse
bibliographique

II/ Synthèse bibliographique

2. Généralités sur les microalgues

2.1. Définition et caractéristiques

Les microalgues sont des organismes microscopiques unicellulaires. On utilise le terme «micro» car la taille d'une microalgue varie de quelques micromètres à une centaine de micromètres. Pour les étudier, il est nécessaire de les observer au microscope optique ou au microscope électronique, ce qui permet de voir plus de détails, en particulier relatifs à leur morphologie (Figure 1). D'un point de vue taxonomique, les microalgues appartiennent à différentes familles qui ont chacune leurs propres caractéristiques, mais elles ont aussi des points communs en particulier dans leur ultra structure et leur métabolisme.

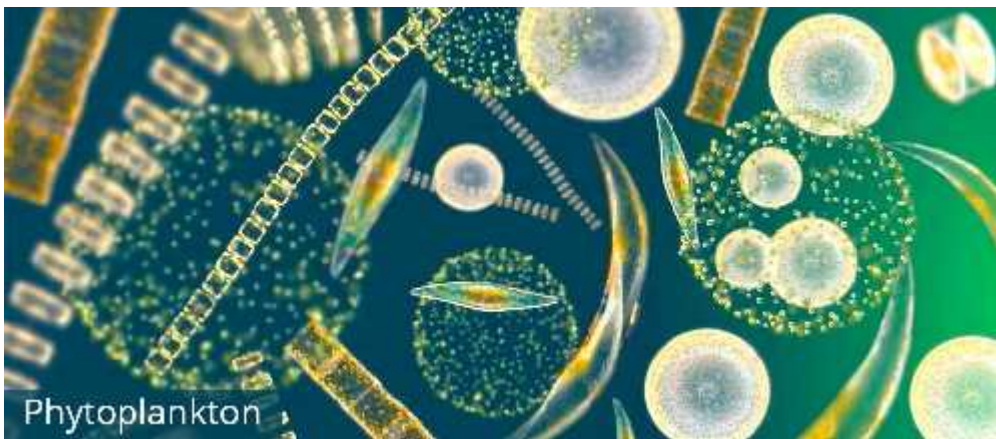


Figure 1 : Différentes formes de microalgues

Une microalgue est un organisme photosynthétique unicellulaire délimitée par une membrane plasmique, qui contient au sein de son cytoplasme de nombreux organites nécessaires à son fonctionnement et à son métabolisme : chloroplastes, amyloplastes, oleoplastes, mitochondries et son noyau entouré de son enveloppe (KnuKey, 1998) (Figure 2).

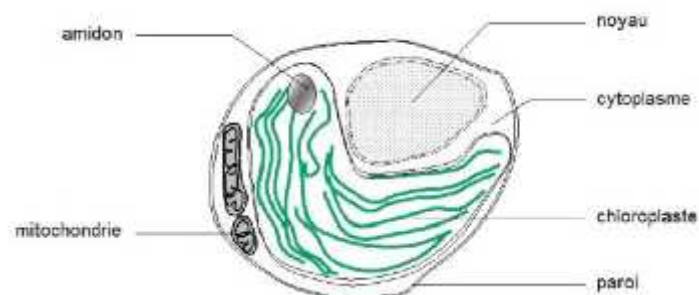


Figure 2. Structure d'une algue verte unicellulaire (Chlorelle)

2.2. Modes de reproduction

2.2.1. Reproduction asexuée

La prolifération des microalgues s'effectue principalement par reproduction asexuée ou multiplication végétative : une cellule mère se divise par mitose rapidement et activement, si les conditions physico-chimiques et nutritives sont favorables en deux cellules filles génétiquement identiques.

1.2.2 Reproduction sexuée

Dans la reproduction sexuée, il y a fusion de gamètes male et femelle pour produire un zygote diploïde (Taleb, 2015) (Figure 3).

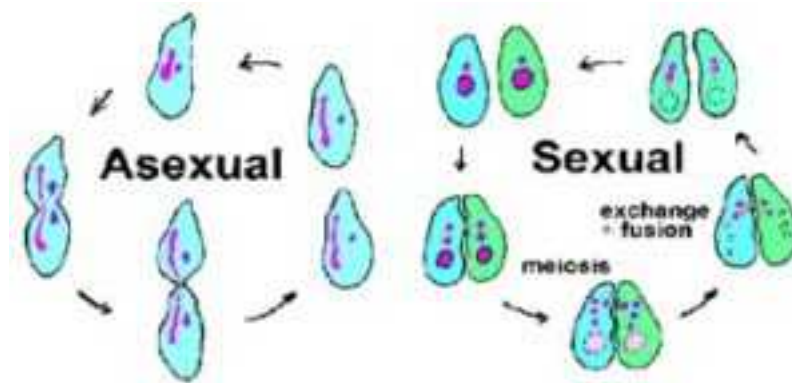


Figure 3. Mode de reproduction asexuée et sexuée.

1.3. Mode de culture

1.3.1. Culture batch

La biomasse et les nutriments sont incorporés au début et aucun ajout n'est effectué par la suite. Dans un tel cas, la croissance de la biomasse est donc ralentie lorsqu'un des éléments essentiels pour la division cellulaire n'est plus présent en quantité suffisante pour soutenir le métabolisme. Cette méthode de culture est particulièrement utile pour l'étude des conditions limitantes pour la croissance cellulaire. En effet, lorsqu'il n'y a aucun ajout de nutriments, l'évolution théorique de la croissance se fait selon cinq phases représentées par la courbe de la (Figure 4). Il s'agit des phases de latence (1), d'accélération (2), de croissance exponentielle (3), stationnaire (4) et de décroissance (5). Ces phases se succèdent à mesure que les nutriments du milieu sont consommés.

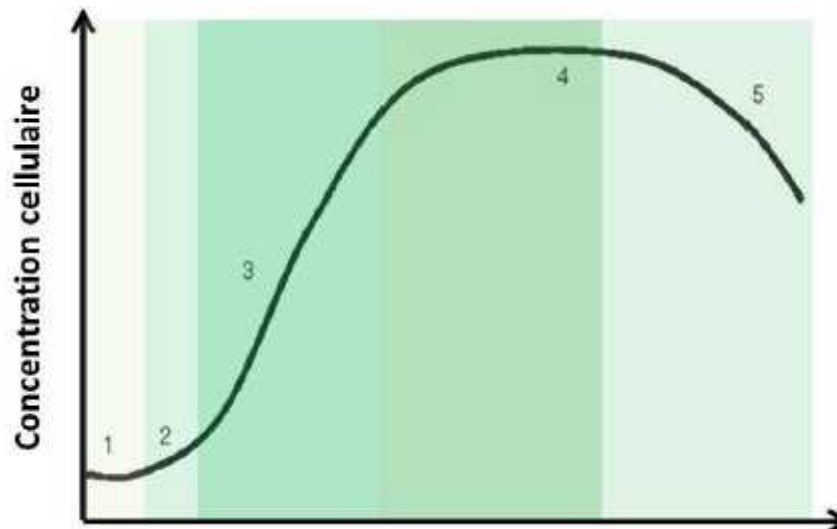


Figure 4: Courbe de croissance théorique de microalgues (Richmond, 2004)

Phase de latence (1)

Les cellules ont besoin d'un certain temps d'acclimatation au nouvel environnement (Ifremer, 2007).

Phase d'accélération (2)

Les cellules ont réussi à accumuler suffisamment de composés intracellulaires pour débiter la croissance par reproduction végétative (Richmond, 2004).

Phase de croissance exponentielle (3)

La croissance est exponentielle et est maintenue constante jusqu'à ce que la composition du milieu ne soit plus optimale (Richmond, 2004).

Phase stationnaire (4)

Un des éléments du milieu devient limitant. Les quantités de cellules qui se divisent et qui meurent sont égales, ce qui produit un plateau de croissance. Les lipides et les glucides peuvent continuer à s'accumuler dans cette phase (Ifremer, 2007).

Phase de décroissance (5)

La plupart des cellules ont épuisé leurs réserves intracellulaires de composants et elles n'ont plus suffisamment d'énergie à leur disposition pour poursuivre la maintenance cellulaire et meurent (Richmond, 2004).

1.3.2. Culture continu

Le mode continu quant à lui, correspond à un mode où la récolte se fait en continu sans arrêt (Taleb, 2015) Le principe repose sur l'application d'un flux entrant, contenant les éléments nutritifs, à un système de culture de volume constant contenant les microalgues. Par

conséquent, le flux d'entrée impose au système un flux sortant de même débit correspondant à la production en biomasse algale. Le but de la culture en continu est de maintenir la concentration cellulaire stable (Taleb, 2015).

1.4. La photosynthèse et pigments

La photosynthèse peut être définie simplement comme l'ensemble des réactions qui utilisent l'énergie lumineuse pour assurer la synthèse d'oses à partir de dioxyde de carbone et d'eau. La photosynthèse se déroule dans les chloroplastes et fait intervenir deux séries de réactions: les réactions photochimiques correspondant à la phase claire durant laquelle la scission de molécules d'eau libère du dioxygène (O_2) et le cycle de Calvin correspondant à la phase sombre durant laquelle les premiers oses sont synthétisés (Figure 5).

1.4.1. Chlorophylles

Les chlorophylles sont des molécules à structure cyclique, comportant un atome central de magnésium et quatre cycles pyrroles, d'où leur appellation de molécules tétrapyrroliques ou chaque cycle pyrrole est formé de quatre atomes de carbone et d'un atome d'azote. Elles jouent un rôle de premier plan dans la photosynthèse. La plupart des chlorophylles, tant en termes de quantité que de diversité structurale, servent à collecter la lumière (Ritchie, 2006).

1.4.2. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des polyènes, c'est-à-dire qu'ils comportent un arrangement linéaire de doubles liaisons conjuguées. Présent chez tous les organismes effectuant la photosynthèse oxygénique, le carotène est le caroténoïde le plus ubiquitaire, alors que d'autres caroténoïdes comportent des substituants variés (notamment des groupements hydroxyles (OH)), la fonction essentielle des caroténoïdes est d'agir à titre d'agents protecteurs, empêchant la formation dans les thylakoïdes des espèces réactives de l'oxygène. Notamment, l'oxygène singulet est très réactif et peut causer d'importants dommages à l'organisme (Strickland and Parsons, 1968).

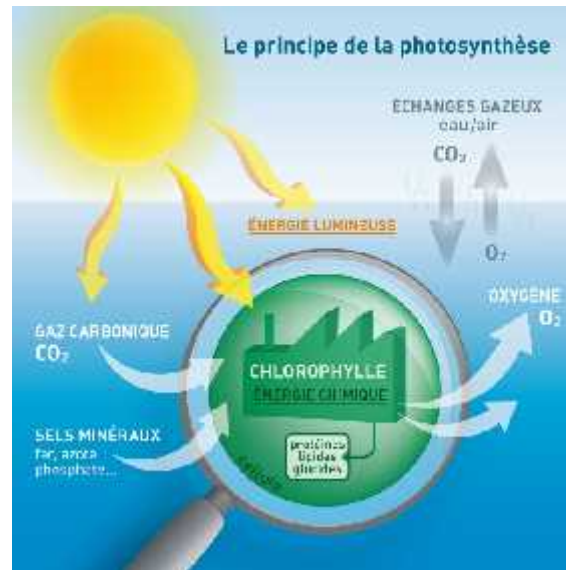


Figure 5. Photosynthèse chez les microalgues

1.5. Mécanismes de lipogénèse chez les microalgues

La biosynthèse des acides gras et des lipides (*Lipogénèse*) répond à deux impératifs dans la cellule: Fourniture des acides gras nécessaires à la synthèse des lipides de structure et mise en réserve de l'énergie. Lorsque les aliments sont trop riches et excèdent les besoins de l'organisme, les lipides sont stockés dans les tissus adipeux. La synthèse des acides gras est entièrement cytosolique alors que leur dégradation par β -oxydation est intra-mitochondriale. Toute biosynthèse comme la synthèse des lipides nécessite :

- De l'énergie apportée par l'ATP.
- Du pouvoir réducteur, fourni sous forme de $NADPH, H^+$ provenant essentiellement du fonctionnement de la voie des pentoses phosphates.

Des précurseurs, le seul précurseur de la synthèse des acides gras est l'acetyl-CoA. L'acetyl-CoA provient de:

- La β -oxydation des acides gras (intra-mitochondriale),
- De l'oxydation du pyruvate (mitochondriale),
- De la dégradation oxydative de l'acide amine dites céto-gènes.

L'acétyl-CoA, quelle que soit son origine, est formé dans la mitochondrie. Pour servir de précurseur à la synthèse des acides gras, il doit être transporté de la matrice mitochondriale dans le cytosol. Seul le radical acétyle est transporté à travers la membrane interne par le système citrate.

2. Facteurs influents sur la croissance des microalgues

Pour croître, les microalgues ont de nombreux besoins, les facteurs physiques les plus importants sont une source d'énergie, généralement la lumière et une température optimale. Et les facteurs chimiques sont la concentration disponible en dioxyde de carbone et un apport en macronutriment et en oligo-éléments (Taleb, 2015).

2.1. Lumière

La lumière est le facteur le plus important pour la croissance photosynthétique des algues. Elle a un effet sur la composition cellulaire des microalgues (photoadaptation ou photoacclimatation) (Hu, 2004). L'énergie radiative ne s'accumule pas, c'est pour cela que la lumière doit être fournie en permanence et doit être considérée comme un substrat (Grima *et al.*, 1996; and Miron *et al.*, 2000).

Le taux de photosynthèse (ou activité photosynthétique) dépend linéairement de l'intensité lumineuse ; avec l'augmentation de l'intensité lumineuse, l'activité de la photosynthèse augmente jusqu'à atteindre un plateau. Ce phénomène est la photo-limitation. Sous de plus fortes intensités lumineuses, l'activité de la photosynthèse diminue, ce phénomène est appelé la photo-inhibition (Par contre, lors de culture à de grandes concentrations cellulaires, la zone «Photo-inhibée» est très proche de la zone noire, il est impossible de savoir quelles cellules sont photo-inhibées et quelles cellules sont photo-limitées (Grima *et al.*, 1996). Un bon mélange de la culture permet dans ce cas de réduire le nombre de cellules photo-inhibées et photo-limitées (Figure 6).

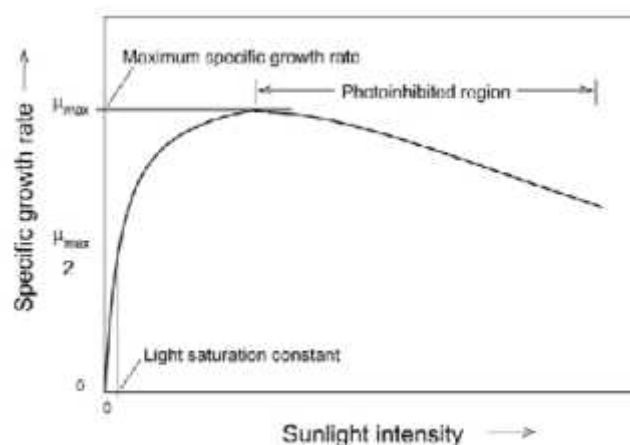


Figure 6. Activité photosynthétique en fonction de l'intensité lumineuse (Masojidek *et al.*, 2004)

2.2. Température

La température est un des facteurs physiques influençant le plus sur la croissance des microalgues. Pour chaque température il y a une intensité lumineuse spécifique pour atteindre le taux de photosynthèse maximal. La température optimale augmente donc avec l'augmentation de l'intensité lumineuse. Il y a aussi une température optimale pour une production de biomasse maximale mais la variation de la température agit aussi sur la composition cellulaire. La diminution de la température augmente le degré d'instauration des lipides et l'augmentation de la température entraîne l'augmentation des concentrations des pigments mais aussi une augmentation de la concentration des radicaux d'oxygène. Si les microalgues ne croissent pas à la température optimale, le besoin en carbone et en nutriment pour obtenir le même taux de croissance est plus important (Mta *et al.*, 2010).

2.3. pH

Le pH est un paramètre essentiel qu'on ne peut pas ignorer lors de la culture des microalgues. Les réactions biochimiques ainsi que les échanges des substrats entre l'intérieur de la cellule et le milieu environnant sont hautement dépendants de la valeur du pH (Breuer *et al.*, 2013). A noter que le pH optimal de la plupart des espèces microalgales est compris entre 7 et 9 (Wang *et al.*, 2012). Le pH joue également sur la dissolution du CO₂ dans le milieu (Taleb, 2015).

2.4. La salinité

La salinité mesure la concentration d'une eau en sels dissous (chlorure de sodium (NaCl), chlorure de magnésium, sulfate de magnésium, etc.), une augmentation de la salinité entraîne l'inhibition de l'activité photosynthétique des algues et par conséquent l'accroissement de la culture algale, cette salinité est sans unité, mais elle est encore souvent exprimée en gramme de sel par litre d'eau (g/l), en pour mille ou encore en *practical salinity unit* (psu).

2.5. Les besoins nutritifs

2.5.1. Carbone

Les microalgues ont besoin de carbone inorganique pour la photosynthèse, il peut être apporté sous forme de sels (bicarbonate) ou par enrichissement de l'air insufflé (car l'air ambiant ne contient pas assez de CO₂ pour la culture intensive des microalgues). Pour que les

microalgues puissent utiliser le CO₂ lors de la photosynthèse, celui-ci doit être solubilisé (Cadoret and Bernard, 2008). Le dioxyde de carbone, dissout dans l'eau prend plusieurs formes, en fonction du pH

Les microalgues sont très consommatrices de dioxyde de carbone, pour produire 1 kilogramme de biomasse, 1.8 kg de dioxyde de carbone sont nécessaires (Cadoret and Bernard, 2008; Livansky and Doucha, 1996). Le dioxyde de carbone est un produit onéreux, une alternative est d'utiliser les effluents d'usines issus de procédés de combustion, riches en dioxyde de carbone et disponibles en grande quantité, et qui contribuent au réchauffement climatique (Chisti, 2007). Il est parfois nécessaire pour cela d'avoir recours à un prétraitement pour concentrer le CO₂ et réduire les substances néfastes au processus de culture.

2.5.2. Azote

L'azote est un essentiel des protéines de structure et de fonctionnement. C'est l'élément le plus important après le carbone (Becker, 1994). Le taux de croissance des microalgues est à peu près identique selon les sources d'azote utilisées (urée, nitrite, nitrate). De nombreuses études montrent l'amélioration de la production et du stockage de lipides dans le cas d'une carence en azote. Il y a aussi une accumulation des caroténoïdes secondaires dans ce cas.

2.5.3. Phosphore

Le phosphore est un macronutriment important dans les processus de métabolisme cellulaire. Une carence en phosphore peut entraîner des accumulations de pigments chez certaines microalgues, mais l'impact est plus faible qu'une carence azotée (Chisti, 2000).

2.5.4. Métaux traces et vitamine

Les microalgues ont besoin de potassium, de fer de silice (pour les diatomées), de soufre, de métaux sous forme de traces et de vitamines. Le fer est un oligo-élément essentiel pour la croissance de la microalgue de par son implication dans le transport des électrons dans le processus des photosynthèses (Hu, 2004).

3. Les facteurs permettant d'augmenter la synthèse lipidique des microalgues

Chez certaines espèces, il est possible d'augmenter significativement la production de lipides par un stress. Les stress identifiés peuvent être de différentes natures (Sheehan *et al.*, 1998). Les conditions de carence en azote sont connues pour stimuler la production de

lipides. Pour les diatomées, une limitation par la silice conduit également à la production de lipides. L'augmentation soudaine de l'intensité lumineuse produit un effet similaire. Enfin, un choc thermique, de même qu'un choc osmotique stimule également la production de lipides, mais il semble que ces deux derniers stress favorisent davantage les lipides polaires (phospholipides et glycolipides) associés aux membranes cellulaires (Takagi *et al.*, 2006).

Les teneurs en lipides (qui seront alors principalement constituées de triglycérides) sont considérablement accrues et peuvent atteindre 80% de la matière sèche (Metting, 1996).

Ces conditions de fortes productivités ne peuvent toutefois pas être maintenues pendant de longues durées elles conduisent le plus souvent à un arrêt de la croissance, puis, après un laps de temps, à la reconsommation des réserves lipidiques ainsi produites. L'optimisation de la productivité en lipide doit donc passer par un compromis entre croissance (sans carence) et production d'huile (avec un stress ralentissant la croissance). (Huntley and Redalje, 2006), proposent une manière d'optimiser la production de lipides chez *Haematococcus pluvialis* en deux étapes : une croissance en photobioréacteurs (PBR) permet d'atteindre des rendements élevés et de limiter les sources de contaminations de la culture. Cette phase de croissance est suivie par 2 jours de carence en étang dans lequel les microalgues sont limitées par l'azote. Cette ultime étape de maturation permet d'obtenir des contenus en lipide de l'ordre 25% pour *Haematococcus pluvialis*.

4. Applications des microalgues

Au vu de leur biodiversité et leurs propriétés biochimiques, les microalgues se révèlent être prometteuses pour de nombreuses applications tels que l'industrie pharmaceutique, agro-alimentaire, l'environnement et les énergies renouvelables.

4.1. Domaine alimentaire

Les microalgues constituent un réel apport nutritif. Ces microorganismes sont utilisés dans l'alimentation animale et humaine, et dans l'aquaculture (Pulz *et al.*, 2004). La biomasse peut être produite sous forme de poudre, tablettes, capsules, pastilles...

Les microalgues sont considérées comme une source potentielle d'acide gras polyinsaturé (Jiang *et al.*, 1999), destinée à l'alimentation humaine et animale. Ces organismes sont susceptibles de synthétiser des AGPI de la série $\omega 3$

Les microalgues ont un potentiel intéressant de production de pigments (Lorenz and Cysewski, 2000), les caroténoïdes sont de plus en plus employés dans l'industrie alimentaire,

suite à la pression du consommateur et à l'augmentation des réglementations limitant l'utilisation des colorants artificiels (Gordon and Bouernfeind, 1982).

4.2. Domaine pharmaceutique

Au vu de leur grande diversité biochimique, les microalgues représentent une source intéressante de molécules bioactives et de toxines utilisables dans le développement de nouveaux médicaments. Plusieurs études ont permis de mettre en évidence l'implication des microalgues dans le domaine pharmaceutique par l'identification de nouvelles molécules naturelles (Hoppe, 1979).

4.3. Domaine cosmétique

Plusieurs espèces de microalgues sont exploitées industriellement dans le domaine cosmétique, principalement les deux espèces *Arthrospira* et *Chlorella* (Stolz and Obermayer, 2005).

Des extraits d'algues, ayant une activité antioxydante, sont exploités sur le marché dans la fabrication des produits de soin capillaire, du visage et de la peau ainsi que dans les crèmes solaires (Pulz *et al.*, 2004).

4.4. Domaine énergétique

La valorisation de la biomasse algale peut se traduire par la production de bioénergie sous forme d'électricité et/ou de chaleur par combustion directe, ou sous forme de bio-méthane après méthanisation ou sous forme de biocarburant ou d'hydrogène. Cependant, cette valorisation ne sera concurrentielle qu'avec une forte productivité de biomasse, une possibilité de récolte mécanique simple et un coût de production plus réduit que les précédentes mettant en œuvre d'autres types de biomasse (Carlsson *et al.*, 2007).

4.4.1. Production de bio-méthane

Production de bio-méthane à partir de la biomasse marine, avec un potentiel intéressant (Chynoweth, 2002). Cependant, des verrous techniques tels que l'accessibilité des nutriments et les coûts de production élevés sont limitants.

4.4.2. Production de biocarburant

Considérant le contexte mondial actuel (hausse du prix du pétrole, raréfaction des ressources fossiles, production de gaz à effet de serre...), il est intéressant de considérer les

microalgues comme source de production de différents types de biocarburant : le bio-oil (Miao *et al.*, 2004), et le biodiesel (Benzidane *et al.*, 2017) :

- Production de bio-oil.
- Production de biodiesel.
- Production de bio-hydrogène

4.5. Domaine environnemental

Les principales applications environnementales sont le traitement des eaux usées et bien sur la consommation de CO₂ comme méthode d'abattement de ce gaz à effet de serre.

- Traitement des eaux usées.
- Agriculture.
- Séquestration du CO₂

5. Généralité sur l'espèce étudiée : *Nannochloropsis sp.*

5.1. Définition

Le genre *Nannochloropsis* a été décrit pour la première fois par (Hibbred, 1998). Il fait partie de la classe des Enstigmatophyceae et de la famille des monodopsidaceae. Cette microalgue appartenant surtout au milieu marin, se trouve également dans l'eau douce et saumâtre (Fawley and Fawley, 2007) (Figure 7).

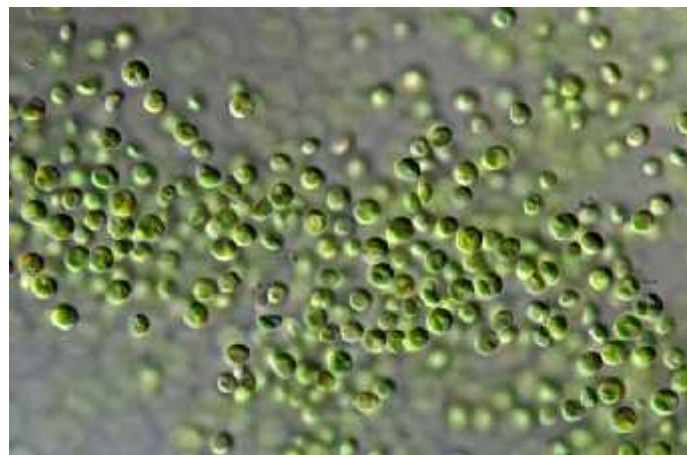


Figure 7 : *Nannochloropsis gaditana*

Le genre *Nannochloropsis* comprend plusieurs espèces : *N. oculata*, *N. gaditana*, *N. granulata*, *N. limnetica*, *N. Salina* (Suda *et al.*, 2002) et qui ont été déterminés par une analyse des séquences d'ADN basée sur l'ADN_r 18S et le gène *rbcL* qui se trouve dans le génome chloroplastique (Wang *et al.*, 2014). Cependant l'étude du génome total de *N. salina* et *N.*

gaditana par (Wong *et al.*, 2014) démontre qu'ils seraient deux souches de la même espèce vue que la différence entre leur génome est inférieure à 20 %.

5.2. La structure de *Nannochloropsis* sp.

Le genre *Nannochloropsis* est composé des espèces unicellulaires de très petites taille environ 2 à 5 µm (Kandilian *et al.*, 2013). Ces microorganismes sont des sources de différents pigments comme la chlorophylle a, la zéaxanthine, la canthaxanthine et l'astaxanthine (Lubiàn *et al.*, 2002). Les espèces ont des formes très variables. En effet, les cellules de *N.granulata* ont une forme globulaire à ovale alors que *N.salina* et *N.gaditana* ont une forme cylindrique ; *N.limnetica* et *salina* n'est pas établie (Suda *et al.*, 2002) (Fawley, 2007).

5.3. La paroi de *Nannochloropsis* sp

La paroi cellulaire de *Nannochloropsis gaditana* est constituée d'une structure bicouche composée d'une paroi intérieure cellulosique (75% de bilan de masse) protégée par une couche hydrophobe algaenan externe (Scholz ,2014).

*Matériels et
Méthodes*

III/ Matériel et méthode

1. Matériel biologique

Nous avons apportée notre souche phytoplanctonique (*Nannochloropsis gatinata*) du Laboratoire d'Aquaculture et de Bioremédiation (Aquabior) au département de Biotechnologie, de la faculté des sciences de la Nature et de la Vie, Senia, Oran.

2. Préparation la chambre de culture

La chambre de culture se situe au niveau du laboratoire de biochimie2. Cette chambre contient une armoire de 2 étages enveloppé à l'intérieure par de l'aluminium et équipée de 8 néons de lumière artificiel LED de 24W (Figure 8).



Figure 8. La chambre de culture

Cette chambre est équipée de 4 oxygénateurs à plusieurs sorties pour agiter et alimenter notre souche d'oxygène. Chaque flacon est branché à un tuyau muni d'un filtreur de 0.45 micromètre pour éviter les contaminations apportées par l'oxygénateur.

3. Milieu de culture

3.1. Echantillonnage de l'eau de mer

L'eau de mer utilisée dans notre expérience provient de la plage de Kharouba. Un échantillon de 10 litre a été rempli dans un géricane en plastique de 10 litre, ce dernier a été emmené au niveau du laboratoire de Biochimie 2 pour être utilisé par la suite (Figure 9).



Figure 9. La plage de Kharouba

3.2. Préparation de l'eau de mer

La filtration de l'eau de mer a été faite par du papier filtre Whatman (1μ) pour éliminer les matières en suspension, des contaminants et des organismes pour répondre aux normes de qualité fixée pour une bonne croissance. Après la filtration l'échantillon d'eau a été autoclavé pendant 20 minutes à 120°C pour éliminer tous ce qui invisible (microorganismes) (Figure 10).



Figure 10. Autoclave

3.3. Préparation du milieu Guillard f/2

Le milieu de culture utilisé dans ce travail est celui de Guillard f/2 (Guillard and Ryther 1962). Les préparations sont faites pour 1 litre d'eau de mer suivant la composition décrite par l'auteur (Tableau, Figure5) :

Tableau 1. Composition du milieu de culture de Guilard and Ryther, 1963.

Volume	Composé	Concentration de la solution stock (stérile)
1 ml	$8,82 \cdot 10^{-4} \text{M NaNO}_3$	75 g/l
1 ml	$3,62 \cdot 10^{-5} \text{M NaH}_2\text{PO}_4$	5,65 g/l
1 ml	Métaux traces	<ul style="list-style-type: none"> • Na_2EDTA : 4,16 g/l • $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 3,15 g/l • $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0,01 g/l • $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,022 g/l • $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0,01 g/l • $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0,18 g/l • $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,006 g/l
0,5 ml	Vitamine	<ul style="list-style-type: none"> • Vitamine B12 • Vitamine B1

Pour la préparation des solutions stocks nous avons utilisé de l'eau distillée. Le milieu de culture préparé est autoclavé à 120°C pendant une période de 20 min, le milieu est ensuite conservé à l'abri de la lumière à température ambiante.

4. Conditions de travail

Avant chaque mise en culture, des conditions de travail doivent être respectées, car les techniques exigent beaucoup de soins (figure11). Le travail doit s'effectuer dans une zone stérile à proximité du bec Bénédictin, la flamme est produite par un brûleur à gaz, elle crée autour d'elle une sphère stérile grâce à la chaleur qu'elle dégage (20 cm de diamètre). Il est alors possible de travailler en conditions stériles dans cette sphère.



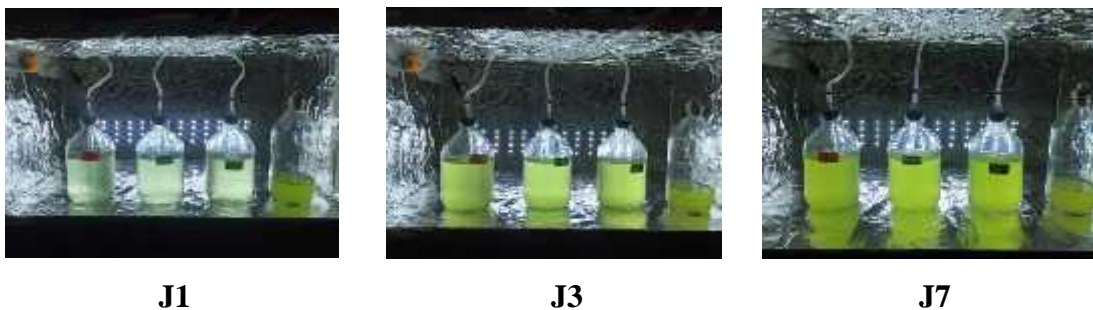
Figure 11. Les conditions de travail avec bac Benzen.



Figure 12. Les composants de milieu de culture Guillard f/2.

5. Préparation de la culture mère

Le but majeur de la pré-culture est de fournir un inoculum destiné à démarrer de grands volumes de culture de micro algues. Dès l'arrivée à un échantillon de *Nannochloropsis* pure au niveau du laboratoire, une pré-culture de 7 jours est lancée. La culture est faite en triplicatas dans des flacons de 500 ml à un volume final de 350 ml (Figure 13).



J1

J3

J7

Figure 13. Préparation de la culture mer (pré-culture).

6. Influence de la salinité et de la carence en azote

Pour l'étude de l'effet de la salinité et de la carence en azote sur le taux de production des lipides nous avons effectué une culture en deux phases : une phase de croissance rapide dans un milieu Guillard f/2 suivie d'une phase de stockage des lipides après un stress provoqué par une carence en azote et concentrations en sel différent. Le plan des 3 expériences réalisées est exposé dans le tableau suivant :

Tableau 2. Les concentrations en azote et en sel pour chaque expérience

Expérience	Concentrations de l'azote : NaNO_3	Salinité : NaCl	Condition de culture
1	<ul style="list-style-type: none"> ✓ $8,82 \cdot 10^{-4}$ M ✓ $5,88 \cdot 10^{-4}$ M ✓ $2,94 \cdot 10^{-4}$ M ✓ 0,00 M 	15 %	<ul style="list-style-type: none"> • Le reste des composants du Milieu Guillard f/2.
2	<ul style="list-style-type: none"> ✓ $8,82 \cdot 10^{-4}$ M ✓ $5,88 \cdot 10^{-4}$ M ✓ $2,94 \cdot 10^{-4}$ M ✓ 0,00 M 	34,6 %	<ul style="list-style-type: none"> • Photoperiode : 18h illumination :6h obscurité. • Intensité lumineuse 24W.
3	<ul style="list-style-type: none"> ✓ $8,82 \cdot 10^{-4}$ M ✓ $5,88 \cdot 10^{-4}$ M ✓ $2,94 \cdot 10^{-4}$ M ✓ 0,00 M 	55 %	<ul style="list-style-type: none"> • Salinité 34,6 %

Au bous de 7 jours de pré-culture, 40 ml de cette dernière a été repiqué dans 350 ml de milieu de culture Guillard f/2 stérile. Après 7 jours, 150 ml de la culture a été centrifugé a 3000 tpm (toure par minute) pendant 5 min et le culot d'algue a été mis en suspension dans 150 ml de milieu de culture Guillard f/2 carencé en azote ($8,82 \cdot 10^{-4}$ M ; $5,88 \cdot 10^{-4}$ M ; $2,94 \cdot 10^{-4}$ M ; 0,00 M) et avec différentes concentrations en NaCl (15%,34.6%,55%). Les réponses en pourcentage lipidique sont mesurées après 13 jours de culture (7 jours de culture sans stress + 6 jours de culture en stress) et le taux de chlorophylle « a » a été mesuré le premier et le dernier jour de la culture.

7. Suivi de la croissance cellulaire

7.1. La densité optique

La mesure de la densité optique des échantillons est effectuée dès la mise en route des cultures permettant un suivi des phases de croissance.

Il s'agit d'une méthode de mesure indirecte de la biomasse, sa mesure fait à la fois pratique, rapide et non destructrice. La mesure se fait à 750nm pour notre souche *nannocloropsis*. Celle-ci est effectuée quotidiennement en prélevant 1 ml de chaque flacon. L'échantillon est mis dans des cuves en plastique pour la lecture au spectrophotomètre (Figure 14) de marque (Multi cellchanGerjenwa)



Figure 14. Spectrophotomètre

7.2. Le comptage des cellules (Malassez)

Le comptage des cellules est effectué dès la mise en route des cultures permettant un suivi des phases de croissance. La mesure de la concentration cellulaire se fait à l'aide d'une cellule de malassez (figure 15) pour compter le nombre de cellule par millilitre. La cellule de numération est une lame porte objet dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume de 2 Microlitre. Le comptage est réalisé au grossissement x40.



Figure 15. Cellule de Malassez.

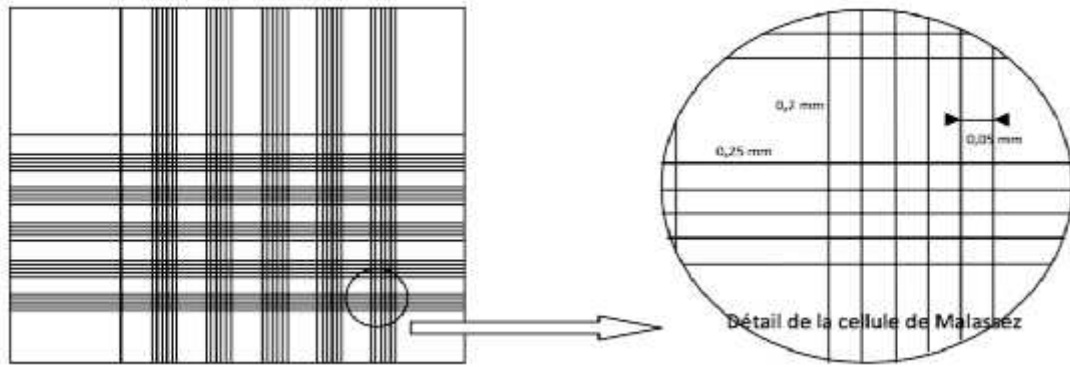


Figure 16. Vue d'une coupe de la gravure d'une cellule de Malassez.

La concentration cellulaire (cellules/ml) est calculée en utilisant l'équation suivante :

$$Nc = \frac{\text{nombre de cellules comptées}}{\text{nombre de carrés pris en compte} \times 10^{-5}}$$

7.3. Dosage des pigments

Ce dosage a été effectué le premier et le dernier jour de chaque expérience. Le principe de cette méthode est d'extraire la chlorophylle « a » et de la quantifier par une méthode spectrophotométrique (Strickland and Parsons, 1968). On a prélevé à partir de chaque flacon le volume de 1ml auquel on a ajouté 4 ml de méthanol (99.8%). Ce mélange a été laissé pendant 2 heures à température ambiante avec agitation. Après 2 h d'incubation l'échantillon a été centrifugé pendant 10min à 3000tpm (figure 16).



Figure 17. Centrifugeuse

L'absorbance du surnageant contenant les pigments dissous dans le méthanol est mesurée à différentes longueurs d'onde (652 et 665 nm) au spectrophotomètre (figure 17).

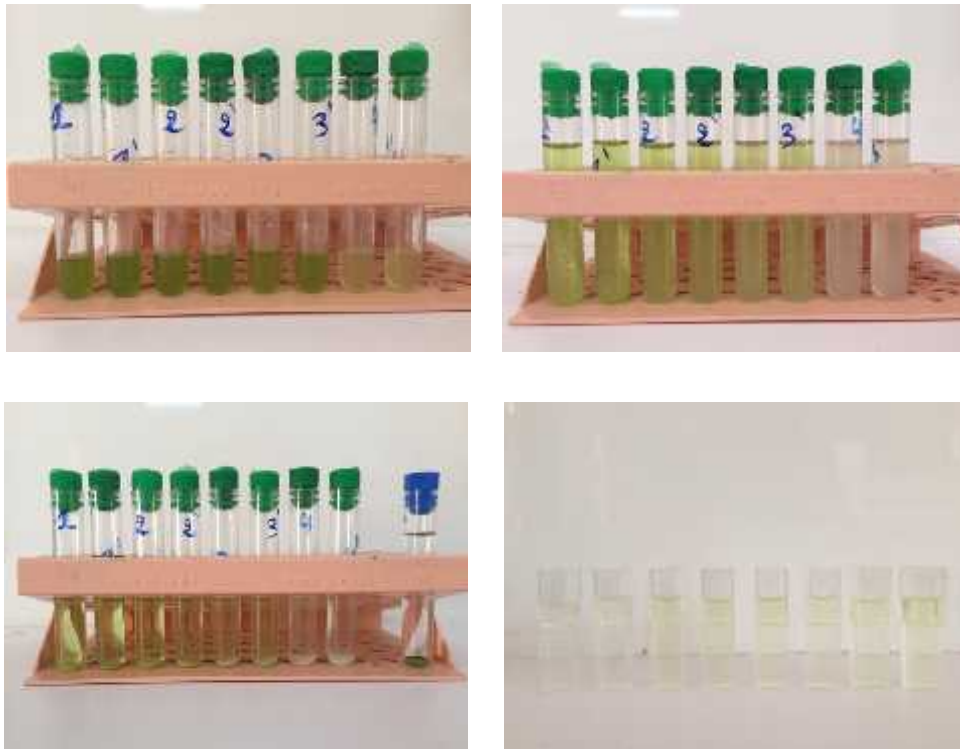


Figure 18. Les étapes de l'extraction de la chlorophylle « a »

Ces absorbances notées A_{652} , et A_{665} sont finalement utilisées pour calculer les concentrations de la chlorophylle a via l'équation de (Ritchie, 2006) pour les chlorophylles :

$$[Chl-a] (\mu g/ml) = [-8.0962 * A_{652} + 16.5169 * A_{665}] * V_2 l^{-1} V_1^{-1}$$

Avec l la profondeur optique de la cuve exprimée en cm.

7.4. Quantification des lipides

Divers essais, concernant notamment les quantités de matière et les volumes de solvants utilisés, nous ont conduits à adopter le protocole suivant :

Environ 150 ml de culture est centrifugé à 4000 tpm pendant 10 minutes, le culot est mis en suspension dans un volume de 10 ml de méthanol et de 5 ml de chloroforme dans les proportions (2:1 / méthanol:chloroforme) selon la méthode de (Bligh and Dyer, 1959) (Figure 11).

On agite pendant 2 min et après centrifugation (10 min, 4000 tours), le surnageant est récupéré à l'aide d'une pipette pasteur dans un ballon de verre de 50 ml préalablement séché et

pesé (Figure 19). La phase organique est ensuite prélevée et évaporée à 50°C à l'aide d'un évaporateur rotatif.



Figure 19. Les étapes de l'extraction des lipides

La pesée du ballon contenant l'extrait lipidique après évaporation du solvant et à vide permet de calculer la teneur en lipide exprimée en (g) selon l'équation suivante (Figure 20) :

$$\text{Lipide (g)} = \text{Poids du ballon contenant l'extrait} - \text{Poids du ballon vide}$$


Figure 20. La pesée des ballons avant et après les lipides par la balance à précision



Figure 21. Rotavapor

8. Analyse des résultats

Pour chaque expérience, les statistiques descriptives (moyennes) sont utilisées pour décrire l'ensemble des résultats.

Résultats

IV/ Résultats

1. La morphologie de *Nannochloropsis gaditana*

Au cours de la période d'expérimentation ; l'observation microscopique au grossissement x40 permet une identification morphologique de la souche étudiée comme le présente la figure ci-dessous



Figure 22 : Observation microscopique des cellules de *Nannochloropsis gaditana*

2. Etude de la carence en azote à différentes salinités

Pour l'étude de l'effet de la salinité et du choc en azote nous avons effectué des cultures avec 3 concentrations en sel (15, 34,6 et 55 % NaCl) en carence d'azote.

2.1. La coloration de la culture

La Figure 23 montre l'évolution de la croissance par la couleur de *N. gaditana* cultivé dans 4 concentrations différentes d'azote (0/ $2,94 \cdot 10^{-4}$ / $5,88 \cdot 10^{-4}$ et $8,82 \cdot 10^{-4}$ M NaNO_3) à un degré de salinité de 15%, 34.46% et 55%. Après avoir cultivé les microalgues dans le milieu Guillard f/2 standard pendant 6 jours, nous avons procédé à un ensemencement de cette dernière dans un milieu stressant, carencé en azote. On peut remarquer qu'après 6 jours de culture, l'intensité de la verdure des microalgues dans le photobioréacteur est très élevée dans toutes les cultures, mais après 7 jours de stress cette couleur diminue en fonction de la diminution de la concentration en azote. Ce résultat est similaire dans les 3 expériences.



J1



J6



J13 (15%)



J13 (34.6%)



J13 (55%)

Figure 23. Effet de la carence en azote à 15%, 34.6% et 55% de NaCl sur la coloration de la culture.

2.2. Carence en azote a 15% de NaCl

2.2.1. Dénombrement des cellules

D'après la figure 24 on peut constater qu'à partir de J1 le nombre de cellule chez toutes les cultures sont de $29,12 \cdot 10^5$ cellule/ml, la phase exponentielle démarre à partir de J2 avec une évolution progressive jusqu'à J6, suivie d'une chute de croissance à J7 chez toutes les cultures. Chez les microalgues cultivées à 0 M NaNO_3 , on note que le nombre de cellule continue à diminuer jusqu'à J9 pour atteindre une valeur de $195 \cdot 10^5$ cellule/ml, suivie d'une croissance pour atteindre un nombre de $345 \cdot 10^5$ cellule/ml à J13. Le nombre de cellule chez les autres cultures continue leurs croissances à partir de J7 jusqu'à J13. Les microalgues cultivés a $5,88 \cdot 10^{-4}$ M NaNO_3 ont atteint un nombre maximal de $452 \cdot 10^5$ cellule/ml a J13.

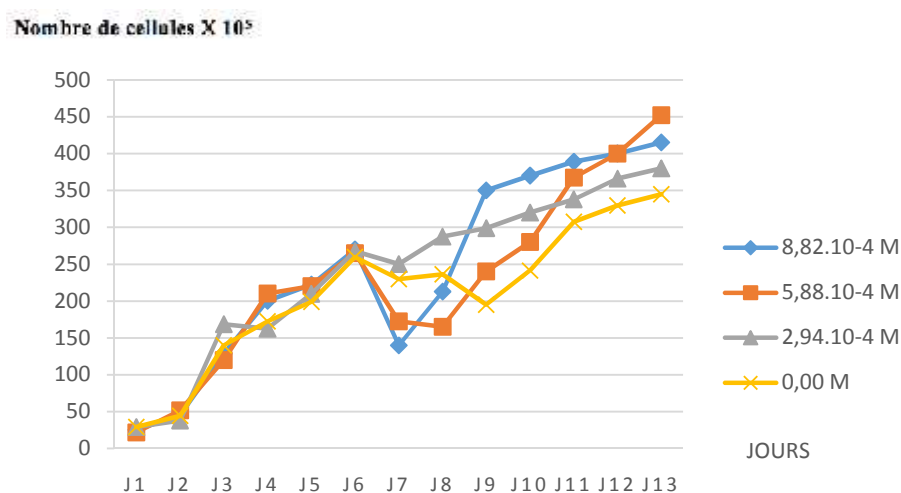


Figure 24. Effet de la carence en azote à 15% de NaCl sur le nombre de cellule de *Nannocloropsis gaditana*.

2.2.2. Densité optique

La figure 25 montre que pour toutes les concentrations, la densité augmente en fonction du temps jusqu'à J6 avec une valeur initiale de 0,19. Après le 6^{ème} jour, qui correspond au jour du stress, on remarque une diminution de la densité optique à J7, suivie d'une augmentation pour atteindre une densité maximale de 1,99 chez les microalgues cultivées à une concentration de $5,88 \cdot 10^{-4}$ M NaNO_3 et une valeur minimale de 1,47 chez les microalgues cultivés à une concentration de 0 M NaNO_3 .

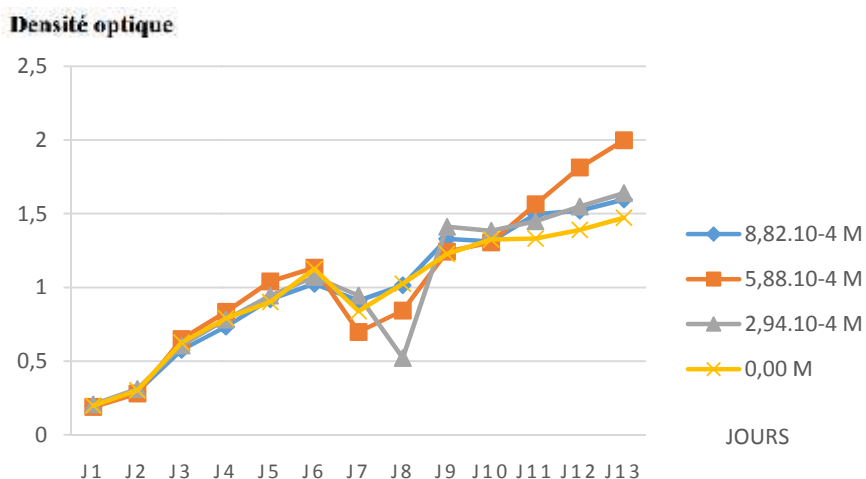


Figure 25. Effet de la carence en azote à 15% de NaCl sur la densité de *Nannocloropsis gaditana*.

2.2.3. Concentration en chlorophylle « a »

La figure 26 démontre que le taux de pigmente (chlorophylle a) augmente de J1 à J6 pour atteindre une valeur approximative de 1,96 µg/ml chez toutes les cultures, cette concentration a continué à augmenter pendant la période du stress jusqu'à atteindre approximativement 3,42 µg/ml sauf chez les microalgues cultivés à une concentration en azote de 0 M qui a atteint une valeur de 2,30 µg/mla J13.

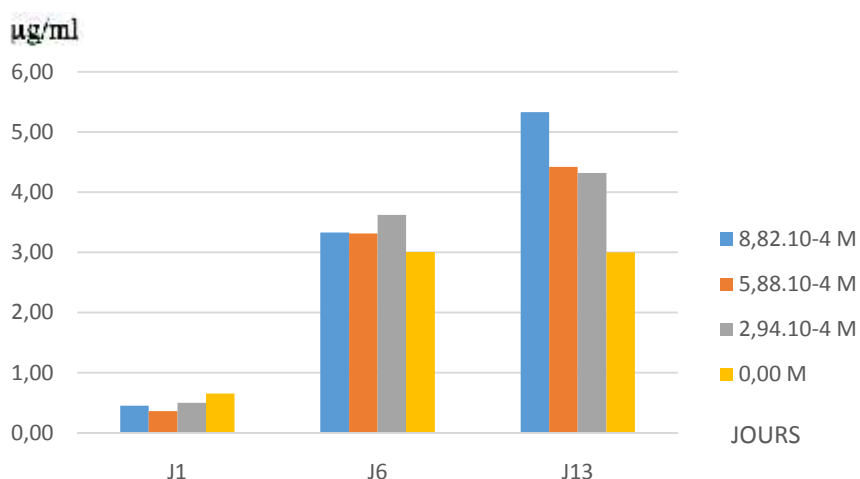


Figure 26. Effet de la carence en azote à 15% de NaCl sur le taux de chlorophylle « a » chez *Nannocloropsis gaditana*.

2.3. Carence en azote à 34,6 % de NaCl

2.3.1. Dénombrement des cellules

La figure 27 montre qu'à partir de J1 le nombre de cellule chez toutes les cultures sont de $13,25 \cdot 10^5$ cellule/ml, la phase exponentielle démarre à partir de J2 avec une évolution progressive jusqu'à J6, suivie d'une chute de croissance à J7 chez toutes les cultures. On remarque que le nombre de microalgue continue a augmenté après J7 pour atteindre des valeurs de $380 \cdot 10^5$, $367 \cdot 10^5$ et $320 \cdot 10^5$ à J13 dans les concentrations $8,82 \cdot 10^{-4}$ / $5,88 \cdot 10^{-4}$ et $2,94 \cdot 10^{-4}$ M NaNO_3 , respectivement. Par contre chez les algues cultivées aune concentration en azote de 0 M on constate une fluctuation du nombre de cellule.

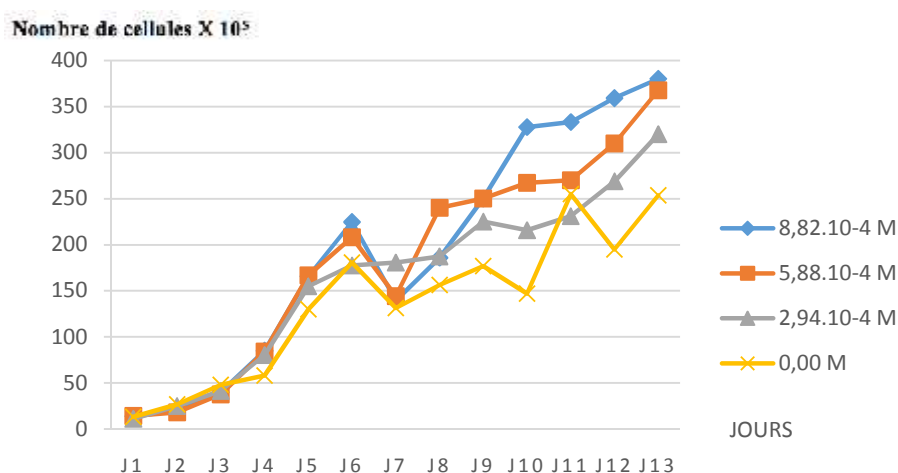


Figure 27. Effet de la carence en azote à 34,6% de NaCl sur le nombre de cellule de *Nannocloropsis gaditana*.

2.3.2. Densité optique

La figure 28 montre que pour toutes les concentrations, la densité augmente en fonction du temps jusqu'à J6 avec une valeur initiale de 0,071. Après le J6 (jour du stress), on remarque une légère diminution de la densité optique à J7, suivie d'une augmentation pour atteindre une densité maximale de 2,58 chez les microalgues cultivées à une concentration de $8,82 \cdot 10^{-4}$ M NaNO_3 et une valeur minimale de 1,41 chez les microalgues cultivées à une concentration de 0 M NaNO_3 .

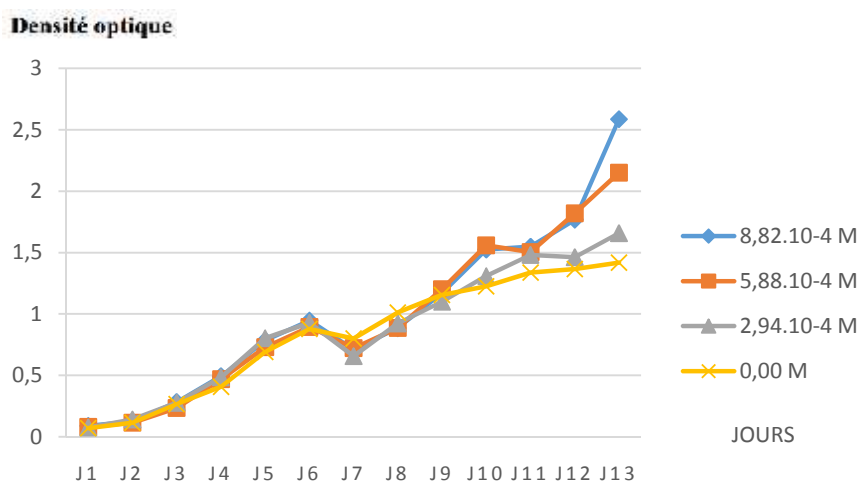


Figure 28. Effet de la carence en azote à 34.6% de NaCl sur la densité de *Nannocloropsis gaditana*.

2.3.3. Concentration en chlorophylle « a »

L’histogramme suivant présente la concentration en chlorophylle« a » en fonction du temps pour les quatre concentrations (0/ 2,94.10⁻⁴ / 5,88.10⁻⁴ et 8,82.10⁻⁴ M NaNO₃). On remarque que le taux de pigmente (chlorophylle a) augmente de J1 à J6 pour atteindre une valeur approximative de 4 µg/ml chez toutes les cultures. Cette concentration n’a pas augmenté pendant les 7 jours du stress, on constate plutôt une diminution du taux de chlorophylle « a » en fonction de la diminution de la concentration de NaNO₃.

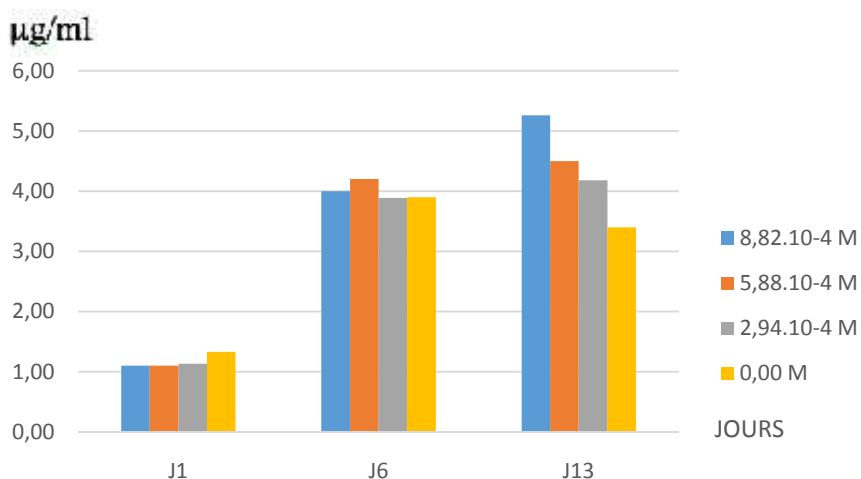


Figure 29. Effet de la carence en azote à 34.6% de NaCl sur le taux de chlorophylle « a » chez *Nannocloropsis gaditana*.

2.4. Carence en azote à 55 % de NaCl

2.4.1. Dénombrement des cellules

D'après la figure suivante, on peut constater qu'à partir de J1 le nombre de cellule chez toutes les cultures sont de $22,12 \cdot 10^5$ cellule/ml, la phase exponentielle démarre à partir de J3 avec une évolution progressive jusqu'à J6, suivie d'une chute de croissance à J7 chez toutes les cultures sauf la culture avec une concentration de $2,94 \cdot 10^{-4}$ M, le nombre de cellules dans cette dernière va continuer a augmenté jusqu'à J13. La croissance des microalgues cultivées dans les milieux dont la concentration est de $8,82 \cdot 10^{-4}$ et $5,88 \cdot 10^{-4}$ NaNO_3 reprend à partir de J13. On remarque que chez les algues cultivées à une concentration en azote de 0 M le nombre des cellules augmentent très lentement pour atteindre une valeur minimale de $610 \cdot 10^5$.

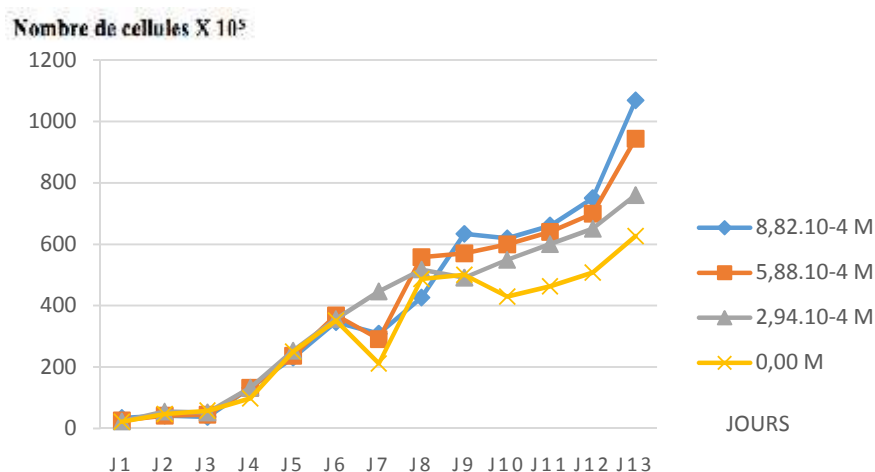


Figure 30. Effet de la carence en azote à 55% de NaCl sur le nombre de cellule de *Nannocloropsis gadita*

2.4.2. Densité optique

La figure 31 montre que pour toutes les concentrations, la densité augmente en fonction du temps jusqu'à J6 avec une valeur initiale comprise entre 0,07 et 0,16. Après le J6 (jour du stress), on remarque une faible diminution de la densité optique à J7, suivie d'une augmentation pour atteindre une densité maximale de 2.03 chez les microalgues cultivées à une concentration de $8,82 \cdot 10^{-4}$ M NaNO_3 et une valeur minimale de 1,26 chez les microalgues cultivées à une concentration de 0 M NaNO_3 .

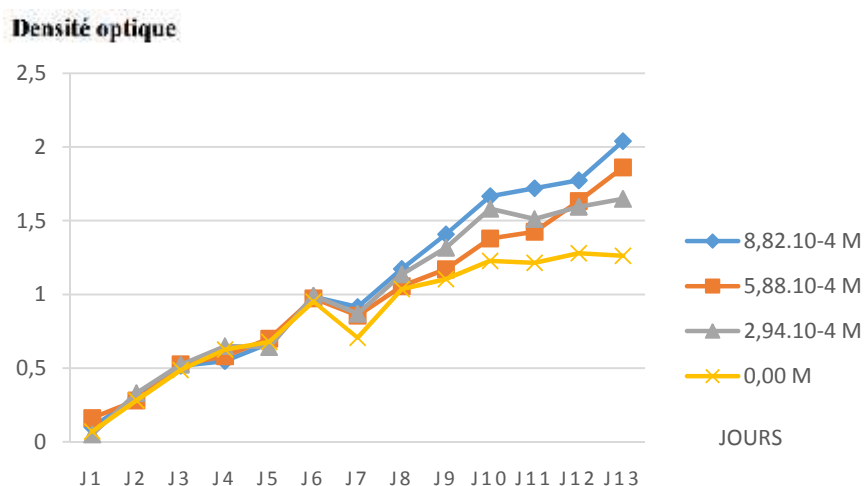


Figure 31. Effet de la carence en azote à 55% de NaCl sur la densité de *Nannocloropsis gaditana*.

2.4.3. Concentration en chlorophylle « a »

L’histogramme suivant présente la concentration en chlorophylle « a » en fonction du temps pour les quatre concentrations (0/ 2,94.10⁻⁴ / 5,88.10⁻⁴ et 8,82.10⁻⁴ M NaNO₃). On remarque que le taux de pigmente (chlorophylle « a ») augmente de J1 à J6 pour atteindre une valeur comprise entre 3.90 et 4.20 µg/ml chez toutes les cultures.

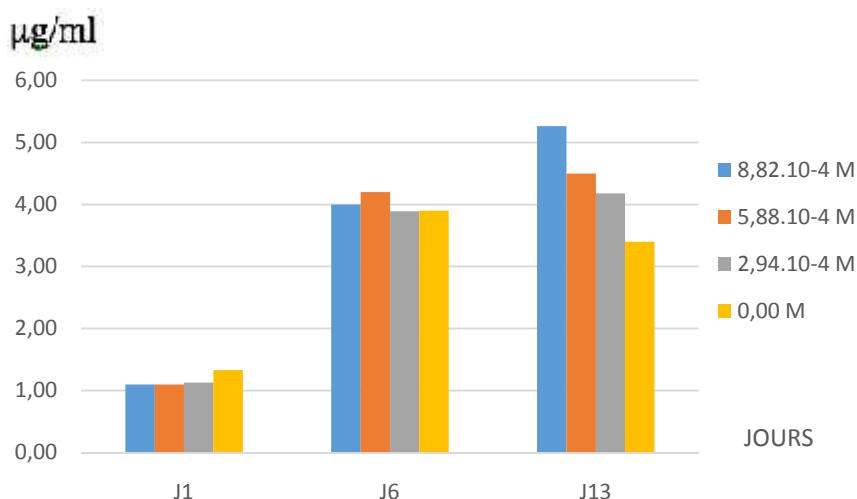


Figure 32. Effet de la carence en azote à 55% de NaCl sur le taux de chlorophylle « a » chez *Nannocloropsis gaditana*.

La concentration en chlorophylle « a » augmente chez les microalgues cultivées à une concentration de 8,82.10⁻⁴ M pour arriver à une valeur de 8.82 µg/ml à J13, mais chez les

autres cultures elle n'a pas augmenté pendant les 7 jours du stress, on constate plutôt une diminution du taux de chlorophylle « a » en fonction de la diminution de la concentration de NaNO_3 .

3. La teneur en lipide

La figure 33 représente le taux de lipide chez les espèces cultivées dans des milieux carencés en azote (0 M/ $2,94 \cdot 10^{-4}$ M/ $5,88 \cdot 10^{-4}$ M et $8,82 \cdot 10^{-4}$ M NaNO_3) et en NaCl (15 %/ 34,6 %/ 55 %) pendant une période de 7 jours. On remarque que la teneur en lipide chez les espèces cultivées à une concentration de 0 M NaNO_3 augmente en fonction de la diminution du taux de NaCl dans le milieu, ils ont atteint une valeur de 0,034 g/150ml. Chez les algues cultivées à $5,88 \cdot 10^{-4}$ M de NaNO_3 on constate que le meilleur résultat en lipide est atteint lorsque la culture contient 34.6 % de NaCl.

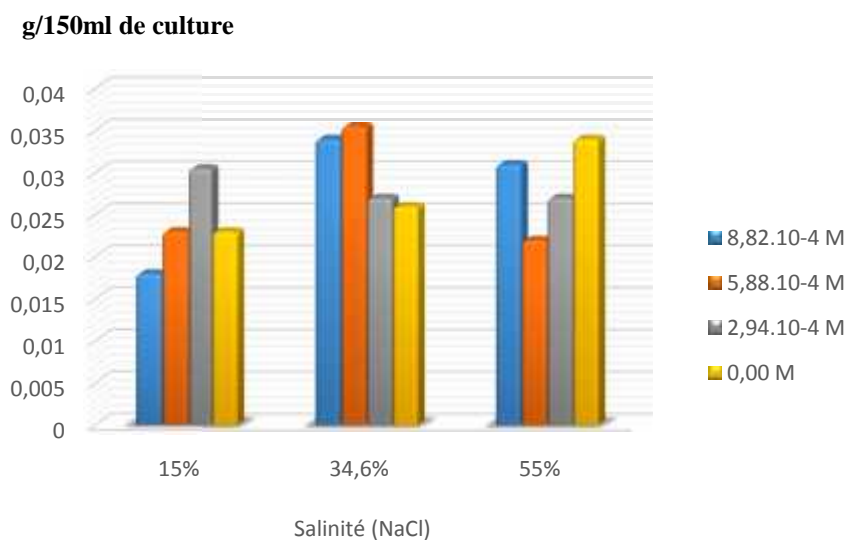


Figure 33. Effet de la salinité sur le taux de lipide chez *Nannocloropsis gaditana*.

Discussion

V/ Discussion

Deux objectifs sont étudiés conjointement dans ce travail : d'une part, la cinétique de croissance et d'autre part, la teneur en huile chez *Nannochloropsis gaditana*. Un plan d'expériences a été mené afin d'étudier l'influence de la concentration en chlorure de sodium et en azote du milieu de culture sur ces deux aspects.

Durant les trois expériences, nous avons cultivé les microalgues dans un premier temps, dans un milieu Guillard f/2 standard afin d'optimiser la production de biomasse et dans un deuxième temps, ces microalgues ont été récupérées pour êtreensemencées dans un milieu stressant avec différentes concentrations en chlorure de sodium (15 %, 34,46 % et 55 %) et carencé d'azote ($0 / 2,94 \cdot 10^{-4} / 5,88 \cdot 10^{-4}$ et $8,82 \cdot 10^{-4}$ M NaNO_3), les résultats montrent que la phase de croissance exponentielle démarre à partir du premier jour, la croissance cellulaire commence à augmenter car les cellules sont déjà adaptées au milieu Guillard f/2 et ceci grâce à la pré-culture. La population va commencer à croître grâce à la reproduction végétative. En effet les cellules sont jeunes et possèdent un fort potentiel de division. Cette phase de croissance continue jusqu'à J6, elle est suivie d'une chute de croissance 7^{ème} jour, lorsque les microalgues ont été transférées dans le nouveau milieu (avec stress). Ceci pourrait être expliqué, entre autres, par le fait que les microalgues ont subi un choc et ont eu besoin de temps pour s'adapter à leur nouvel environnement.

D'après nos résultats, on peut remarquer que la croissance est plus importante chez les microalgues transférées dans un milieu à 55 % de salinité. À la fin de l'expérience (13 jours) le nombre de cellules chez les microalgues cultivées à 55 % de NaCl et à une concentration en NaNO_3 de $8,82 \cdot 10^{-4}$ M, a atteint $1068 \cdot 10^5$ cellules/ml. Ce résultat concorde avec les recherches de Massart *et al.* (2010) qui ont montré que le choc salin favorise la croissance de la biomasse. Les espèces du genre *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) sont des algues picoplanctoniques largement distribuées dans les habitats marins, en particulier dans les eaux côtières et les estuaires (Hibberd, 1980). En outre, des études récentes ont décrit les espèces d'eau douce *Nannochloropsis limnetica*, habitant des masses d'eau intérieures (Fietz *et al.*, 2005, Krienitz and Wirth 2006). Les espèces marines de *Nannochloropsis* se sont révélées très prometteuses en ce qui concerne le niveau de salinité (Boussiba *et al.*, 1987, Renaud and Parry, 1994).

La teneur en lipide chez *Nannochloropsis gaditana* est moins importante dans les

cultures à 15 et 34,6 % de NaCl que chez les microalgues cultivées à 55 %. La production cellulaire de lipides totaux augmente avec la quantité de sel, Pal *et al.* (2011) ont étudiés une large gamme de niveaux de salinité permettant la croissance et la production de lipide chez *Nannochloropsis sp.*, ils ont constaté que la formation de lipide induite par le stress est augmentée avec une augmentation de la salinité et de l'intensité de la lumière. Cette augmentation est expliquée par le fait que l'algue réagit au stress osmotique par la production de quantités massives de glycérol servant à synthétiser les triglycérides et les phospholipides microalgaux. En effet, le glycérol intracellulaire sert à équilibrer osmotiquement le sel extracellulaire (Chitlaru *et al.*, 1991).

Le stockage de lipides chez les microalgues résulte d'un déséquilibre transitoire entre le flux de carbone issu de la photosynthèse et le flux d'autres éléments nécessaires à la croissance (phosphore ou azote). Aujourd'hui les scientifiques cultivent les microalgues dans certaines conditions (carence en nutriments) pour booster le stockage des lipides (Taleb, 2015). En effet, nos résultats prouvent une fois de plus que la carence en azote favorise la production des lipides chez *Nannochloropsis gaditana*, nous avons constaté que la meilleure production de lipide est chez les microalgues qui ont subi un stress par l'azote.

Selon Converti *et al.* (2009), quand certaines espèces subissent un « stress » dû à la carence de certains nutriments, elles peuvent se mettre à produire des lipides en très grande quantité. Ce stress doit être parfaitement dosé : c'est un stress léger qui ne doit surtout pas interrompre la croissance ; pour bien faire, il doit assurer une production de lipides optimale.

La concentration en chlorophylle « a » chez les microalgues a été réalisée par un dosage spectrophotométrique, les résultats montrent que le taux de chlorophylle « a » diminue avec la diminution de la concentration en azote dans le milieu de culture, ce résultat est similaire chez les microalgues cultivés dans les 3 concentrations de NaCl. De même, Phadwal and Singh (2003) ont trouvé que la diminution de la concentration en azote, diminue le taux de croissance et le contenu chlorophyllien, mais augmente le taux de β -carotène.

Conclusion

VI/ Conclusion

Grace à leurs caractéristiques biochimiques spécifique et très variable, les microalgues représentent aujourd'hui une grande voie de recherche à approfondir. Les problèmes liés au réchauffement climatique attirent le regard vers ces microorganismes capables de consommer le CO₂ présent dans l'atmosphère pour produire de la biomasse contenant des acides gras utilisés pour la fabrication des biocarburants (Taleb, 2015).

Le but de ce travail était d'évaluer l'influence de la culture en deux étapes sur la productivité en biomasse et en lipides chez la souche de microalgues *Nannochloropsis gaditana*. La première étape consistait à favoriser une productivité maximale de biomasse via une culture dans un milieu de culture Guillard f/2. La seconde à permettre une accumulation maximale en lipide via un stress osmotique et une carence en source d'azote.

En regard de nos résultats, on peut conclure que les conditions de carence en azote sont en effet efficaces pour stimuler la production de lipides. Nous avons aussi constaté que l'augmentation soudaine du taux de salinité (choc osmotique) favorise également la production de lipides.

De fortes teneurs en lipides ne peuvent toutefois pas être maintenues pendant de longues durées car, elles conduisent souvent à un arrêt de la croissance. Il faut trouver un compromis entre croissance (donc sans carence) et production d'huile (avec un stress ralentissant la croissance). Il faut donc bien connaître l'impact de l'ensemble des paramètres sur la production d'huile pour arriver à l'optimiser.

Références

bibliographiques

B

Becker E.W. (1994). Microalgae. Cambridge Press University

Blig E.G and Dyer W. J. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol.* 37:911-917.

Boussiba S., Vonshak A., Cohen Z., Avissar Y., Richmond A. (1987) .Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*. *Biomass*, 12:37–47

C

Cavort J.P., Bernard O. (2008). La production de biocarburant lipidique avec des microalgues. Promesses et défis. *Journal de la société biologique*, vol.202, no3, p. 201-211.

Chisti y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, Vol.25, No.3, pp.294-306

Chitlaru E. and Pick U. (1991). Regulation of glycerol synthesis in response to osmotic changes in *Dunaliella*. *Plant Physiol.*, 96(1), 50-60.

Converti A., Casazza.A.A., OrtizE.Y., Perego.P., Del Borghi.M (2009) .Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production, *Chemical Engineering and Processing* 48 : 1146–1151

F

Fawley KP and Fawley MW. (2007). Observation On the diversity and ecology of freshwater *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) with descriptions of new taxa. *Protest* 158: 325-336

Fietz S, Bleiß W., Hepperle D., Koppitz H., Krienitz L., Nicklisch A. (2005). First record of *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae) in the autotrophic picoplankton from Lake Baikal. *J Phycol*, 41:780–790

G

Guillard R.R and Ryther J.H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* 8:229-239.

H

Hibberd D. (1980) .Eustigmatophytes. In: Cox E (ed) Phytoflagellates: developments in marine biology. Elsevier, New York, pp 319– 334

K

Kandilian R., Lee E., Pilon L. (2013). Radiation and optical properties of *Nannochloropsis oculata* grown, 27(10), 905-922.

Knukey R.M. (1998). Isolation of Australian Microalgae and Preparation of Microalgae concentrates for use aquaculture feeds .PhD the University of Tasmania, December 1998, 254 pp

Krienitz L and Wirth M. (2006). The high content of polyunsaturated fatty acids in *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae) and its implication for food web interactions, freshwater aquaculture and biotechnology. *Limnologica*, 36:204–210

M

M.C., Gerken H.G. Ultrastructure and composition of the *Nannochloropsis gaditana* cell wall, *Eukaryot call*, (2014) Nov, 13(11):1450-64

Massart A., Aubry E., Hantson A L.,(2010). Étude de stratégies de culture de *Dunaliella tertiolecta* combinant haute densité cellulaire et accumulation de lipides en vue de produire du biodiesel. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **14**(2):567-572

Mata T.M., Martins A.A., Caetano N.S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications, *Renew. Sust.Energ. Rev.* **14**,217-232

P

Pal D ., KhozinI., Goldberg ., Cohen Z ., Boussiba S .(2011). The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Appl Microbiol Biotechnol*, 90:1429–1441 DOI 10.1007/s00253-011-3170-1

Phadwal K and Singh PK. Effect of nutrient depletion on beta- carotene and glycerol accumulation in two strains of *Dunaliella* sp. - *Bioresour. Technol.*, 2003, **90**(1), 55-58.

Q

Qiang H., Sommerfield M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M., Darzins A.I. (2008). Microalgae triacylglycerols as feedstocks for biofuel production, perspectives and advances. *The plant journal*, vol.54, p. 621-639.

R

Renaud SM and Parry DL. (1994) .Microalgae for use in tropical aquaculture II: Effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. *J Appl Phycol*, 6:347–356

Richmond A. Ed., (2004). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied

Ritchie R J., (2006). Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth. Res.* 89, 27–41.

Rodolfi L., Chini Zittelli G., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Tredici M.R. (2009). Microalgae for oil. strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 102, 100–112.

S

Scholz M.J ., Wiess T.L ., Jinkerson R.F ., Jing J., Roth R., Good enough U., Posewitz

Strickland J.D.H., Parsons T.R. (1968). A practical handbook of seawater analysis. Queen's Printer.

Suda S., Atsumi M and Miiyashita. (2002). Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N.oceanica*.Nov. (Eustigmatophyceae). *Phycologia* 41:273279

T

TALEB A., (2015) .Production de biodiesel à partir des microalgues : recherche des souches accumulatrices des lipides et optimisation des conditions de culture en photobioréacteurs, these de doctorat, L'Université Nantes, France.

W

Wolfgang E.B. (1994). Microalgae biotechnology and microbiology. [En ligne].
http://books.google.fr/books?id=KAKx4I7NWEYC&printsec=frontcover&source=gbv_v2_summary_r&cad=0#v=onepage&q=&f=false (Page consultée le 20 octobre 2009).