

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

**Ouali Mohamed El-Amine et Smail Belkacem**

Pour l'obtention du diplôme de

### MASTER

En Hydrobiologie Marine et Continentale

**Spécialité: RESSOURCES HALIEUTIQUES ET EXPLOITATION  
DURABLE**

**THÈME**

**Effet de la supplémentation du milieu de culture en  
carbone sur la croissance et la composition  
biochimique d'une souche microalgale marine  
« *Nannochloropsis gaditana* »**

Soutenu publiquement le 03/07/2017

DEVANT LE JURY

Président	Pr. MEZALI SOUALILI Dina Lila	PR	U. Mostaganem
Encadreur	Mme. BENZIDANE Dehiba	MAA	U. Mostaganem
Examineurs	Dr. BENAMAR Nardjess	MCA	U. Mostaganem

ANNEE 2016 /2017

## Remerciement

Louange à **Allah**, seigneur de l'univers, le tout puissant miséricordieux, pour m'avoir inspiré et comblé en me donnant la santé et le courage d'accomplir ce travail.

Tout d'abord, J'exprime ma gratitude et mon profond respect à mon encadreur de mémoire de Master **Mme. BENZIDANE DEHIBA**, maitre-assistante "A" à l'université de Mostaganem, pour les conseils judicieux qu'elle n'a cessé de nous prodiguer, pour son soutien moral et pour son aide et suivi inestimable. Nous ne la remercierons jamais assez pour la confiance qu'elle nous a accordé et pour nous avoir fait profiter de son expérience sans jamais ménager sa peine pour nous aider à avancer. Elle nous a permis de nous construire en tant que scientifique et de réaliser ce travail. Je lui dois éternelle reconnaissance et lui souhaite réussite dans tous ce qu'elle entreprendra.

Je remercie les membres du jury :

**Mme. MEZALI SOUALILI Dina Lila** Professeur au Département des Sciences de la Mer et des Ressources Halieutiques à l'Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, qui nous a fait l'honneur de présider notre soutenance en me faisant part de ses précieuses critiques.

**Dr. BENAMAR Nardjess** Maitre de conférence "A" à l'université de Mostaganem, pour avoir accepté d'examiner mon travail de mémoire en tant qu'examineur.

Je remercie aussi chaleureusement tous les enseignants de notre département. Mes remerciements s'adressent également à l'ensemble des techniciennes et techniciens des laboratoires, plus particulièrement le responsable des laboratoire **M. SOUANE A.** et la technicienne du laboratoire Biochimie « 2 » **Mme. MOKHTARIA**, qui ont pris en charge le matériel et les produits chimiques pour les analyses requises, ainsi que pour leur accueil chaleureux.

Mes parents, mes sœurs, mon fiancé, mes amis qui m'ont soutenu pendant les moments les plus durs.

## *Dédicaces*

*Nous avons le grand plaisir de dédier ce mémoire à tous ceux qui nous sont chers,*

*À nos pères, pour ses soutiens durant toutes ces années d'études.*

*À nos mères en qui nous avons toujours vu la source de tendresse et d'affection et qui nous soutient dans les bons et mauvais moments de notre vie.*

*À nos sœurs et nos frères*

*Notre plus profonde affection à nos amies, et nos insister sur nos pour ses compréhensions, ses encouragements pendant toute mes années universitaires.*

*Je dédié à toute la promotion de MASTER 2 RESSOURCES HALIEUTIQUES ET EXPLOITATION DURABLE de l'année 2016/2017.*

*Ainsi à tout qui nous connut de proche ou de loin.*

*Mr. OUALI MED AMINE*

## *Dédicaces*

*Nous avons le grand plaisir de dédier ce mémoire à tous ceux qui nous sont chers :*

*À nos pères, pour ses soutiens durant toutes ces années d'études.*

*À nos mères en qui nous avons toujours vu la source de tendresse et d'affection et qui nous soutient dans les bons et mauvais moments de notre vie.*

*À nos sœurs et nos frères*

*Notre plus profonde affection à mon amie OUALI AMINE, et nous insister sur nos pour ses compréhensions, ses encouragements pendant toute mes années universitaires.*

*Je dédie toute la promotion de MASTER 2 RESSOURCES HALIEUTIQUES ET EXPLOITATION DURABLE de l'année 2016/2017.*

*Ainsi à tout qui nous connut de proche ou de loin.*

*Mr. SMAIL  
BELKACEM*

## Résumé

Les microalgues sont des micro-organismes aquatiques. Dotées d'une croissance rapide, elles ont la particularité de pouvoir produire des substances industriellement intéressantes. Toutefois, leur potentiel est encore peu exploré : sur un million d'espèces estimées, seules 30 000 environ ont été étudiées. Déjà utilisées dans l'alimentaire, les cosmétiques et les fertilisants, les microalgues sont considérées comme une voie alternative aux carburants traditionnels. En effet, certaines espèces ont la capacité de produire des composés ayant un potentiel énergétique comme les lipides (source de biodiesel)

Le but de ce travail est d'optimiser les conditions de culture chez l'espèce *Nannochloropsis gaditana* et ceci par l'étude de l'effet de la supplémentation du milieu de culture Guillard f/2 en carbone organique (glucose) et en carbone inorganique (bicarbonate et peptone) à différentes intensités lumineuses, sur la croissance et le pouvoir d'accumulation des lipides.

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 le choix de la source de carbone dépend de ce qu'on veut obtenir ; biomasse, Chlorophylle « a » ou teneur en lipide. La supplémentation du milieu de culture Guillard f/2 par 3 g/l de peptone a donné des résultats de croissance et des teneurs en chlorophylle « a » très intéressants. Par contre, pour produire beaucoup de lipide on peut utiliser du peptone à 2 g/l ou du bicarbonate à 1 g/l.

Les sources de carbone telle que le glucose, le peptone ...etc, présentent un coût assez élevé ne permettant pas d'atteindre une production rentable en biocarburants. La recherche de sources alternatives de carbone organique bon marché (les déchets industriels) est donc une nécessité.

### **Mots clé :**

Microalgue, lipide, *Nannochloropsis gaditana*, carbone, peptone, glucose.

# Sommaire

Liste des tableaux.....	
Liste des figures.....	
Liste des abréviations.....	
<b>I.Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>II. Synthèse bibliographique.....</b>	<b>3</b>
1. Généralités sur les microalgues.....	3
1.1.Définition et caractéristiques.....	3
1.2.La photosynthèse.....	4
1.3. Classification des algues.....	5
1.4. Reproduction des microalgues.....	5
1.4.1. Reproduction asexuée.....	5
1.4.2. Reproduction sexuée.....	6
2. Mode de culture des microalgues.....	6
2.1. Culture en batch.....	7
2.2. Culture continu.....	8
3. Modes de nutrition des microalgues.....	8
3.1. Mode autotrophe.....	8
3.2. Mode hétérotrophe.....	8
3.3. Mode mixotrophe.....	9
4. Importance des conditions de culture.....	9
4.1. La lumière.....	9
4.2. La température.....	11
4.3. Le pH.....	11
4.4. L'oxygène dissous.....	11
4.5. La salinité.....	12
4.6. L'agitation.....	12
5. L'utilisation des microalgues.....	12
5.1. Industries alimentaires.....	12
5.1.1. Alimentation animale.....	13
5.1.2Engrais.....	13
5.1.3.Alimentation humaine.....	13

5.2. Cosmétique.....	13
5.3. Santé.....	14
5.4. Energie et environnement.....	14
6. Généralité sur l'espèce étudié : <i>Nannochloropsis gaditana</i> .....	14
6.1. Définition.....	14
6.2. La structure de <i>Nannochloropsis sp</i> .....	15
6.3. La paroi de <i>Nannochloropsis sp</i> .....	15
<b>III. Matériels et méthodes</b> .....	16
1. Matériel biologique.....	16
2. Système de culture.....	16
3. Milieu de culture.....	17
3.1.Echantillonnage de l'eau de.....	17
3.2.Traitement de l'eau.....	18
3.3.Préparation du milieu Guillard f/2.....	19
4. Conditions de travail.....	20
5. Préparation de la culture mère (préculture).....	20
6. Plans d'expériences.....	21
6.1.Influence de la source de carbone.....	21
6.2.Influence du carbone et de l'intensité lumineuse.....	22
7. Suivie de la croissance cellulaire.....	22
7.1. La densité optique (DO).....	22
7.2.Le comptage des cellules algales.....	22
8. Détermination de la concentration de la chlorophylle « a » totaux :.....	23
9. Détermination de la concentration des lipides.....	25
10. Analyse des résultats.....	27
<b>IV/ Résultats</b> .....	28
1. La morphologie de <i>Nannochloropsis gaditana</i> .....	28
2. Influence de la source et de la concentration du carbone.....	<b>28</b>
2.1. Supplémentation en glucose.....	28
2.1.1. La coloration de la culture.....	28
2.1.2. Dénombrement des cellules.....	29
2.1.3. Densité optique.....	29

2.1.4. Taux de Chlorophylle « a ».....	30
2.2. Supplémentation en bicarbonate.....	31
2.2.1. La coloration de la culture.....	31
2.2.2 Dénombrement des cellules.....	31
2.2.3.Densité optique.....	32
2.2.4.Taux de Chlorophylle « a ».....	32
2.3. Supplémentation en peptone.....	33
2.3.1. La coloration de la culture.....	33
2.3.2. Dénombrement des cellules.....	33
2.3.3. Densité optique.....	34
3.3.4. Taux de Chlorophylle « a ».....	35
2.4. Supplémentation en Lactosérum.....	35
2.4.1. La coloration de la culture.....	35
2.4.2. Taux de Chlorophylle « a ».....	36
3. Influence de la lumière.....	36
3.1. Sans source de carbone.....	36
3.1.1. La coloration de la culture.....	36
3.2. Avec source de carbone (Bicarbonate).....	37
3.2.1. La coloration de la culture.....	37
3.2.2. Dénombrement des cellules.....	37
3.2.3. Densité optique.....	38
3.2.4. Taux de Chlorophylle « a ».....	39
4. La teneur en lipide.....	39
4.1. Influence de la source et de la concentration du carbone.....	39
4.2. Influence de la lumière.....	40
<b>V/ Discussion</b> .....	41
<b>VI/ Conclusion</b> .....	44
<b>VII/ Références bibliographiques</b> .....	45

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Différentes formes de microalgues.....	3
<b>Figure 2.</b> Les photosynthèses chez les microalgues.....	4
<b>Figure 3.</b> Schéma d'un chloroplaste en coupe transversale.....	5
<b>Figure 4.</b> Exemple de reproduction sexuée et asexuée chez Chlamydomonas.....	6
<b>Figure 5.</b> Courbe de croissance théorique de microalgues (Richmond, 2004).....	7
<b>Figure 6.</b> Repartitions des algues selon le captage du spectre lumineux (John, 2015).....	10
<b>Figure 7.</b> <i>Nannochloropsis gaditana</i> .....	15
<b>Figure 8.</b> Chambre de culture.....	16
<b>Figure 9.</b> Programmeur de temps.....	17
<b>Figure 10.</b> Oxygénateur.....	17
<b>Figure 11.</b> Site de prélèvement (kharouba).....	18
<b>Figure 12.</b> Autoclave.....	18
<b>Figure 13.</b> Les solutions mères des milieux Guillard .....	19
<b>Figure 14.</b> Conditions de travail au bec Benzen.....	20
<b>Figure 15.</b> Culture mère.....	20
<b>Figure 16.</b> Spectrophotomètre .....	22
<b>Figure 17.</b> Cellule de Malassez.....	23
<b>Figure 18.</b> Les étapes d'extraction de la chlorophylle « a » .....	24
<b>Figure 19.</b> Vérification de l'extraction de la chlorophylle « a ».....	24
<b>Figure 20.</b> Echantillon de chlorophylle « a » prés pour mesure au spectrophotomètre.....	25
<b>Figure 21.</b> Les différentes étapes pour déterminé le taux de chlorophylle « a ».....	26
<b>Figure 22.</b> Rotavapor.....	26
<b>Figure 23.</b> Les étapes pour déterminé le poids des lipides.....	27
<b>Figure 24.</b> Observation microscopique des cellules de <i>Nannochloropsis</i> <i>gaditana</i> .....	28
<b>Figure 25.</b> Effet du glucose sur la coloration des cultures.....	28

<b>Figure 26.</b> Effet de glucose sur le nombre de cellule.....	29
<b>Figure 27.</b> Effet de glucose sur l'évolution de la densité optique.....	30
<b>Figure 28.</b> Effet du glucose sur la concentration de la chlorophylle « a ».....	30
<b>Figure 29.</b> Effet du bicarbonate sur la coloration des cultures.....	31
<b>Figure 30.</b> Effet de bicarbonate sur le nombre des cellules.....	31
<b>Figure 31.</b> Effet de bicarbonate sur la densité optique.....	32
<b>Figure 32.</b> Effet de bicarbonate sur le taux de chlorophylle.....	33
<b>Figure 33.</b> Effet de bicarbonate sur la coloration de culture.....	33
<b>Figure 34.</b> Effet de peptone sur le nombre de cellule.....	34
<b>Figure 35.</b> Effet de peptone sur la densité optique.....	34
<b>Figure 36.</b> Effet de peptone sur le taux de chlorophylle.....	35
<b>Figure 37.</b> Effet du lactosérum sur la coloration des cultures.....	35
<b>Figure 38.</b> Effet de lactosérum sur le taux de chlorophylle « a » .....	36
<b>Figure 39.</b> Effet de la lumière sur coloration de la culture.....	37
<b>Figure 40.</b> Effet de lumière sur la coloration de culture avec source de carbone.....	37
<b>Figure 41.</b> Effet de la lumière sur le nombre de cellule.....	38
<b>Figure 42.</b> Effet de lumière sur la densité optique.....	38
<b>Figure 43.</b> Effet de la lumière sur le taux de chlorophylle « a » .....	39
<b>Figure 44.</b> Effet de source de carbone sur le taux de lipide.....	40
<b>Figure 45.</b> Effet de la lumière sur le taux de lipide.....	40

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Les différents types nutritionnels des microalgues.....	9
<b>Tableau 2.</b> Composition du milieu Guillard (Guillard & Ryther 1962).....	19
<b>Tableau 3.</b> Concentration en carbone des 4 expériences étudié.....	21

## Liste des abréviations

**%** : Pour cent

**μ** : Micro

**μg/ml** : Micro gramme par millilitre

**AGPT** : Acide gras poly insaturé

**C°** : Degré Celsius

**cm** : Centimètre

**CoCl<sub>2</sub>** : Chlorure de cobalt

**EDTA** : Acide éthylène diamine tétra-acétique

**FeCl<sub>3</sub>** : Chlorure de fer III

**g** : Gramme

**g/l** : Gramme par litre

**h** : Heure

**J** : Jour

**M** : Mole

**Min** : Minute

**ml** : Millilitre

**Mm** : Millimètre

**MnCl<sub>2</sub>** : Manganese II chloride tetrahydrate

*N. gaditana* : *Nannochloropsis gaditana*

**Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>** : Molybdate de sodium

**NaCl** : Chlorure de sodium

**NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : Phosphate de Mono sodium

**NaNO<sub>3</sub>** : Nitrate de sodium

**nm** : Nanomètre

**Tpm** : Toure par minute

**W** : Wat

**ZnSO<sub>4</sub>** : Le sulfate de zinc

# *Introduction*

### I/ Introduction

Actuellement, le problème du réchauffement climatique ainsi que les craintes de l'épuisement des ressources pétrolières sont des préoccupations majeures mondiales. Le changement climatique est en partie attribué à l'accumulation des gaz à effet de serre due principalement aux émissions de gaz comme le gaz carbonique (CO<sub>2</sub>), associées à l'utilisation des combustibles fossiles qui représentent aujourd'hui 88% de la consommation énergétique mondiale (Rodolfi *et al.*, 2009).

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

Les microalgues sont 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 (Burlew, 1953).

Notre travail vise à optimiser la composition du milieu de culture pour produire le plus de biomasse possible et donc, plus de lipide, et ceci en :

- Testant différent source de carbone à différentes concentrations ;
- Variant l'intensité et le type de lumière utilisé.

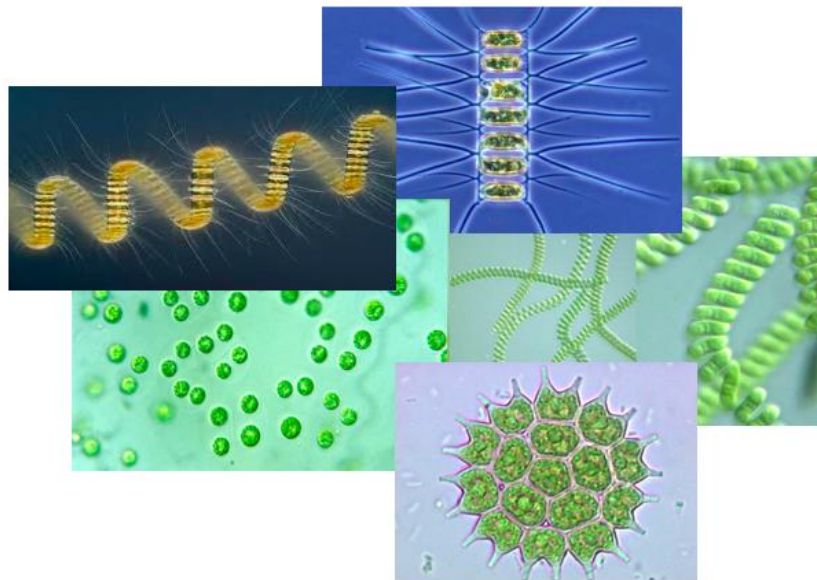
*Synthèse  
bibliographique*

## II/ Synthèse bibliographique

### 1. Généralités sur les microalgues

#### 1.1. Définition et caractéristiques

Les microalgues sont des organismes microscopiques photosynthétiques unicellulaires ou pluricellulaires indifférenciés, dont la taille varie de quelques micromètres à une centaine de micromètres. Pour les étudier, il est donc nécessaire de les observer au microscope optique ou électronique (Ville & Champ, 2014). La microalgue est délimitée par une membrane plasmique, qui contient au sein de leur cytoplasme de nombreux organites nécessaires à leur fonctionnement et à leur métabolisme (chloroplaste, amyloplaste, oléoplaste, mitochondrie et noyau) (Sadi, 2012). Elles se trouvent dans les habitats aquatiques, qu'ils soient marins ou d'eau douce (figure 1).



**Figure 1.** Différentes formes de microalgues

Leur coloration est due à la coexistence de pigments variés, dont le plus important est la chlorophylle sous ses trois formes (a, b, et c). Cette chlorophylle leur confère la capacité de synthétiser la matière organique nécessaire à leur développement à partir de molécules simples comme le gaz carbonique et l'eau.

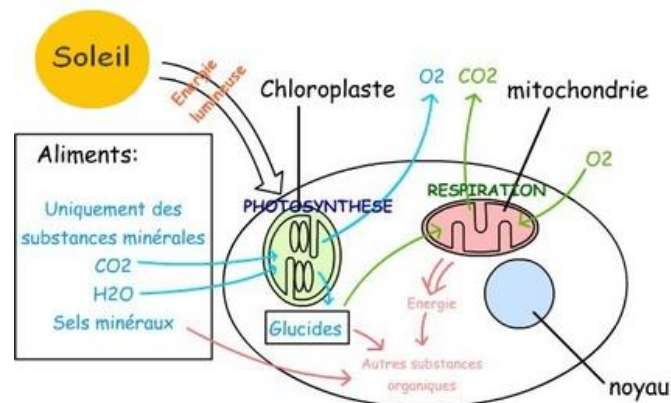
Ces microorganismes appartiennent à deux groupes : les eucaryotes et les procaryotes ;

- Les microalgues eucaryotes possèdent une structure cellulaire végétale classique compartimentée, avec ou sans paroi cellulosique, et avec des pigments photosynthétiques renfermés dans des plastes (Ville & Champ, 2014).

- Les microalgues procaryotes, appelées aussi cyanobactéries (batteries effectuant la photosynthèse).

## 1.2. La photosynthèse

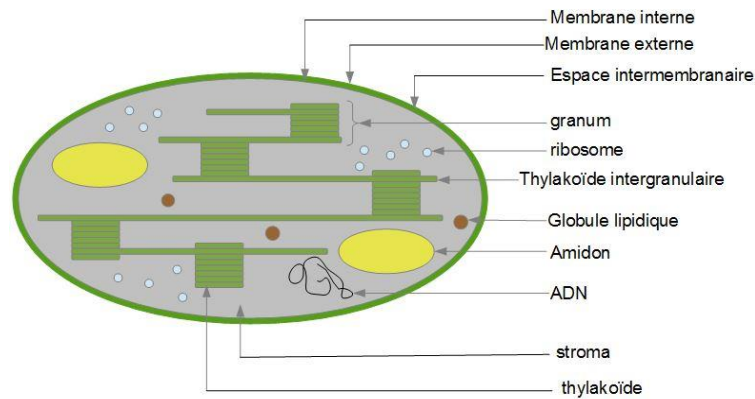
Le terme photosynthèse signifie littéralement « synthèse réalisée à l'aide de l'énergie lumineuse ». On désigne donc par ce terme la capacité de certains organismes à assimiler le carbone inorganique (comme le dioxyde de carbone atmosphérique, ou ses différentes formes dissoutes pour les organismes aquatiques) à la lumière pour le convertir en matière organique tout en dégageant de l'oxygène (Taleb, 2015) (figure 2).



**Figure 2.** La photosynthèses chez les microalgues.

Les microalgues sont des cellules végétales. Leur croissance est ainsi basée sur le même principe que la photosynthèse des plantes supérieures. Elles ont donc la capacité de se développer sur milieu entièrement minéral. En milieu aqueux, la lumière leur permet alors de croître par absorption des minéraux nécessaires (nitrates, phosphates notamment) et du carbone inorganique environnant (les différentes formes de carbone dissous) (Taleb, 2015).

Chez ces microorganismes, la photosynthèse a lieu dans les chloroplastes, plus spécifiquement au niveau des membranes des thylacoïdes à l'interface du lumen et du stroma où se trouvent les complexes pigmentaires qui sont à la base du processus photosynthétique (figure 3). En effet, l'énergie lumineuse est captée par ces pigments et transférée par la suite aux photosystèmes II (PSII) et I (PSI) et qui transforment à leur tour l'énergie lumineuse reçue en potentiel d'oxydoréduction permettant la synthèse des molécules (Taleb, 2015).



**Figure 3.** Schéma d'un chloroplaste en coupe transversale

### 1.3. Classification des algues

Le terme algue regroupe des individus chlorophylliens vivant essentiellement dans l'eau et qui ne sont pas des embryophytes et sont très rarement regroupées en fonction de leur métabolisme énergétique ou encore en fonction de leur habilité à synthétiser les métabolites nécessaires, mais plutôt en fonction de leurs propriétés morphologiques. Il existe donc plusieurs classifications taxonomiques différentes de microalgues, mais elles peuvent être réparties dans sept embranchements, dont les principales sont les cyanophycées, les chrysophycées, les rhodophycées, les euglenophycées, les chlorophycées, les charophycées et les phacophycées (Cavalla, 2000).

### 1.4. Reproduction des 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 cyclique ou répétitif. La figure 4 montre le cycle de vie des microalgues qui comprend généralement des processus de reproduction sexuée et/ou asexuée (Abdennadher, 2014).

#### 1.4.1. Reproduction asexuée

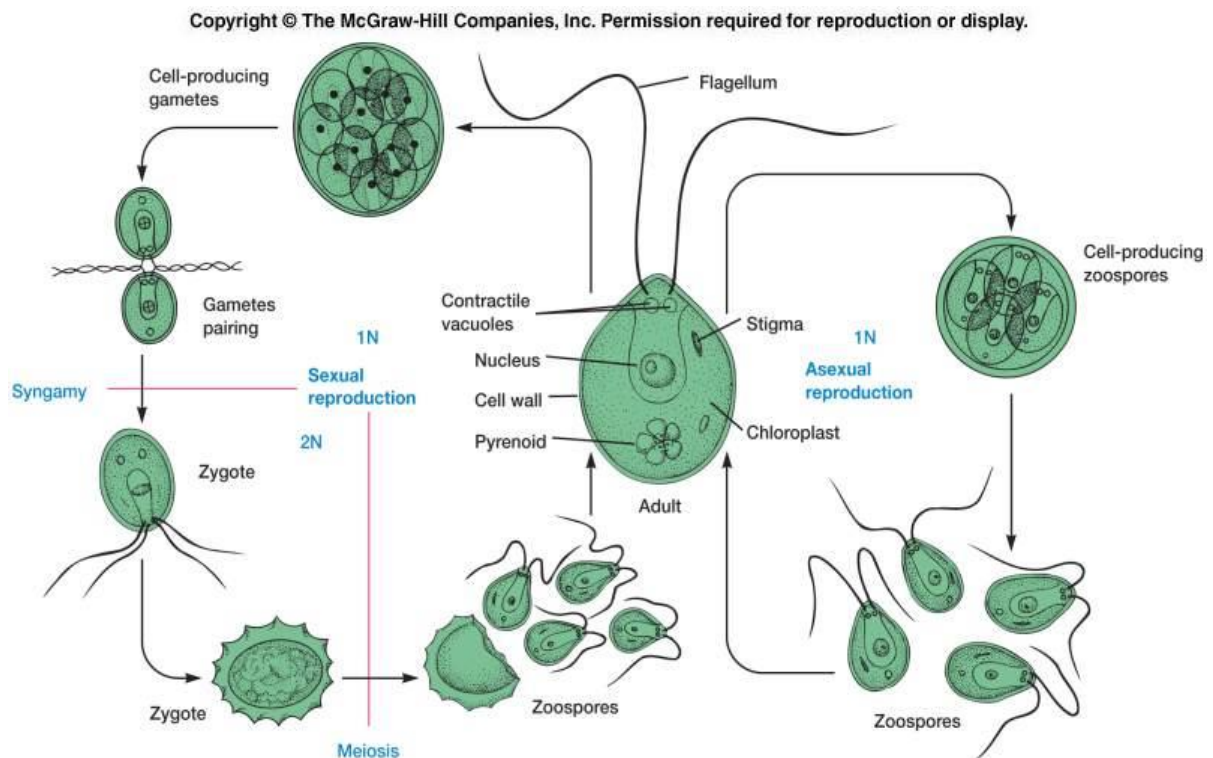
La prolifération microalgale s'effectue principalement par une reproduction asexuée ou multiplication végétative : une cellule mère se divise alors en deux cellules filles génétiquement identiques, ce mode de reproduction peut être divisé en trois types (Claude, 2008) :

- Fragmentation du thalle
- Sporulation

- Scission binaire.

### 1.4.2. 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 (Claude, 2008).



**Figure 4.** Exemple de reproduction sexuée et asexuée chez *Chlamydomonas*.

Ces gamètes issus de la transformation du contenu d'une cellule fertile, l'œuf ou le zygote formé se développera pour donner un nouvel individu génétiquement différent des parents. Cet individu diploïde, désigné sous le nom de sporophyte produira, dans les sporocystes, par méiose (réduction du nombre de chromosomes par deux) (Claude, 2008).

## 2. Mode de culture des microalgues

Une culture d'algue peut être mise en place suivant deux modes, en batch (discontinu) et en continu. Ces modes de culture se différencient exclusivement par la régulation des apports en nutriments réalisée (Jauzein, 2009).

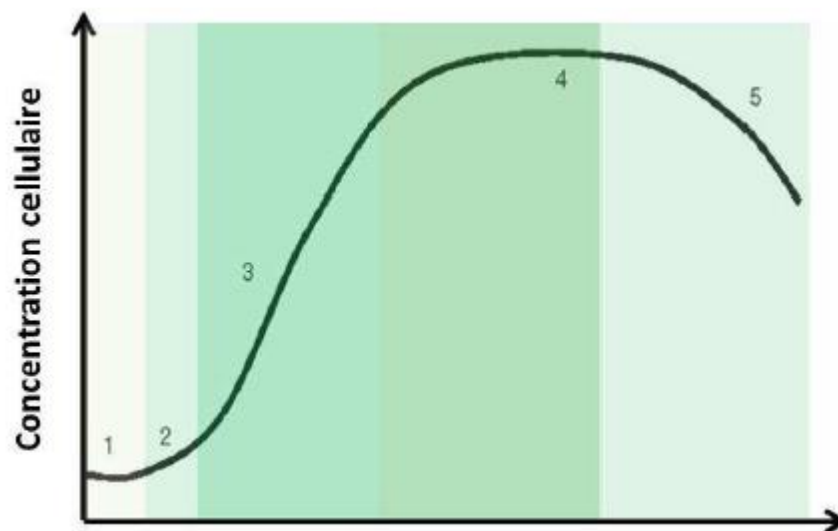
## 2.1. Culture en batch

En mode batch (discontinu), tous les éléments essentiels à la croissance de l'algue (lumière, azote, phosphore, carbone, micro-éléments) sont apportés au moment de l'inoculation (Larosiere, 2012). Ce dernier se fait en phase exponentielle (Melanie, 2009). La croissance connaît différentes phases caractéristiques présentent dans la figure 5.

**Phase de latence (1) :** au cours de cette phase qui dure de quelques heures à plusieurs dizaines d'heures, le taux de croissance est très faible (Chevanton, 2013).

**Phase d'accélération (2) :** les cellules commencent à se multiplier jusqu'à atteindre leur taux de croissance maximal, à ce stade les facteurs de croissance n'étant pas limitant (Chevanton, 2013).

**Phase de croissance exponentielle (3) :** la croissance est exponentielle et est maintenue constante jusqu'à ce que la composition du milieu ne soit plus optimale (Andersen, 2005).



**Figure 5.** Courbe de croissance théorique de microalgues (Richmond, 2004).

**Phase stationnaire (4) :** un des éléments du milieu (lumière, azote, phosphore, carbone,...) devient limitant, et en conséquence la vitesse de croissance diminue, les quantités de cellules qui se divisent et qui meurent sont égales, ce qui produit un plateau de croissance. Les lipides et les glucides peuvent continuer à s'accumuler dans cette phase (Richmond, 2004).

**Phase de décroissance (5) :** la plupart des cellules ont épuisé leurs réserves intracellulaires de composants et elles n'ont plus suffisamment d'énergie à leur disposition pour poursuivre la maintenance cellulaire et meurent (Richmond, 2004).

Ces différentes phases ne sont toutefois pas toujours aussi distinctes ; quelque fois certaines peuvent se raccourcir ou se prolonger les rendant plus difficilement reconnaissables.

### **2.2.Culture continu**

Le mode continu quand à lui correspond à un mode où la récolte se fait en continu sans arrêt (Melanie, 2009). Le principe repose sur l'application d'un flux entrant, contenant les éléments nutritifs, à un système de culture de volume constant contenant les microalgues. Par conséquent, le flux d'entrée impose au système un flux sortant de même débit correspondant à la production en biomasse algale (Melanie, 2009). Le but de la culture en continu est de maintenir la concentration cellulaire stable.

### **3. Modes de nutrition des microalgues**

Le concept algal repose sur le principe de capter et de concentrer des formes renouvelables diffuses et irrégulières d'énergie comme le rayonnement solaire ou l'énergie chimique de certains rejets en les convertissant en biomasse algale.

#### **3.1. Mode autotrophe**

Les microalgues sont largement et principalement connues comme étant des organismes photoautotrophes (Legrand, 2007), cette autotrophie leur permet d'utiliser l'eau, les sels minéraux, une source de carbone inorganique comme le  $\text{CO}_2$  et le  $\text{HCO}_3^-$  et la lumière du soleil comme source d'énergie afin de synthétiser leur propre matière organique par la photosynthèse, le plus souvent appliqué en mode ouvert dans des bassins extérieurs (Cantin, 2010). Des développements sont aussi entrepris pour réaliser des applications en mode fermé avec des photobioréacteurs (PBR) plus efficaces.

#### **3.2.Mode hétérotrophe**

Les microalgues de métabolisme hétérotrophe sont principalement cultivées dans des bioréacteurs fermés appelés fermenteurs (Sadi, 2012) à l'abri de la lumière et avec une alimentation en sucres, ils sont donc incapables de synthétiser leur propre matière organique (Melanie, 2009). Pour assurer leur croissance elles peuvent utiliser l'hydrate de carbone pour remplacer le rayonnement solaire en tant que source d'énergie pour leur métabolisme (Sadi, 2012).

### 3.3. Mode mixotrophe

En plus de ces deux modes de nutrition, il existe aussi des microalgues de métabolisme mixotrophe pouvant avoir un métabolisme autotrophe, ou encore hétérotrophe. En effet, en absence d'énergie lumineuse, lorsqu'une source de carbone organique est disponible, le développement des chloroplastes est inhibé et ces microalgues métabolisent leur énergie en mode hétérotrophe, le Tableau 1 représente les différents types nutritionnels des microalgues.

**Tableau 1.** Les différents types nutritionnels des microalgues (Taleb, 2015).

Mode de nutrition	Source d'énergie	Source de carbone
<b>Photo-autotrophe</b>	Radiation solaire	CO <sub>2</sub> seulement
<b>Photo-hétérotrophe</b>	Radiation solaire	CO <sub>2</sub> et Carbone organique.
<b>Chemo-autotrophe</b>	Composé inorganique	CO <sub>2</sub>
<b>Chemo-hétérotrophe</b>	Composé organique	Carbone organique

## 4. Importance des conditions de culture

Une fois les microalgues retenues pour l'expérience, il faut étudier les différents facteurs qui peuvent affecter leur croissance, et par conséquent leur productivité ou encore l'obtention de composés spécifiques (Alain, 2006).

Il existe trois facteurs majoritaires et indispensables déterminants pour la culture de microalgues : la lumière, la température, et le pH. D'autres facteurs moins importants seront aussi à prendre en compte comme l'agitation du milieu (Melanie, 2009).

### 4.1.La lumière

La lumière est la source d'énergie primaire et fondamentale des organismes réalisant la photosynthèse et est par conséquent un facteur écophysologique 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 (Alain, 2006).

La quantité d'énergie arrivant au dessus de la couche atmosphérique correspond à 1370 W/m<sup>2</sup>. A la surface de la terre cette quantité d'énergie est de 1000 W/m<sup>2</sup> à midi par jour

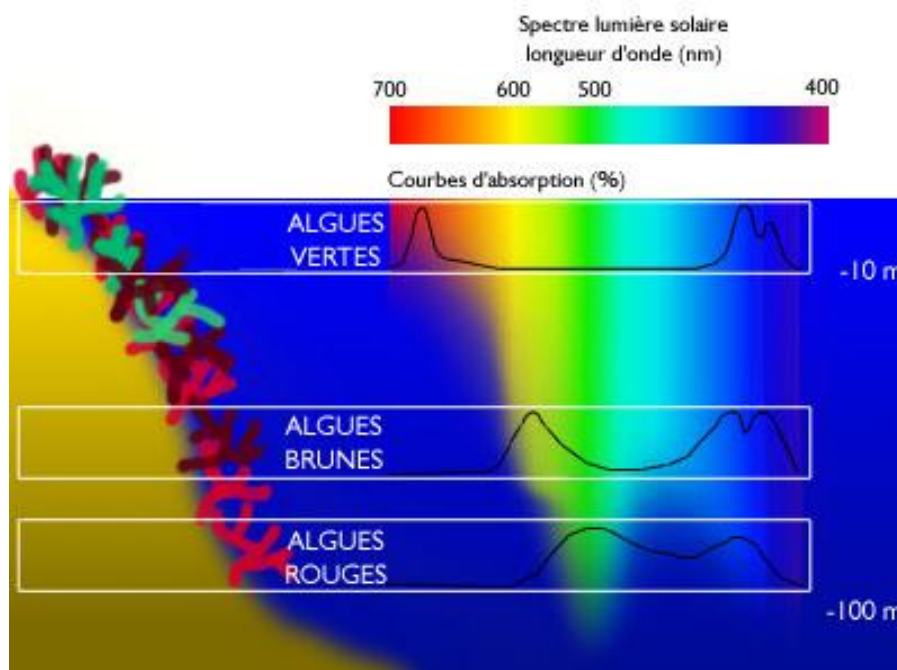
ensoleillé. La quantité d'énergie solaire disponible peut varier en fonction de l'altitude et principalement des conditions météorologiques relatives à la saison (Melanie, 2009).

Les microalgues vont capter préférentiellement certaines longueurs d'ondes grâce à leurs pigments photosynthétiques. Elles vont surtout absorber les longueurs d'ondes bleues et rouges. Elles possèdent donc un appareil pigmentaire photosynthétique différent (phycobilisome) leur permettant de capter des longueurs d'ondes particulières pour chaque espèce de microalgue (Melanie, 2009). Les cyanobactéries vivant plusieurs mètres en dessous de l'eau par exemple, reçoivent un spectre lumineux différent que celles vivant à la surface de l'eau. La distribution des microalgues est donc dépendant de leur besoin en lumière.

Les microalgues exigeant en lumière (photophiles) se développent à la surface (algues vertes). Celles ayant besoin de peu de lumière (sciaphiles) se développent en profondeur, sous les surplombs ou les autres algues (algues rouges) (figure 6).

Bien qu'essentielle pour la croissance des algues en photoautotrophie et photohétérotrophie, l'excès de lumière peut être nuisible à partir d'un certain seuil, il y aura photoinhibition et destruction des cellules (Boileau, 2015).

La photoinhibition est causée par un surplus d'électrons généré par la captation des rayons solaires, ces derniers vont saturer les récepteurs d'électrons du pigments Photosynthétique. Comme ces récepteurs agissent comme semi-conducteurs, leur saturation empêchera donc le passage des électrons d'un pigment chlorophyllien à l'autre inhibant ainsi la photosynthèse (Alain, 2006).



**Figure 6.** Répartitions des algues selon le captage du spectre lumineux (John, 2015).

L'augmentation linéaire de la croissance est observée initialement avec l'augmentation de l'intensité lumineuse jusqu'à un niveau de saturation qui est spécifique à chaque espèce. Puis on observe une perte de linéarité jusqu'à recrutement de la totalité des sites collecteurs se traduisant par une activité photosynthèse maximale.

En condition supra-optimale, un phénomène de stress lié au trop fort éclairage et appelée photoinhibition est observé entraînant une diminution de l'activité photosynthèse.

### **4.2. La température**

La température est un des principaux facteurs influant sur le taux de croissance des microalgues, et une variation importante de celle-ci peut affecter les diverses réactions biochimiques à l'intérieur de la cellule, en modifiant la composition chimique intracellulaire et la nature des composés présents dans le milieu par la suite. Il a été démontré que chaque espèce de microalgues a son optimum de température (Taleb, 2015).

### **4.3. Le pH**

Comme pour la température, chacune des espèces a son propre pH idéal. La concentration de CO<sub>2</sub> dans le milieu de culture a un effet important sur le pH, le CO<sub>2</sub> réagissant avec l'eau pour former des ions carbonates CO<sub>3</sub><sup>-2</sup> qui en s'hydrolysant vont libérer des ions OH<sup>-</sup>, ces deux réactions conduisent à une augmentation de pH (alcalinisation), cette augmentation du pH affecte alors l'équilibre du système carbonaté et vont se produire les réactions de précipitation des ions phosphates avec les cations métalliques multivalents (Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Al<sup>3+</sup>....), le pH pourrait influencer la croissance des algues (Alain, 2006).

### **4.4. L'oxygène dissous**

Dans les milieux aquatiques, l'oxygène est le moteur essentiel à la vie des organismes, il assure l'oxydation de la matière organique en faisant intervenir les différents groupements bactériens et en contribuant donc à l'autoépuration du milieu. L'oxygène est souvent généré par les algues et les végétaux aquatiques dont l'activité photosynthétique assure l'approvisionnement des organismes aquatiques en oxygène nécessaire à leur respiration, il est apporté également au milieu par ré-aération à partir de l'atmosphère ou par diffusion à partir d'eaux plus oxygénées. L'oxygène dissous est étroitement lié à la température qui conditionne sa solubilité (Taleb, 2015).

#### **4.5. La salinité**

La salinité mesure la concentration d'une eau en sels dissous (chlorure de sodium (NaCl), chlorure de magnésium, sulfate de magnésium, etc.), une augmentation de la salinité entraîne l'inhibition de l'activité photosynthétique des algues et par conséquent l'accroissement de la culture algale, cette salinité est sans unité, mais elle est encore souvent exprimée en gramme de sel par litre d'eau (g/l), en pour mille ou encore en *practical salinity unit* (psu) (Massart *et al.*, 2010).

#### **4.6. L'agitation**

L'agitation est un facteur clé dans la culture des microalgues, non seulement pour éviter la sédimentation, la photoinhibition, la limitation en nutriment et la stratification thermique, mais aussi pour accroître l'efficacité de la conversion de la lumière (Richmond, 1986). Elle facilite le maintien des algues en suspension et leur exposition temporaire à la lumière. C'est surtout sous de faibles intensités lumineuses, au lever et au coucher du soleil, que l'effet de l'agitation est marqué (Richmond, 1986).

Le mode d'agitation peut être : manuelle ou électrique par une pompe ou une roue à aubes L'agitation nocturne continue favorise nettement l'autoépuration du milieu (Jordan, 1999).

### **5. L'utilisation des microalgues**

Les microalgues peuvent être utilisées dans de nombreux secteurs en raison de leurs constituants en acides gras, vitamines, polysaccharides, protéines, pigments, antioxydants...etc.

#### **5.1. Industries alimentaires**

Les algues sont très utilisées dans l'industrie alimentaire, notamment pour leurs propriétés épaississantes, gélifiantes et en tant qu'additifs. Les microalgues aussi peuvent être utilisées. En effet, celles qui possèdent des caroténoïdes, dont le bêta-carotène ou l'astaxanthine (par exemple *Dunaliella* ou *Haematococcus*), sont utilisées en tant que colorant dans divers produits comme les glaces, les jus de fruits, le beurre, la margarine ou encore dans l'enrobage de tablettes. Egalement, on peut citer l'additif E160a qui peut être obtenu grâce à *Dunaliella*. Les microalgues sont aussi source de vitamines (Ville & champs, 2014).

### 5.1.1. Alimentation animale

Les microalgues font partie intégrante de la chaîne alimentaire aquatique et sont donc indispensables à la croissance des mollusques bivalves et favorisent celle des jeunes stables de poissons et de crevettes. De plus, elles représentent la nourriture exclusive des larves de plusieurs espèces de mollusques, crustacées et poissons. Elles apportent les acides gras et les acides aminés essentiels, le cholestérol et de multiples oligoéléments que les animaux d'élevage aquacoles ne peuvent synthétiser de novo (Alain, 2006).

### 5.1.2. Engrais

Les microalgues apparaissent également comme de bons fertilisants des sols pauvres puisqu'elles apportent notamment du potassium, de l'azote, éléments essentiels à la croissance Végétale. Elles permettent aussi de capturer et de garder l'humidité. Enfin, elles accélèrent la pousse des cultures et les protègent en limitant la prolifération des épiphytes (organismes à végétaux qui croient et vivent sur d'autres végétaux sans se nourrir à leurs dépens) et des parasites (Ville & champs, 2014).

### 5.1.3. Alimentation humaine

Certaines microalgues sont sources de matière alimentaire à haute valeur nutritive en vitamines, protéines, sucres et lipides, produits en grande quantité et utilisables par l'homme. Notamment les *Diatomées*, la *Chlorelle* et la *Spiruline* sont consommées (sous forme de compléments alimentaires). Ces acides gras tels que les oméga-6 ne sont pas synthétisés chez l'homme ni chez les animaux et pourtant ils sont essentiels au bon fonctionnement de l'organisme. En effet, ils initient les processus inflammatoires essentiels pour lutter contre les infections, cicatriser des blessures, ou encore permettre la synthèse d'hormones thyroïdiennes (Ville & Champs, 2014).

## 5.2. Cosmétique

Le potentiel vital des microalgues est une chance pour la cosmétique. En effet, malgré leurs petites tailles, les microalgues offrent une concentration impressionnante d'actifs bienfaisants pour l'épiderme. Plusieurs extraits de microalgues se retrouvent déjà dans le marché du cosmétique. Par exemple, l'astaxanthine a été reconnue pour avoir des propriétés protectrices contre les rayons ultraviolets et elle a été ajoutée à certains produits. Les cosmétiques à base de lipides (crèmes et lotions) peuvent bénéficier d'extraits de microalgues

pour ses propriétés nutritives et protectrices pour la peau (Pultz & Gross, 2004). De plus, des extraits de microalgues sont utilisés pour pigmenter les produits cosmétiques (Pultz & Gross, 2004).

### 5.3. Santé

La mer est sans aucun doute la plus grande pharmacie de la planète, Sur les 4000 substances déjà décrites, 500 ont une activité biologique prouvée : antibiotique, antivirale (contre le Sida), antiparasitaire et même anti-tumorale. Mieux comprendre les microalgues permettra d'élucider certains mécanismes de défenses de nos propres cellules (Pultz & Gross, 2004).

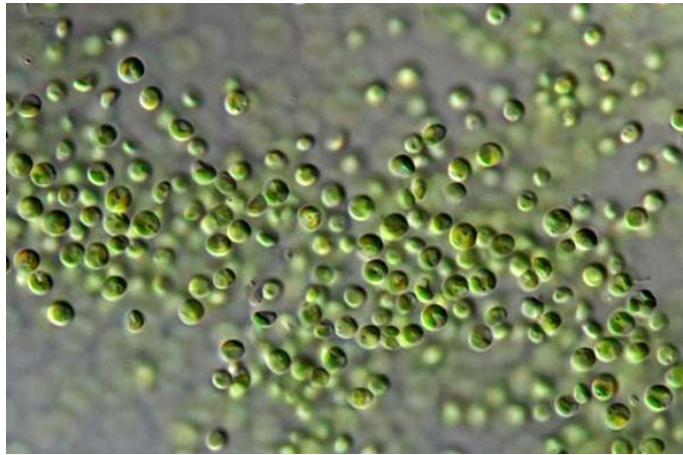
### 5.4. Energie et environnement

Certaines microalgues ont la capacité de produire de l'hydrogène grâce à des enzymes, les hydrogénases, lors de la photosynthèse. Or cet hydrogène peut être utilisé comme biocombustible et ainsi servir de source d'énergie propre et renouvelable (Benzidane *et al.*, 2017). Les microalgues semblent pouvoir servir dans des usines de traitement d'eaux usées. En effet, l'addition de microalgues dans des eaux usées ne contenant ni métaux lourds ni radio-isotopes, peut atténuer les impacts des effluents de ces eaux et des déchets industriels azotés. De plus, en enlevant de l'azote et du carbone de l'eau. Elles sont également source de biomatériaux comme l'amidon qui peut servir à la fabrication de plastiques recyclables (Ville & Champs, 2014).

## 6. Généralité sur l'espèce étudié : *Nannochloropsis gaditana*

### 6.1. Définition

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



**Figure 7.** *Nannochloropsis gaditana*

Le genre *Nannochloropsis* comprend plusieurs espèces : *N. oculata*, *N. gaditana*, *N. granulata*, *N. limnetica*, *N. Salina* et qui ont 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. Cependant l'étude du génome total de *N. salina* et *N. gaditana* par démontre qu'ils seraient deux souches de la même espèce vu que la différence entre leur génome est inférieure à 20%.

### **6.2. La structure de *Nannochloropsis* sp.**

Le genre *Nannochloropsis* est composé des espèces unicellulaires de très petites taille environ 2 à 5  $\mu\text{m}$ . 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.

### **6.3. 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 algale externe.

*Matériels et  
Méthodes*

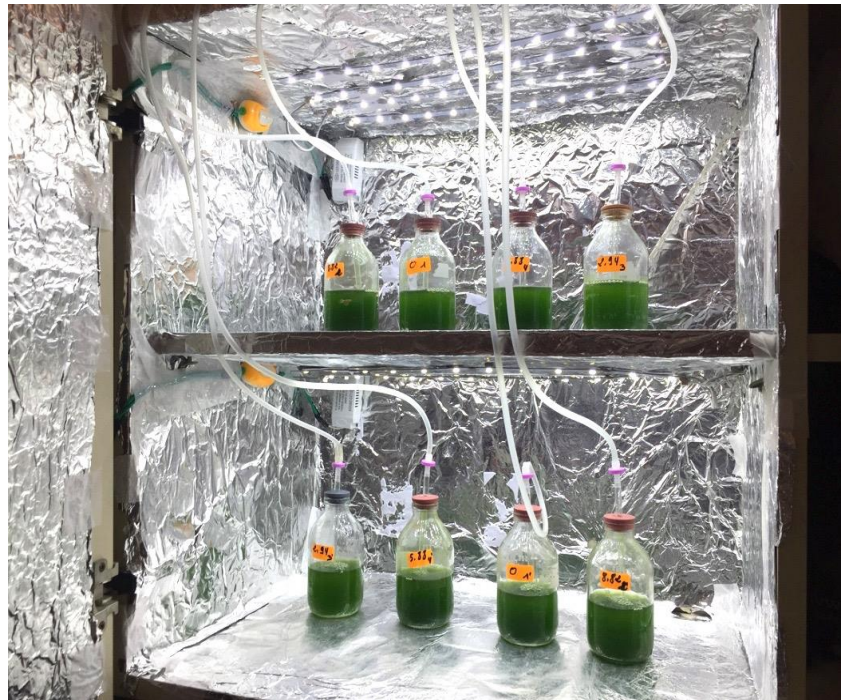
### III/ Matériels et méthodes

#### 1. Matériel biologique :

Notre travail porte sur la microalgue *Nannochloropsis gatinata*. Cette souche provient du Laboratoire d'Aquaculture et de Bioremédiation (AquaBior) du département de Biotechnologie à l'université d'Oran 1 Ahmed BenBella.

#### 2. Système de culture

Le système de culture a été installé au niveau du laboratoire de Biochimie 2 au département de Sciences de la Nature et de la Vie. Pour la réalisation de ce système nous avons utilisé une armoire de deux étages. Chaque étage est équipé de 4 néons de lumière blanche artificielle LED d'une intensité de 24 W. Tous l'intérieure a été couvert par du papier Aluminium pour permettre aux rayons lumineux de circulé toute au tour (figure 8).



**Figure 8.** Chambre de culture

Une photopériode de 18 h d'illumination et de 6 h d'obscurité a été maintenue à l'aide d'un programmeur de temps ou était branché les néons pendant toute la durée des expériences.



**Figure 9.** Programmeur de temps

L'agitation des cultures est assurée par un système de bullage d'air. Ce dernier est constitué par des oxygénateurs équipés d'un filtre (0,45  $\mu\text{m}$ ) pour éviter toute contamination par l'air (figure10). La température de la chambre de culture était entre 22 et 24°C.



**Figure 10.** Oxygénateur.

### 3. Milieu de culture

#### 3.1. Echantillonnage de l'eau de mer

L'eau de mer utilisée dans notre expérience provient de la plage de Kharouba (figure11). 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 11.** Site de prélèvement (kharouba)

### **3.2. Traitement de l'eau**

L'eau de mer doit être traitée pour éliminer les matières en suspension, les contaminants et les organismes pour répondre aux normes de qualité fixées pour une bonne croissance des microalgues.

Une fois l'eau de mer arrivée au laboratoire, il a été filtré à l'aide d'un papier Whatman (1 $\mu$ ) pour éliminer toutes les matières en suspension. L'eau filtrée a été mis dans des flacons de 250 ml qui vont servir de photobioréacteur pour la culture des microalgues.

Après le remplissage des flacons, nous avons procédé à l'autoclavage figure12 de l'eau dans le but d'éliminer tous ce qui est vivant comme les microalgues, les bacteries, les zooplanctons...etc).



**Figure 12.** Autoclave

### 3.3. Préparation du milieu Guillard f/2

Le milieu de culture utilisé dans ce travail est celui de Guillard f/2 (Guillard & 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 Guillard (Guillard & Ryther 1962).

Volume	Composé	Concentration de la solution stock (stérile)
1 ml	NaNO <sub>3</sub> 8,82.10 <sup>-4</sup> M	75 g/l
1 ml	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3,62.10 <sup>-5</sup> M	5,65 g/l
1 ml	Métaux traces	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Na<sub>2</sub> EDTA : 4,16 g/l</li> <li>• FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O : 3,15 g/l</li> <li>• CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O : 0,01 g/l</li> <li>• ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O : 0,022 g/l</li> <li>• CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O : 0,01 g/l</li> <li>• MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O : 0,18 g/l</li> <li>• Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O : 0,006 g/l</li> </ul>
0,5 ml	Vitamine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vitamine B12</li> <li>• Vitamine B1</li> </ul>

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 13.** Les solutions mères du milieu Guillard f/2.

#### 4. Conditions de travail

Avant chaque mise en culture des conditions de travail doivent être respectées, car les techniques exigent beaucoup de soins. Le travail doit s'effectuer dans une zone stérile à proximité du bec Benzen (figure14), la flamme est produite par un brûleur à gaz, elle crée autour d'elle une sphère stérile grâce à la chaleur qu'elle dégage (20 cm de diamètre). Il est alors possible de travailler en conditions stériles dans cette sphère.

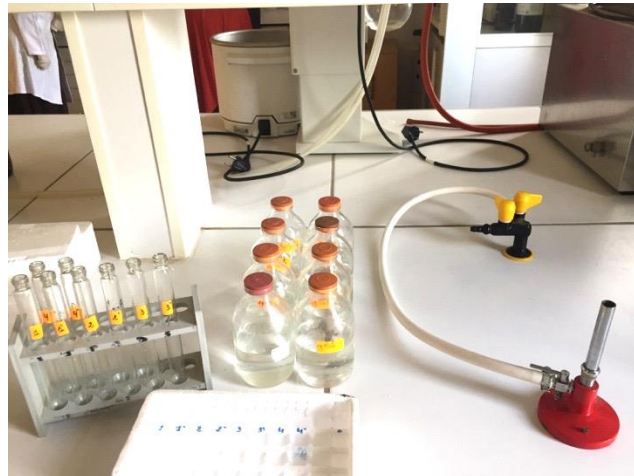


Figure 14. Conditions de travail au bec Benzen.

#### 5. Préparation de la culture mère (préculture)

Pour le lancement des paramètres de l'étude, et afin de faire l'inoculation à partir d'une culture jeune, on a réalisé une préculture de 7 jours dans les conditions précédemment citées. La culture est faite en triplicatas dans des flacons de 500 ml à un volume final de 350 ml (figure15).

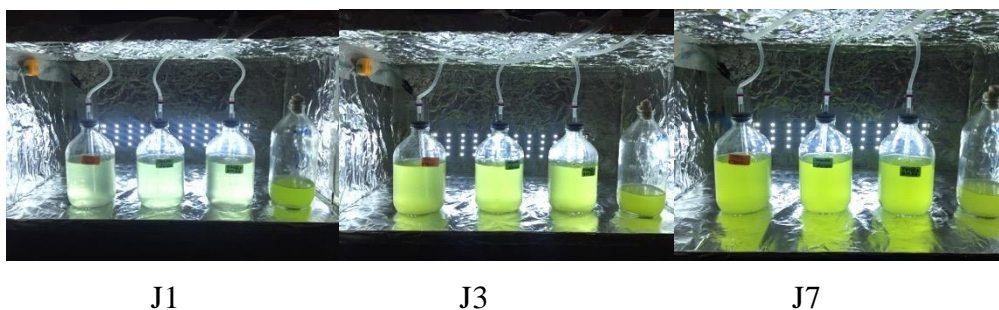


Figure 15. Culture mère

## 6. Plans d'expériences

### 6.1. Influence de la source de carbone

Pour l'étude de l'effet de la supplémentation du milieu de culture Guillard f/2 par différentes sources de carbone, nous avons testés 4 produits : Glucose, Bicarbonate de sodium, Peptone et lactosérum. Au bous de 7 jours de préculture, 20 ml de cette dernière a été repiqué dans 150 ml de milieu de culture stérile contenant une source de carbone a différentes concentrations Tableau3, le suivi de la culture a été effectué pendant une période de 7 jours. Le plan des expériences est représenté dans le tableau 3 :

**Tableau 3.** Concentration en carbone des 4 expériences étudié

Expérience	Sources de carbone	Concentrations testé	Condition de culture
1	Glucose	✓ 0 g/l ✓ 1 g/l ✓ 2 g/l ✓ 3 g/l	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Milieu Guillard f/2.</li> <li>• Photoperiode : 18h illumination :6h obscurité.</li> <li>• Intensité lumineuse 24 W.</li> <li>• Salinité 34,6 %</li> </ul>
2	Bicarbonate	✓ 0 g/l ✓ 1 g/l ✓ 2 g/l ✓ 3 g/l	
3	Peptone	✓ 0 g/l ✓ 1 g/l ✓ 2 g/l ✓ 3 g/l	
4	Lactosérum	✓ 0 g/l ✓ 3,3 g/l ✓ 6,6 g/l ✓ 10 g/l	

Pour la préparation du lactosérum nous avons mélangé 1 litre de lait avec un pot de yaourt nature. Le mélange a été laissé pendant 4 à 5 jours à température ambiante jusqu'à la formation d'un lactosérum à la surface.

## 6.2. Influence du carbone et de l'intensité lumineuse

Au cours de cette expérience, nous avons soumis la culture de *Nannochloropsis* à 4 différents modes de luminosité :

- ✓ Obscurité (pendant 24h)
- ✓ Lumière du jour (12h illumination / 12h obscurité) à une intensité variable.
- ✓ Néon LED (18h illumination / 6h obscurité) à une intensité de 12 W.
- ✓ Néon LED (18h illumination / 6h obscurité) à une intensité de 24 W.

Cette expérience a été effectuée avec et sans supplémentation en bicarbonate comme source de carbone. Le suivi de la culture a été effectué pendant une période de 7 jours.

## 7. Suivi 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 microalgale ce 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 (6715 UV / Vis Spectrophotometer JENWAY) (figure16).

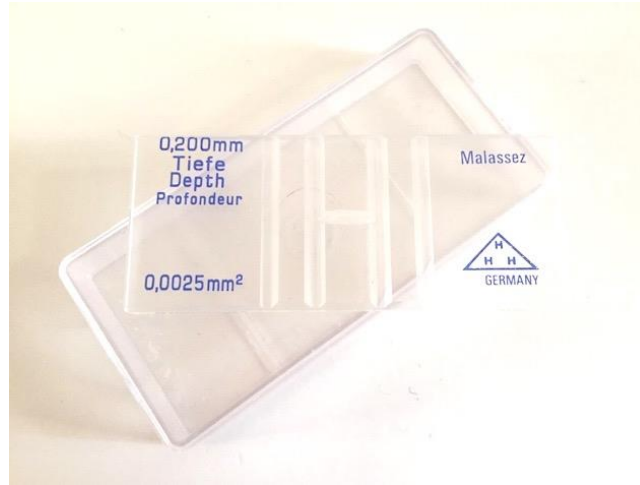


Figure 16. Spectrophotomètre

### 7.2. 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) (figure17). 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.



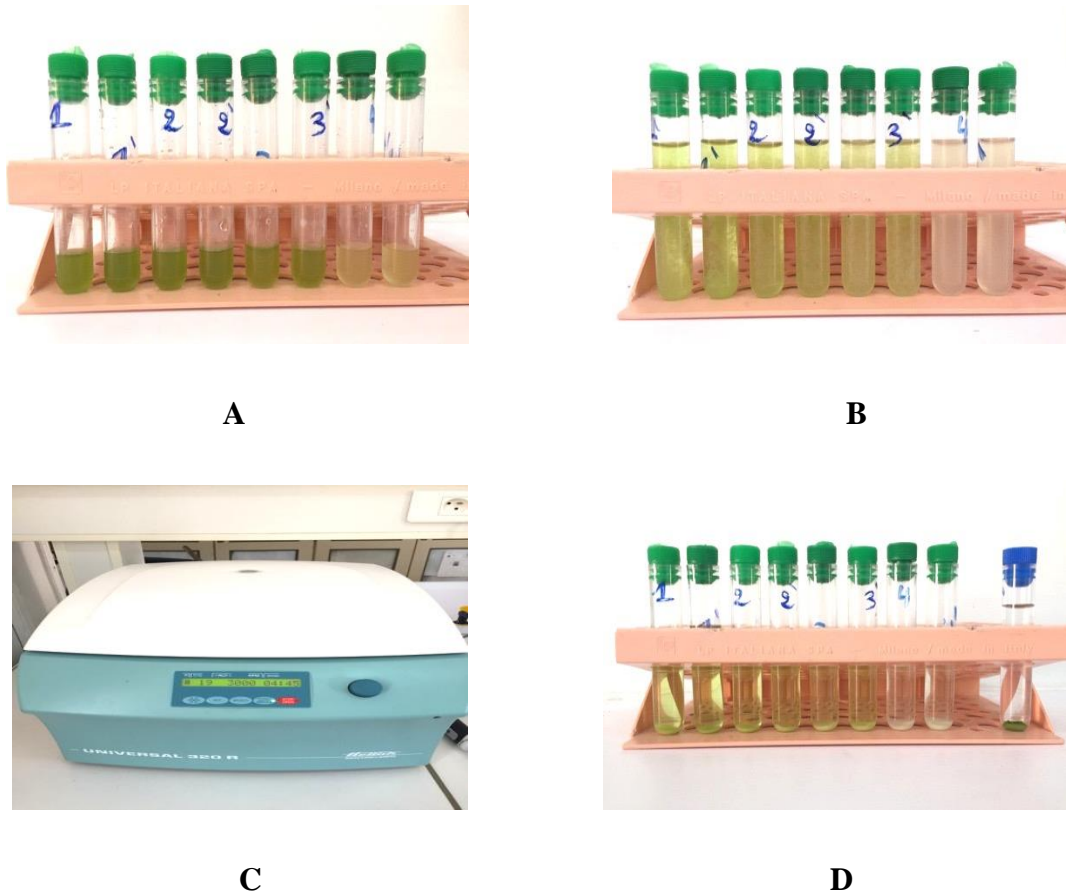
**Figure 17.** Cellule de malassez

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

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

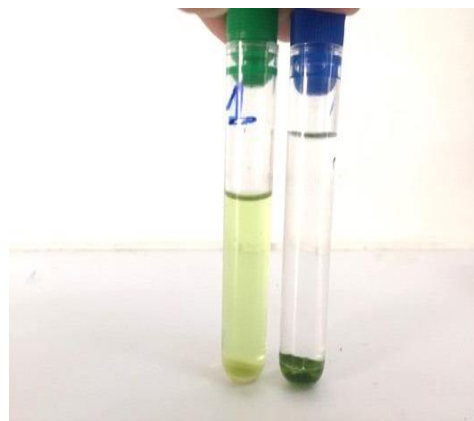
### **8. Détermination de la concentration de la chlorophylle « a » totaux :**

Le contenu en chlorophylle « a » est déterminé par une méthode spectrophotométrique (Strickland & Parsons, 1968). Ainsi, un volume noté V1 de la culture est mélangé a un volume V2 convenable de méthanol (99.8%) pendant une durée minimale de 30 minutes et maximale de 3 heures, à température ambiante (figure18). Par la suite, les débris cellulaires sont précipités et séparés par centrifugation pendant 15 minutes à 3000 tpm (figure18).



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

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 (652 et 665 nm) au spectrophotomètre.



**Figure 19.** Vérification de l'extraction de la chlorophylle « a ».

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

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

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

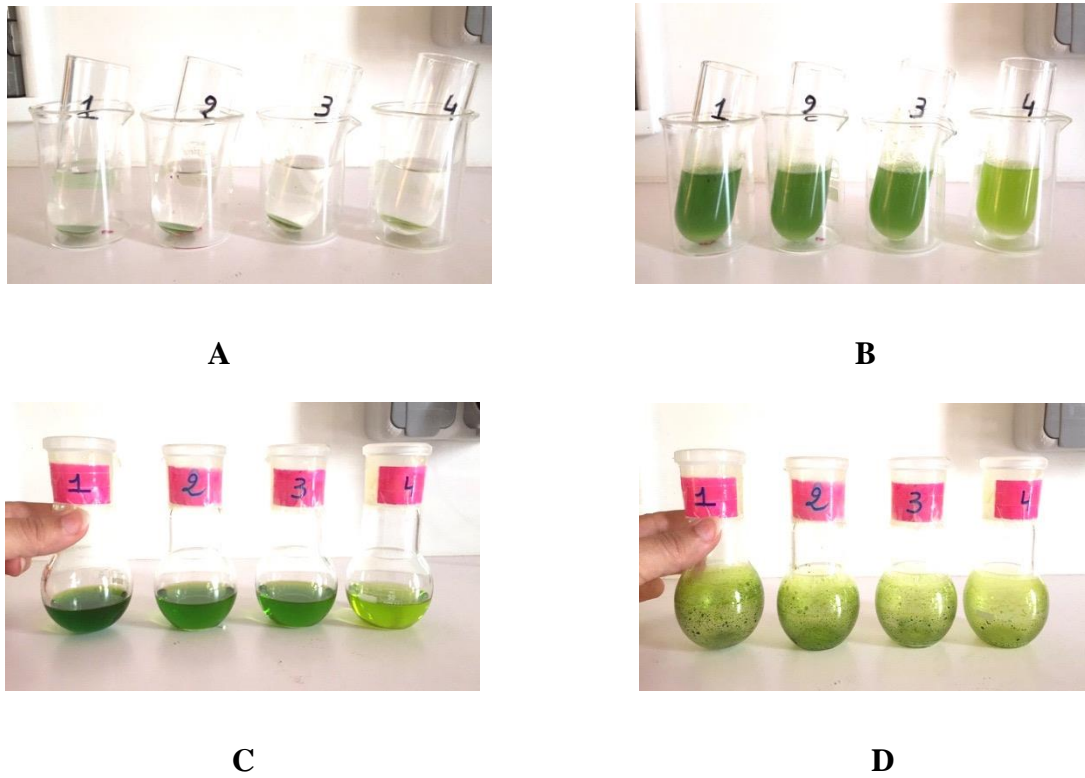


**Figure20.** Echantillons de chlorophylle « a » prêt pour la mesure au spectrophotomètre.

#### 9. 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 a 4000 tpm pendant 10 minute, 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 & Dyer, 1959) (figure21). On agite pendant 2 min et après centrifugation (10 min, 4000 tours), le surnageant est récupéré à l'aide d'une pipette pasteur dans un ballon de verre de 50 ml préalablement séché et pesé.



**Figure 21.** Les différentes étapes pour déterminé le taux de chlorophylle « a »

La phase organique est ensuite prélevée et évaporée à 50°C à l'aide d'un évaporateur rotatif en appel rotavapeur de la marque BUCHI (figure 22).



**Figure 22.** Rotavapeur

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 :

Lipide (g) = Poids du ballon contenant l'extrait - Poids du ballon vide



Avant



Après

Figure 23. Les étapes pour déterminé le poids des lipides

## 10. Analyse des résultats

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

# *Résultats*

## IV/ Résultats et Discussion

### 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 24 :



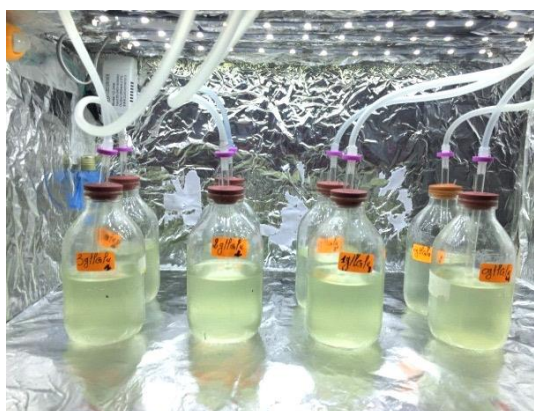
**Figure 24.** Observation microscopique des cellules de *Nannochloropsis gaditana*.

### 2. Influence de la source et de la concentration du carbone

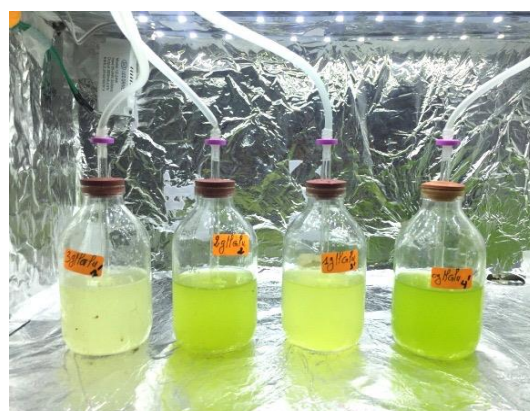
#### 2.1. Supplémentation en glucose

##### 2.1.1. La coloration de la culture

La figure 25 montre l'évolution de la croissance par la couleur de *N. gaditana* cultivé dans 4 concentrations différentes de glucose (0, 1, 2 et 3 g/l).



J1



J7

**Figure 25.** Effet du glucose sur la coloration de la culture

On peut remarquer qu'après 7 jours de culture, la couleur change en fonction du taux de glucose utilisé. Les concentrations de 2 et 4 g/l présentent une couleur verte plus prononcée que pour les concentrations 1 et 3 g/l.

### 2.1.2. Dénombrement des cellules

Le comptage dans les réacteurs permet le suivi l'évolution en nombre des microalgues présentes en solution. Les résultats des différentes concentrations sont exprimés dans la Figure 26.

A partir de cette figure 26 on peut remarquer que le nombre de cellules de J1 jusqu'à J5 augmente pour tous les concentrations du glucose. Le nombre de microalgues cultivés dans du glucose à 1 et 3 g/l a chuté à J6, mais pour les microalgues cultivées dans une concentration en glucose de 0 et 2 g/l, on remarque une augmentation jusqu'à atteindre un nombre de  $250 \cdot 10^5$  et  $350 \cdot 10^5$  cellules/ml.

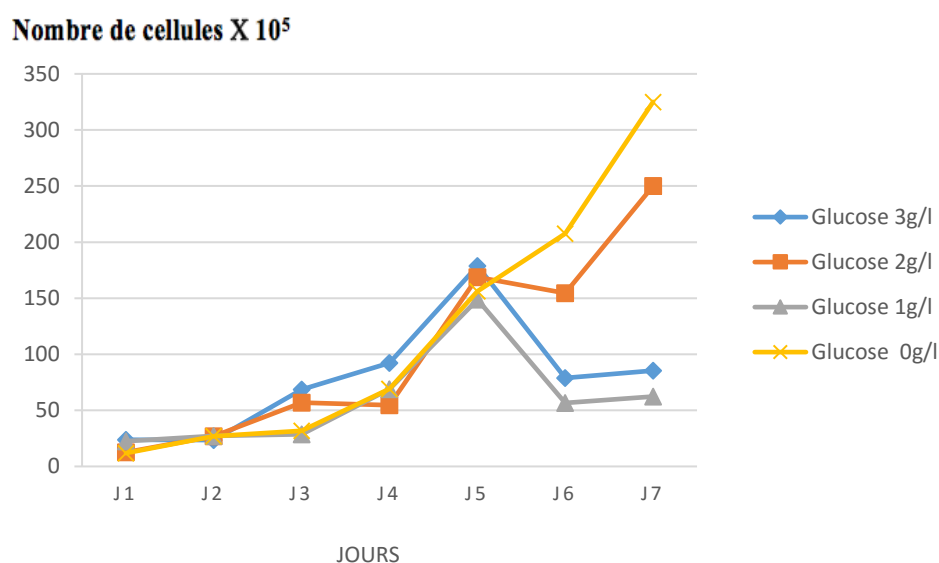


Figure 26. Effet de glucose sur le nombre de cellule

### 2.1.3. Densité optique

La densité optique mesurée par un spectrophotomètre est une méthode de mesure indirecte de la biomasse.

Les mesures réalisées sur les 4 jours permettent de montrer une augmentation de la densité optique jusqu'à atteindre la valeur de DO maximale de 1,45 pour la concentration en

glucose de 2 g/l. Après le J4 on remarque la diminution de la densité optique pour les concentrations 3 et 1 g/l, mais la densité optique des microalgues cultivés à 0 g/l de glucose continu a augmenté en fonction du temps pour atteindre 1,34.

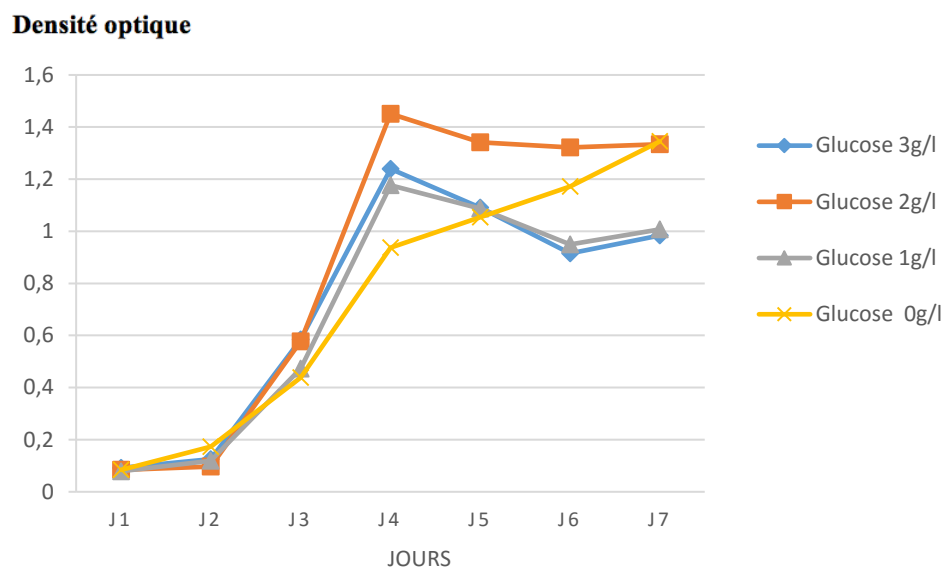


Figure 27. Effet de glucose sur l'évolution de la densité optique

#### 2.1.4. Taux de Chlorophylle « a »

La figure 28 montre qu'à J7, la concentration en chlorophylle « a » chez le groupe de microalgue cultivé a une concentration de 0 g/l est la plus élevée (3,80 µg/ml) contrairement au cultures a des concentration de glucose de 1, 2 et 3 g/l.

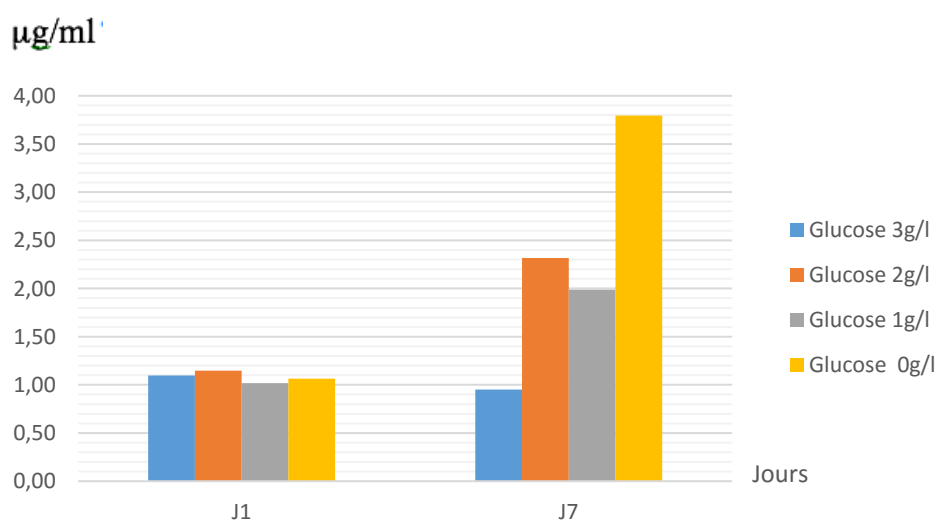


Figure 28. Effet du glucose sur la concentration de la chlorophylle « a ».

## 2.2. Supplémentation en bicarbonate

### 2.2.1. La coloration de la culture

La figure 29 montre l'évolution de la croissance par la couleur de *N. gaditana* cultivé dans 4 concentrations différentes de bicarbonate (0, 1, 2 et 3 g/l). On peut remarquer qu'après 7 jours de culture, l'intensité de la verdure des microalgues est pareille chez toutes les cultures.

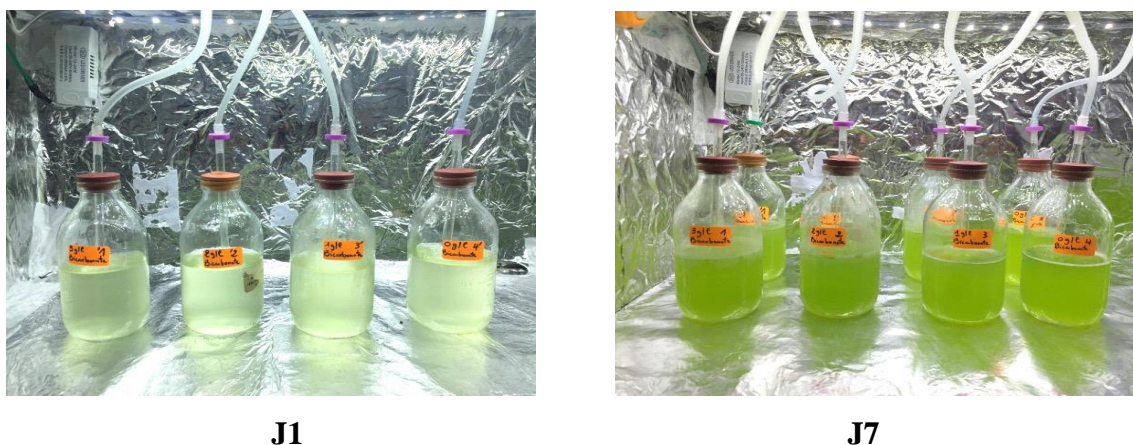


Figure 29. Effet du bicarbonate sur la coloration des cultures

### 2.2.2. Dénombrement des cellules

Les résultats de la culture des microalgues à différentes concentrations en bicarbonate sont exprimés dans la figure 30.

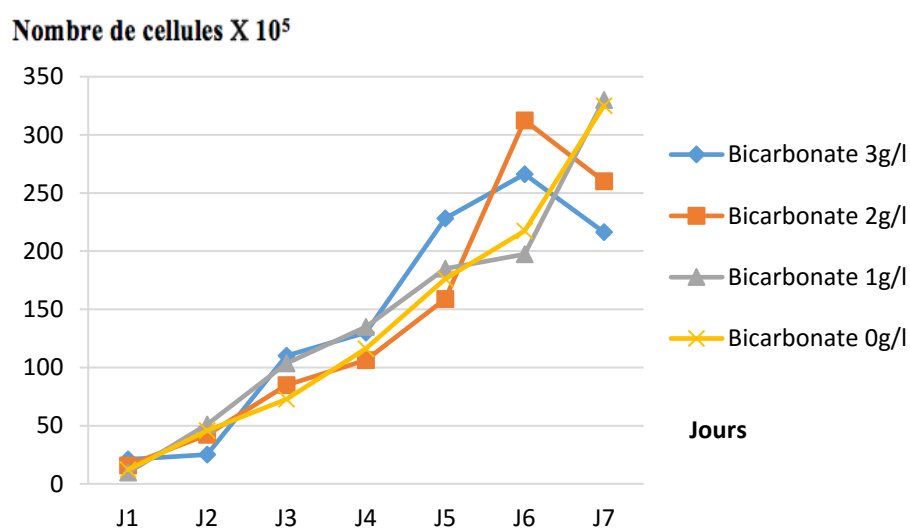


Figure 30. Effet de bicarbonate sur le nombre des cellules

Selon le résultat exposé dans la figure 30, on peut remarquer une progression du nombre cellulaire dans chaque concentration de bicarbonate de J1 jusqu'à J6. Après J6 on observe une diminution du nombre de cellule dans les concentrations 2 et 3g/l, mais chez les microalgues cultivés à 0 et 1 g/l de bicarbonate, le nombre augmente avec le temps pour atteindre  $325.10^5$  cellules/ml.

### 2.2.3. Densité optique

La figure 31 montre une progression de la densité optique de J1 à J7 pour toutes les cultures pour atteindre une valeur maximale de 1,51 chez les microalgue cultivées à 0 g/l de bicarbonate et une valeur minimale de 1,31 chez les microalgues cultivées dans une concentration de 3 g/l de bicarbonate.

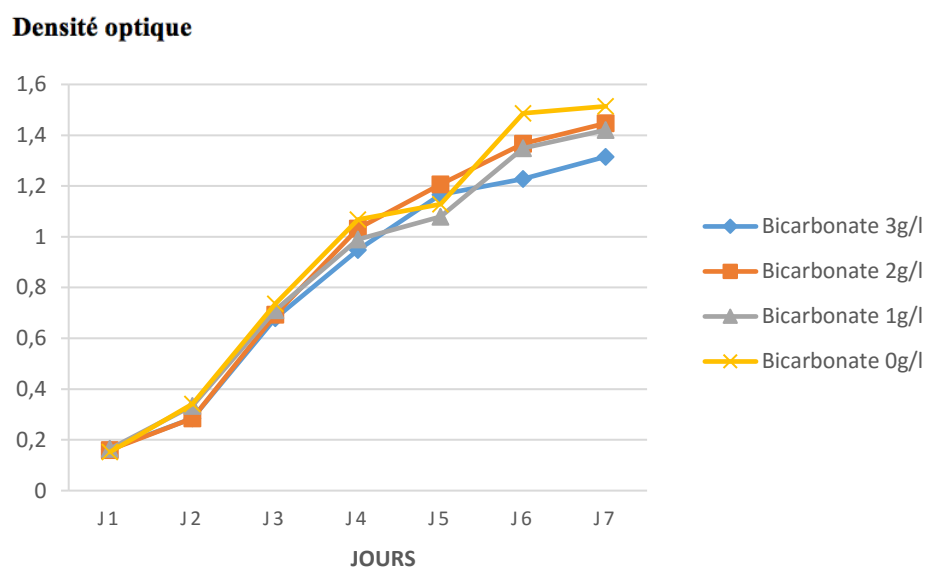
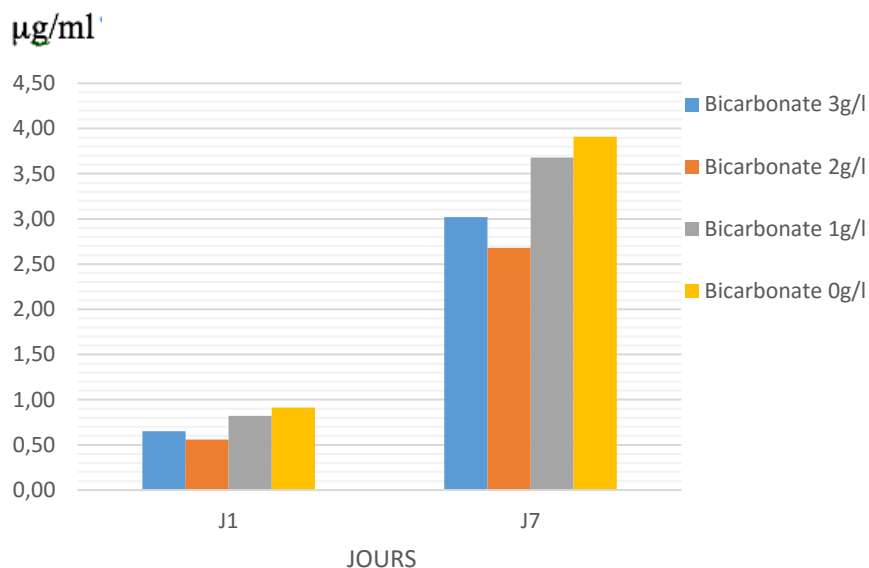


Figure 31. Effet de bicarbonate sur la densité optique

### 2.2.4. Taux de Chlorophylle « a »

Les résultats du taux de chlorophylle « a » après 7J de culture montre que les valeurs de la chlorophylle « a » chez les espèces cultivés a des concentration de 1 et 0 g/l de bicarbonate plus élevé que chez les espèces cultivés a des concentration de 2 et 3 g/l de bicarbonate.

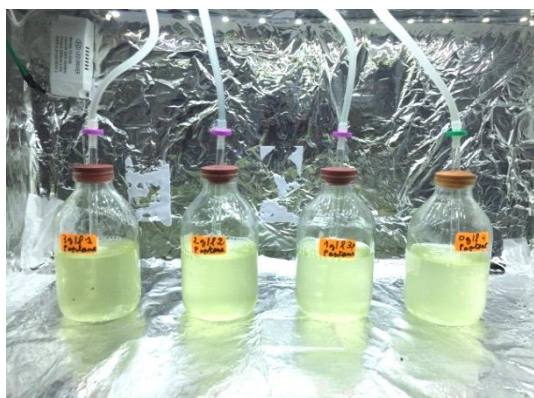


**Figure 32.** Effet de bicarbonate sur le taux de chlorophylle « a ».

### 2.3. Supplémentation en peptone

#### 2.3.1. La coloration de la culture

La coloration de différentes concentrations de peptone de J1 à J7 sont exprimés dans la figure 33. On peut remarquer que la couleur de la culture supplémentée en peptone (1, 2 et 3g/l) est beaucoup plus verte que la culture avec 0 g/l de peptone.



J1

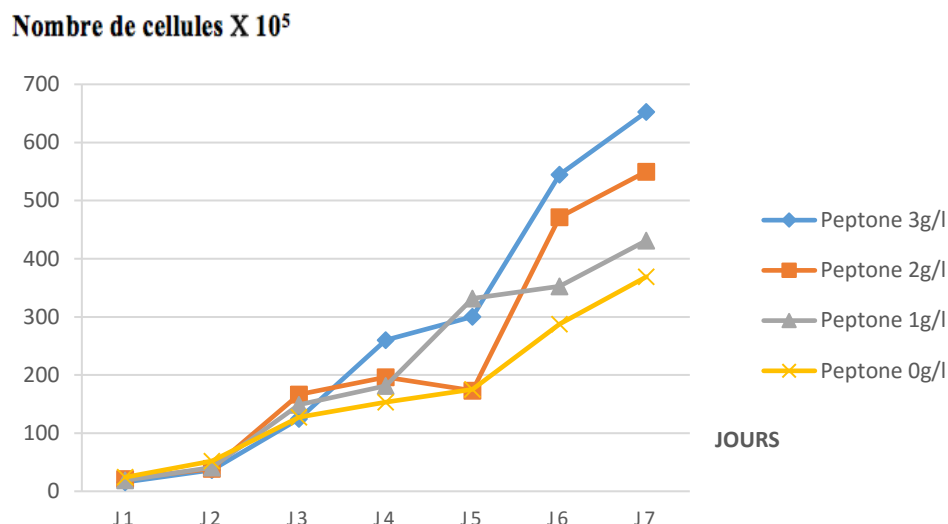


J7

**Figure 33.** Effet de bicarbonate sur la coloration de culture

#### 2.3.2. Dénombrement des cellules

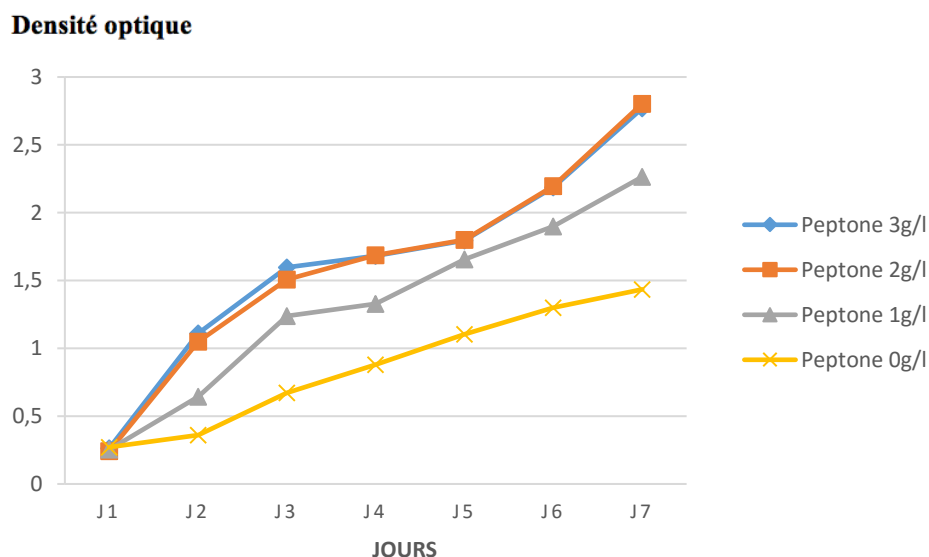
Le résultat de la figure 34 montre une augmentation progressive du nombre de cellules de microalgues en fonction du temps. On peut dire que l'augmentation du nombre des cellules microalgale est directement proportionnelle à la concentration de peptone.



**Figure 34.** Effet de peptone sur le nombre de cellule

### 2.3.3. Densité optique

Selon les résultats exposés dans la figure 35 on peut remarquer que la densité optique augmente chaque jour pour atteindre, une valeur de 2,80 chez les espèces cultivées dans 2 et 3 g/l de peptone en comparaison avec notre témoin (0 g/l) qui atteint une valeur de 1,43.



**Figure 35.** Effet de peptone sur la densité optique

### 2.3.4. Taux de Chlorophylle « a »

D'après les résultats exposés sur la figure 36, On peut dire que l'augmentation de la concentration en chlorophylle « a » chez les microalgues est proportionnelle à la concentration en peptone.

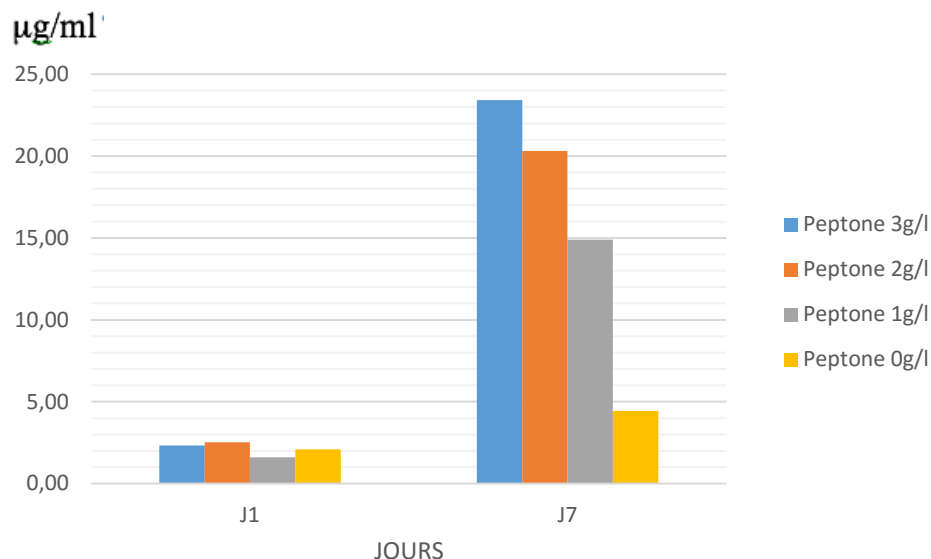


Figure 36. Effet de peptone sur le taux de chlorophylle « a »

## 2.4. Supplémentation en Lactosérum

### 2.4.1. La coloration de la culture

La figure 37 montre l'évolution de la croissance par la couleur de *N. gaditana* cultivé dans 4 concentrations différentes de lactosérum (0, 4, 7, 10 et 13 %).

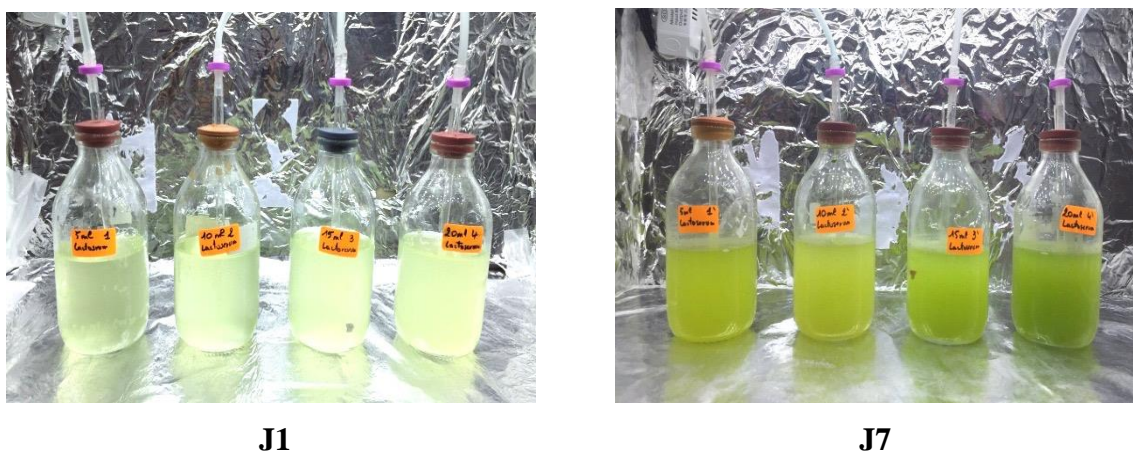


Figure 37. Effet du lactosérum sur la coloration des cultures

On peut remarquer qu'après 7 jours de culture, la couleur change en fonction du taux de lactosérum utilisé. La concentration de 13 % présente une couleur verte plus prononcée que pour les concentrations 4, 7 et 10 %.

### 2.4.2. Taux de Chlorophylle « a »

Les résultats du taux de chlorophylle « a » des différentes concentrations sont exprimés dans la figure 38.

On peut noter que le taux de chlorophylle chez les algues cultivées sans supplémentation en lactosérum est plus important (4,43 µg/ml) que lorsqu'on ajoute du lactosérum comme source de carbone (glucose).

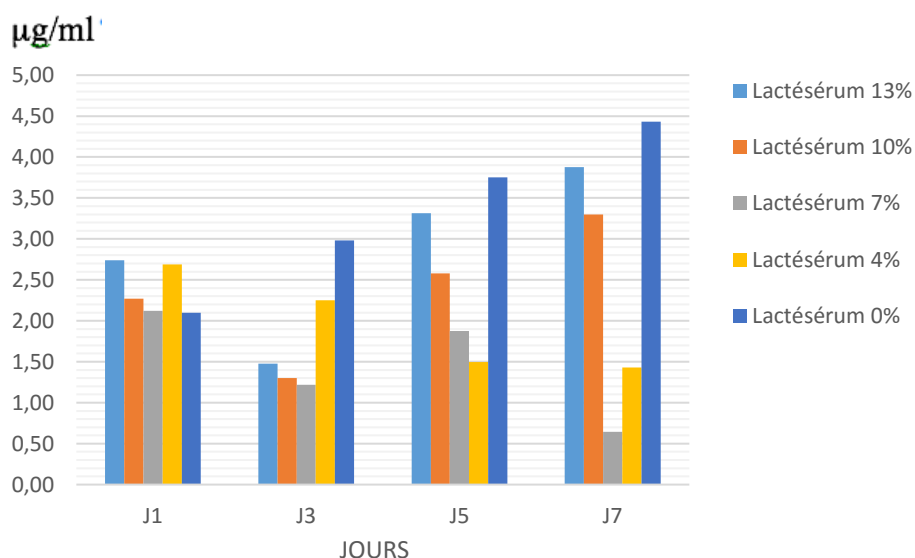


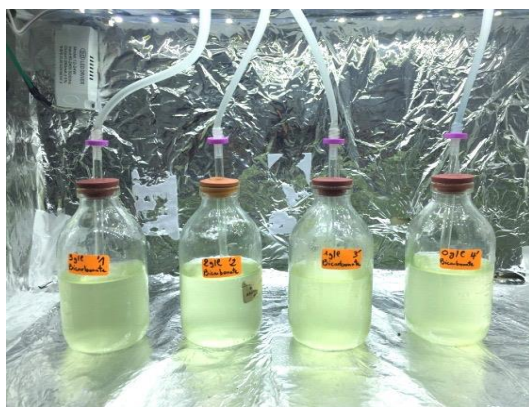
Figure38. Effet de lactosérum sur le taux de chlorophylle « a »

## 3. Influence de la lumière

### 3.1.Sans source de carbone

#### 3.1.1. La coloration de la culture

La figure 39 montre l'évolution de la croissance par la couleur de *N. gaditana* cultivé dans 4 intensités de lumière sans source de carbone (obscurité, lumière du jour, 12 W et 24 W). On remarque qu'à J7 la couleur des microalgues est devenu brunâtre pour tous les modes de culture.



J1



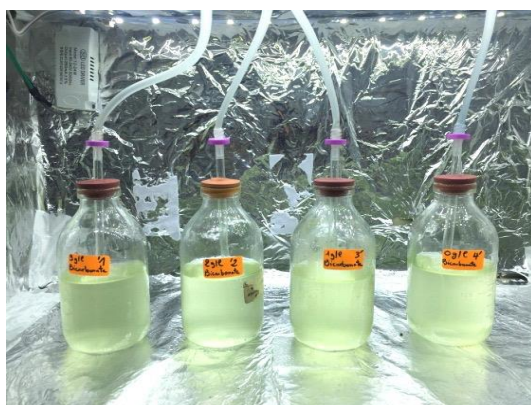
J7

Figure 39. Effet de la lumière sur coloration de la culture

### 3.2. Avec source de carbone (Bicarbonate)

#### 3.2.1. La coloration de la culture

La figure 40 montre l'évolution de la croissance par la couleur de *N. gaditana* cultivé dans 4 intensités de lumière sans source de carbone (obscurité, lumière du jour, 12 W et 24 W). D'après la figure suivante nous pouvant constater que les cellules cultivées dans l'obscurité ne présentent aucune couleur contrairement aux autres. Les microalgues élevées à une intensité de 12 W sont devenues plus verte que celle de 24 W.



J1



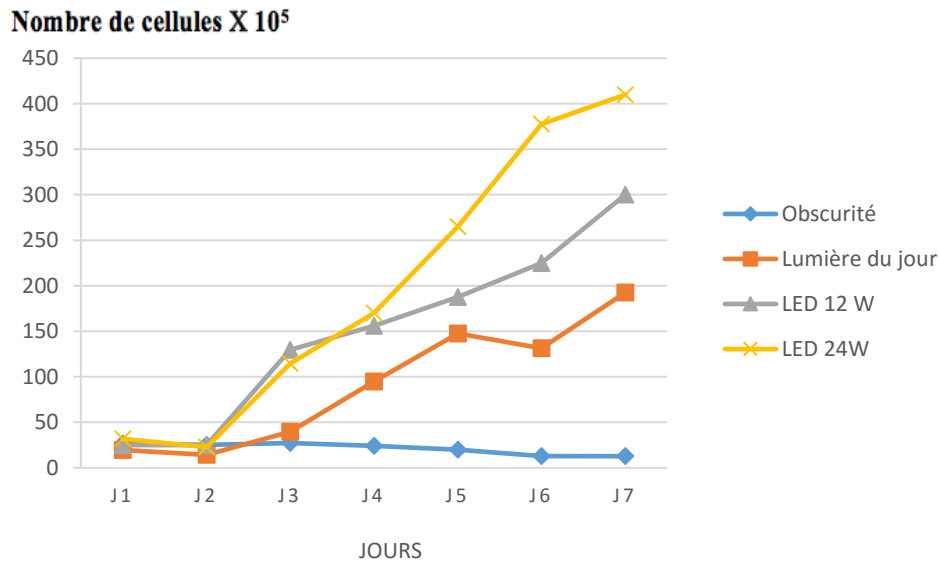
J7

Figure 40. Effet de lumière sur la coloration de culture avec source de carbone

#### 3.2.2. Dénombrement des cellules

A partir de la figure 41 on observe que le nombre de microalgues cultivé à l'obscurité n'augmente pas contrairement aux autres cultures qui augmentent en fonction du temps à partir du deuxième jour. A 12 W le nombre de cellule atteint une valeur maximale de  $410 \cdot 10^5$

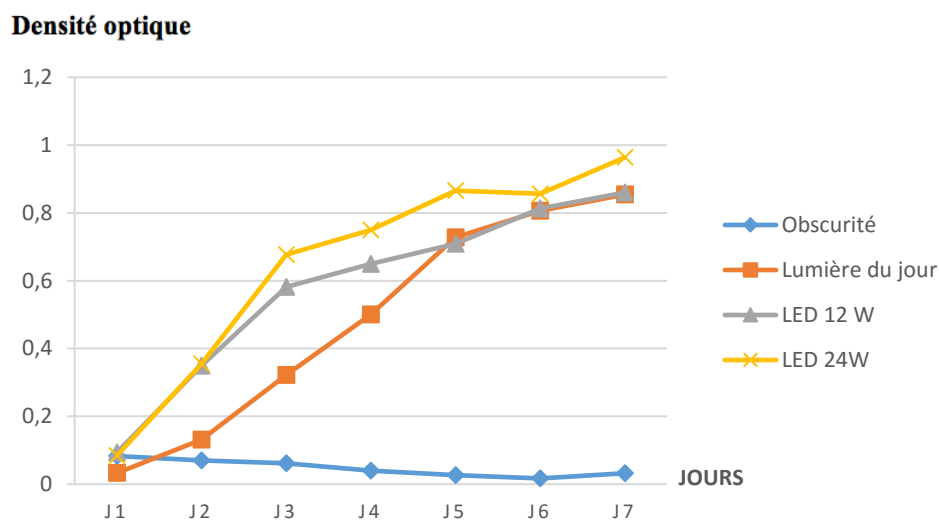
cellules/ml contrairement aux algues cultivées a 24 W ( $300.10^5$  cellules/ml).



**Figure 41.** Effet de la lumière sur le nombre de cellule

### 3.2.3. Densité optique

Les mesures de DO réalisées sont démontrées sur la figure 42. Les résultats montrent une augmentation progressive de la densité optique des microalgues cultivées à la lumière du jour, 24 et 12 W, mais à l'obscurité la densité optique diminue en fonction du temps.

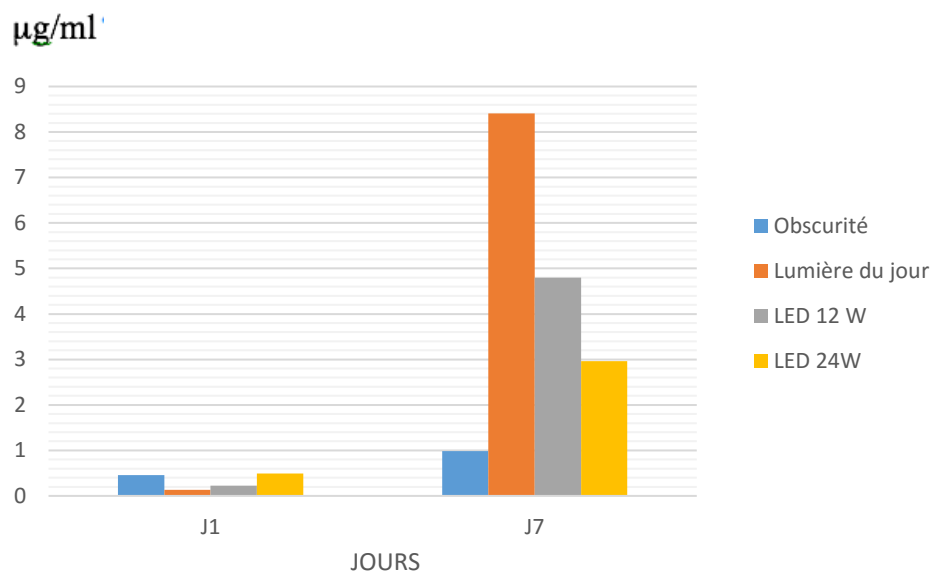


**Figure 42.** Effet de lumière sur la densité optique

### 3.2.4. Taux de Chlorophylle « a »

La mesure du taux de chlorophylle « a » en fonction de l'intensité lumineuse est illustrée dans la figure 43.

Le résultat montre une grande différence dans le taux de chlorophylle entre J1 et J7 des microalgues cultivé à la lumière du jour (8,40 µg/ml), alors que le taux de chlorophylle « a » chez les algues cultivés à l'obscurité est beaucoup moins important (0,98 µg/ml).

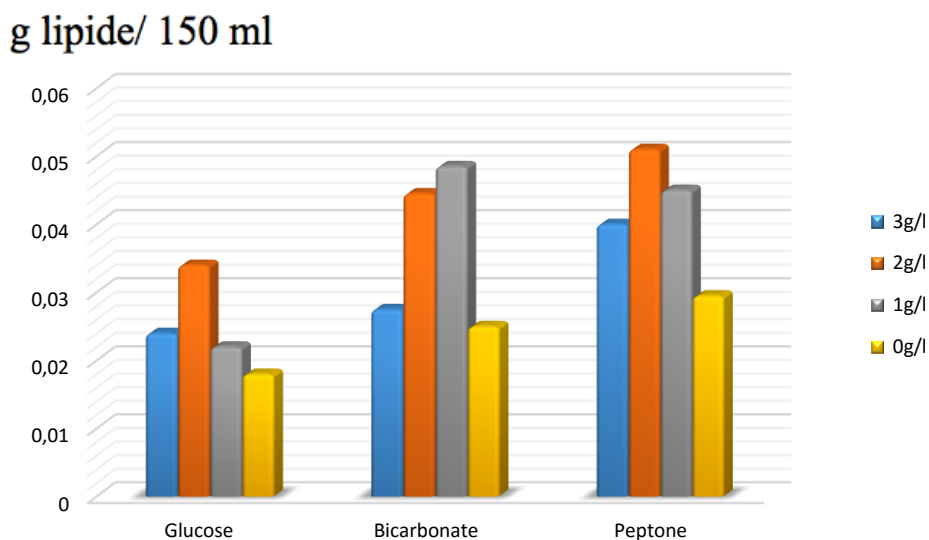


**Figure 43.** Effet de la lumière sur le taux de chlorophylle « a »

## 4. La teneur en lipide

### 4.1. Influence de la source et de la concentration du carbone

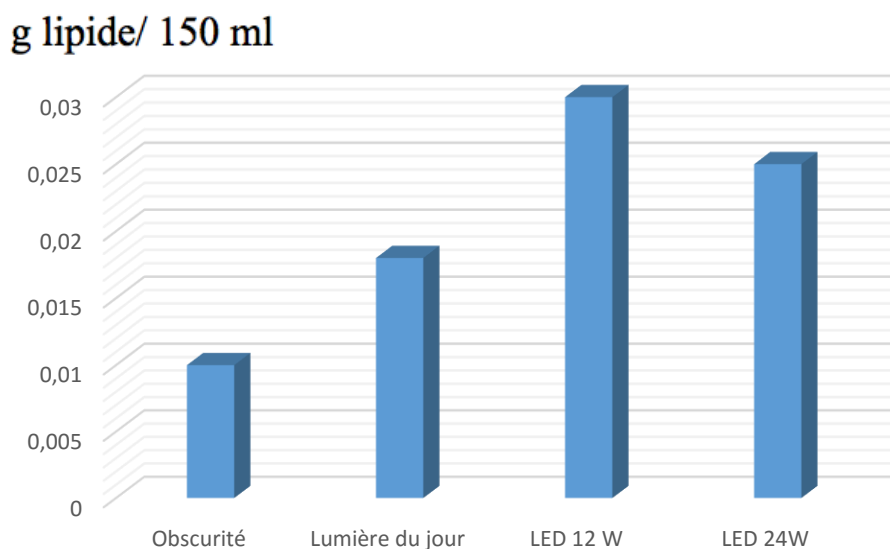
La figure 44 représente le taux de lipide chez les espèces cultivés dans des milieux de culture supplémenté en glucose, en bicarbonate et peptone après 7 jours de culture. On remarque que le taux de lipide chez les espèces cultivé dans un milieu riche en peptone (2 g/l) et en bicarbonate (1 g/l) est plus importants que leurs témoins avec des valeurs de 0,051 et 0,048 g/150 ml de culture respectivement. Pour les espèces cultivées dans un milieu enrichi en glucose, la teneur maximale en lipide est de 0,034 avec une concentration de 2 g/l.



**Figure 44.** Effet de source de carbone sur le taux de lipide

#### 4.2. Influence de la lumière

Selon la figure suivante, on constate que les individus cultivés à l'aide des lampes LED 12 W donnent des teneurs lipidiques maximale de 0,03 g/150 ml de culture contrairement à la culture effectuée à l'obscurité.



**Figure 45.** Effet de la lumière sur le taux de lipide.

# *Discussion*

## V/ Discussion

Les microalgues peuvent avoir un métabolisme autotrophe ou hétérotrophe. Les microalgues de métabolisme autotrophe utilisent le carbone inorganique, principalement le CO<sub>2</sub> comme source de carbone et la lumière comme source d'énergie, alors que les microalgues de métabolisme hétérotrophe doivent utiliser du carbone organique comme source de carbone et d'énergie (Stevenson *et al.*, 1996).

Dans ce présent travail nous avons testé l'effet de la supplémentation du milieu de culture Guillard f/2 en carbone organique (glucose) et en carbone inorganique (bicarbonate et peptone) sur la croissance et le pouvoir d'accumulation des lipides.

Le glucose est la source de carbone organique la plus fréquemment utilisée en laboratoire dans les cultures mixotrophes des microalgues. En effet, Il a été prouvé plusieurs fois que le glucose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) est une des sources de carbone organique aisément assimilable par les algues (Michaud, 2016). Il pénètre dans la cellule par transport actif via la protéine transmembranaire HUP1 (Hallmann & Sumper, 1996).

Après enrichissement du milieu en glucose (0, 1, 2 et 3 g/l), nous avons remarqué que la croissance est meilleur lorsque on utilise le milieu Guillard f/2 standard. Après 7 jours de culture le nombre de cellules, la densité et le taux de chlorophylle « a », sont plus important chez la *Nannochloropsis gaditana* cultivée a 0 g/l de glucose comparé aux autres cultures supplémentés en 1, 2 et 3 g/l de glucose. Ceci peut êtres du a une contamination bactérienne. Le glucose est la source de carbone indispensable à la croissance des bactéries donc si le milieu est riche en glucose on risque d'avoir une contamination, alors dans ce cas un phénomène de compétition entre les microalgue et les bactéries peut être observé (Kamjunke *et al.*, 2008).

L'étude de l'effet de la supplémentation du milieu de culture en bicarbonate (0, 1, 2 et 3 g/l) sur la croissance de *Nannochloropsis gaditana*, a démontré que l'usage d'un milieu enrichi en bicarbonate a différentes concentrations, donne des résultats de croissance pratiquement similaire au culture qui ne sont pas additionné de bicarbonate. Donc on peut dire que le bicarbonate n'a aucun effet sur la croissance de *Nannochloropsis gaditana*. Les travaux de White *et al.* (2013) sont en faveur de cette hypothèse. En effet, ils ont observé qu'après supplémentation du milieu en bicarbonate chez l'espèce *Nannochloropsis salina*, le

taux de croissance ne changé pas significativement entre les concentrations en bicarbonate de 0, 1 et 2 g/l. par contre ils ont constaté que la teneur en chlorophylle « a » doublé quand ont additionné le milieu en bicarbonate, alors que dans notre expérience, la culture dans un milieu standard donné de meilleurs résultats.

Après supplémentation du milieu en peptone à différentes concentration (1, 2 et 3 g/l) nous avons directement remarqué une croissance beaucoup plus importante que chez les cultures non additionnées et cela, dès le 4<sup>ème</sup> jours. En effet, le nombre de cellules chez les cultures enrichies en peptone à 3 g/l a atteint une valeur de  $653.10^5$  cellules/ml contrairement au culture sans peptone ( $369.10^5$  cellules/ml). D'après ces résultats, On peut remarquer que la croissance a presque doublé. Ces résultats remarquables peuvent être expliqués par la double fonction du peptone. En effet, les cellules de microalgue utilisent ce dernier, non seulement comme une source de carbone mais surtout comme une source d'azote. Selon Attrassi *et al.* (2007), le peptone est une source d'azote très facilement dégradable par les microorganismes et ceci parce que c'est une source organique. Le taux de chlorophylle « a » a atteint des concentrations 5 fois plus importante (23,41  $\mu\text{g/ml}$ ) chez les cultures contenant 3 g/l de peptone que chez les culture non additionné en peptone (4,43  $\mu\text{g/ml}$ ).

Lors de notre travail nous avons essayé de valoriser les déchets des industries laitières en utilisant le lactosérum qui résulte de la production de lait caillé et de camembert. Ce dernier, représente une source de carbone organique non négligeable car il est très riche en glucose (Bergeron, 2014).

Nous avons testé 5 concentrations de lactosérum (0, 4, 7, 10 et 13 %). Après 7 jours d'expérience, la couleur des cultures montre que l'usage du lactosérum comme source de carbone donne de meilleur résultats que chez le témoin (sans lactosérum). Nous n'avons pas présenté les résultats du comptage et de la densité optique car les valeurs étaient faussées par la présence de bactérie lactique du lactosérum. La concentration de la chlorophylle « a » est plus importante chez les microalgues cultivées dans un milieu sans lactosérum (4,43  $\mu\text{g/ml}$ ) comparais aux autres cultures supplémentés en lactosérum. Ces résultats ont été constaté par plusieurs chercheurs, en effet, d'après Perez- Garcia *et al.* (2011) et Michaud (2016), l'ajout de glucose au milieu de culture de *Chlorella vulgaris* induit plusieurs changements métaboliques tels que, la diminution du contenu cellulaire en chlorophylle.

Pour l'étude de l'effet de la lumineuse sur le mécanisme d'absorption du carbone, et

donc, sur la croissance de *Nannochloropsis gaditana*, nous avons testés 4 intensités lumineuse (culture à l'obscurité, a la lumière du jour, avec des lampes LED de 12 W et 24 W) sans ou avec une source de carbone (bicarbonate). L'expérience des différent intensité lumineuse sans supplémentation en source de carbone a échoué, car la culture mère utilisé pour l'ensemencement était contaminée par des bactérie, c'est ce qui explique la couleur brunâtre dans les photobioréacteur.

Les résultats lorsque on a additionné le milieu en bicarbonate, montre que la croissance est pratiquement nul chez les microalgues cultivées en hétérotrophie (Sans lumière). Contrairement au cultures réalisé à la lumière du jour, les microalgues cultivé a l'aide d'une lumière artificielle LED donne de meilleur résultat. L'intensité lumineuse qui a donné la meilleure croissance est celle de 24 W ( $400 \cdot 10^5$  cellules/ml). En effet, d'après Cheirsilp et son équipe, un apport plus important en lumière va stimuler la photosynthèse et donc stimuler la croissance de la biomasse algale (Cheirsilp *et al.*, 2012). Il existe des contradictions sur l'effet de la lumière dans la littérature. Certains auteurs comme Martinez et son équipe soutiennent qu'une augmentation de l'intensité lumineuse n'influe pas sur le développement de la biomasse de *Chlorella pyrenoidosa* (Martinez *et al.*, 2014). Alors que d'autres soulignent une augmentation de la biomasse suite à un apport de lumière plus important sur leurs cultures de *Chlorelia sp.* et *C. prothecoides* (Cheirsilp *et al.*, 2012) .

La quantification des lipides a été réalisé à la fin de chaque expérience, les résultats montrent que la teneur en lipide chez les microalgue cultivées dans un milieu enrichi a 3 g/l de peptone est plus importante que chez les autres cultures. Ceci pourrait être expliqué, entre autres, par le fait que le peptone a donné la meilleur croissance, donc le nombre important de cellule a fait que le taux de lipide soit important, un résultat similaire a été constaté par Ren *et al.* (2013) chez *Scenedesmus sp.* La culture supplémentée en bicarbonate à 1 g/l, a donné des valeurs en lipide plus élevé que pour les autres concentrations en bicarbonate, ce résultat est en désaccord avec les résultats de White *et al.* (2013), qui a montré que la teneur en lipide est plus importante dans les cultures supplémentées avec 2 g/l de bicarbonate chez *Tetraselmis suecica* and *Nannochloropsis salina*.

# *Conclusion*

## VI/ Conclusion

Le but de ce travail était d'évaluer l'influence de la supplémentation de la culture par différentes sources de carbone sur la productivité en biomasse et en lipide chez l'espèce *Nannochloropsis gaditana*.

En regard de nos résultats, on peut conclure que le choix de la source de carbone dépend de ce qu'on veut obtenir ; biomasse, Chlorophylle « a » ou teneur en lipide. La supplémentation du milieu de culture Guillard f/2 par 3 g/l de peptone a donné des résultats de croissance et des teneurs en chlorophylle « a » très intéressants. Par contre, pour produire beaucoup de lipide on peut utiliser du peptone à 2 g/l ou du bicarbonate à 1 g/l.

Bien qu'il a été prouvé plusieurs fois que le glucose ( $C_6H_{12}O_6$ ) est une des sources de carbone organique aisément assimilable par les algues, les milieux de culture contenant ce dernier sont sujet a des contaminations, donc la manipulation doit être effectué sous bec Benzen en travaillant dans des conditions d'asepsie strict.

Les sources de carbone telle que le glucose, le peptone ...etc, présentent un coût assez élevé ne permettant pas d'atteindre une production rentable en biocarburants. La recherche de sources alternatives de carbone organique bon marché (les déchets industriels) est donc une nécessité.

*Références  
bibliographiques*

## VII/ Références bibliographiques

**Abdennadher M., 2014.** Étude Taxonomique & Écophysiologique des dinoflagelle's toxiques du Golfe de Gabès : *Alexandrium minutum*, *Prorocentrum lima*, *Cooliaspp.* & *OStreopsis avata*, THÈSE pour obtenir le grade de docteur de l'université de sfax. 244 p.

**Alain G., 2006.** Étude d'opportunité des biotechnologies marines sur la production et l'utilisation des microalgues, Rapport commandité par la SODIM. 44 p.

**Attrassi K., Benkirane R., Attrassi B., Badoc A., Douir A., 2007.** Effet de la source de carbone et d'azote sur la croissance et la sporulation de moisissures des pommes en conservation. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 146, 211-224.

**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.

**Bergeron G. J.-M., 2014.** Utilisation du lactosérum dans un procédé de culture de microalgues mixotrophes pour la production de biodiesel. Thèse de doctorat, UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE.

**Boileau M., 2015.** Evaluation du potentiel d'utilisation d'une eau usée industrielle comme substrat de culture pour des microalgues d'eau douce dans une optique de production de biocarburants'de 3Egénération. p 34 - 35.

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

**Cantin I., 2010.** La production de biodiesel à partir des microalgues ayant un métabolisme hétérotrophe, Essai présenté au Centre Universitaire de Formation en Environnement en vue de l'obtention du grade de maître en environnement (M.Env) , Université de Sherbrooke. 97p.

**Cavalla M., 2000.** Les algues- Les microalgues. p 2.

**Cheirsilp B. and Torpee S., 2012.** "Enhanced growth and lipid production ofmicroalgae

under mixotrophic culture condition: effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation." *Bioresour. Technol* vol. 110, pp. 510-516, Apr.

**Chevanton M., 2013.** Interactions microalgues-bactéries en système expérimental bispécifique : effets sur la croissance de *Dunaliella* Sp. thèse de doctorat, école doctorale Vénam, université de Nantes. 198 p.

**Claude P., 2008.** Quelques particularités biologiques : Les formes et la reproduction des algues.

**Diadié D., 2009.** Production d'aliments enrichi en acide gras polyinsaturés à partir de microalgues pour les besoins aquacoles. p 4

**Doré-Deschênes F., 2009.** Utilisation des microalgues comme source d'énergie durable, Essai présenté au Centre Universitaire de Formation en Environnement en vue de l'obtention du grade de maître en environnement (M.Env.), Université de Sherbrooke. 111p.

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

**Hallmann A., Sumper M., 1996.** The *Chlorella* hexose/H<sup>+</sup> symporter is a useful selectable marker and biochemical reagent when expressed in *Volvox*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, pp. 669-673.

**Jauzein C., 2009.** Paramétrisation de la nutrition azotée et phosphorée d'*Alexandrium catenella* microalgue toxique responsable d'efflorescences dans la lagune de Thau.

**John L., 2015.** Les Algues vertes, rouges, brunes, dorées et autres Algues.

**Kamjunke N., Köhler B., Wannicke N., Tittel J., 2008.** Algae as competitors for glucose with heterotrophic bacteria (1).

**Legrand J., 2007.** Capture biologique du CO<sub>2</sub>. Utilisation de micro-organismes photosynthétiques. Laboratoire GEPEA.

**Martinez M.E., Carnacho F., Jiménez J.M. and Espinola J.B., 1997.** "Influence of light intensity on the kinetic and yield parameters of *Chlorella pyrenoidosa* mixotrophic growth," *Process Biochemistry*. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959296000453>. [Accessed: 17-Jun-2014].

**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.

**Perez-Garcia O., Bashan Y., Esther Puente M., 2011.** Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and removing ammonium by the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of Phycology*. 47(1), 190-199.

**Phycol J., 2008.** Jun;44(3):616-23. doi: 10.1111/j.1529-8817.2008.00520.x.

**Pulz and Gross W., 2004.** Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology ET Biotechnology*. 65: 635-648.

**Ren H.Y., Liu B.-F., Chao M., Lei Z. and Ren N.-Q., 2013.** A new lipid-rich microalga *Scenedesmus* sp. strain R-16 isolated using Nile red staining: effects of carbon and nitrogen sources and initial pH on the biomass and lipid production *Biotechnology for Biofuels*. 6:143 <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/6/1/143>

**Richmond A., 1986.** Microalgae of economic potential. In *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Richmond A., (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida. 285 -329.

**Rodolfi L., Chini Zittelli G., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Trevisan 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.

**Sadi M., 2012.** Les microalgues : un défi prometteur pour des biocarburants propres, Préparation of Papers in a two. Column for the IEE international symposium on Industrial Electronic. p 196 : 47.

**Sadi M., 2012.** Les microalgues : un défi prometteur pour des biocarburants propres, Préparation of Papers in a two. Column for the IEE international symposium on Industrial Electronic. p 196 : 47.

**Stevenson R.J., Bothwell M.L., Lowe R.L., 1996.** Algal ecology, [En ligne]. [http://books.google.ca/books?hl=fr&lr=&id=gl7hw2WLA1cC&oi=fnd&pg=PA299&dq=heterotrophic+metabolism+microalgae&ots=6Ou7EFLepF&sig=Wjt0nXaRgfSXfhfOoH\\_0TLmfQ#v=onepage&q=heterotrophic%20metabolism%20microalgae&f=false](http://books.google.ca/books?hl=fr&lr=&id=gl7hw2WLA1cC&oi=fnd&pg=PA299&dq=heterotrophic+metabolism+microalgae&ots=6Ou7EFLepF&sig=Wjt0nXaRgfSXfhfOoH_0TLmfQ#v=onepage&q=heterotrophic%20metabolism%20microalgae&f=false) (Page consultée le 13 octobre 2009).

**Taleb A., 2015.** Production de biodiesel à partir des microalgues : recherche des souches accumulatrices des lipides et optimisation des conditions de culture en photobioréacteurs, thèse de doctorat. Université de Nantes.

**Ville and Champ, 2014.** Les microalgues une usine photo synthétique pour le recyclage du CO<sub>2</sub> et la production de biocarburants. p5.

**White D.A., Pagarette A., Rooks P. and Ali S.T., 2013.** The effect of sodium bicarbonate supplementation on growth and biochemical composition of marine microalgae cultures. *Appl Phycol J.*, 25:153–165 DOI 10.1007/s10811-012-9849-6