

République Algérienne Démocratique et Populaire

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



جامعة عبد الحميد بن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MER ET DE L'AQUACULTURE

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

**GUEBABI Karima et ZERROUKI Houriya**

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN HYDROBIOLOGIE MARINE ET CONTINENTALE**

**Spécialité: Ressources Halieutique**

**THÈME**

Etude de la croissance et de la composition biochimique de deux souches microalgale marine «*Nannochloropsis gaditana*» (Hibbred, 1998) et «*Nannochloris sp.*» (Naumann, 1921).

Soutenue publiquement le 15/09/2019

DEVANT LE JURY

Président: Dr. BELBACHIR NorEddine	MCB	U.Mostaganem
Encadreur: Mme.BENZIDANE Dehiba	MAA	U.Mostaganem
Co Encadreur: Dr.BENAMAR Nardjess	MCA	U.Mostaganem
Examinatrice: Mme. BILLAMI Malika	MAA	U.Mostaganem

*Thème réalisé au Laboratoire de Biochimie 02 (Université de Mostaganem).*

## 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 accordée 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.

Un grand merci à **Dr. BENAMAR Nardjess** Maitre de conférences "A" à l'Université de Mostaganem, pour ses conseils concernant mon style d'écriture, elles ont grandement facilité mon travail.

Je remercie les membres du jury

**Dr. BELBACHIR NorEddine** le responsable de Département des Sciences de la Mer et de l'Aquaculture 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.

**Mme.BILLAMI Malika** enseignante à l'Université Abdelhamid Ibn Badis 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 **M.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.

## **Dédicace:**

*Je dédie ce travail à :*

*Mes chers parents*

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

*Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez fait consentis pour ma formation, je ne saurais exprimer ma gratitude seulement par des mots que dieu vous protège et vous garde pour nous. Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de vous.*

*A ma sœur DALILA qui ma aider beaucoup et mon frère*

*MUSTAPHA*

*A ma binôme ZERROKI HORIYA et tous mes chères amies.*

*A la promotion de MASTER 2 RESSOURCES HALIEUTIQUES  
l'année 2018/2019.*

**GUEBABI KARIMA**

## **Dédicace :**

*Je dédie ce travail à :*

*Mes chers parents*

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

*Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour ma formation. Dieu vous protège et vous garde pour nous.*

*A mes sœurs Fatima et Rachida et mes frères Mohamed,  
Mansour et Aymeen*

*A mon mari Abd El Kadir*

*A ma binôme GUEBABI KARIMA et tous mes chères amies.*

*A la promotion de Master 2 RESSOURCES HALIEUTIQUES  
l'année 2018/2019.*

**ZERROKI Horiya**

## Résumé

Les microalgues suscitent actuellement un vif engouement et de nombreuses start-up investissent dans ce créneau. De plus, beaucoup de recherches appliquées sont consacrées aux microalgues pour la production de lipides en vue de produire de l'énergie renouvelable (biocarburants). L'exploitation des microalgues conduit aussi à la production de pigments; ces pigments peuvent avoir des applications dans certain domaine médical, cosmétique, et environnemental.

Néanmoins, il reste encore des verrous à lever, via des recherches amont, avant que les rendements et les coûts espérés soient effectivement atteints et que ces technologies ne puissent voir le jour à grande échelle.

L'objectif de notre travail était d'étudier l'évolution de la croissance des espèces *Nannochloropsis gaditana* et *Nannochloris sp.* et leur réaction dans le milieu de culture Guillard f/2.

Le suivie de la croissance, a été effectué quotidiennement par mesure de la densité optique par un spectrophotomètre et un dénombrement des cellules a été réalisé a l'aide de la cellule de Malassez pour la détermination de la concentration cellulaire. Les paramètres de croissance (concentration de la biomasse initiale et maximale ainsi que le taux de croissance spécifique), et la productivité volumique de la biomasse ont été déterminé. Pour l'étude de la composition biochimique des deux espèces, des dosages du taux de chlorophylle «a», du taux de Caroténoïdes et de la teneur en lipides ont été effectués.

Nos résultats montrent que *Nannochloris sp.* Présente une concentration de la biomasse (1956,69 mg MES/L) et un taux de croissance spécifique ( $0,008 \text{ J}^{-1}$ ) supérieur a celui de *Nannochloropsis gaditana* (1644,97 mg MES/L et  $0,009 \text{ J}^{-1}$ , respectivement). En ce qui concerne la production des métabolites, la teneur en lipide, en chlorophylle «a» et en caroténoïde, *N.gaditana* a une meilleur production (45%,  $21 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , et  $0,030 \mu\text{g}/\text{ml}$ , respectivement).

En regard de nos résultats, on peut conclure que l'espèce la plus riche en lipide, chlorophylle «a» et en caroténoïde est *Nannochloropsis gaditana*. Cependant, le suivie des paramètres de croissance chez *Nannochloris sp* était meilleure. Cette dernière est rapidement adaptée au milieu et aux conditions expérimentales.

## Motes clés

Microalgue, *Nannochloropsis gaditana*, *Nannochloris sp*, Guillard f/2, Lipides, Carotinoïde, Chlorophylle «a».

## **Abstract**

Microalgae are currently generating a lot of enthusiasm and many start-ups are investing in this niche. In addition, much applied research is devoted to microalgae for the production of lipids to produce renewable energy (biofuels). The exploitation of microalgae also leads to the production of pigments; these pigments may have applications in certain medical, cosmetic and environmental fields.

Nevertheless, there are still issues to be resolved, through upstream research, before expected yields and costs are actually achieved and these technologies cannot be realized on a large scale.

The objective of our work was to study the evolution of the growth of the species *Nannochloropsis gaditana* and *Nannochloris sp.*, and their reaction in the culture medium Guillard f/2.

The growth monitoring was carried out daily by measuring the optical density by a spectrophotometer and a count of the cells was made using the Malassez cell for the determination of the cell concentration. The growth parameters (concentration of initial and maximum biomass as well as the specific growth rate) and the volume productivity of the biomass were determined. For the study of the biochemical composition of the two species, chlorophyll «a» rate, Carotenoid level and lipid content were measured.

Our results show that *Nannochloris sp.* has a concentration of biomass (1956.69mg MES/L) and a specific growth rate ( $0.008 \text{ J}^{-1}$ ) greater than that of *Nannochloropsis gaditana* (1644.97mgMES/L and  $0.009 \text{ J}^{-1}$ , respectively). With regard to the production of metabolites; the lipid, chlorophyll a and carotenoid content, *N.gaditana* has a better production (45%,  $21\mu\text{g}/\text{m}^3$ , and  $0,030\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively).

In view of our results, we can conclude that the species richest in lipid, chlorophyll «a» and Carotenoid is *Nannochloropsis gaditana*. However, the monitoring of growth parameters in *Nannochloris sp.* was better. The latter is quickly adapted to the environment and the experimental conditions.

## **Key words**

Microalga, *Nannochloropsis gaditana*, *Nannochloris sp.*, Guillard f/2, Lipides, Carotenoïde, Chlorophylle «a».

## ملخص

تولد الطحالب الدقيقة حالياً الكثير من الحماس و تستثمر العديد من الشركات الناشئة في هذا المجال بالإضافة إلى ذلك تخصص الكثير من البحوث التطبيقية على الطحالب الدقيقة لإنتاج الدهون من أجل إنتاج الطاقة المتجددة (الوقود الحيوي) استغلال الطحالب الدقيقة يؤدي أيضا إلى إنتاج مستقبلات. قد يكون لهذه المستقبلات تطبيقات في بعض المجالات الطبية التجميلية و البيئية

ومع ذلك، لا تزال هناك مشكلات يتعين حلها، من خلال البحوث الأولية، قبل أن يتم بالفعل تحقيق العوائد والتكاليف المتوقعة ولا يمكن تحقيق هذه التقنيات على نطاق واسع.

كان الهدف من عملنا هو دراسة تطور نمو الأنواع نانوكلوغوبسيس غاديتانا و نانوكلوغيس س ، وسلوكهم في وسط الثقافة غيلارد ف/2

تم تنفيذ مراقبة النمو يوميا عن طريق قياس الكثافة الضوئية بواسطة مقياس الطيف الضوئي وتم عد الخلايا باستخدام الخلية ملاز لتحديد تركيز الخلية. تم تحديد معلم النمو (تركيز الكتلة الحيوية الأولية والحد الأقصى وكذلك معدل النمو المحدد) وإنتاجية حجم الكتلة الحيوية. لدراسة التركيب الكيميائي الحيوي للأنواع ، تم قياس معدل الكلوروفيل "أ" ومستوى الكاروتينات ومحتوى الدهون.

نتائجنا تظهر أن نانوكلوغيس . لديها تركيز الكتلة الحيوية (1956.69 ملغ مادة معلقة / لتر) ومعدل نمو معين (0.008 يوم<sup>-1</sup>) أكبر من تركيز غاديتانا (1644.97 ملغ مادة معلقة / لتر و 0.009 يوم<sup>-1</sup> ، على التوالي). فيما يتعلق بإنتاج

المستقبلات ، أي محتوى الدهون ، والكلوروفيل "أ" والكاروتينات ، فإن إنتاج نانوكلوغوبسيس غاديتانا أفضل (21.45% ميكروغرام / متر مكعب ، و 0.030 ميكروغرام / مل. على التوالي).

في ضوء النتائج التي توصلنا إليها ، يمكننا أن نستنتج أن النوع الأكثر ثراءا بالدهون ، الكلوروفيل "أ" والكاروتينويد نانوكلوغوبسيس غاديتانا بالرغم من أن معايير النمو كانت أكبر بالنسبة لنانوكلوغيس . هذه الأخير قد تكيفت بسرعة مع الوسط الجديد والشروط التجريبية .

## الكلمات المفتاحية

الطحالب الدقيقة، نانوكلوغوبسيس غاديتانا، نانوكلوغيس . ، جيلارد ف.2. ، الدهون، الكاروتينات، الكلوروفيل "أ"

## Sommaire

<b>Liste des figures</b> .....	
<b>Liste des tableaux</b> .....	
<b>Liste des abréviations</b> .....	
<b>A. Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>B. Synthèse bibliographique</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Généralités sur les microalgues</b> .....	<b>3</b>
1.2. La synthèse des triglycérides par les microalgues.....	4
1.2.1. Formation de l'acide phosphatidique.....	4
1.2.2. Formation du diacylglycérol ou diglycéride.....	4
1.2.3. Formation du triacylglycérol ou triglycéride.....	4
<b>2. Système de culture des microalgues</b> .....	<b>5</b>
2.1. Système de production ouvert: bassin de type " raceway ".....	5
2.2. Photobioréacteurs.....	5
<b>3. Milieu de vie</b> .....	<b>5</b>
3.1. Culture en mode batch.....	5
3.2. Culture en mode Fed-batch.....	6
<b>4. Reproduction de microalgues</b> .....	<b>7</b>
4.1. Reproduction asexuée.....	7
4.2. Reproduction sexuée.....	7
<b>5. Applications des microalgues</b> .....	<b>7</b>
5.1. Domaine alimentaire.....	8
5.2. Domaine pharmaceutique.....	8
5.3. Domaine cosmétique.....	8
5.4. Domaine énergétique.....	8
5.5.1. Production de bio méthane.....	9
5.5.2. Production de biocarburant.....	9

5.5.3. Production de biohydrogène.....	9
5.5. Domaine environnemental.....	9
<b>6. Facteurs influences la culture algue.....</b>	<b>10</b>
6.1. La lumièr.....	10
6.2. La température.....	10
6.3. Le pH.....	10
6.4 La teneur en O2 générée .....	11
6.5. La salinité.....	11
6.6. Les besoins nutritifs .....	11
6.6.1. Carbone.....	11
6.7. Azote.....	11
6.8. Phosphore .....	12
6.9. Métaux traces et vitamine .....	12
<b>7. Généralité sur les espèce étudiées .....</b>	<b>12</b>
7.1. Nannochloropsis gaditana.....	12
7.2.Nannochloris sp. ....	13
<b>Matériel et Méthodes .....</b>	<b>15</b>
<b>1. Matériel biologique.....</b>	<b>17</b>
<b>2. Préparation de chambre de culture .....</b>	<b>17</b>
<b>3. Milieu de culture.....</b>	<b>17</b>
3.1. Echantillonnage de l'eau de mer.....	17
3.2. Traitement de l'eau .....	18
3.2.1. Filtration .....	18
3.2.2. Stérilisation .....	18
3.3. Préparation du milieu Guillard f/2.....	19
4. Préparation de culture mère : (pré-culture).....	20
5. La densité optique.....	22
6. Extraction des lipides.....	22
7. Extraction de chlorophylle «a» .....	23

8. Le comptage des cellules .....	25
9. Détermination de paramètre de croissance .....	27
10. Analyse des résultats.....	27
<b>D. Résultats .....</b>	<b>27</b>
1. L'observation microscopique .....	27
2. La densité optique .....	27
3. Paramètre de la croissance .....	28
4. Dosage de chlorophylle «a» .....	28
5. Comptage des cellules .....	29
6. Extraction de lipides.....	30
7.Dosage Caroténoïde .....	30
<b>E. Discussion.....</b>	<b>31</b>
<b>F.Conclusion et Perspectives.....</b>	<b>34</b>
<b>G.Références Bibliographique .....</b>	<b>35</b>

## Liste des figures

Figure 1.Photo de micro algue (Jack Legrand, 2002).....	3
Figure 2.La forme chimique de A/lipide neutre, B/Phospholipidz (Jack Legrand,2002).....	4
Figure 3.Système de photobioréacteur.(Jack Legrand,2002).....	5
Figure 4.Coube de croissance théorique chez les microalgues(Richmond,2004).....	6
Figure 5.Exemple de reproduction sexuée et asexée. ....	7
Figure 6.Les applications variées dans des domaines clés (alimentation, pharmacie, cosmétique)(Jack Legrand ,2002). ....	8
Figure 7.Photosynthèse des micro algues. ....	11
Figure 8. <i>Nannochloropsis gaditana</i> (gr x 40).....	13
Figure 9. <i>Nannochloris sp.</i> (Naumann,1921).(grossissement x40).....	14
Figure 10.Chambre de culture.....	17
Figure 11.Plage Salamandre (10 mars 2019).....	18
Figure 12.Filtration de l'eau de mer. ....	18
Figure 13.Photo d'autoclave au niveau de la salle d' autoclavage.....	19
Figure 14.Les composants de milieu Guillard f/2.....	20
Figure 15.Photo de culture mère. ....	20
Figure 16.Spectrophotomètre de type JENWAY au niveau de laboratoire Biochimie 02 .....	21
Figure 17.Préparation de culture en triplicatas chez les souches étudiées .1/ <i>Nannochloris sp.</i> 2/ <i>N.gaditana</i> .....	22
Figure 18.Centrifugeuse au niveau de laboratoire Biochimie 02.....	23
Figure 19.Rotavapor au niveau de laboratoira Biochimie 02 .....	23
Figure 20.Dilution des échantillons étudiées. ....	24
Figure 21.Les étapes d'extraction de chlorophylle «a» chez les espèces étudiées.....	25
Figure 22.Lame de Malassez. (GKZH,2019). ....	25
Figure 23.Louis Charles Malassez. (Waléry, 1909).....	26

Figure 24.L'observation microscopique des espèces étudiées. ....	27
Figure 25.L'evolution expérimentale et prédite de la biomasse de <i>N.gaditana</i> et <i>Nannochloris</i> <i>sp.</i> mode batch.....	27
Figure 26.Dosage de chlorophylle «a» chez les deux espèces étudiées.....	29
Figure 27.Comptage de cellules chez les deux espèces étudiées.....	29
Figure 28.Teneur en lipide chez les deux souches étudiées. ....	30
Figure 29.Dosage de Caroténoïde chez les deux souches étudiées.....	31

## Liste des tableaux

Tableau 1.Taxonomie de <i>Nannochloris sp.</i> .....	13
Tableau 2.Composition du milieu de culture f/2 (Guillard et Ryther, 1963).....	19
Tableau 3.L'absorbance final avant la culture en triplicatas.....	21
Tableau 4..Paramètre de croissance chez les espèces étudiées.....	28

## Liste des abréviations

**AGPT:** Acide gras poly insaturé  
**CoCl<sub>2</sub>:** Chlorure de cobalt  
**EDTA:** Acide éthylène diamine tétra-acétique  
**FeCl<sub>3</sub>:** Chlorure de fer III  
**MnCl<sub>2</sub>:** Manganèse II chlorure de tétrahydrate  
**TAG:** Triacyglycérol  
**EPA:** Acide eicosapentaénoïque  
**O<sub>2</sub>:** Oxygène  
**ZnSO<sub>4</sub>:** Sulfate de zinc  
**NaMoO<sub>4</sub>:** Molybdate de sodium  
**NaCl:** Chlorure de sodium  
**PSU:** Unité pratique de salinité  
**ml:** Millilitre  
**NaNO<sub>3</sub>:** Nitrate de sodium  
**nm:** Nanomètre  
**W:** Watt  
**%:** Pour cent  
**μ:** Micro  
**μg/ml:** Micro gramme par millilitre  
**°C:** Degré Celsius  
**Cm:** Centimètre  
**G:** Gramme  
**G/l:** Gramme par litre  
**μm:** Micro mètre  
**h:** Heure  
**min:** Minute  
**mm:** Millimètre  
**M:** Mol  
**tpm:** Toure par minute  
**J:** Jour  
**Mg MES/L/J:** Milligramme matière en suspension par litre par jour  
**W/m<sup>3</sup>:** Watt par mètre cube  
**Kg:** killogramme  
**pH:** Le potentiel hydrogène  
**g/m<sup>3</sup>/min:** gramme par mètre cube par minute  
**m<sup>2</sup>:** Mètre carré

# *Introduction*

## A. Introduction

Les algues sont des organismes photosynthétiques qui se développent dans des habitats variés, majoritairement des environnements aquatiques, et qui sont capables de convertir l'énergie lumineuse et une source de carbone, le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), en un ensemble de matières organiques ou "biomasse". En fonction de leur taille, elles peuvent être principalement classées en deux catégories: les macroalgues et les microalgues. Les macroalgues sont des algues multicellulaires de taille proche du centimètre et qui croissent le plus souvent dans des bassins naturels d'eau douce ou d'eau salée. Les microalgues ont une taille de l'ordre du micromètre et sont considérées comme des algues unicellulaires qui se développent en suspension principalement dans des solutions aqueuses (Tebbani *et al.*, 2014).

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

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).

L'objectif des recherches est de créer une nouvelle chimie basée sur l'utilisation de ressources renouvelables à court terme à base de 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).

Au vu 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 sélectionner une souche de microalgue performante qui est capable de produire des

métabolites industriellement intéressant et plus particulièrement la production de pigment et de lipide et en même temps qui soit capable de croître rapidement.

Notre travail se présente comme suite : Une partie bibliographique inclut deux chapitres le premier est focalisé sur quelques notions générales sur les microalgues et leur caractéristiques, les conditions de culture des microalgues, application biotechnologique des microalgues. Le deuxième chapitre donne un aperçu général sur les deux espèces étudiées. La deuxième partie consacrée à la présentation de nos expériences, et les résultats obtenus. La dernière partie aborde la discussion de nos résultats, terminant avec la conclusion et les perspectives.

# *Synthèse Bibliographique*

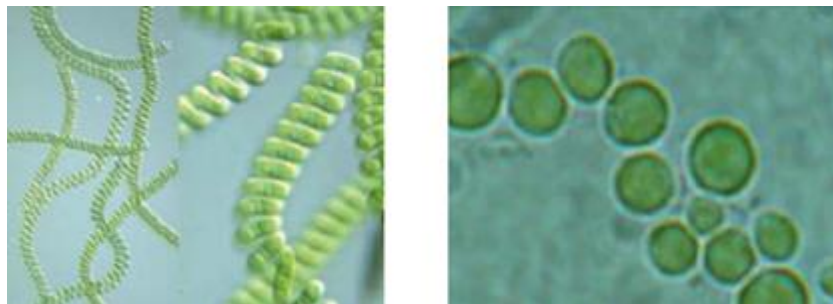
## B. Synthèse bibliographique

### 1. Généralités sur les microalgues

Les microalgues sont des micro-organismes aquatiques dotées d'une croissance rapide, elles ont la particularité de pouvoir produire des substances industriellement intéressantes (**Figure 1**). 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).

Ces micro-organismes synthétisent par le biais de la photosynthèse, de l'oxygène et des métabolites organiques primaires tels que les glucides, les lipides et les protéines. Du point de vue structure cellulaire, la microalgue présente un noyau et une membrane plasmique contenant des organites essentielle à son fonctionnement tels que les chloroplastes, les amyloplastes, les oléoplastes et les mitochondries, elle contient trois principaux type de pigments qui sont les chlorophylles, les caroténoïdes et les phicobiliprotéines. On distingue ainsi trois grands types de microalgues.

\*Les microalgues ayant un métabolisme autotrophe ce mode de nutrition leur permet d'utiliser les rayons solaires ou de la lumière artificielle afin de synthétiser leur énergie. Les microalgues de métabolisme autotrophe utilisent également une source de carbone inorganique comme le  $\text{CO}_2$  et le  $\text{HCO}_3^-$  pour la synthèse du carbone organique. Ce carbone organique est essentiel à la synthèse de toutes les composantes organiques nécessaires à leur survie.



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

\*Les microalgues ayant un métabolisme hétérotrophe : ces microalgues utilisent une source de carbone organique (généralement des sucres ou de petites molécules organiques en C2, C3, C5 et en C6) pour la production de leur énergie.

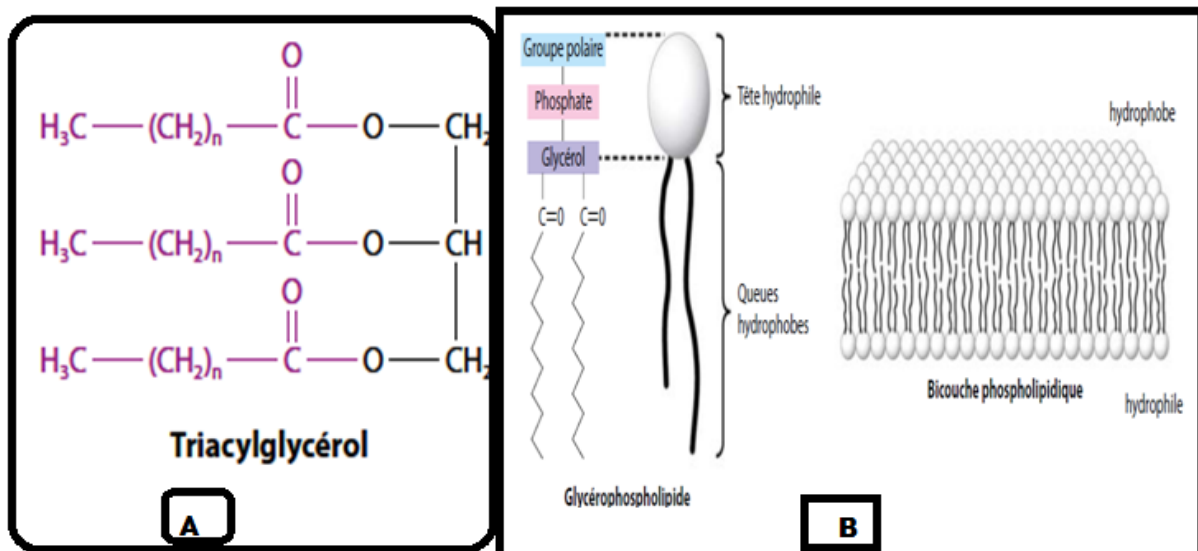
\*Les microalgues ayant un métabolisme mixotrophe: elles peuvent avoir un métabolisme autotrophe et/ou hétérotrophe en fonction des éléments disponibles et des conditions environnementales dans lesquelles elles vivent.

## 1.2. La synthèse des triglycérides par les microalgue

Les triglycérides font parties de la famille des lipides et sont constitués de trois acides gras et un glycérol. La synthèse de tryglycérides comporte trois étapes: formation de l'acide phosphatidique, déphosphorylation de ce dernier en diglycéride et estérification de la dernière fonction alcool du glycérol (**Figure 2**).

### 1.2.1. Formation de l'acide phosphatidique

Pour donner l'acide phosphatidique deux acyl-CoA réagissent sur le glycérol 3-P. Et grâce à l'action de l'acyl transférase, les fonctions alcool primaire et secondaire du glycérol-P sont estérifiées.



**Figure 2.** La forme chimique de (A) Lipide neutre, (B) Phospholipide (Jack Legrand, 2002).

### 1.2.2. Formation du diacylglycérol ou diglycéride

La formation du diacylglycérol ou diglycéride est le résultat du départ du groupement phosphate de l'acide phosphatidique. La réaction est catalysée par une hydrolase appelée phosphatidate phosphatase.

### 1.2.3. Formation du triacylglycérol ou triglycéride

Le diacylglycérol réagit avec un acyl-CoA pour donner le triglycéride. Tous les acides gras peuvent être différents. Une acyl-CoA transférase intervient. Les triacylglycérols sont libérés dans le cytosol sous forme de gouttelettes lipidiques.

## 2. Système de culture des microalgues

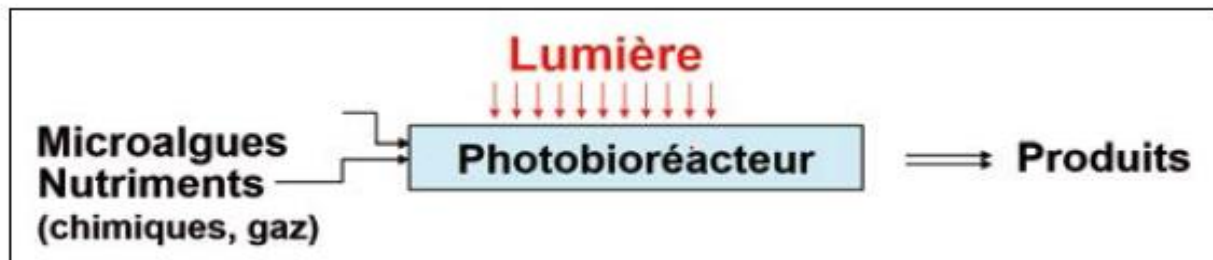
### 2.1. Système de produite ouvert: bassin de type " raceway "

Les cultures d'algues à l'aire libre représentent 10000 tonnes par an de matière sèche. A grande échelle, la production de masse se fait principalement à l'aide de bassins de type «raceway», de toutes tailles (entre 1000 et 5000m<sup>2</sup>), en eau douce ou salée, ils sont constitués de bassins clos, de quelques dizaines de cm de profondeur, circulaires ou formant des boucles imbriquées les contre les autres.

### 2.2. Photobioréacteurs

Les microalgues peuvent être également cultivées en bioréacteurs (enceintes dans lesquelles se déroulent des interactions biologiques, utilisées pour la production de biomasse d'un métabolite, pour la conversion d'une molécule) dans le cas des algues, on utilise des photobioréacteurs, construits dans des matériaux transparents laissant passer la lumière et autorisant les réactions de photosynthèse, l'éclairage se fait à partir de la lumière solaire ou artificielle avec des tubes fluorescents. Il peut être optimisé avec un certain angle d'inclinaison du réacteur (Jack Legrand *et al.*, 2002).

Le principal avantage de cette technique est qu'elle permet de contrôler les conditions de culture (distribution et évacuation du CO<sub>2</sub> de l'O<sub>2</sub>, contrôle du pH, de la température) et aussi de maintenir la stérilité de la culture (**Figure 3**).



**Figure 3.** Système de photobioréacteurs. (Jack Legrand, 2002).

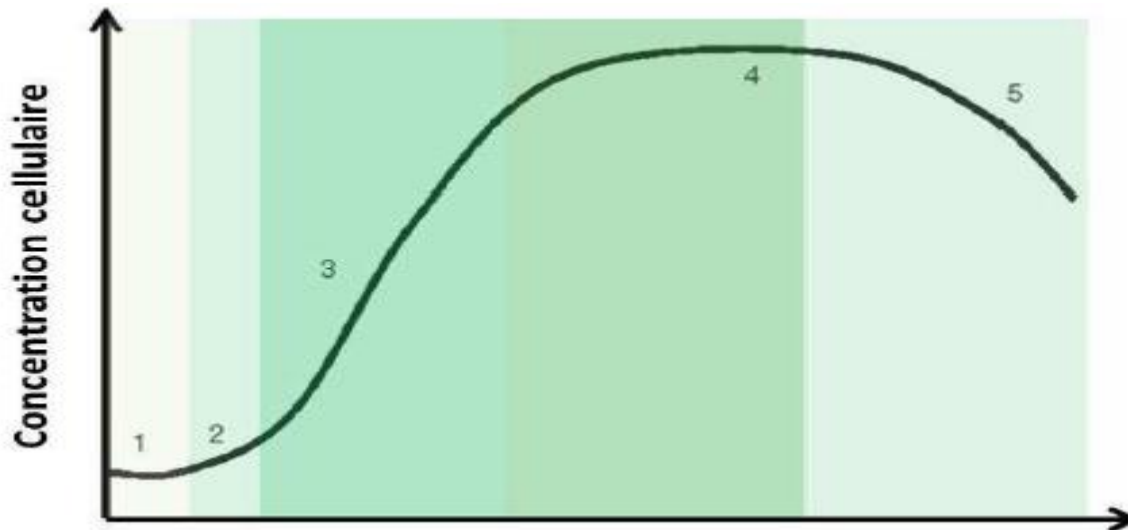
La conversion de nutriments en produits par les microalgues est réalisée à l'aide d'énergie lumineuse dans les photobioréacteurs. Des paramètres cinétiques sont à contrôler physiques (rayonnement, transfert gaz/liquide), chimique (incorporation cellulaire des nutriments) et biologiques (photosynthèse, métabolisme).

## 3. Milieu de vie

### 3.1. Culture en mode batch

Pour une culture en mode batch, la croissance de microalgues suit une allure bien définie selon une courbe d'allure sigmoïde traduisant cinq phases principales : phases de latence (1),

d'accélération (2), de croissance exponentielle (3), stationnaire (4) et de décroissance (5). Ces phases se succèdent à mesure que les nutriments du milieu sont consommés, (figure 4).



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

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

**-Phase d'accélération (2) :** Les cellules ont réussi à accumuler suffisamment de composés intracellulaires pour débiter la croissance par reproduction végétative (Richmond, 2004).

**-Phase de croissance exponentielle (3) :** cette phase s'achève par une étape dite de décélération durant laquelle les nutriments nécessaires à la culture commencent à s'épuiser, particulièrement les substrats limitants. À l'issue de cette phase, la concentration cellulaire a atteint une valeur limite.

**-Phase stationnaire (4) :** Cette phase intervient lorsque le substrat limitant s'épuise (P, N, CO<sub>2</sub>, ect). L'apport de lumière peut aussi être insuffisant, en raison d'une concentration cellulaire élevée, de la formation de bio film sur les parois du photobioréacteur, donnant le phénomène d'auto-ombrage des cellules. La concentration cellulaire est dans ce cas constante et maximale ; (Tebbani S, 2014).

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

### 3.2. Culture en mode Fed-batch

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

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

#### 4. Reproduction de microalgues

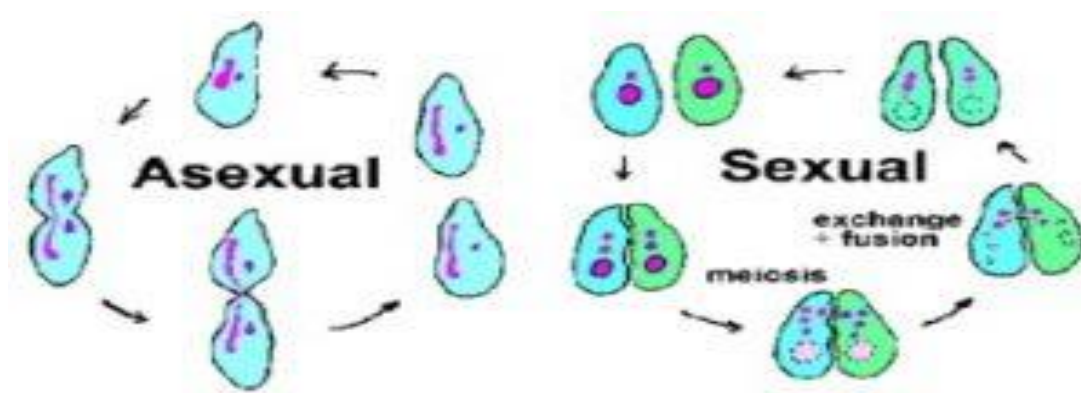
Tous les organismes vivants passent par divers stades de vie, plus ou moins différents, avant de revenir à leur état initial. Ce processus est appelé cycle de vie, en raison de son caractère cyclique ou répétitif. La figure 5 montre le cycle de vie des microalgues qui comprend généralement des processus de reproduction sexuée et/ou asexuée.

##### 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.

##### 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.



**Figure 5.** Exemple de reproduction sexuée et asexuée.

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).

#### 5. Applications des microalgues

Les microalgues se révèlent très prometteuses pour de nombreuses applications dans des domaines variés tels que ; l'industrie pharmaceutique, l'agro-alimentaire l'environnement et les énergies renouvelables. Les principales utilisations sont détaillées comme suite :

### 5.1. Domaine alimentaire

Les microalgues constituent un réel apport nutritif, elles sont utilisées dans l'alimentation animale et humaine et dans l'aquaculture, elles servent à fabriquer des colorants en industrie alimentaire. Les polysaccharides (polymères hydrosolubles) issues des microalgues sont exploités dans l'industrie agroalimentaire en tant qu'agents gélifiants ou épaississants. Le glycérol (molécule intervenant dans les systèmes d'osmorégulation des microalgues) est exploité dans l'agroalimentaire comme édulcorant.

### 5.2. Domaine pharmaceutique

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

### 5.3. Domaine cosmétique

Plusieurs espèces de microalgues sont utilisées industriellement dans le domaine cosmétique, principalement les deux espèces *Arthrospira* et *Chlorella*, des extraits d'algues, ayant une activité antioxydants, sont exploités pour la fabrication des produits de soins capillaires, soins antirides ainsi que dans les crèmes solaires, les pigments issus des microalgues sont également utilisés pour les cosmétiques (**Figure 6**).



**Figure 6.** Des applications variées dans des domaines clés (alimentation, pharmacie, cosmétiques) (Jack Legrand, 2002).

### 5.4. Domaine énergétique

La valorisation de la biomasse algale peut se traduire par la production d'énergie sous forme d'électricité et/ou de chaleur par combustion directe, ou sous forme de bio éthane ou de biocarburant. Cependant, cette valorisation ne sera concurrentielle qu'avec une forte productivité de biomasse, une possibilité de récolte mécanique simple et un cout de production plus réduit que les procédés mettant en œuvre d'autre types de biomasse (Carlsson A.S., 2007).

### 5.5.1. Production de bio méthane

Plusieurs recherches ont permis de vérifier la faisabilité technique et commerciale de la production de bio méthane à partir de la biomasse marine, avec un potentiel intéressant (Chynowth, 2002). Cependant, des verrous techniques tels que l'accessibilité des nutriments et les coûts de production élevés limitent l'exploitation des microalgues pour cette application. Un moyen permettant de réduire les coûts est par exemple de coupler la production de biométhane avec la production de métabolites secondaires à haute valeur ajoutée. Des espèces telle que *Gracilaria sp.* et *Macrocystis* représentent des organismes producteurs de biométhane.

### 5.5.2. Production de biocarburant

Considérant le contexte mondial actuel (hausse du prix du pétrole, raréfaction des ressources fossiles, production de gaz à effet de serre, ect), il est intéressant de considérer les microalgues comme source de production de différents types de biocarburant : le bio-oil (Miao *et al.*, 2004), et le biodiesel;(Benzidane D., 2017).

### 5.5.3. Production de biohydrogène

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

Induisant la synthèse d'hydrogène par l'enzyme Hydrogénase (BENEMANN J.R., 1987). La méthode indirecte repose sur la conversion de l'amidon stocké par les algues sous forme d'hydrogène sous des condition d'anaérobie et de limitation de soufre (Carlsson A.S., 2007). Plusieurs espèces de microalgues ont démontré une prédisposition intéressante vis-à-vis des procédés indirecte, c'est-à-dire une grande capacité de synthèse de biohydrogène sous des conditions de privation de soufre. En conséquence, la production d'hydrogène à partir des microalgues représente un créneau prometteur mais ceci nécessite une meilleure compréhension des métabolismes des microalgues et de leur ingénierie (Beer L.L., 2009).

## 5.5. Domaine environnemental

Les principales applications environnementales sont le traitement des eaux usées et bien sûr la consommation de CO<sub>2</sub> comme méthode d'abattement de ce gaz à effet de serre.

- Traitement des eaux usées.
- Agriculture.
- Séquestration du CO<sub>2</sub>.

## **6. Facteurs influences la culture algue**

Efficacité de la culture de microalgues dépend de plusieurs paramètres environnementaux physiques ou biologiques, liés aux caractéristiques intrinsèques de l'espèce algale et de la géométrie du système de production, ces paramètres affectent non seulement l'activité photosynthétique et la productivité en biomasse, mais également le comportement physiologique et métabolique des microalgues :

### **6.1. La lumière**

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

La quantité d'énergie arrivant au dessus de la couche atmosphérique correspond à  $1370 \text{ W/m}^2$ . A la surface de la terre cette quantité d'énergie est de  $1000 \text{ W/m}^2$  à midi par jour

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

### **6.2. La température**

La vitesse de croissance de la micro algue dépend de la température. En effet, ce paramètre permet de réguler les réponses cellulaires , physiologique es et morphologique des microalgues.

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

### **6.3. Le pH**

Le pH est un paramètre essentiel qu'on ne peut pas ignorer lors de la culture des microalgues. Les réactions biochimiques ainsi que les échanges des substrats entre l'intérieur de la cellule et le milieu environnement sont hautement dépendants de la valeur du pH. A noter que le pH optimal de la plupart des espèces microalgale est compris entre 7 et 9 (Wang D, 2014). Le pH joue également sur la dissolution du  $\text{CO}_2$  dans le milieu (TALEB., 2015).

## 6.4 La teneur en O<sub>2</sub> générée

L'O<sub>2</sub> générée par la photosynthèse peut atteindre une quantité 10 g/m<sup>3</sup>/min (Christy, 2007). L'oxygène dissout à une action inhibitrice sur la photosynthèse. La limite tolérable est d'environ 40% la saturation du milieu.

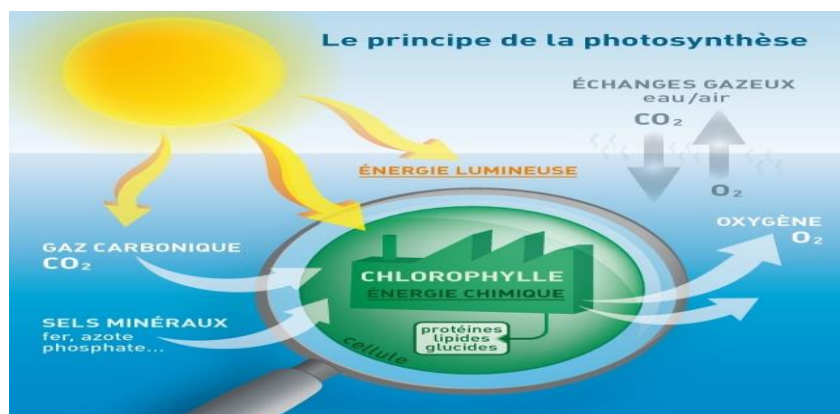
## 6.5. La salinité

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 unité pratique de salinité (psu).

## 6.6. Les besoins nutritifs

### 6.6.1. Carbone

Les microalgues ont besoin de carbone inorganique pour la photosynthèse (**Figure 7**), il peut être apporté sous forme de sels (bicarbonate) ou par enrichissement de l'air insufflé (car l'air ambiant ne contient pas assez de CO<sub>2</sub> pour la culture intensive des microalgues). Pour que les microalgues puissent utiliser le CO<sub>2</sub> lors de la photosynthèse, celui-ci doit être solubilisé (Bernard, 2008). Le dioxyde de carbone, dissout dans l'eau prend plusieurs formes, en fonction du pH.



**Figure 7.** Photosynthèse des microalgues.

Les microalgues sont très consommatrices de dioxyde de carbone, pour produire 1 kilogramme de biomasse, 1.8 kg de dioxyde de carbone sont nécessaires (Cadoret et Bernard, 2008).

### 6.7. Azote

L'azote est un essentiel des protéines de structure et de fonctionnement. C'est l'élément le plus important après le carbone (Becker, 1994). Le taux de croissance des microalgues est à peu

prés identique selon les sources d'azote utilisées (urée, nitrite, nitrate). De nombreuses études montrent l'amélioration de la production et du stockage de lipides dans le cas d'une carence en azote. Il y a aussi une accumulation des caroténoïdes secondaire dans ce cas.

### 6.8. Phosphore

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

### 6.9. Métaux traces et vitamine

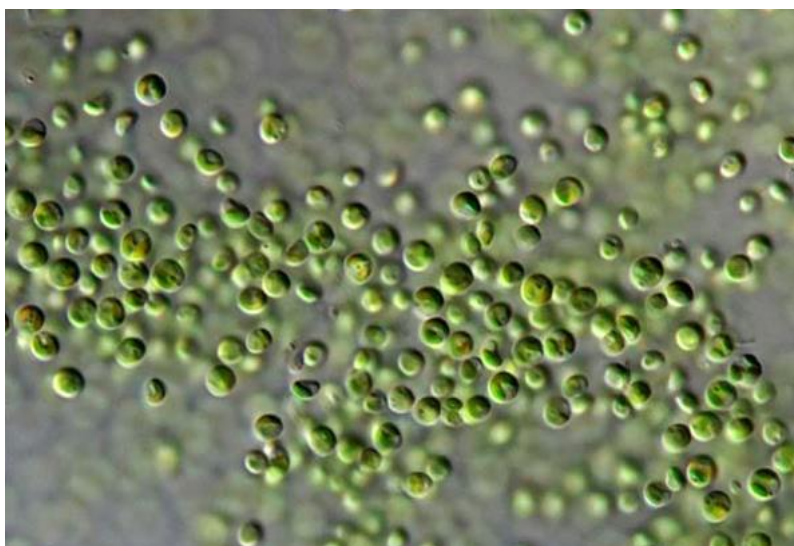
Les microalgues ont besoin de potassium, de fer de silice (pour les diatomées), de soufre, de métaux sous forme de traces et de vitamines. Le fer est un oligo-élément essentiel pour la croissance de la microalgue de par son implication dans le transport des électrons dans le processus des photosynthèses.

## 7. Généralité sur les espèces étudiées

### 7.1. *Nannochloropsis gaditana*

Le genre *Nannochloropsis* a été décrit pour la première fois par Hibbred (1998) (**Figure 8**). 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, 2007). Le genre *Nannochloropsis* est composé des espèces unicellulaires de très petites taille environ 2 à 5 µm (Kandilian R., 2013). Ces microorganismes sont des sources de différents pigments comme la chlorophylle a, la zéaxanthine, la canthaxanthine et l'astaxanthine (Lubian, 1982) 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 *N. salina* n'est pas établie (Suda S., 2002). 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 algéenne externe (Scholz M.J., 2014)

La microalgue *N.gaditana* est un producteur naturel de triacyglycérol (TAG) et de l'acide eicosapentaénoïque (EPA).



**Figure 8.** *Nannochloropsis gaditana* (Hibbred, 1998) (Gx40).

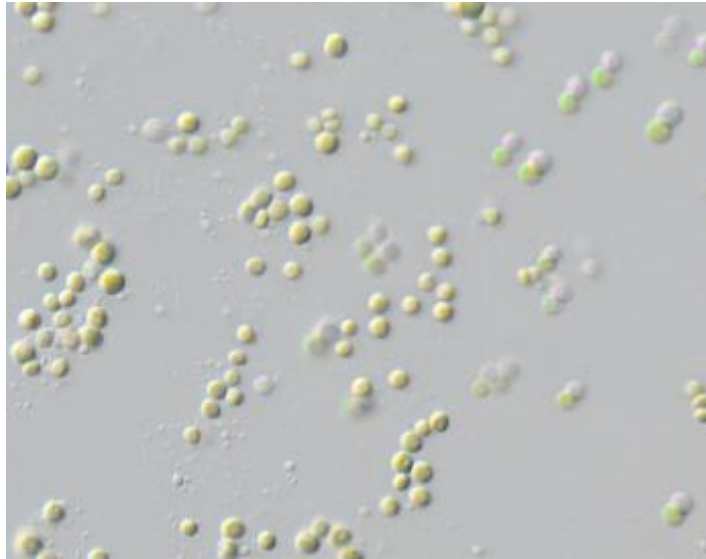
La paroi cellulaire de *Nannochloropsis gaditana* est constituée d'une structure bicouche composée d'une paroi intérieure cellulosique (75% de bilan de masse) protégée par une couche hydrophobe externe (Scholz ,2014).

## 7.2. *Nannochloris* sp.

*Nannochloris* est un genre d'algue verte de la famille des Chlorellacées (figure 9).

**Tableau 1:** Taxonomie de *Nannochloris* (Naumann ,1921).

Classification scientifique	
<b>Phylum</b>	<b>Chlorophyta</b>
<b>Classe</b>	<b>Trebouxiophyceae</b>
<b>Ordre</b>	<b>Chlorellales</b>
<b>Famille</b>	<b>Chlorellaceae</b>
<b>Genre</b>	<i>Nannochloris</i> (Naumann ,1921)



**Figure 9.** *Nannochloris sp.* (Naumann ,1921) (Gx40).

# *Matériel et Méthodes*

## 1. Matériel biologique

Les deux souches microalales *N.gaditana* et *Nannochlorise Sp.* du Laboratoire d'Aquaculture et de Bioremédiation (Aquabior) au département de Biotechnologie, de la faculté des sciences de la Nature et de la Vie, Senia, Oran.

## 2. Préparation de chambre de culture

La chambre de culture se trouve au niveau du laboratoire de Biochimie 02 à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Cette chambre contient une armoire de deux étages équipé de 08 néons de lumière blanche artificielle LED à 24 W chaque étage a 04 néons sont fixes dans la chambre, et deux oxygénateurs pour agiter et alimenter notre souche d'oxygène, ils ne sont pas fixés chacune porte deux sorties, l'intérieures de la chambre été enveloppées par papier aluminium pour réunir tous rayons lumineux (**Figure 10**).



**Figure 10.** Chambre de culture au niveau de laboratoire Biochimie 02.

## 3. Milieu de culture

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

L'eau de mer utiliser dans notre travail du plage de Salamandre, un échantillon de 12 L été rempli dans deux géricans en plastique de 06 litre (**figure 11**).

Salamandre est une plage située entre Mostaganem et Mezghrane, qui s'étend des rochers de Levalaz à la plage de Lacrek.



**Figure11.** Plage Salamandre (10 mars 2019).

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

### **3.2.1. Filtration**

L'eau de mer 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 flacon de 1000 ml qui vont servir de photobioréacteur pour la culture des microalgues (**Figure 12**).



**Figure 12.** Filtration de l'eau de mer

### **3.2.2. Stérilisation**

Après la filtration, l'échantillon d'eau a été autoclavé pendant 20 min à  $120^{\circ}\text{C}$  pour éliminer tous ce qui est vivant comme les microalgues, les bactéries, les zooplanctons (**Figure 13**).



**Figure13.** Autoclave au niveau de la salle d'autoclavage.

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

Le milieu de culture utilisé dans ce travail, est celui de Guillard f/2 (Ryther, 1963). C'est un milieu de culture commun, largement utilisé pour la croissance des algues, composé d'éléments suivant dans (**tableau 2**). La figure 14 représenta les composants de milieu de culture Guillard f/2.

**Tableau 2:** Composition du milieu de culture Guillard f/2 (Guillard et Ryther, 1963).

Volume	Composé	Concentration de la solution stock (stérile)
1ml	(NaNO <sub>3</sub> ) à $8,82 \cdot 10^{-4}$ M	75g/l
1ml	(NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) à $3,62 \cdot 10^{-5}$ M	5,65g/l
1ml	Métaux traces	NA <sub>2</sub> EDTA : 4,16 g/l FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O :3,15 g/l CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O : 0,01 g/l ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O : 0,022 g/l CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O : 0,01 g/l MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O :0,018 g/l Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O : 0,006 g/l
0,5ml	Vitamine (trois B)	Vitamine B1 Vitamine B6 Vitamine B12



**Figure 14.** Les composants de milieu Guillard f/2.

- 1. Solution stock de Nitrate de sodium ( $\text{NaNO}_3$ ) à  $8,82 \cdot 10^{-4}$  M.
- 2. Solution stock de Dihydrogénophosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) à  $3,62 \cdot 10^{-5}$  M.
- 3. Solution stock de Métaux traces
- 4. Solution stock Vitamine (trois B).

#### 4. Préparation de culture mère : (pré-culture)

L'objectif de la culture mère est de créer de grandes quantités de microalgues qui, lorsqu'elles arrivent à une certaine concentration, commencent la culture en triplicatas pour chaque échantillon d'algues étudié : (*N.gaditana* et *Nannochlorise sp.*).



J01

J04

J25

**Figure 15.** Photo de culture mère.

Lorsque la concentration de nos algues arrive à une valeur spécifique de (1nm) de chaque souche, nous sommes allés à la culture en triplicatas, le tableau suivant :

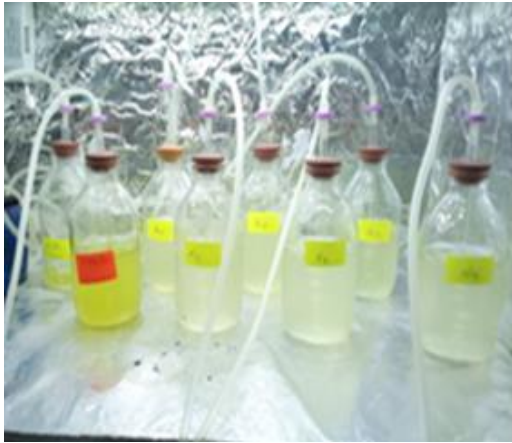
**Tableau 1:** Labsorbance final avant la culture en triplicatas.

Longueur d'onde	Absorbance	
	<i>N.gaditana</i>	<i>Nannochlorise sp</i>
680nm	1,116	1,402

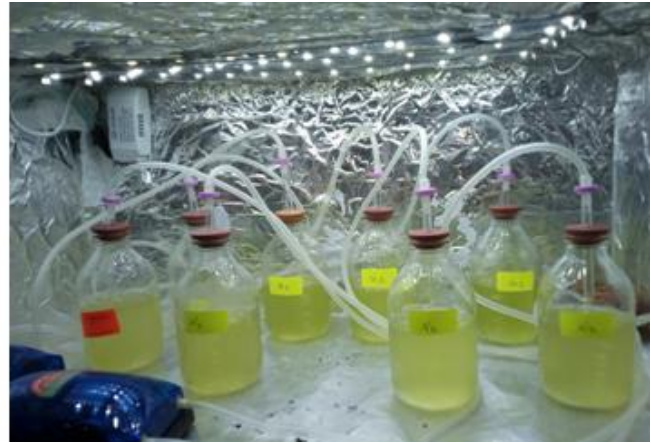
La mise au point a été mesurée par le spectrophotomètre JENWAY qui existe au niveau de laboratoire Biochimie «02» (**Figure 16**).

**Figure 16.** Spectrophotomètre de type JENWAY au niveau de laboratoire Biochimie 02.

Le spectrophotomètre est un appareil qui permet de mesurer l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée. Dans notre expérience la longueur d'onde utilisé été 680nm. La première absorbance (début de l'expérience) été 0,15 pour chaque échantillon.



J 01



J 04



1

2

J20

**Figure17.** Préparation de culture en triplicatas chez les souches étudiées. (1) *Nannochloris sp.* et (2) *N.gaditana*.

### 5. La densité optique

Il s'agit d'une méthode de mesure indirecte de la biomasse. La mesure à 680 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.

### 6. Extraction des lipides

Quand les algues arrivent à la phase stationnaire ; Ils sont placés dans centrifugeuse a 3000 tpm pendant 20min.

C'est un appareil destiné à imprimer une accélération, grâce à un mouvement de rotation, à un mélange liquide-solide. Cet appareil peut aussi servir à séparer les mélanges constitués de parties ayant une densité différent (**Figure18**).



**Figure 18** .Centrifugeuse au niveau de laboratoire Biochimie 02.

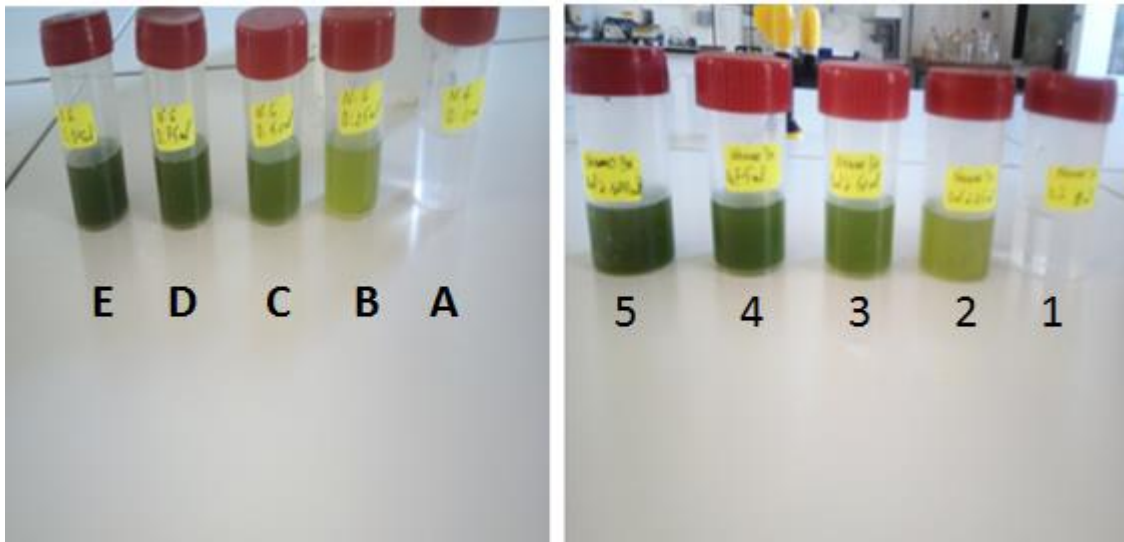
Après cette étape, les culots sont placés au réfrigérateur pendant trois jours. A l'aide d'un mortier et pilon toutes les cellules sont écrasées, a chaque souche de microalgal 20ml de chloroforme avec 10ml de méthanol, ils sont placés en centrifugation cette fois à la vitesse maximale pendant 20min. Et à partir de là, nous avons mis le mélange dans un rotavapor à 55C° (**Figure 19**).



**Figure 19**. Rotavapor au niveau de laboratoire Biochimie 02.

### 7. Extraction de chlorophylle «a»

Le principe de cette méthode est d'extraire la chlorophylle « a » et de la quantifier par une méthode spectrophotométrique. On a prélevé à partir de chaque pilulier volume de 1ml de chacune souche micro algal auquel on a ajouté 5ml de méthanol dans des tubes. Ce mélange a été laissé pendant 1 heure à température ambiante avec agitation chaque 15 min (**figure 20 et 21**).



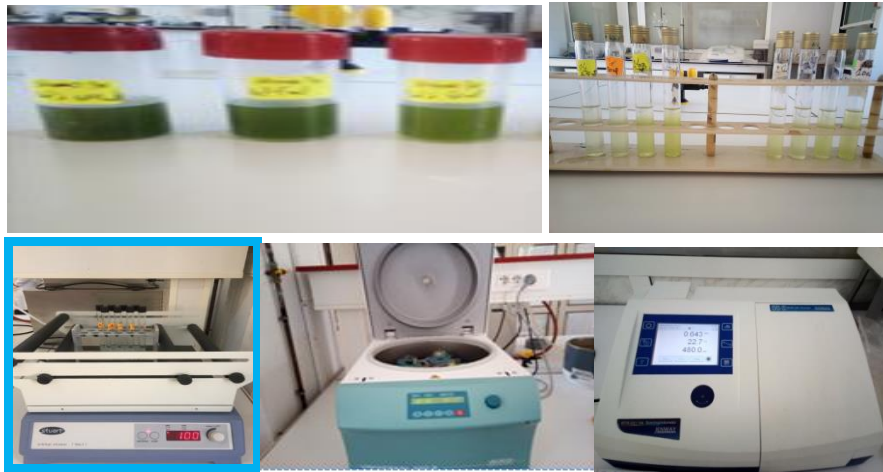
**Figure 20.** Dilution des échantillons de deux espèces étudiées.

Avec :

1. 0ml de solution mère de *Nnnochloris sp.* et 20ml d'EDS.
2. 25ml de solution mère *Nannochloris sp.* et 15ml d'EDS.
3. 50ml de solution mère *Nannochloris sp.* et 10 ml d'EDS.
4. 75ml de solution mère *Nannochloris sp.* et 5ml d'EDS.
5. 100ml de solution mère *Nannochloris sp.* et 0ml d'EDS.

Et la deuxième espèce *N.gaditana* :

- A. 0ml de solution mère de *N.gaditana* et 20ml d'EDS.
- B. 25ml de solution mère *N.gaditana* et 15ml d'EDS.
- C. 50ml de solution mère *N.gaditana* et 10 ml d'EDS.
- D. 75ml de solution mère *N.gaditana* et 5ml d'EDS.
- E. 100ml de solution mère *N.gaditana* et 0ml d'EDS.



**Figure 21.** Les étapes d'extraction de chlorophylle «a»

Après 1 heure d'incubation les échantillons ont été centrifugés, pendant 20min à 4000tpm vitesse max. L'absorbance du surnageant contenant les pigments dissous dans le méthanol est mesurée à différente longueur d'onde : (652 et 665 nm) au spectrophotomètre.

### 8. Le comptage des cellules

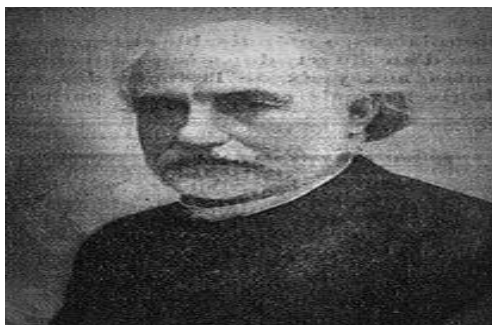
La numération cellulaire est la détermination du nombre de cellules contenues dans un volume précis de milieu liquide. On exprime le résultat de la numération en concentration cellulaire, c'est à dire en nombre de cellules par litre.

La numération cellulaire est réalisée directement par comptage au microscope, à l'aide d'une lame de comptage spéciale (cellule de Malassez) (**figure 22**).



**Figure 22.** Lame de Malassez (GKZH, 2019).

Cellule de Malassez permet de compter le nombre de cellules en suspension dans une solution. Cette méthode de dénombrement ne permet de compter que les cellules (vivantes ou non) dans une solution, et non d'autres organismes tels que les Bactéries. Il s'agit d'une lame de verre sur laquelle un quadrillage a été gravé de 25 rectangles contenant eux-mêmes 20 petits carrés. Elle a été inventée par Louis-Charles Malassez(**Figure23**).



**Figure 1.** *Louis-Charles Malassez* (Waléry, 1909).

Pour dénombrer les cellules, on place une lamelle de verre sur la cellule de Malassez, appelée lame de Malassez sur laquelle on dépose entre 10 et 15  $\mu\text{l}$  de cellules en suspension. Après avoir attendu quelques minutes pour que les cellules sédimentent, on peut compter le nombre de cellules dans 10 rectangles (quadrillés). Le volume d'un rectangle quadrillé étant de 0,01  $\mu\text{l}$ , en comptant 10 rectangles, il suffit alors de multiplier le résultat par 10 000 pour obtenir le nombre de cellules par ml. Par exemple, si 30 cellules sont observables sur 10 rectangles, on obtient un total de 300 000 cellules par ml.

## 9. Détermination de paramètre de croissance

Le modèle cinétique logistique de Verhulst (Verhulst, 1838) a été utilisé pour modéliser l'évolution de la concentration de biomasse expérimentale dans les réacteurs. Ce modèle est une équation indépendante du substrat et peut décrire avec précision la croissance de la biomasse dans les différentes conditions de culture qui se produisent dans de nombreux bioréacteurs en batch (Gong & Lun, 1996). Selon Ruiz *et al.* (2012), l'équation suivante, va nous permettre d'avoir une prédiction de la cinétique de croissance à partir des résultats expérimentaux :

$$X = \frac{X_0 X_m e^{\mu t}}{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu t}}$$

- X : concentration de biomasse (mg MES.L-1) à un temps de fonctionnement « t ».

- $X_m$  : concentration de biomasse maximale (mg MES.L-1)
- $X_0$  : concentration de biomasse initiale (mg MES.L-1)
- $\mu$  : taux de croissance spécifique maximal (J-1).

La productivité volumique de la biomasse (mg MES. L-1. J-1) est un paramètre important à considérer dans la technologie de culture des microalgues, car elle montre la capacité d'un réacteur à produire de la biomasse dans des conditions d'exploitation spécifiques et définie comme la biomasse produite par volume de réacteur et par unité de temps. La productivité volumétrique de la biomasse (PVB) en culture batch est calculée comme suite (Ruiz *et al.*, 2012) :

$$PVB = \frac{\mu \cdot (0,9X_m - 1,1X_0)}{\ln\left(\frac{0,9(X_m - 1,1X_0)}{1,1X_0}\right)}$$

## 10. Analyse des résultats

Pour chaque expérience, les statistiques descriptives (moyennes  $\pm$  écarts types) sont utilisées pour décrire l'ensemble des résultats. Un programme « Solver » de Microsoft Excel 2017 a été utilisé pour ajuster les données du modèle de croissance des microalgues étudiée.

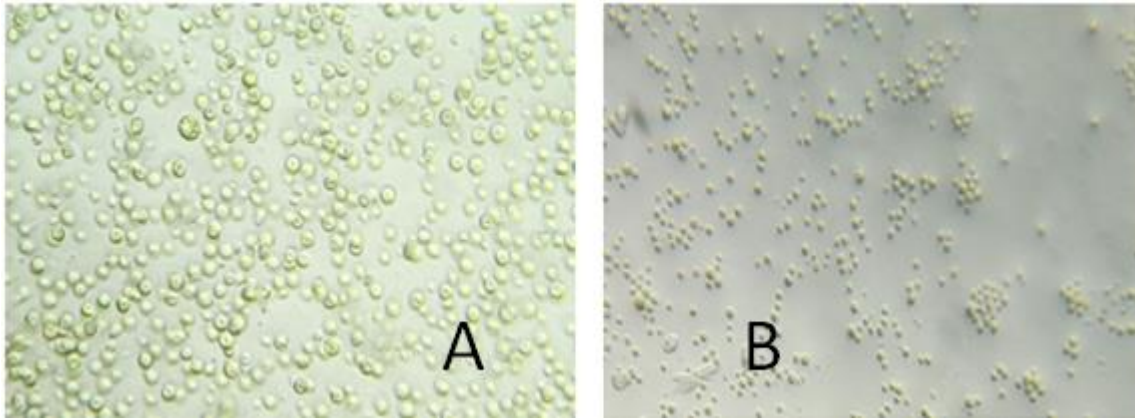
*Résultats et*

*Discussion*

## D. Résultats

### 1. L'observation microscopique

L'observation microscopique au grossissement x40 permet une identification morphologique de la souche étudiée comme le présente la **figure 23**

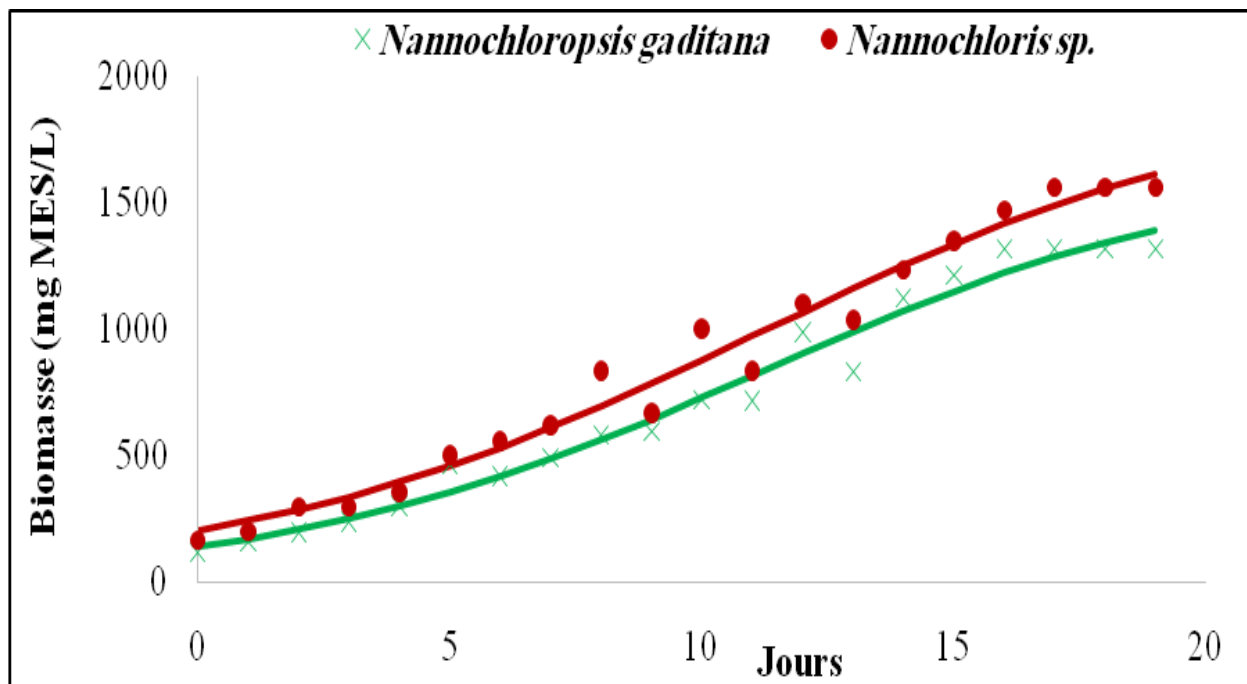


**Figure 24.** L'observation microscopique des espèces étudiées (G40).

(A : *Nannochloropsis gaditana*, B : *Nannochloris sp.*)

### 2. La densité optique

La courbe suivante montre l'évolution de la biomasse des espèces étudiées par temps (en jours), (**figure 25**).



**Figure 25** .L'évolution expérimentale et prédite de la biomasse de *N.gaditana* et *Nannochloris sp.* en mode batch. Les lignes représentent les valeurs prédites par le modèle logistique de Verhulst.

**La phase de latence De J 0 à J 5 :** On observe une adaptation cellulaire par les deux espèces, aux nouvelles conditions, avec une valeur 500 mg MES/L.

**La phase d'accélération (de J5 à J17):** L'évolution est rapide c'est à dire les cellules ont réussi à accumuler suffisamment de composés intracellulaires pour débiter la croissance par reproduction végétative leur valeur 1300 mg MES/L.

**La phase stationnaire (de J17 à J20) :** La concentration cellulaire est dans ce cas constante et maximale 1500 mg MES/L.

À toutes les étapes, l'évolution de *Nannochloris sp.* était plus accélérée que *N.gaditana*.

### 3. Paramètre de la croissance

Le tableau ci-dessous nous montre les paramètres de croissance chez *N.gaditana* et *Nannochloris sp.* ( $X_0$  : concentration de la biomasse initiale et  $X_m$  : concentration de la biomasse maximale ainsi que le taux de croissance spécifique  $\mu$ ), et la productivité volumique de la biomasse, avec R2 Coefficient de corrélation. Nous remarquons la supériorité de *Nannochloris sp.* à travers tous les paramètres qui existe au tableau et les deux espèces en bonne corrélation.

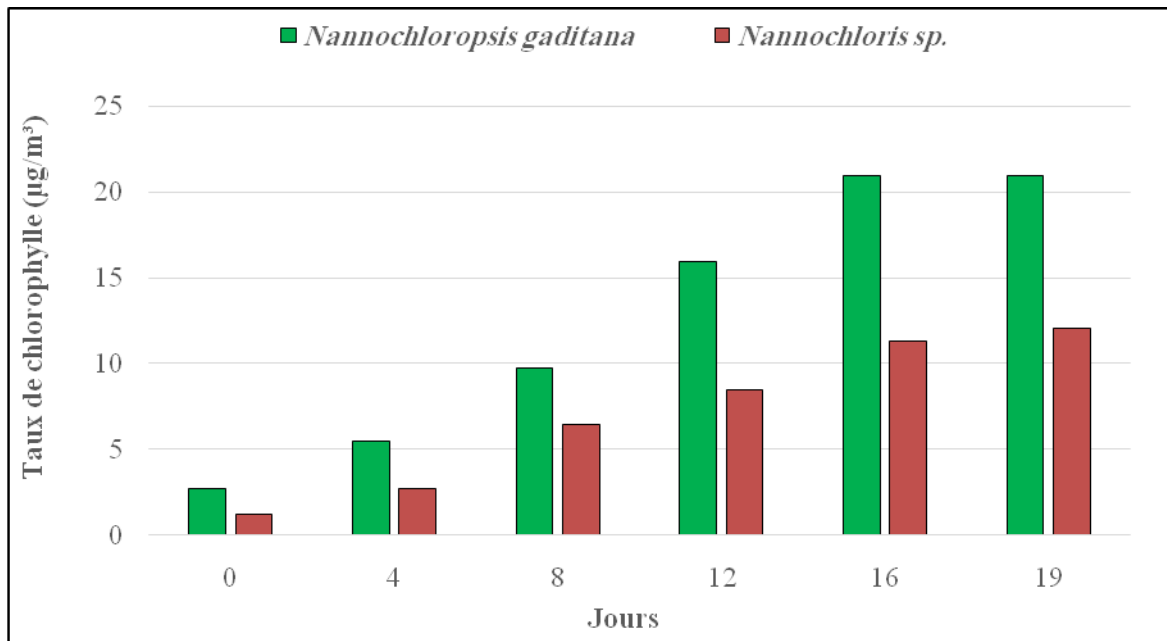
**Tableau 4:** Paramètre de croissance chez les espèces étudiées.

	<i>Nannochloropsis gaditana</i>	<i>Nannochloris sp.</i>
X0 (mg MES/L)	141,46	202,99
Xm (mg MES/L)	1644,97	1956,69
$m\mu$ (J <sup>-1</sup> )	0,009	0,008
R2	0,98	0,98
Productivité volumique (mg MES/L/J)	63,5	70,6

### 4. Dosage de chlorophylle «a»

La figure 26 présente la concentration en chlorophylle « a » en fonction du temps pour les deux souches étudiées. On remarque que le taux de pigmente (chlorophylle « a ») augmente de J1 à J19 pour atteindre une valeur approximative de 21  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  chez *N.gaditana*.

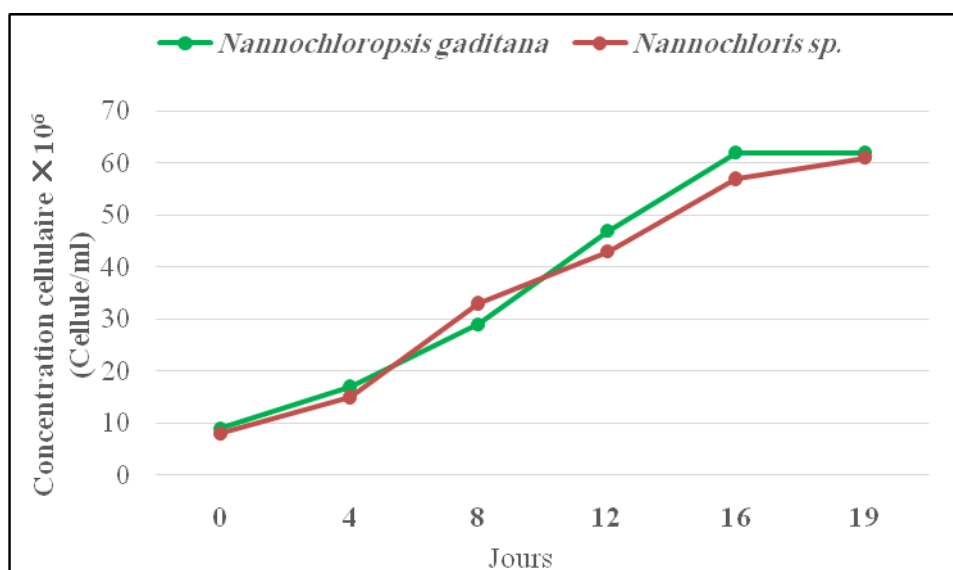
D'autre part le taux de chlorophylle a de *Nannochloris sp.* arrive au valeur 13 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Où chaque jour de mesure, le taux de chlorophylle «a» se développe plus chez *N.gaditana* que *Nannochloris sp.*, ceci est dû à *N.gaditana* contient une double membrane, (Scholz ,2014) c'est ce que empêche d'exclusion total de chlorophylle «a» par le éthanol.



**Figure 26** .Dosage de chlorophylle «a» chez les deux espèces étudiées.

### 5. Comptage des cellules

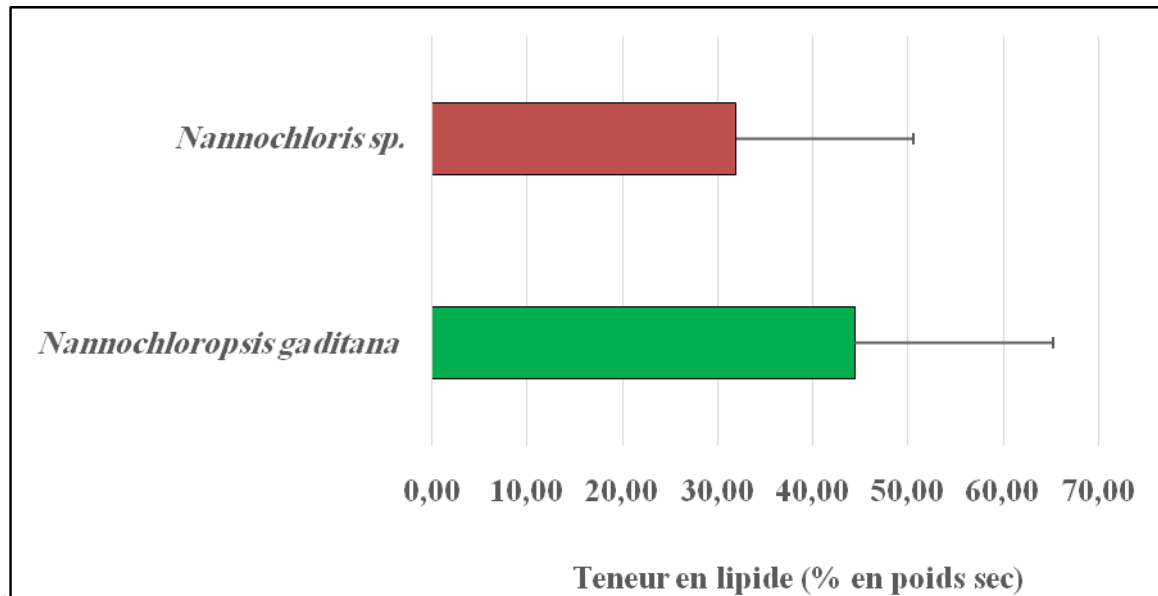
La courbe suivante montre l'évolution du nombre de cellules des espèces étudiés en termes de temps. De J 0 à J4 : On observe l'évolution suivant : Le nombre de cellules, était à valeur de  $16 \times 10^6$  cellule/ml chez *N.gaditana* et  $15 \times 10^6$  cellule/ml chez *Nannochloris sp.*. De J4 à J8 : La concentration cellulaire de *Nannochloris sp* est de  $31 \times 10^6$  cellule/ml, et de  $29 \times 10^6$  cellule/ml chez *N.gaditana*. De J 8 à J16 : Le nombre des cellules de *N.gaditana* est de  $60 \times 10^6$  cellule/ml. Alors que, chez *Nannochloris sp* elle est d'une valeur de  $59 \times 10^6$  cellule/ml. De J 16 à J19 : Le nombre des cellules de chacun espèces est de  $60 \times 10^6$  cellule/ml.



**Figure 27**. Comptage de cellules chez les deux espèces étudiées.

## 6. Extraction de lipides

La quantité de lipide, en poids sec, chez les espèces cultivées, dans le milieu de culture, pendant une période de 19 jours. La teneur en lipide chez les espèces cultivées, varie d'une espèce à l'autre, une valeur de 45% chez *Nannochloropsis gaditana* et chez *Nannochloris sp.* avec une valeur de 32 % (**Figure 28**).

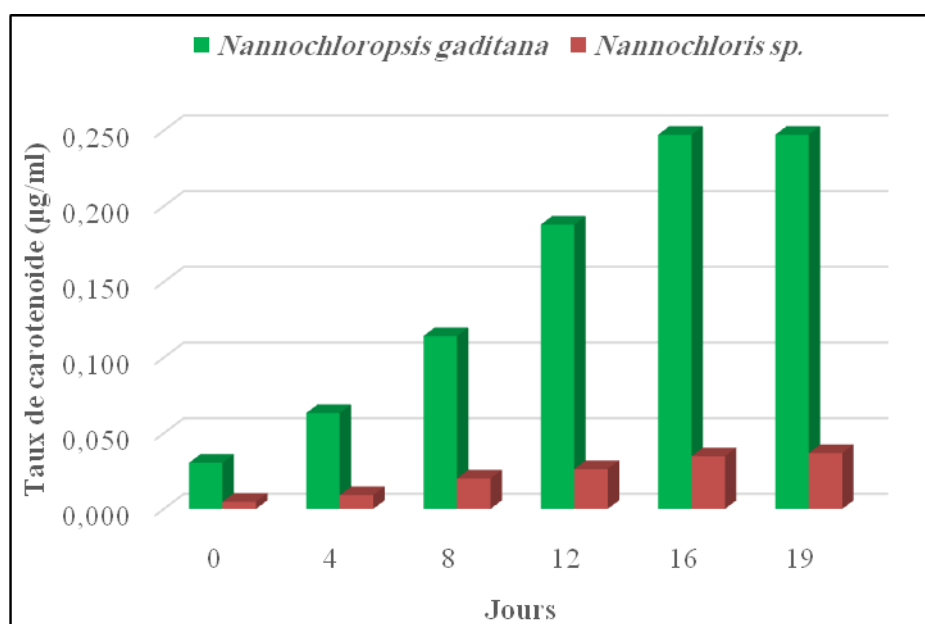


**Figure 28.** Teneur en lipide chez les deux souches étudiées.

## 7. Dosage Caroténoïde

L'histogramme suivant montre la quantité de Caroténoïde en termes de temps (**Figure 29**). Nous observons une grande évolution de caroténoïde chez *N.gaditana*, depuis le premier jour (jour 0) avec une valeur de 0,030 µg/ml et de valeur 0,001 µg/ml chez *Nannochloris sp.*.

Pour le dernier jour (jour 19) la quantité de caroténoïde chez *N.gaditana* a une valeur de 0,25 µg/ml par rapport à *Nannochloris sp* avec une valeur de 0,030µg/ml.



**Figure 29.** Dosage de caroténoïde chez les deux souches étudiées.

### E. Discussion

Les microalgues peuvent avoir un métabolisme autotrophe ou hétérotrophe, 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).

Les objectifs dans ce travail sont: l'étude de croissance chez *N.gaditana* et *Nannochloris sp.* dans le milieu de culture Guillard f/2, détermination de la teneur en lipide et de la quantité de chlorophylles «a» et des caroténoïdes.

Nous avons cultivé les microalgues dans un premier temps, dans un milieu Guillard f/2 afin d'optimiser la production de biomasse c'est étape de pré-culture. Les deux espèces ont commencé à croître grâce à la reproduction végétative. En fait, les cellules sont jeunes et possèdent un fort potentiel de division. Ce sont des caractéristiques de microalgues, suivi d'un déclin en croissance, lorsque les algues ont été transférées dans un nouvel environnement (laboratoire). Cela peut s'expliquer, entre autres choses, que les microalgues ont été choquées et ont besoin de temps pour s'adapter à leur nouvel environnement. Le suivi des paramètres de croissance chez *Nannochloris sp.* était meilleure. Car elle est rapidement adaptée au milieu et aux conditions expérimentales.

En ce qui concerne le dosage du taux de chlorophylle «a», et du taux de caroténoïdes, il se développe plus chez *N.gaditana* que *Nannochloris sp.* puisque *N.gaditana* contient un double membrane, alors on suppose que c'est ce qui empêche d'extraction total de chlorophylle «a». En

effet, 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 externe (Scholz, 2014).

Les recherches effectuées par de Massart *et al.*, 2010, qui concerne les effets de milieu de culture sur la croissance et la composition biochimique des microalgales marines concorde aussi avec nos résultats.

D'après nos résultats on peut remarquer que la croissance est plus importante chez *Nannochloris sp.* alors que sa teneur en lipide est moins importante. Car elle s'adaptés rapidement avec le nouveau milieu, compensé par une grande évolution de Caroténoïde chez *N.gaditana*, en plus la concentration en chlorophylle «a» chez les microalgues à été réalisé par un dosage spectrophotométrique, les résultats montrent que le taux de chlorophylle «a» se développe plus chez *N.gaditana* que *Nannochloris sp.*.

Ces résultats concorde avec les recherches et (Massart *et al.*, 2010). Jorijin H *et al.*(2019)

Nos résultats concordent aussi avec les recherches de Jorijin H *et al.* (2019). *Nannochloropsis gaditana* est une espèce de microalgue connue pour sa capacité à accumuler de grandes quantités de triacylglycérol (TAG) et à produire de l'EPA. L'une des stratégies les plus couramment utilisées pour induire l'accumulation de TAG est la privation d'azote. Cette stratégie est souvent appliquée en culture discontinue, commençant par une phase de croissance et suivie par une privation d'azote, dans laquelle le TAG est produit de novo et par la conversion de lipides membranaires (Jorijin H *et al.*, 2019).

D'autre part la recherche de Pal *et al.* (2011), montre le contraire de nos résultats car ils ont trouvé que, la production de taux de lipides augmente chez *Nannochloropsis sp.* que *N.gaditana*, mais ça dépend de la salinité et de l'intensité de la lumière. En effet, ils ont constaté que la formation de lipide induite par le stress est augmentée avec une augmentation de la salinité et de l'intensité de la lumière. Cette augmentation est expliquée par le fait que l'algue réagit au stress osmotique par la production de quantités massives de glycérol servant à synthétiser les triglycérides et les phospholipides microalgales. En effet, le glycérol intracellulaire sert à équilibrer osmotiquement le sel extracellulaire (Chitlaru *et al.*, 1991).

*Conclusion et  
Perspectives*

## Conclusion et Perspectives

Grace à leurs caractéristiques biochimiques spécifique et très variable, les microalgues représentent aujourd'hui une grande voie de recherche à approfondir. Les problèmes liés au réchauffement climatique attirent le regard vers ces microorganismes capables de consommer le CO<sub>2</sub> présent dans l'atmosphère pour produire de la biomasse contenant des acides gras utilisés pour la fabrication des biocarburants (Taleb, 2015).

Le but de ce travail était de comparer entre les paramètres de croissances, la productivité volumique, le teneur en lipides et le taux de chlorophylle «a» et de caroténoïde chez deux souches de microalgues *Nannochloropsis gaditana* et *Nannochloris sp.*.

Nos résultats montrent que la concentration de la biomasse plus importante chez *Nannochloris sp.* avec une valeur (1956,69 mg MES/L) et un taux de croissance spécifique (0,008 J<sup>-1</sup>) celui de *Nannochloropsis gaditana* (1644,97 mg MES/L et 0,009 J<sup>-1</sup>, respectivement). En ce qui concerne la production des métabolites; la teneur en lipide, en chlorophylle «a» et en caroténoïde, *N.gaditana* a une meilleur production (45% ,21µg/m<sup>3</sup>, et 0,030µg/ml, respectivement). Le taux de lipides chez *N.gaditana* entre 31 et 68% de poids sec selon (Hibbred, 1998).

*Nannochloropsis gaditana* est une espèce de microalgue connue pour sa capacité à accumuler de grandes quantités de triacylglycérol (TAG) et à produire de l'EPA (Jorijn H. Janssen, 2019).

En regard de nos résultats, on peut conclure que la souche microalgale parfait est *Nannochloropsis gaditana* en vue de produire de l'énergie renouvelable (biocarburants). Des études ultérieures permettront de compléter ce travail:

- Comparer avec d'autres espèces de microalgue ou de cyanobactérie.
- Essayer d'autre milieu de culture.
- Tester l'influence du stress sur la production de métabolites chez les deux espèces étudiées.

# *Références Bibliographique*

## G. Références Bibliographique

**Becker** Microalgue Biotechnology and microbiology. Cambridge Press University.- 1994.

**Beer L.L. Boyd E.S ., PETERS J.W ., Posewitz M.C .,** Engineering algae for biohydrogen and biofuel production.- 2009.- Vol. 20: 3.

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

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

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

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

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

**Chisti** Biodiesel from microalgue. Biotechnology advances [Livre]. - 2007. - Vol. Vol.25 : No.3 : pp. pp.294-306.

**Chisti** Biodiesel from microalgue. Biotechnology advances, [Livre]. - 2007. - Vol. Vol.25 : No.3 : pp. pp.294-306.

**Chynowth** Review of biomethane from marine biomass, [Livre]. - 2002.

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

**Gong H. & Lun S., 1996.** The kinetics of lysine batch fermentation. *Chinese journal of biotechnology*, 12: 219-225.

**GKZH** , 2019. GUEBABI Karima et ZERROUKI Horiya .Poto de Lame de Malassez au niveau de laboratoire d'Halieutique UNV ABD EL HAMID IBN BADIS.Mostaganem.

**Jorijn H. Janssen René H. Wijffels , etMaria J. Barbosa.** Production De Lipides Dans

Nannochloropsis Gaditana Au Cours De La Désaffection De L'azote [En ligne]. - 8 Janvier 2019.

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

**Legrand, J.** (2002). *Les microalgues pour quoi faire?*

**Lubian** Nonnochloropsis gaditana sp. Nov., una nueva Eustigmatophyceae marina. [Livre]. - (1982). - pp. 287-293..

**Pulz Gross W** Valuable products from biotechnology of microalgae. Mini review, Applied Microbiology and Biotechnology [Livre]. - vol.65,n°6, p.635-648 : [s.n.], 2004.

**Ruiz J., Arbib Z., Álvarez-Díaz P.D., Garrido-Pérez C., Barragán J. & Perales J.A., 2012.** Photobiotreatment model (PhBT): a kinetic model for microalgae biomass growth and nutrient removal in wastewater. *Environmental Technology*, 1-13.

**Ryther Guillard R.R and** Studies of marine planktonic diatoms. I. Cyclotella and Detonula confervacea Cleve. Can. J. Microbiol. 8:229-239. [Livre]. - 1963.

**Scholz M.J . Wiess T.L ., Jinkerson R.F ., Jing J., Roth R., Good enough U., Posewitz** [Livre]. - 2014.

**Sihem Tebbani Rayen Filali, Didier Dumur, Supelec, Filipa Lopes, Dominique Pareau,** Biofixation de CO<sub>2</sub> par les microalgues Modélisation, estimation et commande. [Livre]. - [s.l.] : ISTE, 2014.

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

**TALEB.** Recherche des souches accumulatrices des lipides et optimisation des conditions de culture en photobioréacteurs, these de doctorat, L'Université Nantes, France [Revue]. - 2015.

**Verhulst P.F., 1838.** Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. *Mathematical Physics*,10: 113-121.

**Waléry Photographie** Malassez. Photographie Waléry - La Presse médicale - [Volume d'annexes]

[En ligne] // [www.biusante.parisdescartes.fr/histmed/image?med100000x1909xannexesx1017](http://www.biusante.parisdescartes.fr/histmed/image?med100000x1909xannexesx1017). -

Masson et Cie, 1909, 1909.

**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** Nannochloropsis genomes reveal of microalgal oleaginous [Revue]. - 2014.

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

ligne]//[http://book.google.fr/books?id=KAKx4I7NWEYC&printsec=frontcover&source=gbs\\_v2\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q=&f=false](http://book.google.fr/books?id=KAKx4I7NWEYC&printsec=frontcover&source=gbs_v2_summary_r&cad=0#v=onepage&q=&f=false) - 1994.- 20 Octobre 2009.