

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

Elarbi Daouadji Ameer et Forlou Kheir Eddine

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER

En Hydrobiologie Marine et Continentale

**Spécialité: EXPLOITATION ET PROTECTION DES
RESSOURCES MARINES VIVANTES**

Thème

**Effet de la carence en azote et en phosphate 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. BORSALI Sofia.	MCB	U. Mostaganem
Encadreur	Mme. BENZIDANE Dehiba.	MAA	U. Mostaganem
Co-Encadreur	Dr. BELHAKEM Fadela	MCA	U. Mostaganem
Examineurs	Mme. BILLAMI Malika	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.

Je remercie mon professeur et co-encadreur **Dr. BELHAKEM Fadela**, qui m'a aidé de façon considérable et m'a autorisé à exprimer toutes mes idées librement afin de réaliser ce travail.

Ma gratitude revient à **Dr. BORSALI Sofia**, 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 **Mme. BILLAMI Malika**, 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 travail à :

Ma grande mère et mon grand père que Dieu me les garde et protège.

*Mes oncles et mes tantes pour tout ce qu'ils ont fait pour moi, et
surtout HAMA et YOUSEF.*

Tous les membres de ma famille, grands et petits.

*Tous mes amis: Yousef, Hama, Farid, Yahia, Yassine, Abdaka,
Howari, Mostafa Kbayli, Hamid, Belbey, Houda, Nazima, Hamida,
Malika, Miloud, Lhadj, Islam, Mohammed, Brahim, Hamouda, Aïssa,
Ahmed.....etc.*

*Tous mes collègues de l'université: Yaser, Amine, Louti, Jawad, Sami,
Nazihha, Smail, Amine, Wali, Abdou, Bagda, Douadji, Fodil, Hamlimi,
Abdaga, Halimi, Nouri, Khoujaetc.*

*Mon regretté ami YUCEF, que Dieu lui accorde sa miséricorde et
l'accepte dans son vaste paradis.*

*Tous les étudiants de ma promotion, surtout de la cinquième année
option: Science de la Mer et de l'Aquaculture.*

Enfin, à tous ceux qui me connaissent et m'aiment.

ELARBI DAOUADJI Ameer

Dédicace

Je dédie ce travail à :

*Mes très chers parents pour leurs Encouragements et leurs
Soutenances durant chaque étape de ma vie.*

Mon petit frère et Mes sœurs

*Mes chers amis (es) : Ouali ElAmine, Kacem Smaïl, Elarbi Daouadji
Ameur, Hamid Belbey, Mostafa Kbayli...etc.*

Toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce travail.

*Toute ma promotion du département des Sciences de la Mer et de
l'Aquaculture*

2016/2017.

Forlou Kheir Eddine

Résumé

Les microalgues suscitent aujourd'hui un intérêt grandissant tant les applications qui convergent autour de ces cellules sont nombreuses. De la production d'énergie, à la nutrition humaine et animale, en passant par le traitement des rejets anthropiques, chercheurs et industriels s'investissent dans ces vastes domaines d'application. Il y a aujourd'hui une multitude de verrous scientifiques et technologiques qui méritent d'être levés.

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 causé par une carence en phosphate et 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 et en phosphate sont en effet efficaces pour stimuler la production de lipides. Il faut donc trouver un compromis entre croissance et richesse en lipides.

Des études ultérieures permettront d'optimiser ces teneurs. Ainsi, dans une première approche, la culture des microalgues pourrait être scindée en deux phases : une phase de croissance rapide dans un milieu riche favorable et une phase de stockage des lipides après une carence en phosphate et en azote.

Mots clé :

Microalgue, énergie, *Nannochloropsis gaditana*, phosphate, azote, lipide.

SOMMAIRE

	Page
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
I/ Introduction.....	1
II/ Synthèse Bibliographique.....	2
1. Généralité sur les microalgues.....	3
1.1. Définition et caractéristique.....	4
1.2. Classification des microalgues	4
1.2.1. Les bacillariophycées (diatomées)	4
1.2.2. Les dinophycées (dinoflagellés)	5
1.2.3. Les rhodophycées (microalgues rouges).....	6
1.2.4. Les chlorophycées (microalgues vertes)	6
1.2.5. Les Eustigmatophyceae	6
1.2.6. Les algues bleues	7
1.3. Cinétiques de croissance des cultures phytoplanctoniques	7
2. La culture des microalgues	8
2.1. L'approvisionnement en nutriments	9
a) Le carbone	9
b) L'Azote	10
c) Le phosphore	10
d) Le potassium.....	10
e) Le magnésium	10
2.2. Les paramètres physico-chimiques	11
a) La lumière	11
b) La température	11
c) Le PH	11
d) La teneur en O₂ générée	12
3. Utilisation des microalgues	12
3.1. Domaine alimentaire	12
3.2. Domaine pharmaceutique	12

3.3. Domaine cosmétique	13
3.4. Domaine énergiques	13
3.4.1. Production de biométhane	13
3.4.2. Production de biocarburant.....	13
3.5. Domaine environnemental	14
4. Généralité sur l'espèce étudiée (<i>Nannochloropsis sp.</i>).....	14
4.1. Définition	14
4.2. La structure de <i>Nannochloropsis sp</i>	14
4.3. La paroi de <i>Nannochloropsis sp</i>	14
III/ Matériels et Méthodes.....	15
1. Matériel biologique.....	15
2. Préparation de la chambre de culture	15
3. Milieu de culture.....	16
3.1. Echantillonnage de l'eau de mer.....	16
3. Traitement de l'eau	17
3.2.1. Filtration	17
3.2.2. Stérilisation.....	17
3.3. Préparation du milieu Guillard f/2.....	17
4. Condition de travail	19
5. Préparation de culture mère (pré-culture).....	19
6. Plans d'expériences.....	20
7. Suivie de la croissance cellulaire	22
7.1. La densité optique (DO)	22
7.2. Le comptage des cellules algales	22
7.3. Détermination de la concentration de la chlorophylle « a » totaux	22
7.4. Détermination de la concentration des lipides	24
8. Analyse des résultats	25
IV/ Résultats.....	26
1. La morphologie de <i>Nannochloropsis gaditana</i>	26
2. Etude de la carence en azote et en phosphate	26
2.1. La coloration de la culture.....	26
2.2. Carence en azote à $2,42 \cdot 10^{-5}$ M NaH_2PO_4	28

2.1.1. Dénombrement des cellules	28
2.2.2. Densité optique.....	28
2.2.3. Concentration en chlorophylle « a »	29
2.3. Carence en azote à $1,22 \cdot 10^{-5}$ M NaH_2PO_4.....	30
2.3.1. Dénombrement des cellules	30
2.3.2. Densité optique.....	30
2.3.3. Concentration en chlorophylle « a ».....	31
2.4. Carence en azote à 0 M NaH_2PO_4	32
2.4.1. Dénombrement des cellules	32
2.4.2. Densité optique.....	32
2.4.3. Concentration en chlorophylle « a »	33
3. La teneur en lipide.....	34
V/ Discussion	35
VI/ Conclusion	38
VII/ Références bibliographiques.....	39

Liste des figures

	Page
Figure 1. Microalgues.....	3
Figure 2. <i>Cylindrotheca closterium</i>	5
Figure 3. <i>Naviculadirecta</i>	5
Figure 4. <i>Dinophysiscaudata</i>	5
Figure 5. <i>Dinophysisacuminata</i>	5
Figure 6. <i>Porphyridium cruratum</i>	6
Figure 7. <i>Chlamydomonas</i>	6
Figure 8. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	6
Figure 9. <i>Pseudocharaciopsis ovalis</i>	7
Figure 10. <i>Eustigmatospolyphem</i>	7
Figure 11. <i>Nostoc sp</i>	7
Figure 12. Cinétique de croissance des cellules Phytoplanctoniques.....	8
Figure 13. <i>Nannochloropsis gaditana</i>	14
Figure 14. L'installation de la chambre de culture.....	15
Figure 15. Programmeur de temps.....	16
Figure 16. Plage de salamandre.....	16
Figure 17. L'autoclavage.....	17
Figure 18. Les solutions mère du milieu Guillard f/2.....	18
Figure 19. Condition de travail au bec Benzein.....	19
Figure 20. Préparation de la culture mère (7 jours).....	19
Figure 21. Spectrophotomètre (Jenway).....	21
Figure 22. Cellule de Malassez.....	22
Figure 23. Vue d'une coupe et de la gravure d'une cellule de Malassez.....	22
Figure 24. Les étapes de l'extraction de la chlorophylle « a ».....	23
Figure 25. Extraction du pigment avec et sans méthanol.....	23
Figure 26. L'extraction des lipides.....	24
Figure 27. Pesé des ballons vides et avec lipides.....	25
Figure 28. Rotavapor.....	25
Figure 29. Observation microscopique des cellules <i>Nannochloropsis gaditana</i>	26
Figure 30. Effet de carence en azote et en phosphate sur la coloration de la culture de	

<i>Nannochloropsis gaditana</i>	27
Figure 31. Figure 29. Effet de la carence en azote à $2,42 \cdot 10^{-5}$ M NaH_2PO_4 sur le nombre de cellule.....	28
Figure 32. Effet de la carence en azote à $2,42 \cdot 10^{-5}$ M NaH_2PO_4 sur la densité de <i>Nannochloropsis gaditana</i>	29
Figure 33. Effet de la carence en azote à $2,42 \cdot 10^{-5}$ M NaH_2PO_4 sur le taux de chlorophylle « a » chez <i>Nannochloropsis gaditana</i>	29
Figure 34. Effet de la carence en azote à $1,22 \cdot 10^{-5}$ M NaH_2PO_4 sur le nombre de cellule de <i>Nannochloropsis gaditana</i>	30
Figure 35. Effet de la carence en azote à $1,22 \cdot 10^{-5}$ M NaH_2PO_4 sur la densité de <i>Nannochloropsis gaditana</i>	31
Figure 36. Effet de la carence en azote à $1,22 \cdot 10^{-5}$ M NaH_2PO_4 sur le taux de chlorophylle « a » chez <i>Nannochloropsis gaditana</i>	31
Figure 37. Effet de la carence en azote à $0,1 \cdot 10^{-5}$ M NaH_2PO_4 sur le nombre de cellule de <i>Nannochloropsis gaditana</i>	32
Figure 38. Effet de la carence en azote à $0,1 \cdot 10^{-5}$ M NaH_2PO_4 sur la densité de <i>Nannochloropsis gaditana</i>	33
Figure 39. Effet de la carence en azote à $0,1 \cdot 10^{-5}$ M NaH_2PO_4 sur le taux de chlorophylle « a » chez <i>Nannochloropsis gaditana</i>	33
Figure 40. Effet de la salinité sur le taux de lipide chez <i>Nannochloropsis gaditana</i>	34

Liste des tableaux

	Page
Tableau 1. Eléments majeurs constitutifs des microalgues.....	9
Tableau 2. Composition du milieu de culture de Guillard and Ryther, 1963.....	18
Tableau 3. Les concentrations en azote et en phosphate pour toutes les expériences.....	20

Liste des abréviations

% : Pour cent

μ : Micro

μg/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

I/ Introduction

Face aux risques d'une future pénurie du pétrole, de nombreux projets de recherche et développement sont en cours afin de suppléer la pétrochimie. Le pétrole est omniprésent dans notre économie actuelle, utilisé dans de nombreux secteurs et servant à la fabrication de nombreux produits : plastiques, carburants, textiles, solvants, engrais, médicaments et cosmétiques (shampoings, crèmes...), additifs alimentaires (colorant artificiel, texturant), peintures. Tout ceci est produit grâce à la synthèse chimique de composés issues du raffinage du pétrole (Rodolfi *et al.*, 2009).

L'objectif est de créer une nouvelle chimie basée sur l'utilisation de ressources renouvelables à court terme comme les microalgues : on l'appelle la chimie verte. Les avantages d'utiliser les microalgues comme ressources renouvelables sont nombreuses. Parmi celles-ci, les plus importantes sont sans aucun doute leurs rapidités de croissance et leurs productivités à l'hectare en comparaison avec les autres plantes. Dans le domaine de la valorisation de la biomasse, les microalgues possèdent un avantage concurrentiel par rapport aux autres végétaux. Il s'agit également de microorganismes ce qui permet de travailler dans le domaine des biotechnologies avec par exemple la production de molécules d'intérêt (Wolfgang, 1994).

Les microalgues sont des végétaux, leur production est une activité agricole qui fixe du carbone et ne participe pas à l'effet de serre. Elles font parti des premiers organismes à être apparus sur terre et à avoir contribué à l'élaboration de notre atmosphère actuelle en captant l'énergie solaire.

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 and Bernard, 2008), tout comme une carence en phosphate (Qiang Hu *et al.*, 2008). Ces conditions de carence ne doivent toutefois pas être maintenues trop longtemps puisqu'elles peuvent éventuellement entraîner une consommation des lipides synthétisés.

Au vue de tous ces avantages, la filière « microalgue» est vouée à se développer et particulièrement dans les régions fortement ensoleillées comme l'Algérie. C'est pourquoi notre travail vise à optimiser la composition du milieu de culture en variant les concentrations en azote et en phosphate dans le but de produire d'importante quantité de microalgue et donc de métabolites, plus particulièrement les lipides. Pour l'étude de l'effet de la carence en azote et en phosphate sur le taux de production des lipides nous avons effectués 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 simultanée en azote et en phosphate.

*Synthèse
bibliographique*

1. Généralité sur les microalgues

1.1. Définition et caractéristique

Les microalgues sont des microorganismes, dénommées également phytoplancton, sont définies comme étant unicellulaires indifférencié (Figure 1).

Les microalgues sont des organismes microscopiques, unicellulaires, leur taille varie de quelques micromètres à une centaine de micromètre. Elles vivent sous forme libre ou en colonie et appartiennent à deux groupes : les eucaryotes et les procaryotes (cyanobactéries) (Knu Key, 1998).

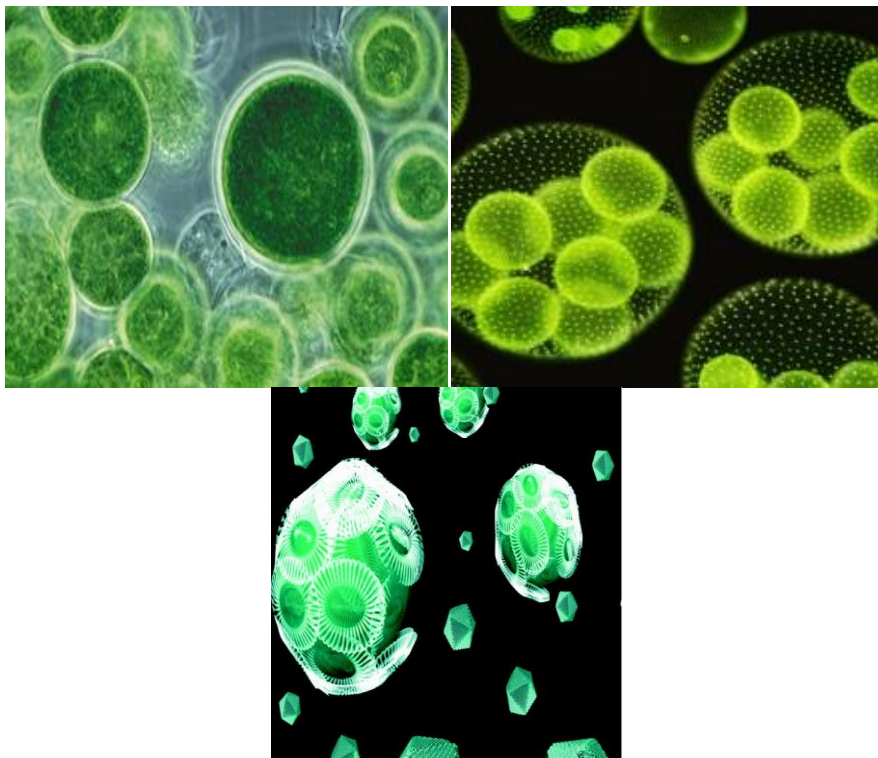


Figure 1. Photo de microalgue.

Ce sont des organismes photo autotrophes. Ils utilisent les rayons solaires afin de synthétiser leur énergie (Stevensenet *al.*, 1996). Cette réaction assure la transformation du dioxyde de carbone en énergie chimique en captant l'énergie lumineuse (Sialve *et al.*, 2013).

Ces microorganismes jouent un rôle majeur des les écosystèmes marins en tant que producteurs primaires. Ils forment le phytoplancton qui est à la base de nombreuses chaînes alimentaires (Godet, 2008).

Les microalgues sont aujourd'hui décrites comme des usines cellulaires qui utilisent comme matières premières l'énergie solaire et le carbone minéral pour produire des

biocarburants potentiels, des aliments et des molécules bioactives à haute valeur ajoutée (Chisti, 2007).

1.2. Classification des microalgues

Les microalgues constituent un groupe extrêmement hétérogène rassemblé autour d'une cohérence physiologique : la photosynthèse (Andersen, 1992). Cette famille ressemblerait de plusieurs centaines de milliers à plusieurs million d'espèce selon les estimations, parmi lesquelles 47000 espèces sont décrites (Andersen *et al.*, 1997 ; Sharma and Rai, 2011). Par comparaison, la diversité des plantes supérieures est de l'ordre de 400 000 espèces. La classification de cette diversité est complexe et la taxonomie est sujette à de fréquents.

Leurs diversité est basée sur des propriétés telles que la pigmentation, la nature chimique des produits de stockage issus de la photosynthèse, l'organisation des membranes photosynthétiques et d'autres caractéristiques morphologiques et génétique (Andersen, 1992 ; Silave and Steyer, 2013).

Il existe donc différentes classes taxonomiques dont les principales sont : les bacillariophycées (diatomées), les dinophycées (dinoflagellés), les prymnésiofycées, les xanthophycées (microalgues vert-jaune), les rhodophycées (micro algues rouges), les chlorophycées (microalgues vertes), les chrysophycées (micro algues d'or), les phéophycées (microalgues brunes) et les Eustigmatophycées (pico-plancton) (Knukey, 1998).

1.2.1. Les bacillariophycées (diatomées)

Les diatomées sont considérées comme majoritaires, car elles représentent souvent le groupe dominant parmi les populations de phytoplancton et sont extrêmement répandues dans tous les types d'habitat. Elles se distinguent des autres groupes par leur carapace de silicium et leur diploïdie. Comme toutes les microalgues, les diatomées sont unicellulaires. Elles mesurent de 2 μm à 1mm. Elles emmagasinent leurs réserves sous forme de chrysolaminarine, un polysaccharide, ainsi que sous forme de huiles. Elles sont reconnues par leur contenu en acides gras. Elles sont responsables de 20% de la production carbonée océanique (Kroth *et al.*, 2008) (Figure 2 et 3).

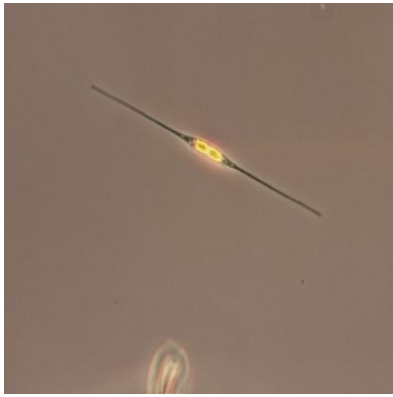


Figure 2. *Cylindrotheca closterium*



Figure 3. *Naviculadirecta*

1.2.2. Les dinophycées (dinoflagellés)

Les dinoflagellés sont des microalgues unicellulaires de couleur rouge orangé et de taille moyenne ou petite, entre 3 et 50 microns. Leurs deux flagelles leur permettent d'effectuer des déplacements tournoyants et des migrations verticales. Dans le cas des dinoflagellés de métabolisme hétérotrophe, les flagelles deviennent alors un moyen leur permettant de capturer les matières organiques qui se trouvent dans leur environnement. Cette classe regroupe beaucoup de microalgues toxiques (Figure 4 et 5). Ainsi, trois espèces principales de dinoflagellés sont redoutées : *Dinophysis* (50 microns) qui contient des toxines responsables des troubles gastro-intestinaux chez l'homme, *Alexandrium* (de 20 à 25 microns) qui produit des toxines paralysantes (entre 20 et 25 microns) (Kroth *et al.*, 2008).

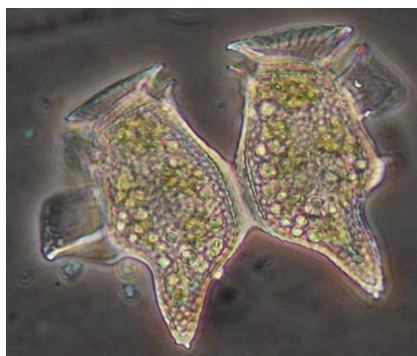


Figure 4. *Dinophysis-caudata*



Figure 5. *Dinophysis-acuminata*

1.2.3. Les rhodophycées (microalgues rouges)

Les rhodophycées se distinguent par leurs plastes appelés « rhodoplastes » colorés en rouge par les phycobiliprotéines et par la présence des synapses entre les cellules et d'amidon

floridien (Figure 6). Ces algues sont retrouvées plutôt dans les eaux salées (ex, porphyridium) et très rarement dans les eaux douces.

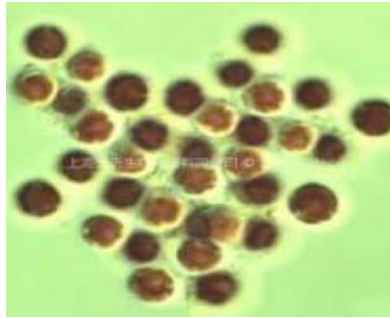


Figure 6. *Porphyridium cruentum*

1.2.4. Les chlorophycées (microalgues vertes)

Les chlorophycées sont retrouvées dans tous les types d'habitat. L'amidon et l'huile constituent leurs principales réserves énergétiques (Figure 7 et 8). Une des espèces les plus répandues est *chlorelle vulgaris*. Cette espèce est très intéressante pour la production de biodiesel en raison de son contenu intéressant en acides gras. On trouve également *chlamydomonas reinhardtii* qui est une espèce modèle dans les nombreuses études de laboratoire (Knukey, 1998).

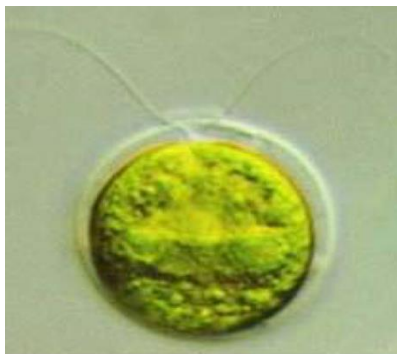


Figure 7. *Chlamydomonas*



Figure 8. *Chlamydomonas reinhardtii*

1.2.5. Les Eustigmatophyceae

Ce groupe constitue une petite division des microalgues, considérée comme une lignée distincte (Knukey, 1998). Ces microalgues se distinguent par leur coloration vert-jaunâtre due à leur composition spécifique en pigment. En effet, elles contiennent des chlorophylles de type a, sans chlorophylle b et c, et des principaux pigments accessoires comme les violaxanthine et vaucheriaxanthine. Cette classe comporte environ 20 espèces regroupées dans 11 genres (Figure 9 et 10). Tous les membres sont des microalgues unicellulaires avec

un ou plusieurs plastes pariétaux de couleur vert-jaunâtre, vivant individuellement ou en colonies. Leur environnement d'origine est le sol et l'eau douce (Knukey, 1998).



Figure 9. *Pseudocharaciopsis ovalis*



Figure 10. *Eustigmatospolyphem*

Le genre *Nannochloropsis* renferme des espèces marines caractérisées par leurs petites tailles (2-4 μm). La plupart des cellules des eustigmatophytes ont une forme coccoïde. C'est le cas de *Nannochloropsis*. Par contre ; il existe également d'autres morphologies cellulaires (ex. ovale ; ellipsoïdale ou irrégulière) (Knukey, 1998).

1.2.6. Les algues bleues

Ce sont les algues les plus simples. Elles sont souvent groupées en colonies entourées d'une masse gélatineuse, pourvues d'un noyau diffus, elles possèdent de la chlorophylle, un pigment vert-bleu mêlé au cytoplasme. On les rencontre généralement dans les eaux douces ou marines, ou sur la terre humide. Certaines sont capables de vivre dans les eaux thermales à une température de 60° à 70°C (Figure 11).



Figure 11. *Nostoc sp.*

1.3. Cinétiques de croissance des cultures phytoplanctoniques

La croissance des cultures phytoplanctoniques mises en culture présente quatre phases essentielles (Taleb, 2015):

- **Une phase de latence (1)**, pendant laquelle la croissance des cellules est lente. L'adurée de cette phase dépend des volumes respectifs d'inoculum et de milieu de culture, et

surtout de l'acclimatation de la culture mère aux nouvelles conditions dans le récipient de culture.

- **Une phase exponentielle (2)**, justement définie par le caractère exponentiel de la croissance. L'augmentation du nombre de cellules (PN) par unité de temps (dt) est alors proportionnelle au nombre de cellules présentes à l'instant t (Figure 12).
- **Une phase stationnaire (3)**, qui perdure jusqu'à ce qu'un élément, dit « limitant » (le plus souvent un élément nutritif comme l'azote ou le phosphore), atteigne une valeur qui ne peut plus satisfaire la demande des cellules (figure 11). A ce stade, le taux de croissance μ décroît jusqu'à zéro, et la culture entre en phase stationnaire : la biomasse et/ou le nombre de cellules n'augmente(nt) plus. D'autres causes, comme la diminution de la lumière disponible due à l'auto-ombrage des cellules, devenues très abondantes, peuvent aussi être à l'origine d'un fléchissement du taux de croissance, sans toutefois l'annuler.
- **Une phase de déclin (4)**, aussi appelée phase sénescence, se traduisant par la mort des cellules, lesquelles ne trouvent pas dans le milieu de culture les éléments nécessaires à leur survie. Elles libèrent alors leurs constituants cellulaires.

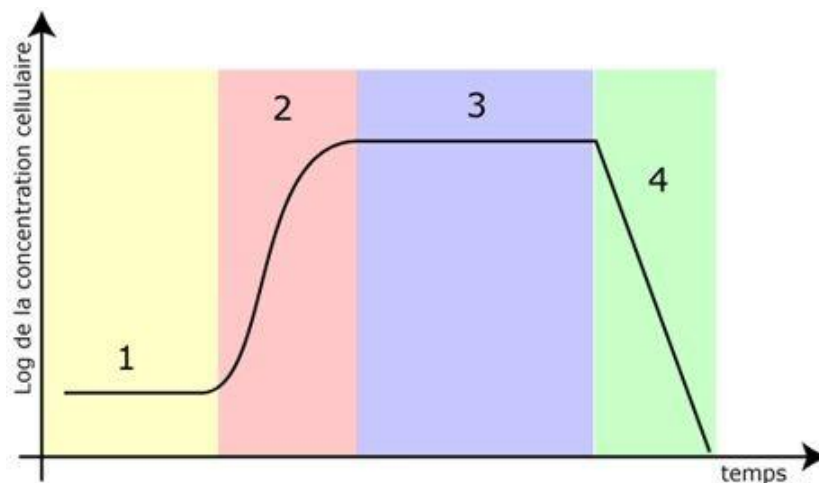


Figure 12. Cinétique de croissance des cellules phytoplanctiques mise en culture

2. La culture des microalgues

Les besoins nutritifs *des microalgues* sont similaires à ceux des plantes supérieures (Becker, 1994 ; Redfield, 1934) a proposé une élémentaire C : N : P de cette composition est relativement constante dans le milieu naturel. Le milieu de culture devra satisfaire les besoins en élément majeurs (ou macroéléments) C, H, N, O, P, S et en micro-élément encore appelés

éléments traces. Le tableau 2 montre les éléments majeurs constitutifs des microalgues (Taleb, 2015)

Tableau 1. Eléments majeurs constitutifs des microalgues.

Elément	Composition cellulaire μg/mg de poids sec	Elément	Composition cellulaire μg/mg de poids sec
C	176-650	Mg	0,5-75
O	205-330	Fe	0,2-34
H	29-100	Zn	0,005-1
N	10-140	Mn	0,02-0,24
Na	0,4-471	Si	0-230
K	1-75	B	0,001-0,25
P	0-80	Mo	0,0002-0,001
S	1,6-16	Cu	0,006-0,3
		CO	0,0001-0,2

2.1. L’approvisionnement en nutriments

a) Le carbone

Le carbone est le constituant majeur des microalgues (Van den Hende *et al.*, 2012). Si, vis-à-vis de cet élément, la plupart des microalgues mobilisent un métabolisme exclusivement photo-autotrophe (utilisation de lumière comme source d’énergie et du carbone inorganique), d’autres présentent un métabolisme hétérotrophe (utilisation du carbone organique en absence de lumière) (Bumbak *et al.*, 2011 ; Becker,1994) ; Dans le cas du métabolisme photo-autotrophe, le carbone inorganique pourra être introduit dans la culture sous forme gazeuse(CO₂) ou directement dans le milieu de culture sous la forme de carbonate (HCO₃).

Le carbone représente environ 50 % en masse de la matière sèche *des microalgues* (Sánchez Miron *et al.*, 2003). Chez les organismes autotrophes, la totalité de ce carbone est issue du CO₂. La production de 100 tonnes de biomasse algale permet donc la fixation d’environ 180 t de CO₂ (Chisti, 2007).

b) L’Azote

Ce composé est classiquement apporté sous 3 formes possibles : ammoniacque, nitrate ou urée. La forme « idéale » de l'azote est en fonction de la biologie des souches cultivées.

L'azote compte pour 7 à 10 % de la composition de la biomasse. C'est un élément indispensable au métabolisme cellulaire qui intervient notamment dans la synthèse de protéines fonctionnelles et structurelles. Il est assimilé préférentiellement sous les formes ammonium (NH_4^+) et nitrate (NO_3^-) (Becker, 1994).

c) Le phosphore

Doit être apporté en fort excès car il tend à former des complexes avec les ions métalliques qui ne sont pas assimilables (Chisti, 2000), il représente environ 1% du poids sec de la cellule. Il intervient pour l'essentiel dans le transfert d'énergie (ATP), la synthèse des acides nucléiques et la formation de la membrane cellulaire. La forme orthophosphate (PO_4^{3-}) est préférentiellement assimilée. Dans le milieu de culture, le phosphore est souvent considéré comme limitant. Sous forme ionique, il va en effet former des complexes avec la plupart des cations métalliques présents.

D'autres composés inorganiques sont déterminants dans l'activité métabolique du phytoplancton. Parmi ceux-ci :

d) Le potassium

Qui est le cation le plus abondant dans le cytoplasme, intervient comme cofacteur enzymatique.

e) Le magnésium

Est indisponible au fonctionnement de la photosynthèse (Pelmont, 2008 ; Becker, 1994).

- ✓ La plupart des éléments traces inorganiques (Br, Cu, Zn, Mo) sont mobilisés dans la composition de l'appareillage enzymatique et participent à la biosynthèse de nombreux composés (Richmond, 2008).
- ✓ L'élément trace le plus indispensable est le fer. Il intervient dans des réactions enzymatiques fondamentales : au niveau des cytochromes des chaînes respiratoires, de l'assimilation de l'azote, de la synthèse de la chlorophylle et des acides nucléiques (Becker, 1994). Enfin, un certain nombre de composés organiques sont identifiés comme des facteurs de croissance indispensables pour certaines espèces qui sont incapables de les synthétiser. La cobalamine (vitamine

B12) est fréquemment citée ainsi que la thiamine (Vitamine B1) et la biotine (Vitamine B7) (Croft *et al.*, 2006 ; Droop, 2007).

2.2. Les paramètres physico-chimiques

En plus de l'approvisionnement en nutriments, de nombreux facteurs sont susceptibles d'influencer la croissance des microalgues : des facteurs abiotiques tels que la lumière, la température, la salinité, le PH, la teneur en O₂ et des facteurs biotiques tels que des pathogènes (bactéries, champignons, virus), des compétiteurs pour les ressources ou des prédateurs (hydres, copépodes, zooplancton).

a) La lumière

Ce facteur constitue la source d'énergie primaire *des microalgues* en conditions photo-autotrophes, La qualité (spectre adéquat avec la photosynthèse).

b) La température

Si les températures sont bien caractérisées en laboratoire pour les différentes souches, l'impact des variations de la température, au cours de la journée et des saisons en souches, sur leur productivité n'est pas bien connu. De nombreuses microalgues tolèrent bien des températures inférieures à 15°C de leur optimum mais ne survient pas à 2-4°C d'excès par rapport à leur température à leur optimale (Mta *et al.*, 2010).

c) Le PH

Le pH est principalement déterminé par la concentration en CO₂. Au fur et à mesure qu'il est consommé le pH augmente. La mesure du pH sert donc d'indicateur pour modérer les flux entrants de CO₂.

d) La teneur en O₂ générée

L'O₂ générée par la photosynthèse peut atteindre une quantité 10 g/m³/min (Chisti, 2007). L'oxygène dissout à une action inhibitrice sur la photosynthèse. La limite tolérable est d'environ 40% la saturation du milieu.

3. Utilisation des microalgues

La diversité des espèces de microalgues et leur richesse en métabolites leur procurent un vaste panel dans de nombreuses applications comme le secteur de la santé, l'alimentation humaine (additifs et colorants alimentaire), cosmétique et pharmaceutique ainsi que

l'alimentation animale et bioénergie. Les composés d'intérêt essentiellement identifiés sont les lipides, les protéines, les vitamines, les polysaccharides, les pigments, les antioxydants et d'autres composants cellulaires (Person *et al.*, 2011).

3.1. 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 (AGPI), destinée à l'alimentation humaine et animale. Ces organismes sont susceptibles de synthétiser des AGPI de la série 3.

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 alimentaire, suite à la colorants artificiels (Richmond, 2004).

3.2. Domaine pharmaceutique

Au vu de leur grande diversité biochimique, les micro-algues présentent 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 micro-algues dans le domaine pharmaceutique par l'identification de nouvelles molécules naturelles (Taleb, 2015).

3.3. Domaine cosmétique

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

Des extraits d'algues, ayant une activité antioxydant, 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).

3.4. Domaine énergiques

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 œuvre d'autres types de biomasse (Chisti, 2008).

3.4.1. 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 (Chynoweth, 2002). Cependant, des verrous techniques tels que l'accessibilité des nutriments et les coûts de production élevés sont limitant.

3.4.2. 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

3.5. 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.

4. Généralité sur l'espèce étudiée (*Nannochloropsis sp.*)

4.1. Définition

Le genre *Nannochloropsis* a été décrit pour la première fois par Hibbred (1998) (Figure 13.). 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).

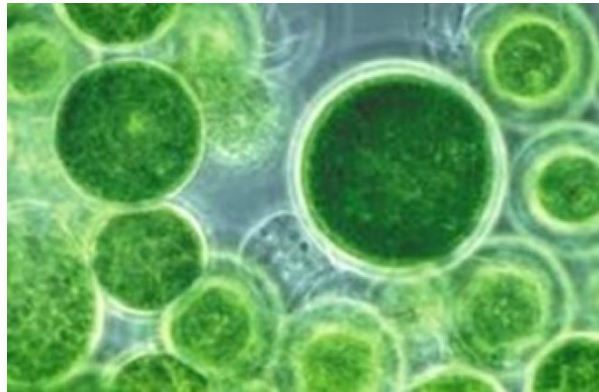


Figure 13 .*Nannochloropsis gaditana*

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 vu que la différence entre leur génome est inférieure à 20 %.

4.2. 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).

4.3. 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*

II / Matériels et méthodes

1. Matériel biologique

Nannochloropsis gaditana utilisé dans notre travail proviennent du laboratoire d'aquaculture et de Bioremédiation (Aquabior) au département de Biotechnologie de la Faculté des sciences de la Nature et de la Vie, Oran.

2. Préparation de la chambre de culture

La chambre de culture est installée au niveau du laboratoire de Biochimie 2 a la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Cette chambre contient une armoire de deux étages équipé de 8 néons de lumière blanche artificielle LED à 24 W (figure 14).



Figure 14. L'installation de la chambre de culture

Toutes les façades les intérieures de la chambre ont été enveloppées par du papier Aluminium pour réunir tous rayons lumineux. L'agitation des cultures a été assurée par un système d'agitation par bullage d'air, composé par des oxygénateurs, dont chacune est branché à un tuyau équipé d'un filtre de $0,45\mu\text{m}$ à son extrémité pour éviter toute contamination.

Une photopériode de 18 h d'illumination et de 6 h d'obscurité a été maintenue à l'aide d'un programmeur de temps (figure 15).



Figure 15. programmeur de temps

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 (figure 16). 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 16 : Plage de Kharouba

3.2. Traitement de l'eau

3.2.1. Filtration

Une fois l'eau de mer arrivée au laboratoire, il a été filtré à l'aide d'un papier Whatman (1 μ) pour éliminer toutes les matières en suspension. L'eau filtrée a été mis dans des flacons de 500 ml qui vont servir de photobioréacteur pour la culture des microalgues.

3.2.2. Stérilisation

Après le remplissage des flacons, nous avons procédé à l'autoclavage (Figure 17) de l'eau dans le but d'éliminer tous ce qui est vivant comme les microalgues, les bacteries, les zooplanctons...etc.



Figure 17 . L'autoclavage

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 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_2PO_4 ($3,62 \cdot 10^{-5}$ M)	✓ 5,65 g/l
1 ml	Métaux traces	✓ 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	✓ 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 (Figure 18).

**Figure 18.** Les solutions mères du milieu Guillard f/2.

4. Condition de travail

Avant chaque mise en culture des conditions de travail doivent être respecté, car les techniques exigent beaucoup de soins (Figure 19). Le travail doit s'effectuer dans une zone stérile à proximité du bec Benzein, la flamme est produite par un bruleur 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 19. Condition de travail au bec Benzein.

5. Préparation de culture mère (pré-culture)

Le but majeur de la pré-culture est de fournir un inoculum destiné à démarrer de grands volumes de cultures de microalgues. 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 20).

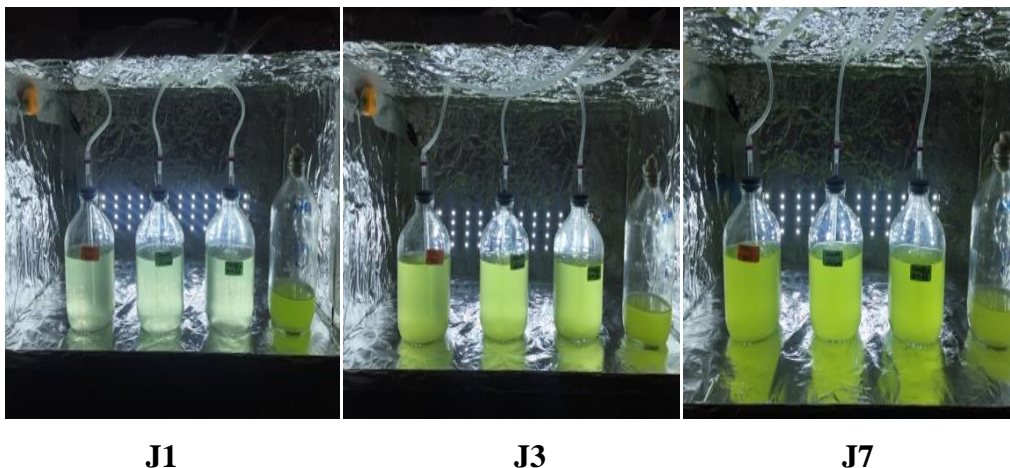


Figure 20 . Préparation de la culture mère (7 jours).

6. Plans d'expériences

Pour l'étude de l'effet de la carence en azote et en phosphate sur le taux de production des lipides, nous avons effectués 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 en phosphate. Le plan des 4 expériences réalisées est exposé dans le tableau suivant (tableau 3)

Tableau 3. La concentration en azote et en phosphate pour toutes les expériences.

Expérience	Concentrations de l'azote : NaNO_3	Concentrations du phosphate : NaH_2PO_4	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 	$2,42 \cdot 10^{-5}$ M	<ul style="list-style-type: none"> • Le reste des composants du Milieu Guillard f/2. • Photoperiode : 18h illumination : 6h obscurité. • Intensité lumineuse 24W. • Salinité 34,6 %
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 	$1,22 \cdot 10^{-5}$ M	
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 	0,00 M	

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 tours par minute (tpm) pendant 5 min et le culot d'algue a été mis en suspension dans 150 ml de milieu de culture Guillard f/2, stéril carencé en azote ($8,82 \cdot 10^{-4}$ M ; $5,88 \cdot 10^{-4}$ M ; $2,94 \cdot 10^{-4}$ M et 0.00 M NaNO_3) et en phosphate ($2,42 \cdot 10^{-5}$ M ; $1,22 \cdot 10^{-5}$ M et 0.00 M NaH_2PO_4).

Les densités optiques des échantillons et le comptage des cellules sont effectués dès la mise en route des cultures permettant un suivi des phases de croissance. 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.

6. Suivre de la croissance cellulaire

7.1. La densité optique (DO)

Il s'agit d'une méthode de mesure indirecte de la biomasse. La mesure à 750 nm indique la turbidité d'une solution microalgue se qui permet une estimation de la concentration en biomasse. Celle-ci est effectuée quotidiennement et une seule fois par jour par un spectrophotomètre visible de marque Multi CellChanGerjenWa. (Figure 21).



Figure 21. Spectrophotomètre (Jenway).

7.2. Le comptage des cellules algales

Les différentes phases de la croissance ont été déterminées grâce à des comptages cellulaires phytoplactonique régulier à l'aide d'une cellule de Malassez (figure 22 et 23) sous microscope. L'observation est réalisée au grossissement x40. 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 nombreuses et difficile à compter.



Figure 22. Cellule de Malassez.

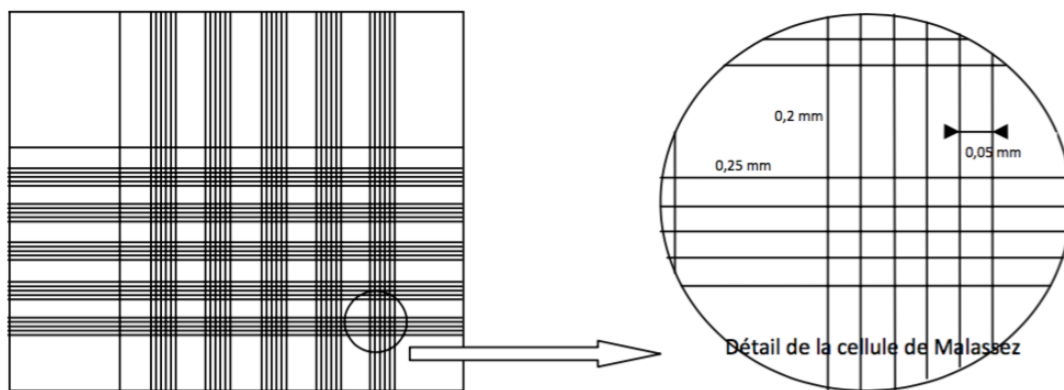


Figure 23. Vue d'une coupe et de la gravure d'une cellule de Malassez.

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

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

7.3. Détermination de la concentration de la chlorophylle « A » totaux

Le contenu en chlorophylle « a » est déterminé par une méthode spectrophotométrique (Strickland and Parsons, 1968). Ainsi, un volume noté V_1 de la culture est mélangé à un volume V_2 convenable de méthanol (99.8%) pendant une durée minimale de 30 minutes et maximale de 3 heures, à température ambiante.

Par la suite, les débris cellulaires sont précipités et séparés par centrifugation pendant 15 minutes à 3000 tpm ; la couleur blanche du culot est un moyen de vérification que l'extraction est complète (Figure 24).



Figure 24 . Les étapes de l'extraction de la chlorophylle « a »

L'absorbance du surnageant contenant les pigments dissous dans le méthanol est mesurée à deux longueurs d'onde (652 et 665 nm) au spectrophotomètre (Figure 25).

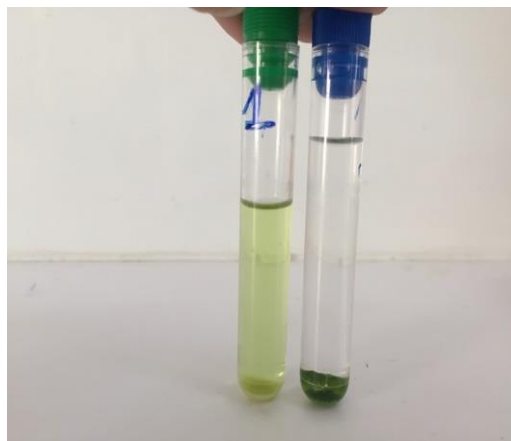


Figure 25 . Extraction du pigment avec et sans méthanol

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.

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

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

7.4. Détermination de la concentration 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 rpm 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, v/v) méthanol:chloroforme) selon la méthode de Bligh and Dyer (1959) (Figure 26).

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



Figure 26 . Extraction des lipides.

La pesée du ballon contenant l'extrait lipidique après évaporation du solvant et à vide permet de calculer la teneur en lipides exprimée en (g) selon l'équation suivante : (Figure 27.)

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

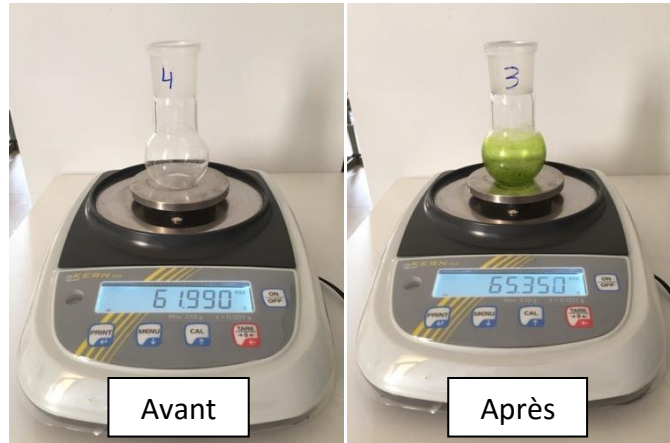


Figure 27 . Pesé des ballons vides et avec lipides.



Figure 28 . 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 toute la période d'expérimentation, l'observation microscopique nous permet d'obtenir la morphologie présentée dans la Figure 29.

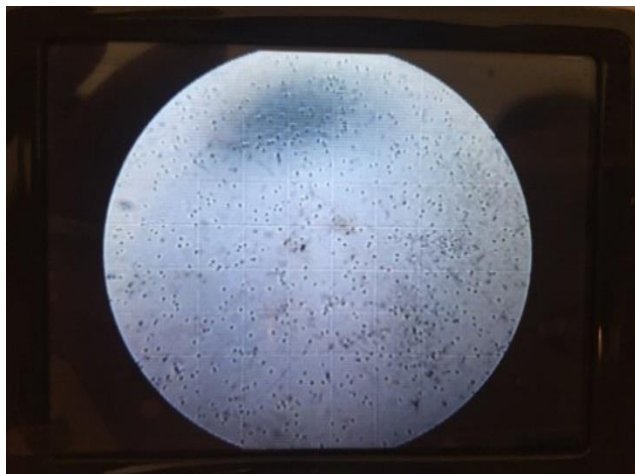


Figure 29 : Observation microscopique des cellules de *Nannochloropsis gaditana*

2. Etude de la carence en azote et en phosphate

Pour l'étude de l'effet du stress causé par la carence en azote et en phosphate nous avons effectués des cultures avec 3 concentrations en phosphate ($2,42 \cdot 10^{-5}$ M/ $1,22 \cdot 10^{-5}$ M et 0 M NaH_2PO_4) en carence d'azote (0 M/ $2,94 \cdot 10^{-4}$ M/ $5,88 \cdot 10^{-4}$ M et $8,82 \cdot 10^{-4}$ M NaNO_3).

2.1. La coloration de la culture

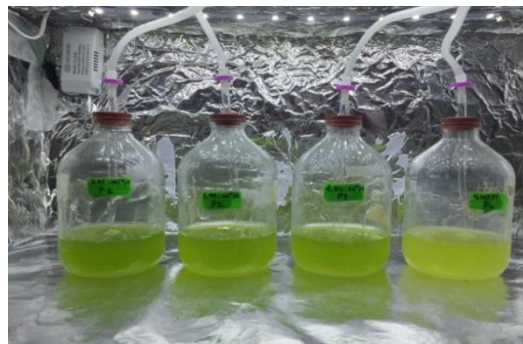
La Figure 30 montre l'évolution de la croissance par la couleur de *N. gaditana* cultivé dans 4 concentrations différentes d'azote (0/ $2,94 \cdot 10^{-4}$ / $5,88 \cdot 10^{-4}$ et $8,82 \cdot 10^{-4}$ M NaNO_3) a une concentration de phosphate (NaH_2PO_4) de $2,42 \cdot 10^{-5}$ M. Après avoir cultivé les microalgue dans le milieu Guillard f/2 standard pendant 6 jours, On peut remarquer que l'intensité de la verdure des microalgues dans le photobioréacteur est pareil dans toutes les cultures. Ces cultures ont été ensemencé dans un milieu stressant carencé en azote, après 7 jours de stress cette couleur diminue en fonction de la diminution de la concentration en azote. Le résultat suivant est similaire dans les deux autres expériences.



J1



J6



J13 (2,42.10⁻⁵ M NaH₂PO₄)



J13 (1,22.10⁻⁵ M NaH₂PO₄)



J13 (0 M NaH₂PO₄)

Figure 30. Effet de carence en azote et en phosphate sur la coloration de la culture de *Nannochloropsis gaditana*.

2.2. Carence en azote à $2,42 \cdot 10^{-5}$ M NaH_2PO_4

2.2.1. Dénombrement des cellules

D'après la figure 31 on peut constater 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. Chez les microalgues cultivées à 0 M NaNO_3 , on constate une fluctuation du nombre de cellule. Le nombre de cellule chez les autres cultures continue leurs croissances à partir de J7 jusqu'à J13. Les microalgues cultivés à $8,82 \cdot 10^{-4}$ M NaNO_3 ont atteint un nombre maximal de $378 \cdot 10^5$ cellule/ml a J13.

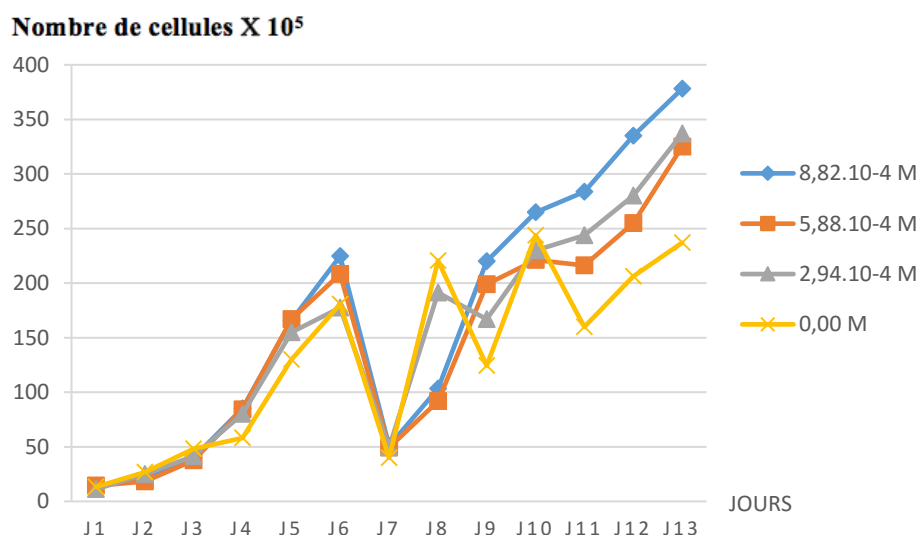


Figure 31. Effet de la carence en azote à $2,42 \cdot 10^{-5}$ M NaH_2PO_4 sur le nombre de cellule de *Nannocloropsis gaditana*.

2.2.2. Densité optique

La figure 32 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 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 1,81 chez les microalgues cultivées à une concentration de $5,88 \cdot 10^{-4}$ M NaNO_3 et une valeur minimale de 1,35 chez les microalgues cultivés à une concentration de 0 M NaNO_3 .

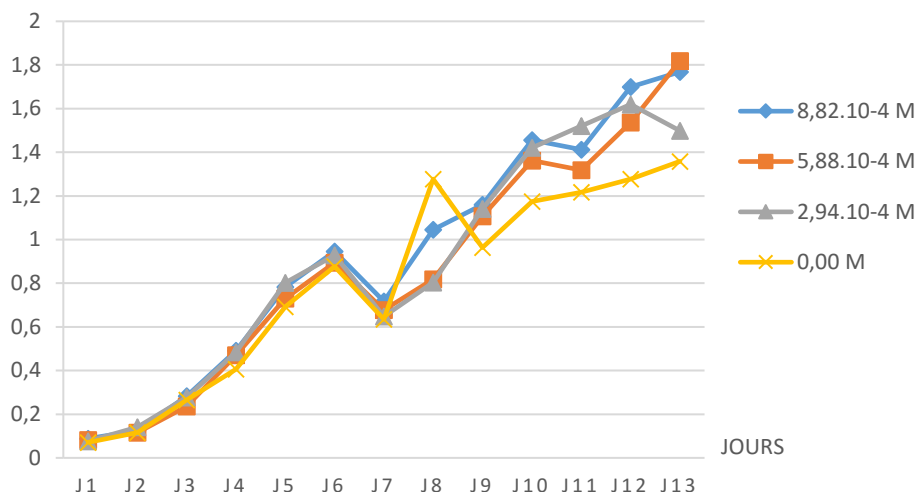


Figure 32. Effet de la carence en azote à $2,42.10^{-5}$ M NaH_2PO_4 sur la densité de *Nannocloropsis gaditana*.

2.2.3. Concentration en chlorophylle « a »

L’histogramme suivant présente la concentration en chlorophylle « a » en fonction du temps pour les quartes concentrations (0/ $2,94.10^{-4}$ / $5,88.10^{-4}$ et $8,82.10^{-4}$ M NaNO_3). On remarque que le taux de pigment (chlorophylle a) augmente de J1 à J6 pour atteindre une valeur approximative de 4 $\mu\text{g/ml}$ 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 NaNO_3 .

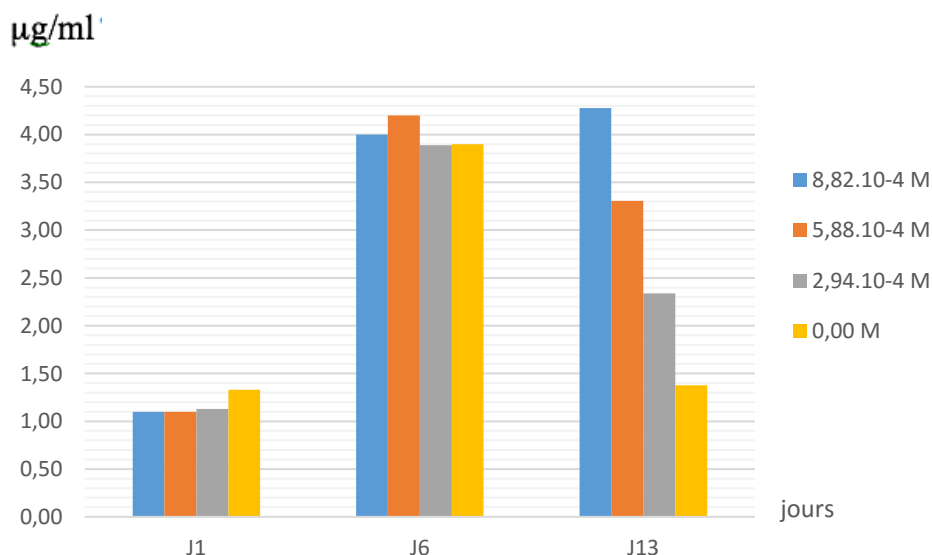


Figure 33. Effet de la carence en azote à $2,42.10^{-5}$ M NaH_2PO_4 sur le taux de chlorophylle « a » chez *Nannocloropsis gaditana*.

2.3. Carence en azote à $1,22 \cdot 10^{-5}$ M NaH_2PO_4

2.3.1. Dénombrement des cellules

D'après la figure 34 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 et $2,94$ M NaNO_3 , on constate une fluctuation du nombre de cellule. Chez les autres cultures la croissance reprend à partir de J7 jusqu'à J13. Les microalgues cultivées à $8,82 \cdot 10^{-4}$ M NaNO_3 ont atteint un nombre maximal de $410 \cdot 10^5$ cellule/ml à J13.

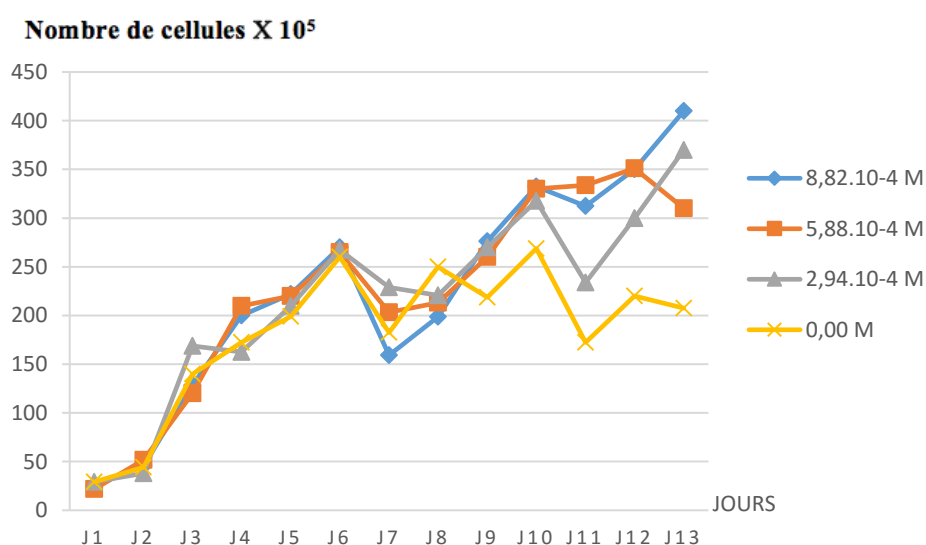


Figure 34. Effet de la carence en azote à $1,22 \cdot 10^{-5}$ M NaH_2PO_4 sur le nombre de cellule de *Nannocloropsis gaditana*.

2.3.2. Densité optique

D'après la figure 35 on remarque 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 1,78 chez les microalgues cultivés à une concentration de $8,82 \cdot 10^{-4}$ M NaNO_3 et une valeur minimal de 1,51 chez les microalgues cultivés à une concentration de $5,88 \cdot 10^{-4}$ M NaNO_3 .

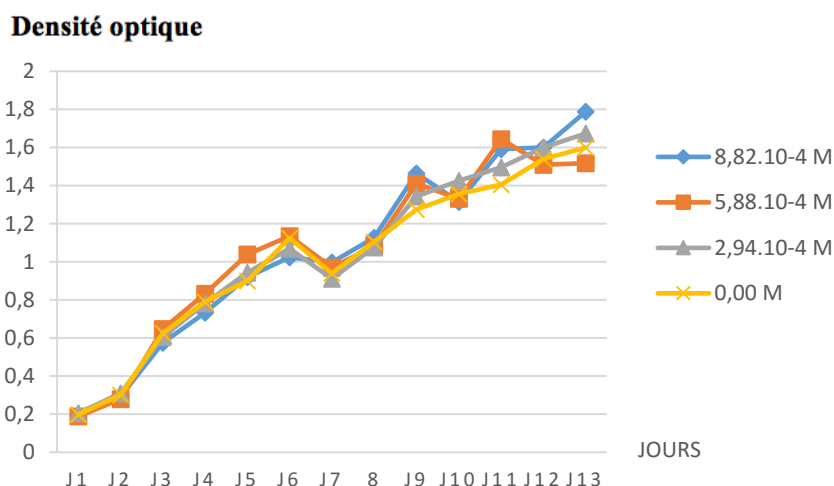


Figure 35. Effet de la carence en azote à $1,22 \cdot 10^{-5}$ M NaH_2PO_4 sur la densité de *Nannocloropsis gaditana*.

2.3.3. Concentration en chlorophylle « a »

La figure 36 démontre que le taux de pigment (chlorophylle a) augmente de J1 à J6 pour atteindre une valeur approximative de $3,62 \mu\text{g/ml}$ chez toutes les cultures, on peut remarqué que chez les microalgues cultivées a $8,82 \cdot 10^5$ M, la concentration en chlorophylle « a » augmente en fonction du temps pour attendre une valeur de $4,50 \mu\text{g/ml}$ à J13. Par contre cette concentration a diminué chez les algues cultivées à $2,94 \cdot 10^5$ M.

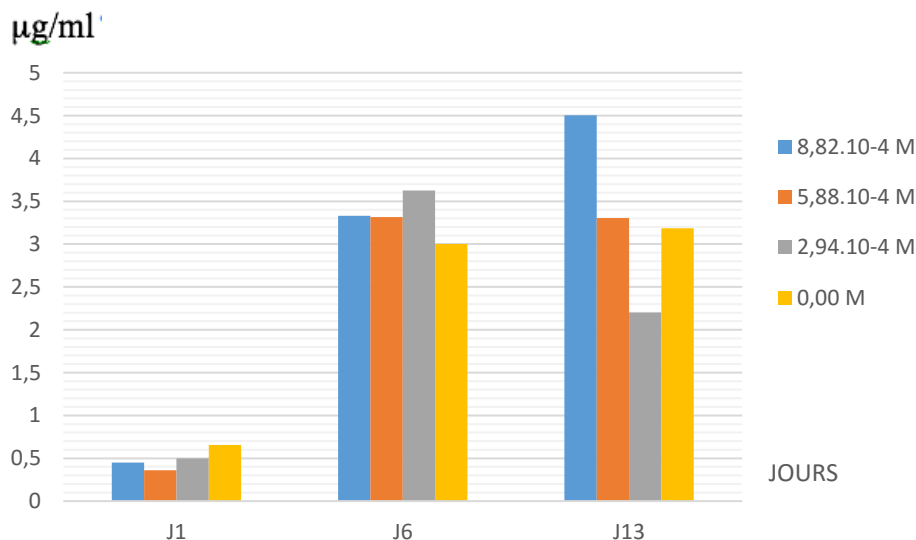


Figure 36. Effet de la carence en azote à $1,22 \cdot 10^{-5}$ M NaH_2PO_4 sur le taux de chlorophylle « a » chez *Nannocloropsis gaditana*.

2.4. Carence en azote à 0 M NaH₂PO₄

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 très forte chute de croissance a J7 pour atteindre un nombre de $19,62 \cdot 10^5$ cellule/ml au niveau de toutes les cultures. La croissance reprend à J8 et continu a augmenté jusqu'à J13, pour arrivé a une valeur de $553 \cdot 10^5 / 502 \cdot 10^5$ et $450 \cdot 10^5$ cellule/ml chez les espèces cultivées à des concentrations en azote de $8,82 \cdot 10^{-4}$ / $5,88 \cdot 10^{-4}$ et $2,94 \cdot 10^{-4}$ M, respectivement.

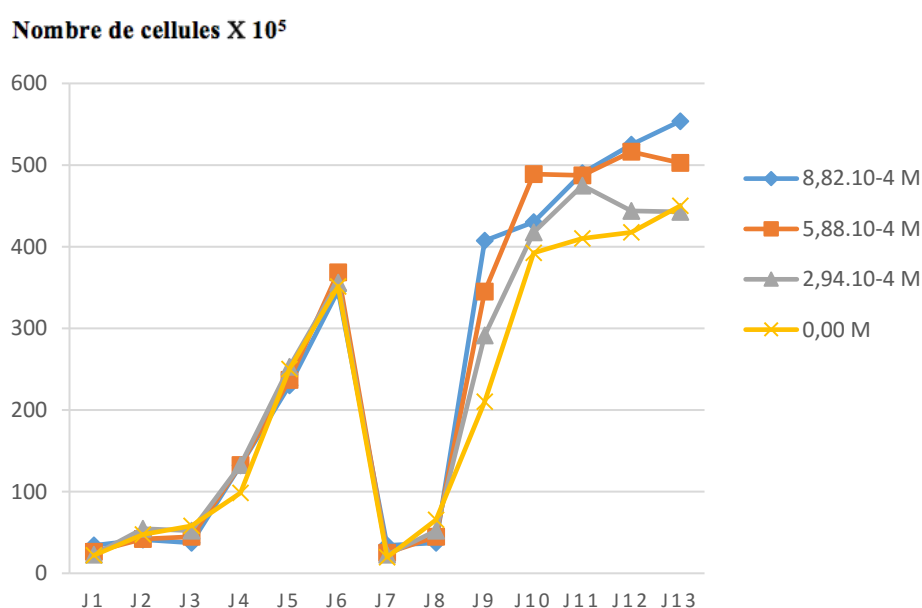


Figure 37. Effet de la carence en azote à $0 \cdot 10^{-5}$ M NaH₂PO₄ sur le nombre de cellule de *Nannocloropsis gaditana*.

2.4.2. Densité optique

La figure 38 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 importante diminution de la densité optique à J7, suivie d'une augmentation pour atteindre une densité maximale de 2 chez les microalgues cultivées à une concentration de $5,88 \cdot 10^{-4}$ M NaNO₃ et une valeur minimale de 1,68 chez les microalgues cultivés à une concentration de 0 M NaNO₃.

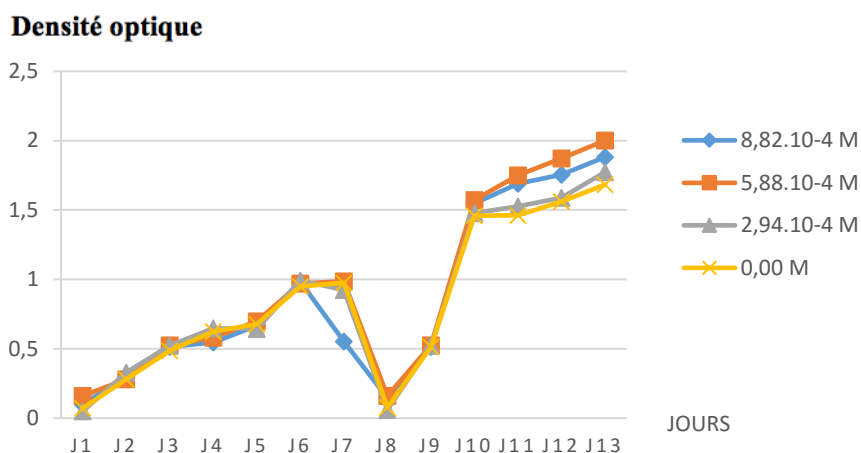


Figure 38. Effet de la carence en azote à 0.10^{-5} M NaH_2PO_4 sur la densité de *Nannocloropsis gaditana*.

2.4.3. Concentration en chlorophylle « a »

L’histogramme représenté dans la figure 40 exprime la concentration en chlorophylle « a » en fonction du temps pour les quartes concentrations (0/ $2,94.10^{-4}$ / $5,88.10^{-4}$ et $8,82.10^{-4}$ M NaNO_3). On remarque que le taux de pigment (chlorophylle a) augmente de J1 à J6 pour atteindre une valeur approximative de $4,16 \mu\text{g/ml}$ chez toutes les cultures. Cette concentration a beaucoup augmenté pendant les 7 jours du stress, surtout chez les algues cultivées à une concentration en azote de 0 M qui atteint une valeur maximale de $16,77 \mu\text{g/m}$.

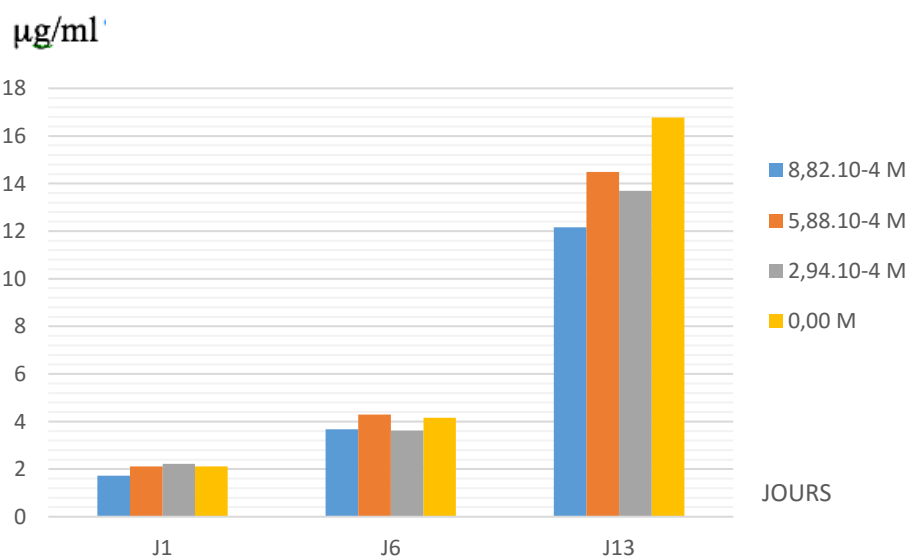


Figure 39. Effet de la carence en azote à 0.10^{-5} M NaH_2PO_4 sur le taux de chlorophylle « a » *Nannocloropsis gaditana*.

3. La teneur en lipide

La figure 40 représente le taux de lipide chez les espèces cultivés dans des milieux carencés en azote (0 M/ $2,94.10^{-4}$ M/ $5,88.10^{-4}$ M et $8,82.10^{-4}$ M NaNO_3) et en phosphate ($2,42.10^{-5}$ M/ $1,22.10^{-5}$ M et 0 M NaH_2PO_4) pendant une période de 7 jours. On remarque que la teneur en lipide chez les espèces cultivées à une concentration de $2,94.10^{-4}$ M NaNO_3 augmente en fonction de la diminution du taux de phosphate dans le milieu, ils ont atteint une valeur maximale de 0,14g/150ml, contrairement au microalgues cultivées à 0 M chez qui, la composition en lipide diminue en fonction de la diminution du phosphate. Chez les algues cultivées à $5,88.10^{-4}$ M de NaNO_3 on constate que le meilleur résultat en lipide est atteint lorsque la culture contient $1,22.10^{-5}$ M de phosphate.

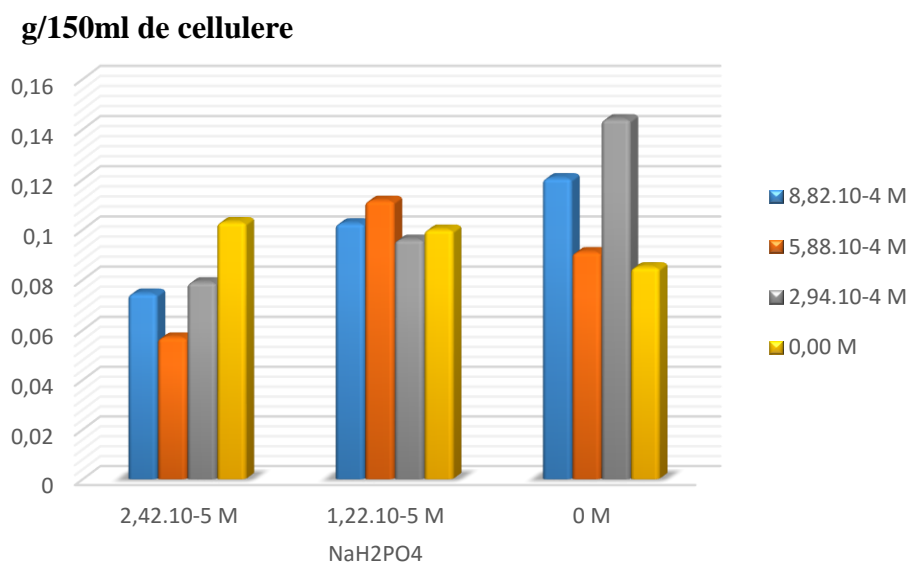


Figure 40. Effet de la salinité sur le taux de lipide chez *Nannocloropsis gaditana*.

Discussion

V/ Discussion

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 causé par une carence en phosphate et en azote.

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 carencé en phosphate ($2,42 \cdot 10^{-5}$ / $1,22 \cdot 10^{-5}$ et 0 M NaH_2PO_4) et en 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 préculture. 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, surtout durant la 3^{ème} expérience, où nous avons utilisé une concentration nulle en phosphate.

D'après nos résultats, on peut remarquer que la croissance des microalgues diminue en fonction de la diminution du taux de phosphate et de l'azote dans le milieu de culture. Les travaux de Redfield (1934) et de Massart *et al.* (2010) sont en faveur de cette hypothèse. En effet, ils ont observé qu'après le carbone, l'azote et le phosphore sont quantitativement les éléments les plus importants de la biomasse phytoplanctonique naturelle. L'azote et le phosphore sont des ressources indispensables à tous les organismes ; ils interviennent dans la composition de molécules essentielles dans le vivant.

À la fin de la première et de la deuxième expérience, la concentration en chlorophylle « a » est plus importante chez les microalgues cultivées à des concentrations en NaNO_3 de $8,82 \cdot 10^{-4}$ M comparées aux autres concentrations en azote. De même, Phadwal et Singh (2003) ont trouvé que la diminution de la concentration en nitrates et phosphates diminue le taux de croissance et le contenu chlorophyllien, mais augmente le taux de β -carotène. Par contre, le

résultat de la 3^{ème} expérience est en faveur des concentrations nulle en azote, ce résultat est en désaccord avec les observations de Phadwal et Singh (2003).

Les conditions de cultures des microalgues doivent être contrôlées afin d'atteindre des cinétiques de croissance et des contenus lipidiques importants. Cet aspect est primordial pour obtenir une productivité en lipides intéressante. On remarque que les facteurs favorables à la croissance (nitrate et phosphate) limitent la quantité d'huile au sein des microalgues (Taleb, 2015). En effet, nos résultats montrent que la production des lipides est stimulée chez les microalgues qui ont subi un stress par l'azote et par le phosphate. Dans la 3^{ème} expérience, on a pu atteindre des quantités maximales en lipide de 0,14 et 0,12 g/150 ml de culture chez les microalgues cultivées à $2,94 \cdot 10^{-4}$ et $8,82 \cdot 10^{-4}$ M de NaNO_3 , respectivement.

Au cours de la dernière décennie, la limitation par l'azote a été particulièrement étudiée dans le but de stimuler la synthèse lipidique chez les microalgues. Des productivités lipidiques importantes ont pu être obtenues par exemple chez *Neochloris oleoabundans* (Li *et al.*, 2008), *Nannochloropsis sp.* (Pal *et al.*, 2011) et *Chlorella sp.* (Hsieh and Wu, 2009).

D'autres auteurs rapportent une accumulation sensible des lipides en réponse à une limitation par le Phosphate (Liang *et al.*, 2013). Chez la microalgue d'eau douce *Monodus subterraneus*, une carence en phosphate entraîne simultanément une réduction des phospholipides (de 8,3 à 1,4 %) et une accumulation de triglycérides (de 6,5 à 39,3 %), par rapport aux lipides totaux (Khozin-Goldberg and Cohen, 2006). Kilham *et al.* (1997) ont montré chez *Ankistrodesmus falcatus* une augmentation significative des triglycérides, consécutive à une limitation par le phosphate, supérieure à celle induite en limitation par l'azote et sans modification de la composition lipidique. Xin *et al.* (2010) ont aussi enregistré une hausse des lipides chez *Scenedesmus sp.*, supérieure en limitation par le phosphate, avec un contenu lipidique de 53% de la biomasse, contre seulement 30 % en limitation par l'azote.

Néanmoins, l'effet d'une carence par le phosphore peut être différent selon les espèces considérées : Reitan *et al.* (1994) rapportent en effet qu'en culture semi-continue, une limitation par le phosphate accroît le contenu en lipides chez des Bacillariophycées (*Phaeodactylum tricorutum* et *Chaetoceros sp.*) et des Prymnesiophycées (*Isochrysis galbana* et *Pavlova lutheri*), alors qu'elle le réduit chez des microalgues flagellées vertes, telles que *Nannochloropsis atomus* et *Tetraselmis sp.*

Si les limitations par l'azote ou le phosphate conduisent ainsi à stimuler l'accumulation

de lipides, elles entraînent également une réduction du taux de croissance, qui nuit finalement à la productivité lipidique. Cette caractéristique est soulignée par Xin *et al.* (2010) qui, malgré des gains sensibles d'accumulation de lipides en limitation par l'azote ou le phosphate, n'obtiennent pas d'amélioration de la productivité chez *Scenedesmus sp.*.

Conclusion

VI/ Conclusion

Depuis l'essor des recherches sur la production de biocarburants par les microalgues, il est bien documenté qu'une carence ou une limitation minérale conduit à la synthèse de lipides de réserve, en créant un déséquilibre entre le métabolisme carboné et celui de la ressource limitante (Khozin-Goldberg et Cohen, 2011).

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 carence en phosphate et en azote du milieu de culture sur ces deux aspects.

En regard de nos résultats, on peut conclure que les conditions de carence en azote et en phosphate sont en effet efficaces pour stimuler la production de lipides. Il faut donc trouver un compromis entre croissance et richesse en lipides. Si les microalgues subissent un stress en fin de croissance exponentielle, elles peuvent augmenter leur contenu lipidique.

Des études ultérieures permettront d'optimiser ces teneurs. Ainsi, dans une première approche, la culture des microalgues pourrait être scindée en deux phases : une phase de croissance rapide dans un milieu riche favorable et une phase de stockage des lipides après une carence en phosphate et en azote.

*Références
bibliographiques*

VII/ Références Bibliographique

Andersen R.A. (1992). Diversity of eukaryotic algae. *Biodiversity and Conservation*, 1(4):267-292.

Andersen R.A., Brett R.W., Potter D. and Sexton J.P. (1998). Phylogeny of the Eustigmatophyceae Based upon 18S rDNA, with Emphasis on *Nonnochloropsis*. *Protist* 149:61-74.

Becker E.W. (1994). Microalgae Biotechnology and microbiology. *Cambridge Press University*.

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* 16 (22): 1270-1277.

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

Bumbak F., Cook S., Zachleder V., Hauser S and Kovar K. (2011). Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential limitations. *Applied Reports* 33:295-364.

Cadoret J.-P and Bernard O. (2008). La production de biocarburant lipidique avec des microalgues : promesses et défis. *Journal de la société biologique*, 202(3) :201-211.

Cao S., Zhang X., fan X., Qiao H., Xu D., Mou S., Wang W and Ye N. (2013). Phylogeny and characterization of *nannochloropsis oceanica* ca var. *si nensis* var. nov. (Eustigmatophyceae), a new oleaginous alga from China. *Phycologia* 52 ; 573-577.

Cavalla M. (2000), Les microalgues , <http://mcavalla.free.fr/rst/Algues-operon.pdf>.

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

Chisti Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol.* 26, 126–131.

Chynoweth D.P. Review of biomethane from marine biomass. (2002). A report prepared for *Tokyo Gas Company*. http://www.agen.ufl.edu/aboutchyn/download/Publications_DC/Reports/marine_final_FT.pdf.

Croft M.T., Warren M.J and Smith A.G. (2006). Lague need their vitamins. *Eukaryotic cell*, 5(8), 1175-83. DISMUKES G.C. , Carrieri D., Bennete N., Ananyev G.M., Posewitz M.C., 2008. Aquatic phototrophs : *nt alternatives to land-based crops fefficieor biofuels current opinion in biotechnology*, 19(3), 235-40.

Droop M.R. (2007). Vitamines, phytoplankton and bacteria : symbiosis or scavenging ? *Journal of Plankton Researche*, 29(2) , 107-113.

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

Godet S.(2008). Isolement et caracterisation de trois genes codant une lipase et deux estérase hypothétique chez la microalgue marine *isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae, Haptophyta). Thèse de doctorat : Biophysiology des organismes et des populations. Université de marine, 235p.

Guillard R.R .L. and Ryther. J .H.(1962). of marine planktonic diatoms. I. *Cylotella nana* Hustedt and *Detonulaconfervaceae* cleve . *can. J. Microbiol.* 8 :229-239.

Hibberd DJ. (1981). Notes on the taxonomy and nomenclatureof the algal classes Eustigmatophyceae and tribophyceae(synonyme Xant hophyceae). *Botanical of the Linnean Society* 82 : 93-11.

Hsieh C.-H., Wu and W.-T. (2009). Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. *Bioresource Technology* 100 (17), 3921–3926.

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

Karlson B., Potter D., Kuylenstierna M and Andersen R A.(1996). Ultrastructure, pigment ocmposition, and 18s rRNA gene sequence for *Nannochloropsis granulata* sp. Nov. (Mondopsidaeae, Eustigmatophyceae). *A marine ultpalnkter. J Phycologia* 35 : 253-260.

Khozin-Goldberg I and Cohen Z. (2011). Unraveling algal lipid metabolism : Recent advances in gene identification. *Biochimie* 93 (1), 91–100.

Kilham S., Kreeger D., Goulden C and Lynn S. (1997). Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. *Freshwater Biology* 38 (3), 591– 596.

Knukey R.M. (1998). Isolation of Australian Microalgae and Preparation of microalgal Concentrates for use as Aquaculture Feeds. PhD *the is University of Tasmania*, December 1998, 254 pp.

Krienitz L., Hepperle D., Stich H B and W Weiler.(2000). *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae), a new species of picoplankton from freshwater. *Phycologia* 39 : 219-227.

Kroth P.G., Chiovitti A., Gruber A., Martin-Jezequel V., Mock T., Parker M.S., Stanley M.S., Kplan ., Caron L., Weber S., Maheswari U., Armbrust E.V. and Bowler C. (2008). A Model for carbohydrate metabolism in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* Deduced from Comparative Whole Genome Analysis. *Plos ONE* 3(1) ; e1426.

Landry M.R and Hassett R.P. (1982). Estimating the grazing of marine microzooplankton. *Mar. Biol.* 67 : 283-288.

Li Y., Horsman M., Wang B., Wu N and Lan C. Q. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81 (4), 629–636.

Liang K., Zhang Q., Gu M and Cong W. (2013). Effect of phosphorus on lipid accumulation in freshwater microalga *Chlorella* sp. *Journal of Applied Phycology* 25 (1), 311–318.

Lubian L M.(1982). *Nonnochloropsis gaditana* sp. Nov., una nueva Eustigmatophyceae marina. *J Lazaroa* 4 : 287-293.

Massart A., Aubry E and 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 and Caetano N.S.(2010b). Microalgue for biodiesel production and other applications, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 14, 217-232.

Materiel et méthode

Miquel M.(2001) . Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé, rapport Office Parlementaire D'évalutaion des choix scientifiques et technologiques (Dir). Rapport Sénat n°26 :360.

Pal D., Khozin-Goldberg I., Cohen Z and Boussiba S. (2011). The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90 (4), 1429–1441.

Pelmont J. (2008). Glossaire de biochimie environnementale. EDP SCIENCES

Person J (2011). Algues filières du future. Livre turquoise. 2011. Algues, filière du future. *Editions Adebioch.* 164p.

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

Pulz O., Gross W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 635–648.

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

Redfield A. (1934).On the Proportions of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton. In daniel, R.J. (ed james johnstone memorial Volume). University Press of (Liverpool, 177-192.

Redfield A. C.(1934). On the proportions of organic derivatives in sea water and their relation to the composition of plankton. University Press of Liverpool.

Reitan K. I., Rainuzzo J. R. and Olsen Y. (1994). Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *Journal of Phycology* 30 (6), 972–979.

Richmond A, (Ed.). 2004. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phyecology. Blackwell Science, Oxford, OX, UK ; Ames, Iowa, USA

Richmond A. 2008. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. John Wiley & Sons.

Ridame C. 2001. Role des apports atmosphérique d'origine continentales dans la biogéochimie marine. Impact des apports sahariens sur la production primaire en méditerranée. Thèse Université Paris VL, 246pp.

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.

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.

Sánchez Miron A, Ceron Garcia Gomez A, Garcia Camacho F , molina Grima E, Chisti Y. Sher stress tolerance andbiochemical of *Phaeodactrylum tricornutum* quasi steady-state continouns culture in outdoor photobioreators. *Biochem Eng J* 2003 ; 16 :287-97.

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.

Sharma N Aveen Kumar, Rai A.K. 2011. Biodiversity and biogeography of microalgue : progress and pitfalls, 15,1-15.

Shawn R Starkenburg, Kyungyoon J Kwon, Ramesh K Jha, Cedar Mckay, michael Jacobs, Olga Chertkov, Scott Twary, Gabrielle Rocap, Rose Ann cattlico (2014) A pangenomic analysis of the *Nannochloropsis* organellar genomes reveal novel genetic variations in Key metabolic genes . *BMC Genomics* 15 :212.

Sialve B Bernet N, Bernard O. 2013. Anaerobic digestion of microalgue as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology advances*, 27(4), 409-416.

Stevenson R.J, Bothwell M.L. a. Algal ecology : Freshwater Benthic Ecosystemes, Academic Press, San Diego. and **Lowe R.L.**, 1996

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

Strickland J.D , H Parsons, TR. 1968. A Practical handbook of seawater analysis . Queen's Printer .

Suda S , M atsumi and H miyashita. 2002. Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. Nov. (Eustigmatophyceae). *Phycologia* 41 : 273-279.

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*

Van Den hends S., Vervaeren H , Boon N, 2012. Flue gas compounds and microalgues : (bio) chemical interaction leading to biotechnological opportunities. *Biotechnology advances*.

Vieler A, G Wu, C-H Tsai, B Bullard, AJ Cornich, C Harvey, I-B Reza, C Thornburg, R Achawanantakum, CJ Buehl , MS Campbell, D cavalier , KL Childs , TJ Clark, R Deshpande, E Erichson, AA Ferguson, W handee, Q Kong, X Li, B Lui, S Lundback, C Peng, RL Roston, sanjaya, JP Simpson, a terbuch, J Warakanont, S ZAumer, EM farre, EL hegg, N Jiang, M-H Kuo, Y Lu, KK Niyogi, J Ohlrogge, K w Osteryoung, Y ShacharHill, BB Sear, Y Sun, H Takahashi, M Yandell, S-H Shiu and C Benning. 2012 Genome, Functional and genannotation and nuclear transformation of the heterokont oleaginous alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779. *PLOS genetics* 8 :1-25.

Vonshak A, 1986. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. In R.A. (Ed), handbook of microalgal mass culture (pp. 177-145). Boca Raton, FL : CRC Press.

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.

Wolfgang, E.B. 1994. *Microalgae : biotechnology and microbiology*, [En

ligne].http://books.google.fr/books?id=KAKx4I7NWEYC&printsec=frontcover&source=gbv2_summary_r&cad=0#v=onepage&q=&f=false(Page consultée le 20 octobre 2009).

Wolfgang, E.B. 1994. Microalgae : biotechnology and microbiology, [En ligne]. http://books.google.fr/books?id=KAKx4I7NWEYC&printsec=frontcover&source=gbv2_summary_r&cad=0#v=onepage&q=&f=false (Page consultée le 20 octobre 2009).

Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., Ying-xue, S., 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology* 101 (14), 5494–5500.