

République Algérienne Démocratique et Populaire

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



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم كلية علوم الطبيعة
والحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MER ET DE L'AQUACULTURE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Benmalek Rabiaa et Benrezkallah Asmaa

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN HYDROBIOLOGIE MARINE ET CONTINENTALE
Spécialité: Ressources Halieutiques

THÈME

**Optimisation Du Milieu de Culture pour la
production de pigments chez les microalgues
(*N. gaditana* et *A. platensis*)**

Posé le 28/08/2020

DEVANT LE JURY

Président	Pr. BENAMAR N.	Pr.	U. Mostaganem
Encadreur	Mme. BENZIDANE D.	MAA	U. Mostaganem
Co-encadreur	Dr. GHOMARI	MCA	U. Mostaganem
Examineur	Mme. BILLAMI M.	MAA	U. Mostaganem

Année universitaire 2019/2020

Remerciements

On souhaite remercier toutes les personnes qu'on a eu l'honneur de rencontrer pendant cette année de fin d'études et toutes les années précédentes, et on envoie un grand remerciement pour **Dr. BELBACHIR Nordinne** le responsable de département des sciences de la mer et de l'aquaculture à l'université Abdelhamid ibn badis de Mostaganem et tous Les membres du jury, Monsieur le Président **Pr. BENAMAR N** et l'examineur **Mme BILLAMI M**, et spécialement pour l'Encadreur **Mme BENZIDANE D** et le Co-encadreur **Dr GHOMARI** de nous avoir conseillé et guidé beaucoup et pour être très modeste avec nous, et nous sommes très heureux d'être là entre cette parfaite famille.

Merci

Dédicace

Je dédie ce **travail** à :

Mes chers parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de vous.

A tous mes chers frères et sœurs.

A tous mes amies du département et tous les professeurs aussi et d'ailleurs surtout **Mr Midaoui Mohammed Salim** énormément et absolument de m'avoir aidé beaucoup dans ce projet de fin d'étude et d'être toujours là avec ses conseils.

A la promotion de **MASTER 2 RESSOURCES HALIEUTIQUES** l'année **2019/2020**.

Mlle Benmalek Rabiaa

Dédicace

Je dédie ce **travail** à :

Mes chers parents.

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de vous.

A tous mes chers frères et sœurs.

A mon cher mari **Mr Kaddar Mohamed** pour m'avoir aidé et encouragé dans cette année et je l'envoie tous mes respects et amour et remercier beaucoup.

A tous mes amies du département et tous les professeurs.

A la promotion de **MASTER 2 RESSOURCES HALIEUTIQUES** l'année **2019/2020**.

Mme Benrezkallah Asmaa

Résumé

Les micro-algues constituent un groupe de microorganismes dont les emplois potentiels n'ont pas été suffisamment étudiés. On a décrit plus de 40.000 espèces de micro-algues. Néanmoins, moins de 1% ont été soumises aux travaux de « screening » pour l'identification de nouvelles substances bioactives ou potentielles applications industrielles ou agricoles. Ces végétaux unicellulaires constituent l'une des plus importantes réserves de nouveaux produits ainsi que de nouvelles applications. Cela justifie le grand intérêt qu'elles suscitent actuellement.

L'objectif de notre travail était d'étudier des articles scientifiques qui traitent sur la croissance et la production des pigments chez *Nannochloropsis gaditana* et *Spiruline platensis* et d'élaborer une synthèse, à partir de ces travaux. Deux articles ont été traité (Lubián *et al.*, 2000 ; GÖKSAN *et al.*, 2007) et les conclusions suivantes ont été tirées :

L'utilisation de cultures de petit volume chez *Spiruline platensis* augmenterait la température du milieu plus rapide, ce qui est le principal facteur entravant la croissance surtout en période hivernale. De plus, l'utilisation de courtes longueurs de trajet de lumière et l'ajout des plus petits volumes dans les cultures favoriserait une productivité plus élevée.

En ce qui concerne l'expérience sur *Nannochloropsis gaditana* la composition du pigment et sa variation avec l'âge de la culture ont été analysées dans six souches de *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae). La capacité d'accumulation des cétopcaroténoïdes, astaxanthine et canthaxanthine était plus élevée chez *N. salina* et *N.gaditana* que dans les autres souches étudiées. L'influence de la salinité (15 à 100 Practical unités) sur la production de pigments a été étudiée chez *N.gaditana*. Les résultats indiquent que *Nannochloropsis* est une source de pigments précieuse, non liée à sa capacité d'accumulation de pigment unique, mais à la disponibilité d'une gamme de pigments tels que chlorophylle α , zéaxanthine. la canthaxanthine et l'astaxanthine, chacune avec des niveaux de production élevés.

Mots clés

Microalgue, *Nannochropsis gaditana*, *Spiruline platensis*, pigment, milieu de culture, Carotinoïde, Chlorophylle a .

summary

Microalgae are a group of microorganisms whose jobs potentials have not been sufficiently studied. More than 40,000 species of microalgae have been described.

Nevertheless, less than 1% were subjected to “screening” work for the identification of new bioactive substances or potential industrial applications or agricultural. These unicellular plants constitute one of the most important reserves of new products as well as new applications. This justifies the great interest that they currently arouse.

The aim of our work was to study scientific articles that deal with the growth and pigment production in *Nannochloropsis gaditana* and *Spirulina platensis* and to develop a synthesis based on this work. Two articles were treated (Lubián et al., 2000; GÖKSAN et al., 2007) and the following conclusions were drawn:

The use of small volume cultures in *Spirulina platensis* would increase the faster medium temperature, which is the main factor hindering growth especially in winter. In addition, the use of short light path lengths and adding the smaller volumes to crops would promote higher productivity.

Regarding the experience on *Nannochloropsis gaditana*, the composition of pigment and its variation with the age of the culture were analyzed in six strains of *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae). The accumulation capacity of ketocarotenoids, astaxanthin and canthaxanthin were higher in *N. salina* and *N. gaditana* than in the other strains studied. The influence of salinity (15 to 100 Practical units) on production pigment was studied in *N. gaditana*. The results indicate that *Nannochloropsis* is

a valuable source of pigments, unrelated to its unique pigment accumulation capacity, but the availability of a range of pigments such as α chlorophyll, zeaxanthin. The canthaxanthin and astaxanthin, each with high production levels.

TABLE DES MATIERES

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations.....	
I/ Introduction.....	1
II/ Synthèse bibliographique	
1. Généralités sur les microalgues	3
1.1. Définition et caractéristiques.....	3
1.2. Classification et distribution	4
1.3. Reproduction de microalgues.....	4
1.3.1. Reproduction sexuée.....	5
1.3.2. Reproduction asexuée	5
2. Besoins des microalgues - facteurs influents sur la croissance des microalgues.....	5
2.1. La lumière	6
2.2. Température	6
2.3. La salinité.....	6
2.4. Les besoins nutritifs	6
2.4.1. Azote	6
2.4.2. Phosphore	7
2.4.3. Carbone.....	7
3. Système de cultures des microalgues.	8
3.1. Systèmes ouverts.	8
3.2. Systèmes fermés.....	8
4. Mode de culture	9
4.1. Culture en mode batch.....	9
4.2. Culture en mode Fed-batch1.....	10
5. Applications biotechnologiques des microalgues.....	10
5.1. Domaine alimentaire	10
5.2. Domaine pharmaceutique	11
5.3. Domaine cosmétique	11
5.4. Domaine énergétique	11
5.4.1. Production de biométhane	11
5.4.2. Production de biocarburant	12
5.4.3. Production de biohydrogène.....	12
5.5. Domaine environnemental	12
6. Production des pigments par les microalgues	12
7. Espèces étudier	13
7.1. <i>Nannochloropsis gaditana</i>	13
7.1.1. Définition.....	13

7.1.2. La structure de <i>Nannochloropsis sp</i>	14
7.1.3. La paroi de <i>Nannochloropsis sp</i>	14
7.2. <i>Spiruline platensis</i>	14
7.2.1. Définition.....	14
7.2.2. Reproduction.....	16

III. Matériel et Méthodes

1. Matériel biologique.....	17
2. Préparation de chambre de culture.....	17
3. Milieu de culture.....	17
3.1. Echantillonnage de l'eau de mer.....	18
3.2. Traitement de l'eau.....	18
3.2.1. Filtration.....	18
3.3. Préparation du milieu Guillard f/2.....	18
3.3.1. Les composants de milieu Guillard f/2.....	19
4. Conditions de travail.....	19
5. Préparation de la culture mère (préculture).....	19
6. Suivie de la croissance cellulaire.....	19
6.1. La densité optique (DO).....	19
6.2. Le comptage des cellules algales.....	20
7. Détermination de la concentration et la composition des pigments	20

IV/ Synthèse et interprétation des résultats trouvés par différents auteurs

1. Production de biomasse	22
2. pH de la culture	23
3. Production des pigments	23
4. Effet de la salinité sur la production de pigments.....	25

V/ Conclusion.....

VI/ Références bibliographiques.....

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Photo de micro algue (Jack Legrand,2002).....	3
Figure 2 . Exemple de reproduction sexuée et asexuée (Claude, 2008).....	5
Figure 3 . Photosynthèse des microalgues . Cadoret et Bernard, 2008).....	7
Figure 4. Courbe de croissance théorique chez les microalgues (Richmond, 2004).....	9
Figure 5. <i>Des applications variées dans des domaines clés (alimentation humaine et animale, pharmacie, cosmétiques, aquaculture...)</i> (Jack Legrand, 2002).....	11
Figure 6. <i>Nannochloropsis gaditana</i>	13
Figure 7. Morphologie de la spiruline: (a)- sous microscope optique (b) Micrographie électronique d' <i>Arthrospira platensis</i> (c)- Micrographie électronique d'un trichome d' <i>Arthrospira platensis</i> (d) Micrographie électronique de non axénique de <i>S. platensis</i> (Ciferri, 1983).....	15
Figure 8. Cycle biologique de la Spiruline (Ciferri et al., 1983).....	16
Figure 9. La chambre de culture.....	17
Figure 10. Vue d'une coupe de la gravure d'une cellule de Malassez	20
Figure 11. Modifications des quantités en poids sec de <i>Spirulina platensis</i> cultivé en pots transparents (l), sacs PE (n) et race ay étang (s).....	22
Figure 12. Modifications de la chlorophylle et des quantités de <i>Spirulina platensis</i> cultivé en pots transparents (l),sacs PE (n) et raceway étang (s).....	24
Figure 13. Contenu des principaux caroténoïdes de <i>Nannochloropsis gaditana</i> à différentes salinités (a) V = violaxanthine. A = antheraxanthine. Z = zéaxanthine. Va = vaucheriaxanthine: (b) C = canthaxanthine As = astaxanthine.....	26

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Distribution des différentes divisions algales (d' après Barsanti et Gualtieri,2006).....	4
Tableau 2. Composition du milieu de culture de Guillard and Ryther (1962).....	18
Tableau 3. Proportions relatives (exprimées en pourcentage) de chacun des principaux caroténoïdes par rapport au total la teneur en caroténoïdes et des chlorophylles a	25

LISTE DES ABREVIATIONS

% : pour cent

μ : Micro

μg /ml : Micro gramme par millilitre

°C : Degré Celsius

nm : Nanomètre

Cm : Centimètre

CoCl₂ : chlorure de cobalt

O₂ : Oxygène

FeCl₃ : chlorure de fer III

g : Gramme

g/l : Gramme par litre

kg : killogramme

h : Heure

J : Jour

M : Mole

Min : Minute

ml : Millilitre

Mm : Millimètre

MnCl₂ : Manganese II chloride tetrahydrate

N. gaditana : *Nannoshloropsis 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 : Watt

ZnSO₄ : Le sulfate de zinc

PH : Le potentiel hydrogène

Introduction

Introduction

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 (Michaud, 2016). 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) (Michaud, 2016).

Pour croître, ces 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. Les microalgues ont la capacité de pouvoir réagir à un changement de leur environnement en modifiant leurs voies métaboliques. En effet, en fonction des conditions du milieu (disponibilité en lumière, source de carbone, ...), elles vont pouvoir utiliser différents modes trophiques comme la phototrophie, l'hétérotrophie ou encore la mixotrophie (Burlaw, 1953).

Cette micro-algue est considérée comme une ressources alimentaires non conventionnelles qui offre jusqu'à 70 % de protéines, des sels minéraux, des oligoéléments et de nombreuses vitamines . (Salle *et al.*, 1999).

Les colorants produits naturellement suscitent un intérêt croissant. Les microalgues représentent une richesse sur le plan biotechnologique en raison de leur large gamme de pigments colorés, notamment les chlorophylle (vert), les caroténoïdes (rouge, orange et jaune) et les phycobiliprotéines (rouge et bleu). Cependant, la concentration de ces pigments, dans des conditions de croissance optimales, est souvent trop faible pour rendre la production de pigments à base de microalgues économiquement réalisable. Dans certains chlorophytes (algues vertes), des conditions de processus spécifiques telles que des intensités lumineuses sursaturantes ou une concentration élevée en sel induisent la secondaires (b-carotène dans *Dunaliella salina* (dunal) teodoresco et astaxanthine chez *haematococcuspluvialis* (flotow)).

Introduction

la surproduction de tous les autres pigments (y compris la lutéine, la fucoxanthine et la phycocyanine) nécessite une modification de l'expression des gènes ou de l'activité enzymatique, très probablement combinée avec la création d'un espace de stockage à l'extérieur des photosystèmes .

Le succès de telles stratégies de modification dépend d'une compréhension adéquate des voies métaboliques et des rôles fonctionnels de tous les pigments impliqués. Dans cette revue, la distribution des pigments commercialement intéressants dans les groupe de microalgues les plus courants, les rôles de ces pigments in vivo et leurs voies de biosynthèse sont passés en revue, et les contraintes et les opportunités de surproduction des pigments primaires et secondaires sont présentées.

Synthèse
bibliographique

Synthèse bibliographique

II/ Synthèse bibliographique

1. Généralités sur les microalgues

1.1. Définition et caractéristiques

Les micro-algues sont des organismes unicellulaires (Figure 1). Ce sont des végétaux aquatiques dont l'ordre de grandeur varie de 10 à 100 μm . Elles se multiplient le plus souvent par voie non sexuée. Il en existe entre 200 000 et 1 000 000 espèces dont 30 000 sont connues à l'heure actuelle et seulement une dizaine sont cultivées. Tout comme les cyanobactéries, les micro-algues sont des organismes photosynthétiques utilisant la lumière du soleil comme source d'énergie afin de fixer le dioxyde de carbone. Les lipides contenus dans les micro-algues représentent jusqu'à 80 % de leur poids sec et sont majoritairement sous forme de triglycérides. Les triglycérides sont une forme de lipides comme le cholestérol ; ils sont composés de molécules de glycérol et d'acide gras. Ils sont présents dans notre organisme et constitue une source importante d'énergie pour notre corps. Les lipides présents dans les micro-algues peuvent eux être utilisés dans le but de produire du biodiesel.

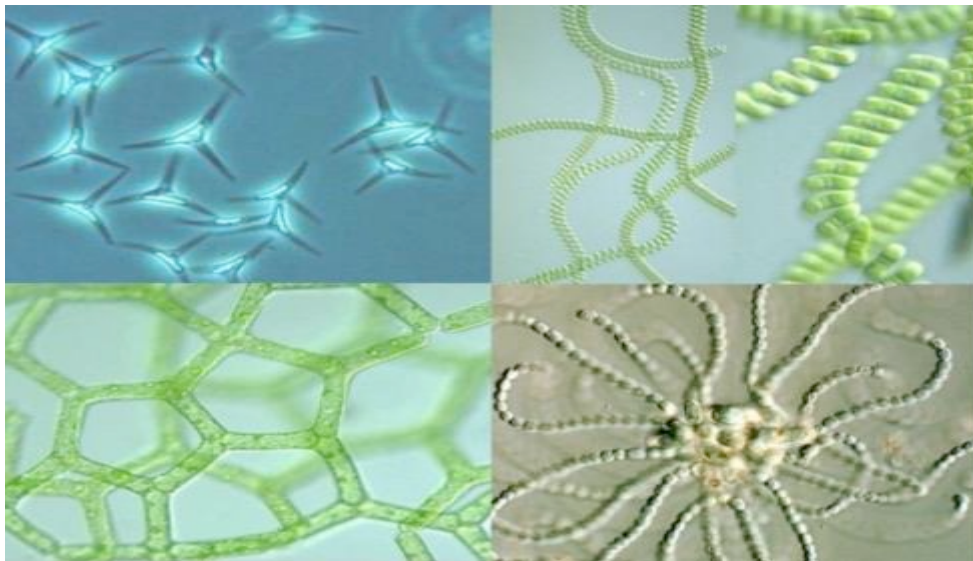


Figure 1. Photo de micro algue (Jack Legrand,2002).

Une micro-algue est délimitée par une membrane plasmique contenant au sein de son cytoplasme de nombreux organites : les chloroplastes, les amyloplastes, les oléoplastes, les mitochondries et son noyau entouré de son enveloppe. Ces derniers sont nécessaires au bon fonctionnement de la micro-algue ainsi qu'à son métabolisme.

Il existe deux groupes de micro-algues, celles appartenant au groupe des eucaryotes, c'est-à-dire possédant des organites cellulaires (noyau, chloroplaste, mitochondries ...) et celles

Synthèse bibliographique

appartenant au groupe des procaryotes, ce sont des organismes ne possédant pas d'organites cellulaires.

1.2. Classification et distribution

Les microalgues constituent un groupe extrêmement diversifié, estimé à environ 300 000 espèces dont 40000 ont été déjà identifiées (Hu *et al.*, 2008). Elles ne sont pas regroupées en fonction de leur métabolisme énergétique ou encore en fonction de leur habileté à synthétiser les métabolites nécessaires, mais plutôt en fonction de leurs propriétés morphologiques, biochimiques et génétiques. Il existe donc différentes classes taxonomiques dont les principales sont: les bacillariophycées (diatomées), les dinophycées (dinoflagellées), les prymnésiofycées, les xanthophycées (microalgues vert-jaune), les rhodophycées (microalgues rouges), les chlorophycées (microalgues vertes), les chrysophycées (microalgues d'or), les phéophycées (microalgues brunes) et les Eustigmatophycées (pico-plancton).

Tableau 1: Distribution des différentes divisions algales (d'après Barsanti et Gualtieri, 2006).

Division	Common Name	Habitat			
		Marine	Freshwater	Terrestrial	Symbiotic
Cyanophyta	Blue-green algae	Yes	Yes	Yes	Yes
Prochlorophyta	n.a.	Yes	n.d.	n.d.	Yes
Glaucophyta	n.a.	n.d.	Yes	Yes	Yes
Rhodophyta	Red algae	Yes	Yes	Yes	Yes
Heterokontophyta	Golden algae	Yes	Yes	Yes	Yes
	Yellow-green algae				
	Diatoms				
	Brown algae				
Haptophyta	Coccolithophorids	Yes	Yes	Yes	Yes
Cryptophyta	Cryptomonads	Yes	Yes	n.d.	Yes
Chlorarachniophyta	n.a.	Yes	n.d.	n.d.	Yes
Dinophyta	Dinoflagellates	Yes	Yes	n.d.	Yes
Euglenophyta	Euglenoids	Yes	Yes	Yes	Yes
Chlorophyta	Green algae	Yes	Yes	Yes	Yes

Note: n.a., not available; n.d., not detected.

1.3. Reproduction de microalgues :

Tous les organismes vivants passent par divers stades de vie, plus ou moins différents, avant de revenir à leur état initial. Ce processus est appelé cycle de vie, en raison de son caractère

Synthèse bibliographique

cyclique ou répétitif. La figure 2 montre le cycle de vie des microalgues qui comprend généralement des processus de reproduction sexuée et/ou asexuée.

1.3.1. Reproduction sexuée

Ce mode est le moins fréquent et le plus aléatoire, généralement déclenchée par des conditions environnementales particulières souvent multifactorielles. Au cours de ce mode de reproduction les gamètes mâle et femelle fusionnent pour produire un zygote diploïde.

1.3.2. Reproduction asexuée

La prolifération microalgale s'effectue principalement par une reproduction asexuée ou multiplication végétative : une cellule mère se divise alors en deux cellules filles génétiquement identiques. (Claude, 2008)

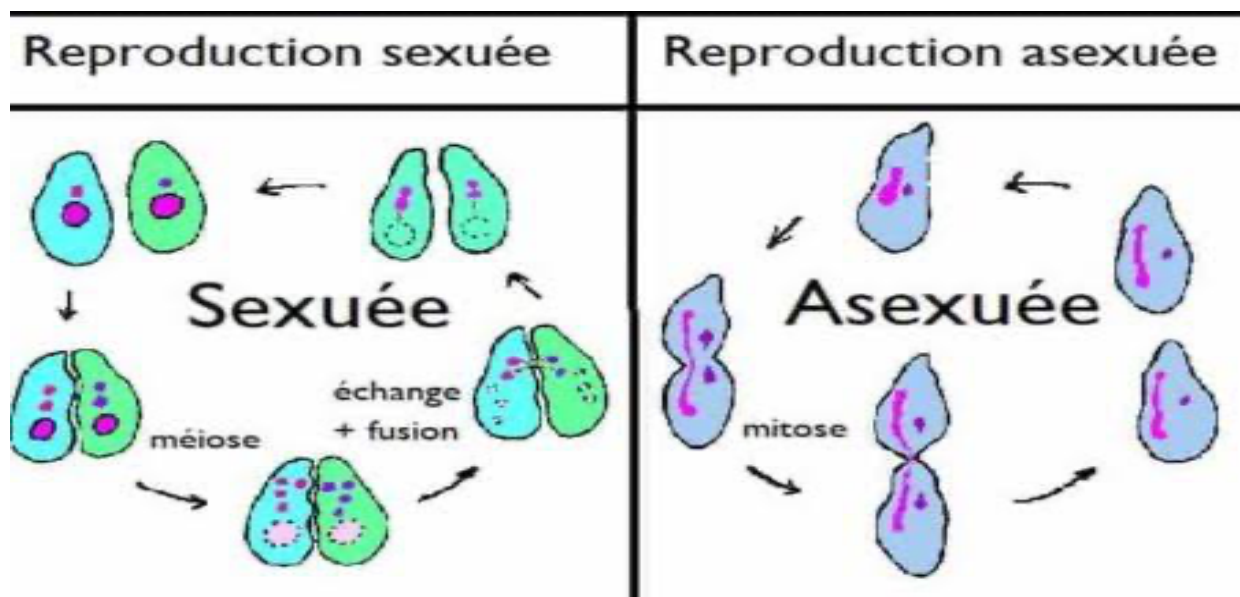


Figure 2 . Exemple de reproduction sexuée et asexuée. (Claude, 2008).

2. Besoins des microalgues - 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 (Burlew, 1953). La croissance algale est affectée par plusieurs paramètres comme le mélange et la concentration en oxygène.

Synthèse bibliographique

2.1. La lumière :

La lumière est la source d'énergie primaire et fondamentale des organismes réalisant la photosynthèse et est par conséquent un facteur éco physiologique très important pour leur survie dans un milieu. Elle prend plus d'importance dans nos climats rigoureux : les photopériodes courtes représentent sept mois par année. Elles deviennent donc un facteur limitant la croissance des microalgues en milieu ouvert, et ce même si la température du milieu de culture est optimisée.

En soleillé. La quantité d'énergie solaire disponible peut varier en fonction de l'altitude et principalement des conditions météorologiques relatives à la saison. (Melanie, 2009).

2.2. Température :

La température est un des facteurs physiques influençant le plus 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 .

La température peut provoquer des changements de la structure cellulaire, et notamment de son volume (une température supérieur à la valeur optimale induit une augmentation du volume cellulaire). Les microalgues tolèrent en général une gamme de température comprise entre 15 et 26°C avec une concentration cellulaire optimale aux alentours de 23°C. Cet intervalle dépend de l'espèce algue.

2.3. La salinité :

La salinité mesure la concentration d'une eau en sels dissous (chlorure de sodium (NaCl), 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 unité pratique de salinité (psu). (Massart *al.*, 2010).

2.4. Les besoins nutritifs :

2.4.1. Azote :

Est un élément 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

Synthèse bibliographique

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.

2.4.2. 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 (Becker, 1994).

2.4.3. Carbone :

Les microalgues ont besoin de carbone inorganique pour la photosynthèse (Figure 3), 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 (Bernard, 2008). Le dioxyde de carbone, dissout dans l'eau prend plusieurs formes, en fonction du pH.

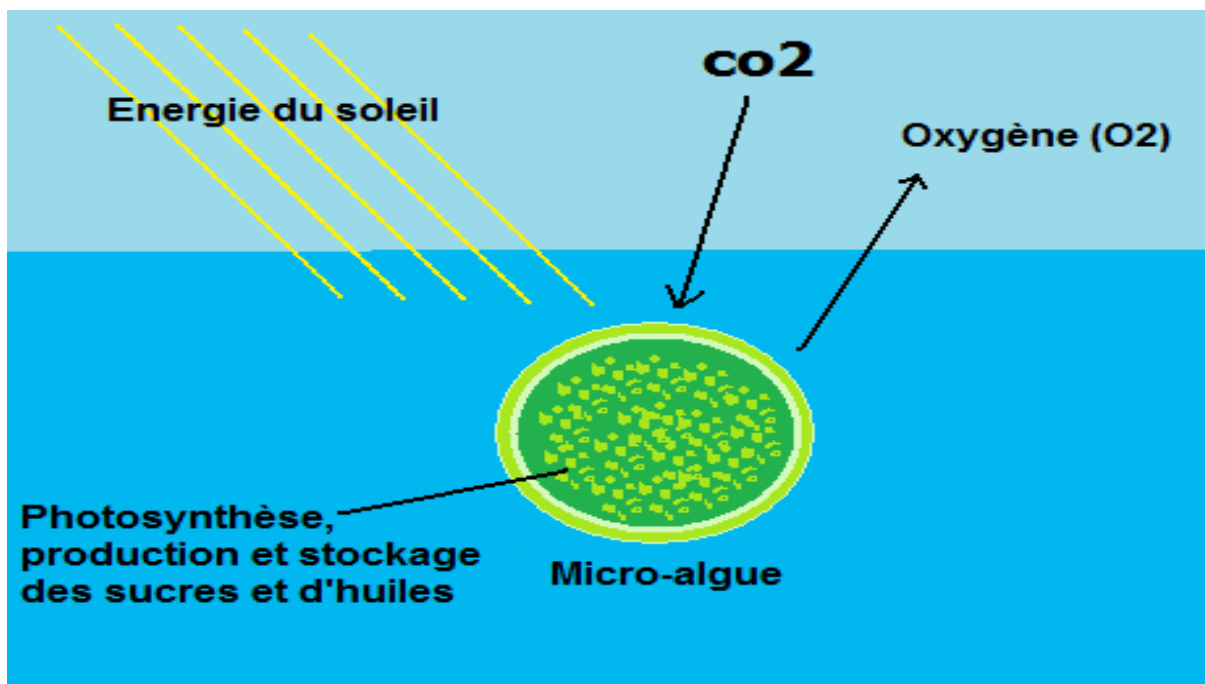


Figure 3 . Photosynthèse des microalgues. (Cadoret et Bernard, 2008).

Synthèse bibliographique

3. Système de cultures des microalgues :

Les systèmes massifs de culture de micro-algues peuvent être classés en deux grandes catégories :

3.1. Systèmes ouverts :

Les systèmes ouverts sont les systèmes d'exploitation qui ont été majoritairement utilisés pour la culture industrielle des microalgues dans les dernières décennies. Les systèmes ouverts sont plus faciles et moins chers à construire et à exploiter que les réacteurs fermés. Ces systèmes sont les moins énergivores et ont une maintenance et un nettoyage facile (Brennan et Owende, 2010). C'est pour ces raisons qu'ils sont toujours considérés à l'heure actuelle comme des systèmes de cultures viables (Langley et al., 2012), malgré leur faible productivité. Les systèmes ouverts utilisent généralement que la lumière naturelle, il n'y a donc pas de coût associé à l'apport de lumière pour ces systèmes de culture. Cependant, les microalgues dans ces systèmes de culture n'ont qu'une utilisation faible de la lumière (Razzak et al., 2013) et sont soumises aux variations journalières et saisonnières de la température et de l'intensité lumineuse (Apt et Behrens, 1999). Des problèmes de contaminations existent (par des bactéries, champignons, protozoaires et d'autres microalgues) et de grosses pertes d'eau par évaporation (Chisti, 2007) sont observées dans ce type de système de culture. Les conditions de cultures sont peu contrôlables et il existe seulement quelques microalgues assez résistantes pour croître sous les conditions extrêmes qui sont habituelles aux bassins ouverts (haut pH, haute température ou haute salinité) (Sierra et al., 2008).

Les bassins varient par leur forme, le type de matériaux utilisés, le système de mélange du milieu. Plusieurs familles de bassin existent :

- Les bassins naturels
- Les bassins circulaires
- Les raceways

3.2. Systèmes fermés :

Photobioréacteurs Les microalgues peuvent être également cultivées en bioréacteurs (enceintes dans lesquelles se déroulent des interactions biologiques, utilisées pour la production de biomasse d'un métabolite, pour la conversion d'une molécule) dans le cas des algues, on utilise des photobioréacteurs, construits dans des matériaux transparents laissant passer la lumière et autorisant les réactions de photosynthèse, l'éclairage se fait à partir de la

Synthèse bibliographique

lumière solaire ou artificielle avec des tubes fluorescents .il peut être optimisé avec un certain angle d'inclinaison du réacteur (Jack Legrand *et al.*, 2002).

Le principal avantage de cette technique est qu'elle permet de contrôler les conditions de culture (distribution et évacuation du CO₂ de l'O₂ contrôle du pH, de la température) et aussi de maintenir la stérilité de la culture

4. Mode de culture :

4.1. Culture en mode batch

Pour une culture en mode batch, la croissance de microalgues suit une allure bien définie selon une courbe d'allure sigmoïde traduisant Cinq phases principales : 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).

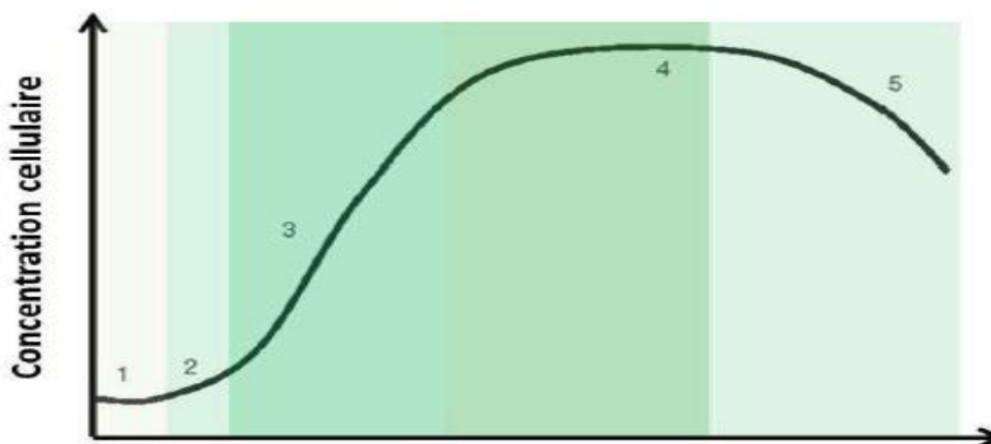


Figure 4. Courbe de croissance théorique chez les microalgues (Richmond, 2004).

-Phase de latence (1) : elle traduit l'adaptation cellulaire, aux nouvelles conditions environnementales.

-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) : cette phase s'achève par une étape dite de décélération

durant laquelle les nutriments nécessaires à la culture commencent à s'épuiser, particulièrement les substrats limitants. À l'issue de cette phase, la concentration cellulaire a atteint une valeur limite.

Synthèse bibliographique

-Phase stationnaire (4): Cette phase intervient lorsque le substrat limitant s'épuise (P, N, CO₂, etc). L'apport de lumière peut aussi être insuffisant, en raison d'une concentration cellulaire élevée, de la formation de bio film sur les parois du photobioréacteur, donnant le phénomène d'auto-ombrage des cellules. La concentration cellulaire est dans ce cas constante et maximale ; (Tebbani S, 2014).

-Phase de déclin (5): toutes les réserves intracellulaires des cellules sont épuisées et les conditions deviennent extrêmement défavorables, provoquant la mort cellulaire.

4.2. Culture en mode Fed-batch

Ce mode de culture se distingue du précédent par l'introduction du milieu de culture au fur et mesure de la culture, jusqu'à atteindre un volume final souhaité.

Ce mode de fonctionnement se caractérise donc par un volume de culture variable. Le mode Fed-batch permet d'optimiser la productivité de biomasse et d'éviter une inhibition par les substrats. (Tebbani S, 2014).

5. Applications biotechnologiques des microalgues :

Les microalgues sont utilisées en industrie dans les domaines énergétique, pharmaceutique, nutraceutique, cosmétique et alimentaire. Les principales utilisations sont détaillées comme suite :

5.1. Domaine alimentaire :

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

Les polysaccharides (polymères hydrosolubles) issues des microalgues sont exploités dans l'industrie agroalimentaire en tant qu'agents gélifiants ou épaississants. Le glycérol (molécule intervenant dans les systèmes d'osmorégulation des microalgues) est exploité dans l'agroalimentaire comme édulcorant.

Les microalgues ont un potentiel intéressant de production de pigments, les caroténoïdes sont de plus employés dans l'industrie alimentaire, suite à la pression du consommateur et à l'augmentation des réglementations alimentaires, suite à la colorants artificiels (Richmond, 2004).

5.2. Domaine pharmaceutique :

Les microalgues représentent une source intéressante de molécules bioactives et de toxines utilisables dans le développement de nouveaux médicaments pour le traitement de maladies cancéreuses notamment (Pulz O, 2004) les polysaccharides extraites des microalgues permettent la synthèse d'agents antioxydants, antiviraux, anti-tumoraux et anticoagulants, les microalgues sont également capables de synthétiser des vitamines.

5.3. Domaine cosmétique :

Plusieurs espèces de microalgues sont exploitées industriellement dans le domaine cosmétique, principalement les deux espèces *Arthrospira* et *Chlorelle* (Stolz and Obermayer, 2005). les pigments issus des microalgues sont également utilisés pour les cosmétiques (Figure 5).



Figure 5. Des applications variées dans des domaines clés (alimentation humaine et animale, pharmacie, cosmétiques, aquaculture...)(Jack Legrand, 2002).

5.4. Domaine énergétique :

La valorisation de la biomasse algale peut se traduire par la production de bioénergie sous forme d'électricité et/ou chaleur par combustion directe, ou sous forme de biométhane après méthanisation ou sous forme de biocarburant ou d'hydrogène. Cependant, cette valorisation ne sera concurrentielle qu'avec une forte productivité de biomasse, une possibilité de récolte mécanique simple et un coût de production plus réduit que les procédés mettant en oeuvre d'autres types de biomasse (Chisti, 2008).

5.4.1. Production de biométhane :

Plusieurs recherches ont permis de vérifier la faisabilité technique et commerciale de la production de bio méthane à partir de la biomasse marine, avec un potentiel intéressant (Chynowth, 2002). Cependant, des verrous techniques tels que l'accessibilité des nutriments

Synthèse bibliographique

et les coûts de production élevés limitent l'exploitation des microalgues pour cette application .

5.4.2. 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 micro-algues comme source de production de différents types de biocarburant : le bio-oil et le biodiesel (Chisti, 2008 ; Benzidane *et al.*, 2017) :

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

5.4.3. Production de biohydrogène :

Le biohydrogène est une source efficace d'énergie renouvelable qui suscite actuellement de nombreuses recherches et applications. Le procédé de synthèse de biohydrogène peut revêtir deux formes : la photolyse directe et la photolyse indirecte. La photolyse directe repose sur un transfert des électrons issus de l'eau aux protons, couplé à une réduction de la ferrédoxine (protéine intervenant au niveau du photosystème des algues dans le transport d'électrons et de protons) (Tebbani S., 2014).

Induisant la synthèse d'hydrogène par l'enzyme Hydrogénase (BENEMANN J.R., 1987). La méthode indirecte repose sur la conversion de l'amidon stocké par les algues sous forme d'hydrogène sous des conditions d'anaérobiose et de limitation de soufre (Carlsson A.S ., 2007) .

5.5. Domaine environnemental :

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

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

6. Production des pigments par les microalgues :

Synthèse bibliographique

Les pigments sont des molécules qui absorbent une partie du spectre lumineux visible. La partie qui n'est pas absorbée est réfléchiée et captée par l'œil humain, et détermine donc leur couleur.

Les pigments sont utilisés dans une large gamme de produits, y compris les aliments et les cosmétiques. Bien que de nombreux pigments puissent être produits de manière synthétique (par exemple à partir de pétrole, d'acides organiques et de produits chimiques inorganiques) pour un prix inférieur à celui de la production naturelle, la demande des consommateurs pour des pigments produits naturellement augmente. Les pigments d'origine naturelle peuvent être obtenus à partir d'insectes (par exemple les cochenilles et les pucerons), de légumes, de fruits, de pétales de fleurs, ou de micro-organismes tels que les microalgues (Lamers *et al.*, 2014)

En outre, contrairement aux plantes, les microalgues permettent d'atteindre des productivités de surface très élevées, qui peuvent être obtenues sans utiliser de terres arables (Del Campo *et al.*, 2000; Lamers *et al.*, 2008). En outre, comme de nombreuses espèces d'algues sont tolérantes au sel, l'eau de mer peut souvent être utilisée pour leur culture. L'utilisation de l'eau de mer est plus durable que l'utilisation de l'eau douce et peut en outre être moins coûteuse.

7. Espèces étudiées :

7.1. *Nannochloropsis gaditana* :

7.1.1. Définition

Le genre *Nannochloropsis* a été décrit pour la première fois par (Hibberd, 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 (figure 6).

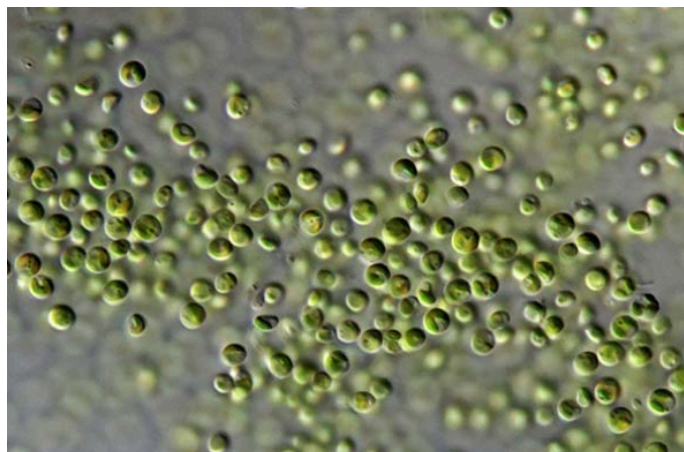


Figure 6. *Nannochloropsis gaditana*

Le genre *Nannochloropsis* comprend plusieurs espèces : *N. oculata*, *N. gaditana*, *N. granulata*, *N. limnetica*, *N. Salina* (Sudaet al, 2002) et qui été déterminés par une analyse des séquences d'ADN basée sur l'ADNr 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 %.

7.1.2. La structure de *Nannochloropsis sp.*

Le genre *Nannochloropsis* est composé des espèces unicellulaires de très petites taille environ 2 à 5 µm. Ces microorganismes sont des sources de différents pigments comme la chlorophylle a, la zéaxanthine, la canthaxanthine et l'astaxanthine. Les espèces ont des formes très variable. En effet, les cellules de *N. gaditana* 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.

7.1.3. 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).

7.2. *Spiruline platensis* :

7.2.1. Définition

La spiruline est une cyanobactérie (0,3 mm de long), vieux comme le monde dont le nom scientifique est "cyanobactérie *Arthrospira platensis*" se présente sous la forme d'un filament pluricellulaire bleu-vert, mobile, non ramifié et enroulé en spirale, qui vit de photosynthèse comme les plantes et prospère naturellement dans les lacs salés et alcalins des régions chaudes du globe (Jordan, 1999; Cruchot, 2008).

Ces caractéristiques biologiques font qu'elle situe à la frontière du monde bactérien et du monde végétal. Bactérie parce que appartenant au groupe des cyanobactéries, végétal parce que microalgue puisant son énergie à la photosynthèse, et dépourvue de cellulose (Giraldine-Andréani, 2005), elle est incapables de réduire (fixer) l'azote de l'air, car elle est dépourvue

Synthèse bibliographique

des structures spécialisées appelées hétérocystes, contrairement à certaines autres cyanobactéries (*Anabaena*, *Nostoc*) (Cruchot, 2008)

En effet, elle est classée parmi les « algues bleu-vert », ce pour plusieurs raisons (Cruchot, 2008) :

- son habitat aquatique,
- la présence d'un système photosynthétique producteur d'oxygène,
- son aptitude à développer des biomasses importantes,
- sa morphologie proche de celle des algues,
- sa couleur liée à sa teneur en pigments bleu (phycocyanine) et vert (chlorophylle).

Les cellules de cyanobactéries n'ayant pas de plastes individualisés. La microscopie électronique a permis de mieux connaître la structure et le fonctionnement de ces cellules, capsule, paroi cellulaire pluristratifiées, le chromoplasma apparaît comme un système membranaire comprenant des thylakoïdes ; la spiruline ne renfermant pas de chloroplastes, ce sont ces thylakoïdes qui constituent les sites de photosynthèse, les ribosomes et des fibrilles de la région de l'ADN et de nombreuses inclusions (Figure 7) (Ciferri, 1983; Fox, 1996; Belay, 1997; Tomaselli, 2002).

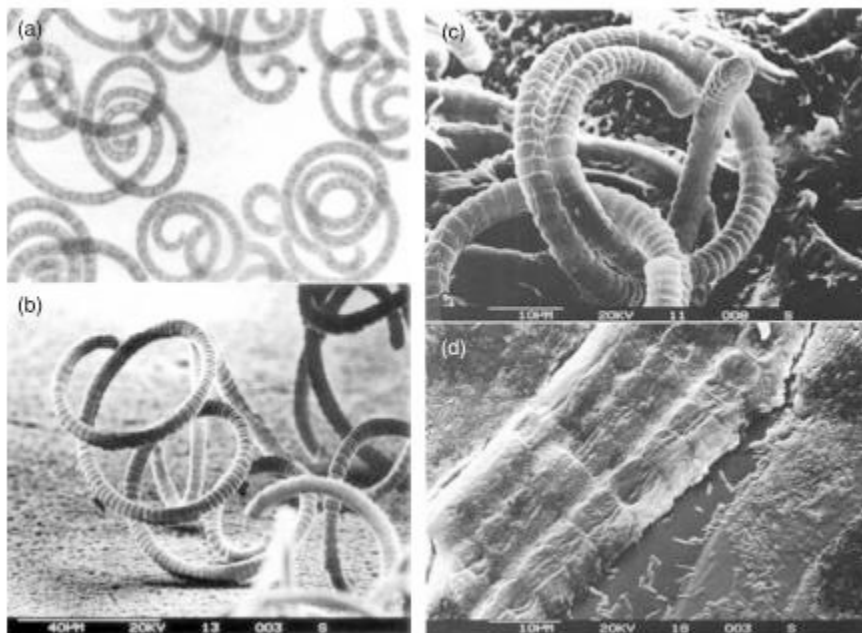


Figure 7. morphologie de la spiruline: (a)- sous microscope optique (b) Micrographie électronique d'*Arthrospira platensis* (c)- Micrographie électronique d'un trichome d'*Arthrospira platensis*(d) Micrographie électronique de non axénique de *S. platensis*

(Ciferri, 1983)

7.2.2. Reproduction

Le cycle biologique de la Spiruline selon Ciferri et al (1983) est le suivant (Figure 8) : un filament en maturité forme des cellules spéciales appelées nécriides, au niveau de ces cellules le trichome se fragmente pour donner naissance à de nouveaux individus de courtes chaînes (2 à 4 cellules) appelées hormogonies. Par division binaire des cellules, les hormogonies croissent en longueur et prennent la forme typiquement hélicoïdale. Dans les conditions expérimentales, le temps de génération maximal de la Spiruline est voisin de 7 heures (Zarrouk, 1966).

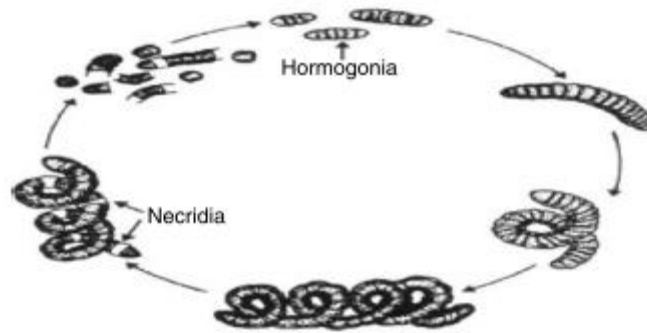


Figure 8. Cycle biologique de la Spiruline (Ciferri et *al.*, 1983)

Matériel et

Méthodes

Matériels et Méthodes

III. Matériels et méthodes :

Cette partie du manuscrits présente le matériel et méthodes que vous avions prévu de faire et que nous n'avons malheureusement pas pu achever.

1. Matériel biologique :

Ce travail porte sur la microalgue *Nannochloropsis gaditana* et *Spiruline platensis*. Ces souches proviennent du Laboratoire d'Aquaculture et de Bioremédiation (AquaBior) du département de Biotechnologie à l'université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella. La souche nous a été fournie en forme de poudre.

2. Préparation de la chambre de culture :

La chambre de culture se situe au niveau du laboratoire de biochimie2 a la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie . Cette chambre contient une armoire de deux étages équipée de 08 néons de lumière blanche artificielle LED à 24 W. (figure 9).



Figure 9. La chambre de culture

La chambre est équipée à 04 néons fixes, et deux oxygénateurs pour alimenter et agiter notre souche de l'oxygène, Chaque flacon est branché à un tuyau muni d'un filtreur de 0.45 micromètre pour éviter les contaminations apportées par l'oxygénateur.

Matériels et Méthodes

3. Milieu de culture :

3.1. Echantillonnage de l'eau de mer

Un échantillon de 10 litres a été rempli dans un girécain de plastique de 10 litres, ce dernier a été emmené au niveau du laboratoire de Biochimie 2 pour être utilisé par la suite.

3.2. Traitement de l'eau

3.2.1. Filtration

La filtration de l'eau de mer a été faite par le papier filtre Whatman 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 de l'eau a été autoclavé pendant 20 minutes à 120°C pour éliminer tous les microorganismes.

3.3. Préparation du milieu Guillard f/2

Le milieu de culture utilisé dans notre travail est de Guillard f/2 (Guillard and Ryther 1962). Les préparations sont faites pour 1 litre de l'eau de mer en suivant la composition décrite ci-dessous (Tableau 2)

Tableau 2. Composition du milieu de culture de Guillard and Ryther (1962).

Volume	Composé	Concentration de la solution stock (stérile)
1 ml	NaNO ₃ ($8,82 \cdot 10^{-4}$ M)	✓ 75 g/l
1 ml	NaH ₂ PO ₄ ($3,62 \cdot 10^{-5}$ M)	✓ 5,65 g/l
1 ml	Métaux traces	✓ Na ₂ EDTA : 4,16 g/l ✓ FeCl ₃ .6H ₂ O : 3,15 g/l ✓ CuSO ₄ .5H ₂ O : 0,01 g/l ✓ ZnSO ₄ .7H ₂ O : 0,022 g/l ✓ CoCl ₂ .6H ₂ O : 0,01 g/l ✓ MnCl ₂ .4H ₂ O : 0,18 g/l ✓ Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O : 0,006 g/l
0,5 ml	Vitamine	✓ Vitamine B12 ✓ Vitamine B1

Matériels et Méthodes

On a utilisé de l'eau distillée pour la préparation des solutions stocks.

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.

3.3.1. Les composants de milieu Guillard f/2 :

- ✓ Solution stock de Nitrate de sodium (NaNO_3) à $8,82 \cdot 10^{-4}$ M.
- ✓ Solution stock de Dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4) à $3,62 \cdot 10^{-5}$ M.
- ✓ Solution stock de Métaux traces
- ✓ Solution stock Vitamine (trois B).

4. Conditions de travail

Les conditions de travail doivent être respecté avant chaque mise en culture, car les techniques exigent beaucoup de soins.

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).

Alors, il est possible de travailler en conditions stériles dans cette sphère.

5.1. Préparation de la culture mère (préculture)

On a réalisé une préculture de 7 jours dans les conditions précédemment citées (pour le lancement des paramètres de l'étude, et afin de faire l'inoculation à partir d'une culture jeune). La culture est faite en triplicatas dans des flacons de 500 ml à un volume final de 350 ml.

6. Suivre de la croissance cellulaire

6.1. La densité optique (DO)

On parle d'une méthode de mesure indirecte de la biomasse. La mesure à 750nm indique la turbidité d'une solution microalgale ce qui permet une estimation de la concentration en biomasse. C'est effectuée quotidiennement et une seule fois par jour par un Spectrophotomètre visible de (6715 UV / Vis Spectrophotomètre JENWAY)

6.2. Le comptage des cellules algales

Le comptage dans les réacteurs permet le suivi de l'évolution en nombre des microalgues présentes en solution. Le comptage se fait à l'œil nu à l'aide d'un microscope (grossissement x40), en utilisant une lame gravée (cellule de Malassez) (Figure 10). Le principe est de compter le nombre de microalgues emprisonnées dans une surface et une épaisseur bien précise de la cellule, limitée par le gravage. Une dilution de la solution est nécessaire si les microalgues sont trop encombrées et difficile à compter.

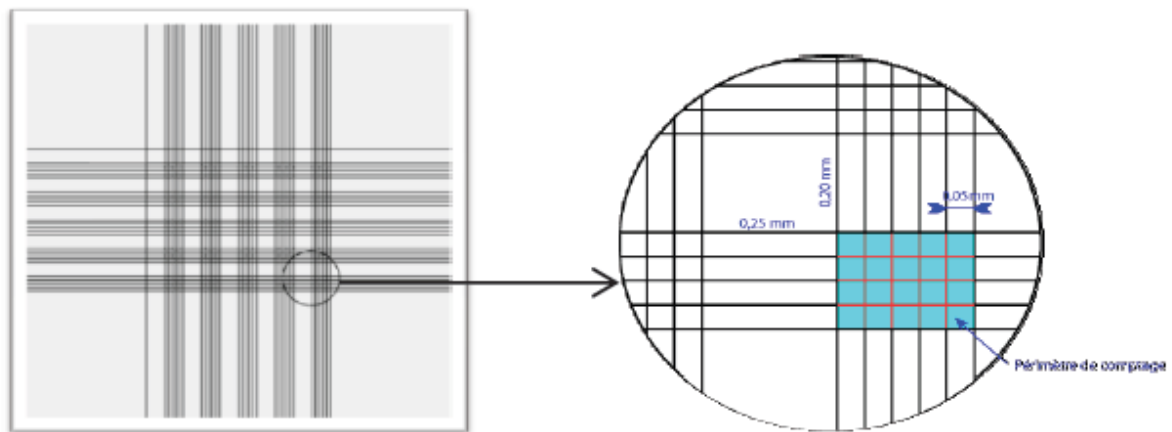


Figure 10. Vue d'une coupe de la gravure d'une cellule de Malassez.

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

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

7. Détermination de la concentration et la composition des pigments :

Le contenu en pigments est déterminé par une méthode spectrophotométrique. Ainsi, un volume noté V_1 de la culture, placé dans un Eppendorf, est centrifugé pendant 10 minutes à 12000 rpm. Ensuite, le surnageant est éliminé et le culot est mis en suspension dans un volume V_2 convenable de méthanol (99.8%) pendant une durée minimale de 30 minutes et

Matériels et Méthodes

maximale de 3 heures, à 44°C et à l'obscurité. Par la suite, les débris cellulaires sont précipités et séparés par centrifugation pendant 5 minutes à 12000 rpm; la couleur blanche du culot est un moyen de vérification que l'extraction est complète. L'absorbance du surnageant contenant les pigments dissous dans le méthanol est mesurée à différentes longueurs d'onde (480, 652, 665 et 750 nm). La mesure de la densité optique à 750 nm (inférieure à 0.01) permet de vérifier l'absence de turbidité (débris cellulaires restantes, bactéries, etc...). Trois réplicats sont préparés. Les valeurs moyennes de ces absorbances notées A^{480} , A^{652} , et A^{665} sont finalement utilisées pour calculer les concentrations de la chlorophylle *a*, la chlorophylle *b* et les caroténoïdes de protection (PPC pour *PhotoProtectiveCarotenoides*) via les équations de (Ritchie, 2006) pour les chlorophylles et de (Strickland and Parsons, 1968) pour les caroténoïdes:

Équation 01

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

Équation 02

$$[Chl-b] (\mu g/ml) = [27.4405 * A^{652} - 12.1688 * A^{665}] * V_2 l^{-1} V_1^{-1}$$

Équation 03

$$[PPC] (\mu g/ml) = [4.0 * A^{480}] * V_2 l^{-1} V_1^{-1}$$

avec l^{-1} la profondeur optique de la cuve exprimée en cm.

*Synthèse et
interprétation des
résultats trouvés par
différents auteurs*

Synthèse et interprétation des résultats

IV/ Synthèse et interprétation des résultats

En vue des circonstances (contexte COVID19), nous étions dans l'incapacité d'effectuer la partie matériel et méthodes prévu pour notre mémoire de master II. Nous avons donc présenté la partie résultats et discussion sous forme d'étudier d'articles scientifiques. Les articles en question sont les suivant :

- *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commerciallyvaluable pigments (Lubián *et al.*, 2000)
- The Growth of *Spirulina platensis* in Different Culture Systems Under Greenhouse Condition (GÖKSAN *et al.*, 2007)

1. Production de biomasse

Toutes les souches de *Nannochloropsis* étudiées par Lubián *et al.* (2000) ont un schéma de croissance similaire, atteignant des densités d'environ 10^8 cellules mL^{-1} après 10 à 15 jours de croissance.

Dans l'expérience de GÖKSAN *et al.* (2007), tous les groupes ont été initiés avec $0,12 \text{ g L}^{-1}$ de poids sec.

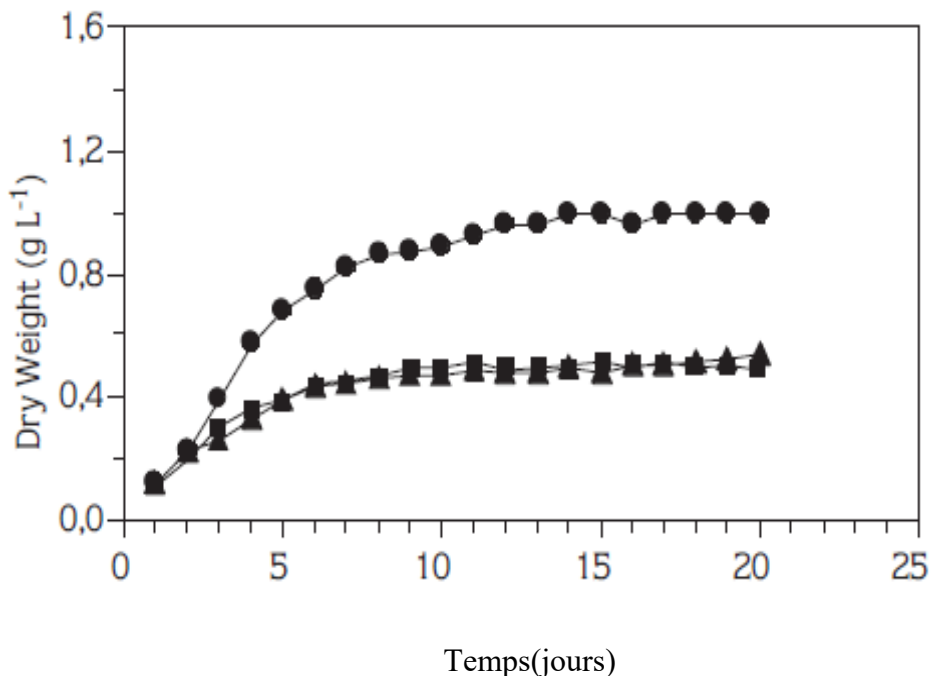


Figure 11. Modifications des quantités en poids sec de *Spirulina platensis* cultivé en pots transparents (l), sacs PE (n) et race ay étang (s).

Synthèse et interprétation des résultats

L'augmentation rapide de la concentration de la biomasse de *Spirulina platensis* est poursuivie jusqu'à le 6ème jour dans le sac et l'étang, alors qu'il augmentait jusqu'au 8ème jour dans le pot. Après que les cellules aient été limitées par la lumière, la croissance était presque constante montrant une légère augmentation (Figure 11). Les valeurs de la concentration de la biomasse (DW) à la fin de l'expérience étaient de 0,99, 0,52 et 0,49 g L⁻¹. Aucun changement significatif a été observé entre l'étang et cultures en sacs en termes de valeurs DW ($P < 0,05$).

2. pH de la culture

Le pH de la culture est un autre paramètre de croissance qui doit être strictement surveillé. Les valeurs de pH les plus élevées obtenus dans l'expérience étaient de 9,9, 9,9 et 11,2 pour les cultures en étang, en sac et en pot. Bien que la *spiruline* soit un organisme vivant dans des milieux alcalins, les valeurs supérieures à 10,3 étaient avéré nocif pour la culture (Richmond *et al.* 1980).

3. Production des pigments

Les changements dans la concentration cellulaire en chlorophylles sont montrés dans Figure 12. Les cultures en pot et en sac ont augmenté la concentration cellulaire en chlorophylle jusqu'aux jours 11 et 14, atteignant les niveaux maximaux de 5,71 et 4,33 mg L⁻¹, respectivement, puis légèrement diminué. Cependant, la culture en étang a montré une constante augmentation, indiquant que la culture en étang s'est développée activement toute la période d'expérimentation. De même, les lectures d'absorbance à 680 nm ont indiqué le même modèle que les mesures DW.

Les résultats ont montré que toutes les souches *Nannochloropsis* étudiées ici ont montré une composition pigmentaire similaire, qui est en accord avec la composition précédemment rapportée dans la littérature pour *Nannochloropsis* souches (Antia *et al.*, 1975; Lubián & Establier, 1983; Owens *et al.* 1987).

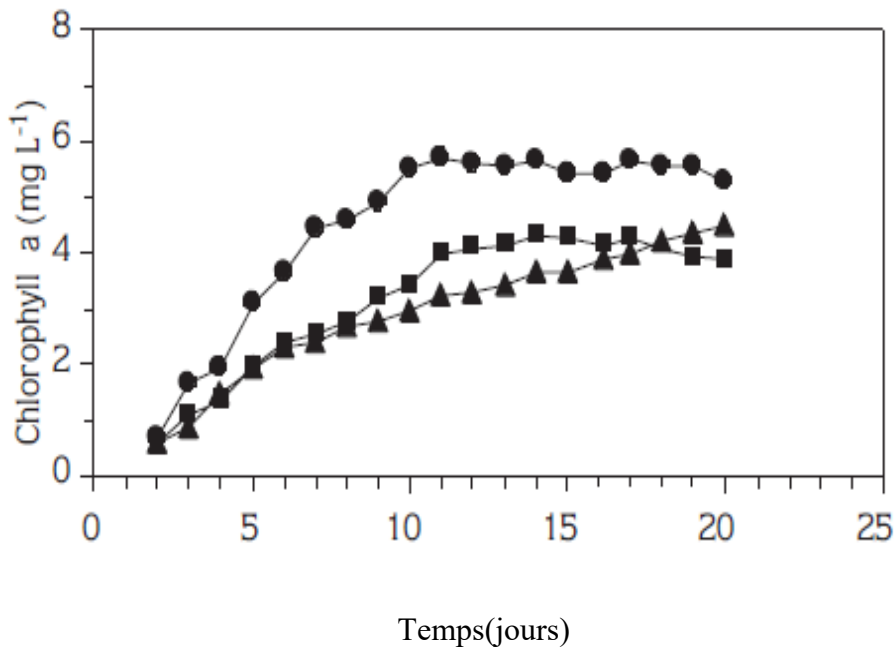


Figure 12. Modifications de la chlorophylle et des quantités de *Spirulina platensis* cultivé en pots transparents (l), sacs PE (n) et raceway étang (s).

Chez *Nannochloropsis* étudiées, les proportions relatives (exprimées en pourcentage) de chacun des principaux caroténoïdes par rapport au total la teneur en caroténoïdes et des chlorophylles a après 10 et 20 jours de croissance est présenté dans le tableau 1 (Lubián et al., 2000).

La Violaxanthine et vaucheriaxanthine se sont avérés être les caroténoïdes les plus abondants toute la période de croissance de toutes les algues, mais la violaxanthine le contenu diminue avec le temps, ce qui rend valeur après 20 jours qu'après 10 jours de croissance, tandis que les teneurs en anthéroxanthine et en zéaxanthine ont augmenté. La teneur en vaucheriaxanthine n'a diminué que chez *N. Salina* et *N. gudituna*, pour laquelle une augmentation du teneur relative en céto-caroténoïdes canthaxanthine et l'astaxanthine était particulièrement évidente. Ces espèces présentaient également une teneur plus faible en chlorophylle a.

Accumulation secondaire de caroténoïdes est connu depuis longtemps pour être favorisé par la privation d'azote dans les cultures âgées de nombreuses espèces de microalgues. il existe une concomitance entre l'arrêt de la chlorophylle et la synthèse des caroténoïdes (Major Gzygan, 1968).

Synthèse et interprétation des résultats

Tableau 3 : Proportions relatives (exprimées en pourcentage) de chacun des principaux caroténoïdes par rapport au total la teneur en caroténoïdes et des chlorophylles a .

Pigment (%)	day	<i>N. oculata</i>	<i>N. salina</i>	<i>N. gaditana</i>
Violaxanthin	10	48.9	47.7	37.1
	20	32.0	28.0	31.7
Astaxanthin	10	2.6	5.4	6.7
	20	3.4	9.6	12.4
Antheraxanthin	10	0.9	3.4	3.5
	20	5.6	5.2	6.1
Vaucherixanthin	10	45.3	32.9	46.Y
	20	47.2	26.5	22.x
Zcaxanthin	10	0.8	1.3	1.0
	20	1.8	5.9	4.9
Canthaxanthin	10	1.5	7.3	4.5
	20	4.5	15.9	16.9
β-carotene	10	n.d.	n.d.	n.d.
	20	5.5	8.8	s.2
Chlorophylla α	10	116.4	116.8	92.6
	20	168.6	103.X	X9.7
Car/Chl α	10	0.6	0.6	I . I
	20	0.8	1.3	I . I

4. Effet de la salinité sur la production de pigments

Il n'y avait pas d'effet clair de la salinité (15 et 100 Practical unités) sur la teneur en pigments de *N. gaditana* puisque la variation du contenu relatif des différents caroténoïdes avec les différentes salinités était négligeable (Figure 13). Toutefois, une augmentation de la teneur en zcaxanthine concomitante à une diminution de la teneur en violaxanthine à la salinité 100 unités pratiques était remarquable. Étant donné que la teneur en cétocaroténoïde était faible en raison de l'analyse des pigments effectuée après seulement 10 jours de croissance, un schéma

Synthèse et interprétation des résultats

bien défini de variation avec la salinité n'a pu être trouvée pour le cétocaroténoïdes (figure 13). Le contenu le plus élevé était trouvé pour la canthaxanthine à la salinité 15 unités pratiques(19,4 ng [10⁶cells]⁻¹), et pour l'astaxanthine à la salinité 36 unités pratiques (14,6 ng [10⁶cells]⁻¹).

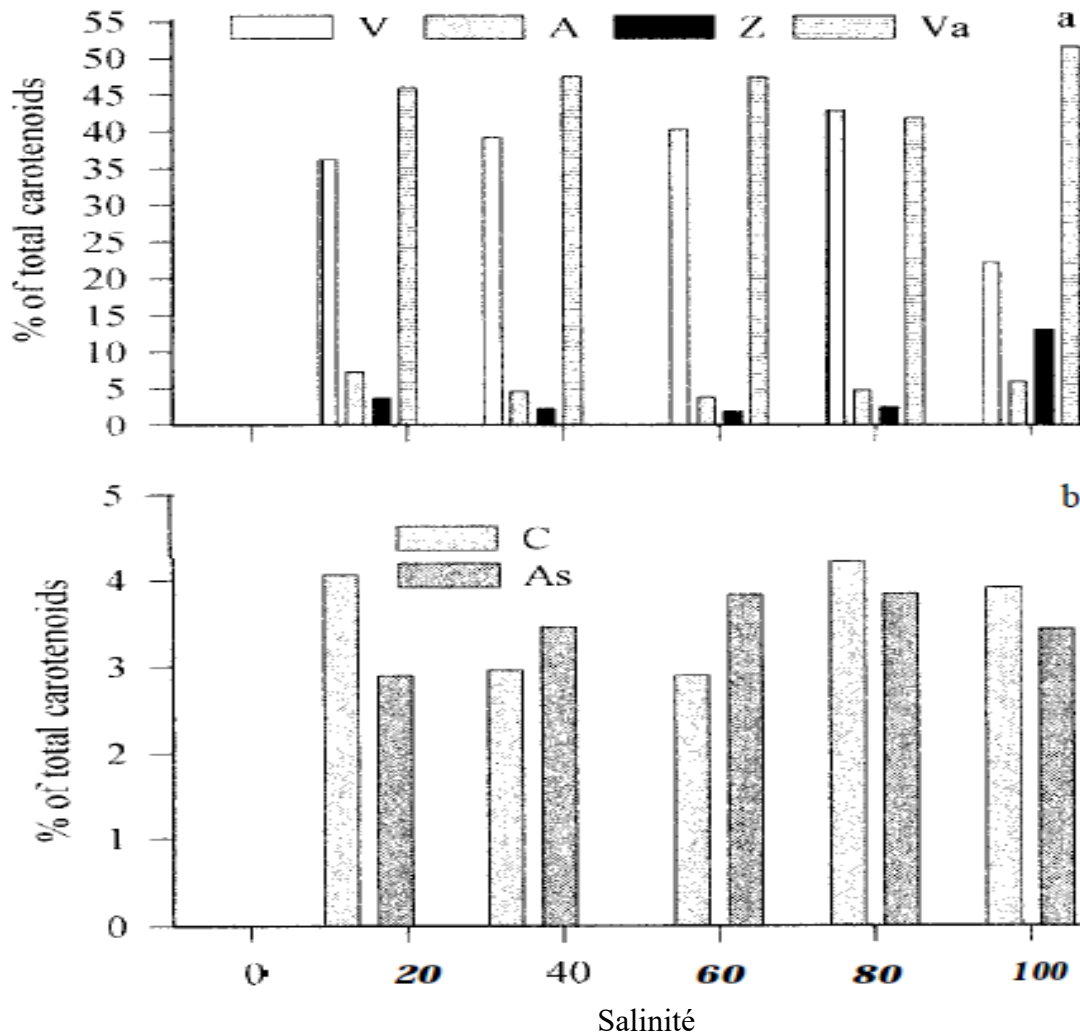


figure 13. Contenu des principaux caroténoïdes de *Nannosloropsis gaditana* à différentes salinités (a) V = violaxanthine. A = antheraxanthine. Z = zéaxanthine. Va = vauchriaxanthine: (b) C = canthaxanthine As = astaxanthine.

Un effet combiné de l'intensité lumineuse et de la concentration de nitrate sur le contenu cellulaire de la canthaxanthine a été démontré chez *N. gaditana* par Lubián et al. (1986). Ces auteurs ont obtenu la plus forte concentration de canthaxanthine dans la culture exposée à la plus basse concentration de nitrate (0,2 mM) et irradiée la plus élevée (4000 lux) analysés

Synthèse et interprétation des résultats

dans leur étude, mais la biomasse et le volume de culture de la production était faible sous ces conditions.

Conclusion

Conclusion

Conclusion :

Les micro-algues, même si elles ne sont pas encore suffisamment explorées, sont actuellement décrites comme une source potentielle de substances bioactifs dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique. Ces substances possèdent une grande valeur sur le marché international et leur demande augmente au même rythme que le développement de la technologie industrielle, la biotechnologie et la demande internationale de nouveaux médicaments et denrées alimentaires.

Ce travail nous a permis de conclure que l'effet de la température était supérieur à la lumière. À cet égard, l'utilisation de cultures de petit volume augmenteraient la température plus rapide dans des conditions de serre, ce qui est le principal facteur gênant la croissance surtout en période hivernale.

De plus, l'utilisation de courtes distance de lumière en plus aux petits volumes de culture permettra d'augmenter significativement la productivité. Un autre point important était l'utilisation des macronutriments dans l'expérience à mi-concentration. Certains des usines commerciales de production de microalgues utilisent le milieu Zarrouk moyen dans les étangs à demi-force pour réduire les coûts des nutriments.

Dans l'expérience menée sur *Nannochloropsis*, la composition du pigment et sa variation avec l'âge de la culture ont été analysées dans six souches de *Nannochloropsis*. La capacité d'accumulation des cétocaroténoïdes, astaxanthine et canthaxanthine était plus élevée chez *N. salina* et *N. gaditana* que dans les autres souches étudiées. Les résultats indiquent que *Nannochloropsis* est une source de pigments précieuse, non liée à sa capacité d'accumulation de pigment unique, mais à la disponibilité d'une gamme de pigments tels que chlorophylle α , zéaxanthine, la canthaxanthine et l'astaxanthine, chacune avec des niveaux de production élevés.

Références

bibliographiques

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

Antia NJ, Bisalputra T, Cheng JY, Kalley JP(1975) Pigment and cytological evidence for reclassification of *Nannochloropsis oculata* and *Manallantus salina* in the Eustigmatophyceae . J. Phycol . 11 :339-343.

Apt, K. E. & Behrens, P. W. Commercial developments in microalgal biotechnology Journal of Phycology, 1999, 35, 215-226

Barsanti, Laura et Paolo Gualtieri. 2006. « Algae - Anatomy, biochemistry, and biotechnology ». CRC Press, Taylor & Francis Group. 301 p.

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

Becker Microalgae Biotechnology and microbiology. Cambridge Press University.- 1994.

BENEMANN J.R . TILLET D ., WEISSMAN J.C., Microalgae Biotechnology [Section du livre]. - 1987.

Benzidane D. Baba Hamed M.B. and Abi-Ayad S.-M. E.-A. 2017. Biodiesel production from marine microalgae *Nannochloropsis gaditana* by in situ transesterification process. African Journal of Biotechnology.

Berera, R., van Stokkum, I. H. M., Gwizdala, M., Wilson, A., Kirilovsky, D. & van

Bernard Cadoret J.-P and La production de biocarburant lipidique avec des microalgues :

Biofixation de CO₂ par les microalgues Modélisation, estimation et commande. [Livre]. - [s.l.] :ISTE, 2014.

Brennan, L. & Owende, P. Biofuels from microalgae--A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2010, 14, 557-577.

Burlew, J. S. Algal culture from laboratory to pilot plant Carnegie Institution of Washington, 1953, 357.

BURLEWJS (editor), 1953. Algaeculture from laboratory topilotplant. CarnegieInst.Wash.Publ.No.600.

Carlsson A.S . Van Beilen J.B ., MOLLER R ., CLAYTON D., Micro- and macro algae: utility for industrial application [Section du livre]. - 2007.

Chisti Biodiesel from microalgae beats bioethanol [Livre]. - 2008. - pp. 126-131. - 26.

Références bibliographiques

- Chisti, Y. Biodiesel from microalgae *Biotechnology Advances*, 2007, 25, 294-306.
- Chynowth Review of biomethane from marine biomass, [Livre]. - 2002.
- Ciferri.O., 1983. Spirulina, the edible microorganism. *Microbiol. Rev.* 47(4), 551-578.
- Claude P., 2008. Quelques particularités biologiques : Les formes et la reproduction des al
- Cruchot H, 2008. La Spiruline, Bilan et Perspective. Thèse docteur en pharmacie. Université de France-Comite.gues.
- Del Campo, J. A., Moreno, J., Rodriguez, H., Vargas, M. A., Rivas, J. & Guerrero, M. G. 2000. Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta). *J. Biotechnol.* 76:51-9.
- Fox R.D., 1996. Spirulina, production & potential . Aix en Provence : Edisud.
- Giraldine-Andréani C, 2005. Spiruline, système sanguine, système immunitaire et cancer. *Phytothérapie*: 158-161.
- GÖKSAN et al. (2007). The Growth of *Spirulina platensis* in Different Culture Systems Under Greenhouse Condition , *Turk J Biol*, 31:47-52.
- Grondelle, R. 2012. The photophysics of the orange carotenoid protein, a light-powered molecular switch. *J. Phys. Chem. B* 116:2568-74.
- Gzygan FC (1968) Sekundär-Carotinoide in Grünalgen . I.Chemie, Vorkommen and faktoren, Welche die bildung dieser Polyrnr beeinflussen. *Arch. Mikrobiol.* 61 :81-102 .
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54, 621-639.
- Jordan J P, 1999. Cultivez votre spiruline : manuel de culture artisanal .Publication Antenna Technologies.
- Lamers, P. P., Janssen, M., de Vos, R. C. H., Bino, R. J. & Wijffels, R. H. 2008. Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications. *Trends Biotechnol.* 26:631-8.
- Langley, N.; Harrison, S. & van Hille, R. A critical evaluation of CO₂ supplementation to algal systems by direct injection *Biochemical Engineering Journal*, 2012, 68, 70-75
- Legrand, J. (2002). Les microalgues pour quoi faire?

Références bibliographiques

- Lubián et al., (2000). *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable Pigments, *Journal of Applied Phycology*, 12 : 249-255.
- Lubián LM. Establier R (1983) Quantitative variations of pigments of *Nannochloropsis gaditana* Lubián. 1983 (Eustigmatophyceae) during its growth in culture. *Inv. Pesq.* 47 :29-38.
- Lubián LM. Establier R. Ruiz E (1986) Light and nitrate influence on the growth and pigment contents of *Nannochloropsis gaditana* Lubián in culture. *Inv. Pesq.* 50 :499-518 .
- 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
- Mélanie S., 2009. Opportunités de développement de la filière microalgues à l'île de la Réunion ARER - Agence Régionale Energie Réunion - Association loi 1901 à but non lucratif Organisme de formation agréé Rapport de stage.
- Michaud J.C., 2016 . STRATÉGIE DE CULTURE ALGALE EN DEUX ÉTAPES AFIN DE PRODUIRE DES BIOCARBURANTS, Thèse, Université du QUEBEC.
- Owens TG, Gallagher JC, Alberte RS (1987) photosynthetic light harvesting function of violaxanthin in *Nannochloropsis* spp. (Eustigmatophyceae). *J. Phycol.* 23 :79-85.
- Packo P. Lamers, Dirk E. Martens, and René H. Wijffels , (2014). PHOTOTROPHIC PIGMENT PRODUCTION WITH MICROALGAE: BIOLOGICAL CONSTRAINTS AND OPPORTUNITIES¹, *Phycological Society of America*, 50 : 229–242 .
- promesses et défis. *Journal de la société biologique*, 202(3) :201-211. [Livre]. - 2008.
- Pulz O., Gross W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 635–648.
- Razzak, S. A.; Hossain, M. M.; Lucky, R. A.; Bassi, A. S. & de Lasa, H. Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing—A review *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2013, 27, 622-653
- Richmond A, Vonshak A, Arad SM. Environmental limitations in outdoor production of algal biomass. In: Shelef G, Soeder CJ. eds. *Algae Biomass*, Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press; 1980: pp. 65-72.
- Richmond A, (Ed.). 2004. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science, Oxford, OX, UK ; Ames, Iowa, USA.
- Ritchie, R.J., 2006. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth. Res.* 89, 27–41.

Références bibliographiques

Rowe, K. S. & Rowe, K. J. 1994. Synthetic food coloring and behavior: a dose response effect in a double-blind, placebocontrolled, repeated-measures study. *J. Pediatrics* 125:691–8.

Salle M, Dankoko B, Badiane M, Ehua E, Kuakuwi N,. 1999. La spiruline: une source d'alimentation à promouvoir. *Médecine d'Afrique Noire*. Vol 46, N°: 87-92.

Scholz mJ, Weiss TL, Jinkerson RF, Jing J, Roth R, Goodenough U, Posewitz MC, Gerken HG. Ultrastructure and composition of the *Nannochloropsis gaditana* cell wall, *Eukaryot Cell*, 2014 Nov ; 13(11) : 1450-64.

Sierra, E.; Ación, F.; Fernández, J.; García, J.; González, C. & Molina, E. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae *Chemical Engineering Journal*, 2008, 138, 136-147.

SihemTebbaniRayenFilali, Didier Dumur, Supelec, Filipa Lopes, Dominique Pareau, Sukenik, A., Livne, A., Neori, A., Yacobi, Y. Z. & Katcoff, D. 1992. Purification and characterization of a light-harversing chlorophyll- protein complex from the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *Plant Cell Physiol*. 33:1041–8.

Stolz, P. and Obermayer B. 2005 Manufacturing microalgae for skin care. *Cosmetics Toiletries*, 120: 99–106

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

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

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.

Tomaselli L. 2002. Morphology, Ultrastructure and Taxonomy of *Arthrospira*(*Spirulina*) *maxima* and *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*, in: Vonshak A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) *Physiology, Cell Biology and Biotechnology*, Taylor & Francis, London, pp.1-17.

Wang D, k Ning, J Li, D han, d Wang, X Zeng, X Jing, Q Zhou, X Su, X Chang, A wang, W Wang, J Jia, L Wei, Y Xin , Y Qiao, R Huang, J Chen , B Han, K Yoon, RT Hill Y Zohar, f Chen, Q Hu and J Xu. 2014. *Nannochloropsis* genomes reveal of microalgal oleaginous traits. *PLOS Genetics* 10 : 1-13.

Zarrouk C., 1966. Contribution à l'étude d'une cyanophycée influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch. et Gardner) Geitler. Thèse doctorat. Université de Paris.